

**Untersuchungen zur Funktion der fünf Isoformen
der Protein-O-mannosyltransferase des
humanpathogenen Pilzes
*Candida albicans***

Inaugural-Dissertation

zur
Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Stephan Karl-Heinz Prill
aus Duisburg

Düsseldorf 2004

Gedruckt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissen-
schaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. J.F. Ernst

Korreferent: Prof. Dr. H. Bünemann

Tag der mündlichen Prüfung: 19 Juli 2004

Inhaltsverzeichnis

1.	EINLEITUNG.....	1
1.1	KLINISCHE RELEVANZ UND THERAPIE VON <i>CANDIDA ALBICANS</i>	1
1.2	VIRULENZFAKTOREN VON <i>C. ALBICANS</i>	2
1.2.1.	Adhäsion	3
1.2.2.	Dimorphismus	3
1.2.3	Invasion des Gewebes	4
1.3	TAXONOMIE UND GENETIK	5
1.4.	DIE ZELLWAND VON <i>C. ALBICANS</i>	6
1.5	GLYKOSYLIERUNG.....	8
1.5.1	O-Glykosylierung.....	9
1.5.2	Protein-O-mannosyltransferasen	11
1.6	ZIELSETZUNG.....	13
2.	MATERIAL UND METHODEN	14
2.1	CHEMIKALIEN UND ENZYME	14
2.2	STÄMME UND MEDIEN	14
2.2.1	<i>E. coli</i> - Stamm.....	14
2.2.2	<i>C. albicans</i> - Stämme	14
2.2.3	Medien zur Anzucht von Hefen	16
2.2.4	Medium zur Anzucht von <i>E. coli</i>	16
2.2.5	Hypheninduktion von <i>C. albicans</i> in Flüssigmedium	17
2.2.6	Hypheninduktion von <i>C. albicans</i> auf festem Medium.....	17
2.2.7	Hypheninduktion von <i>C. albicans</i> in flüssigen Medium	17
2.2.8	Medien mit verschiedenen Substanzen	17
2.3	PRIMER UND PLASMIDE	18
2.3.1	Synthetisch Oligonukleotide	18
2.3.2	Plasmide	18
2.4	PRÄPARATION, KONSTRUKTION UND ANALYSE VON NUKLEINSÄUREN.....	20
2.4.1	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	20
2.4.2	Isolierung von Gesamt-DNA aus Hefen.....	20
2.4.3	Restriktionsverdau.....	21
2.4.4	Entfernen von 3'-überhängenden Enden	21
2.4.5	Auffüllen von 5'-überhängenden Enden	21
2.4.6	Dephosphorylierung von DNA	21
2.4.7	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	21
2.4.8	Molekulargewichts- und Größenstandards.....	21
2.4.9	Konzentrationsabschätzung von Nukleinsäuren.....	22
2.4.9.1	Photometrisch.....	22
2.4.9.2	Abschätzung im Agarosegel.....	22
2.4.10	Nachweis spezifischer Sequenzen über Southernblot-Analyse	22
2.4.10.1	Sondenmarkierung.....	22
2.4.10.2	Transfer auf eine Nylonmembran durch Vacuum-Blot	22
2.4.10.3	Hybridisierung und Detektion	22

2.4.11	Nachweis spezifischer mRNA-Sequenzen über Northern Blot-Analyse.....	23
2.4.12	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	23
2.5	TRANSFORMATION.....	24
2.5.1	Transformation von <i>E. coli</i>	24
2.5.2	Transformation von <i>S. cerevisiae</i>	24
2.5.3	Transformation von <i>C. albicans</i>	24
2.6	ANALYSE VON PROTEINEN	25
2.6.1	Antikörper	25
2.6.2	Herstellung von Hefe-Rohextrakten.....	25
2.6.3	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford	25
2.6.4	Bestimmung der Luziferase Aktivität	26
2.6.5	<i>N</i> -Glykosylierung.....	26
2.6.6	Immunpräzipitation	26
2.6.7	Pulse-Chase.....	27
2.6.8	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	27
2.6.9	Nachweis spezifischer Proteine durch Immunoblot-Analyse.....	28
2.7.	DNA-MIKROARRAYS	28
2.7.1.	Anzucht der Zellen	28
2.7.2	Präparation von RNA aus <i>C. albicans</i>	28
2.7.3	Synthese der Komplementär-DNA	29
2.7.4	Hybridisierung und Waschen der DNA-Mikroarrays.....	30
2.7.5	Scannen der DNA-Mikroarrays.....	30
2.7.6	Normalisierung und statistische Auswertung.....	30
2.7.7	Clusteranalysen	31
2.8	ZELLWANDANALYSE	31
2.8.1	Isolierung von SDS extrahierten Zellwänden.....	31
2.8.2	Bestimmung des Mannoproteingehalts	31
2.8.3	Bestimmung des Chitingehalts.....	32
2.8.4	Bestimmung des Glukangehalts	32
2.8.5	Kohlenhydrat-Bestimmung mittels der Dubois Methode.....	32
2.9	KNOSPENZÄHLUNG/ CALCOFLUOR WHITE-FÄRBUNG.....	33
2.10	MIKROSKOPISCHE UNTERSUCHUNGEN	33
2.11	ELEKTRONENMIKROSKOPIE	33
3.	ERGEBNISSE.....	34
3.1	DATENBANKANALYSE UND SEQUENZVERGLEICH DER PMT-PROTEINFAMILIE.....	34
3.2	DISRUPTION VON <i>CAPMT2</i>	39
3.2.1	Konstruktion konditionaler Mutanten	41
3.2.2	Rekonstituierung des <i>URA3</i> -Gens an seinem nativen Locus	45
3.3	PHÄNOTYPISCHE CHARAKTERISIERUNG DER <i>PMT</i> -MUTANTEN	46
3.3.1	Wachstum der <i>pmt</i> -Mutanten	46
3.3.2	Aggregation.....	46
3.3.3	Zelloberflächenhydrophobizität	49
3.3.4	Morphogenese	50

3.3.4.1	Expression von <i>CaPMT2</i> und <i>CaPMT4</i> während der Hyphenbildung	52
3.3.4.2	Invasives Wachstum.....	53
3.3.5	Untersuchungen zur Sensitivität der <i>pmt</i> -Mutanten	54
3.3.5.1	Sensitivitäten gegen verschieden Substanzen.....	54
3.3.5.2	Sensitivitäten gegen verschiedene Chemotherapeutika	55
3.3.5.3	Sensitivitäten gegen verschiedene Zellwand-destabilisierende Substanzen	56
3.3.6	Knospungsverhalten der verschiedenen <i>pmt</i> -Mutanten.....	58
3.4	ANALYSE DER ZELLWAND VON <i>PMT</i> -MUTANTEN	58
3.5	SUBSTRATE DER PROTEINMANNOsylTRANSFERASEN AUS <i>C. ALBICANS</i>	60
3.5.1	Pir2p	60
3.5.2	Axl2p.....	61
3.5.3	Als1p	62
3.5.4	Kre9p.....	63
3.5.5	Sec20p.....	63
3.5.6	Proteine mit unverändertem Laufverhalten	64
3.5.6.1	Cdr1p.....	64
3.5.6.2	Int1p	65
3.5.6.3	Phr1p/Gas1p	65
3.6	GENOMWEITE TRANSKRIPTOMANALYSE	66
3.6.1	Einfluss von <i>pmt</i> -Mutationen auf das Transkriptom von <i>C. albicans</i>	68
3.6.1.1	Einfluss der <i>pmt1</i> -Mutante auf das Transkriptom von <i>C. albicans</i>	70
3.6.1.2	Einfluss der <i>pmt2/PMT2</i> -Mutante auf das Transkriptom von <i>C. albicans</i>	71
3.6.1.3	Einfluss der <i>pmt4</i> -Mutante auf das Transkriptom von <i>C. albicans</i>	71
3.6.1.4	Einfluss der <i>pmt5</i> -Mutante auf das Transkriptom von <i>C. albicans</i>	71
3.6.1.5	Einfluss der <i>pmt6</i> -Mutante auf das Transkriptom von <i>C. albicans</i>	72
3.6.2	Clusteranalysen	72
3.7	EXPRESSION VON <i>FLO1</i> IN <i>PMT</i> -MUTANTEN.....	75
4.	DISKUSSION	77
4.1	SEQUENZANALYSE DER <i>PMT</i> -PROTEINE.....	77
4.2	DIE PROTEIN O-MANNOsYLIERUNG IST EINE ESSENTIELLE PROTEINMODIFIKATION	78
4.3	MUTATIONEN IN GENEN FÜR PROTEINMANNOsylTRANSFERASEN VERURSACHEN PLEIOTROPE PHÄNOTYPEN	79
4.3.1	Aggregation.....	79
4.3.2	<i>Pmt</i> -Proteine sind in die Morphogenese von <i>C. albicans</i> involviert	80
4.3.3	Sensitivitäten	81
4.4	<i>PMT</i> -MUTANTEN HABEN EINE VERÄNDERTE ZUSAMMENSETZUNG DER ZELLWAND.....	84
4.5	EINFLUSS VON MUTATIONEN IN <i>PMT</i> -GENEN AUF VERSCHIEDENE PROTEINE.....	86
4.6	DER EINFLUSS VON <i>PMT</i> -MUTATIONEN AUF DAS TRANSKRIPTOM VON <i>C. ALBICANS</i>	88
5.	ZUSAMMENFASSUNG.....	91
6.	LITERATURVERZEICHNIS	92
7.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	111
8.	ANHANG	113

1. Einleitung

1.1 Klinische Relevanz und Therapie von *Candida albicans*

Viele positive Entwicklungen der modernen Medizin bergen auch Gefahren. Neue Möglichkeiten der Organverpflanzung durch Immunsuppression, langfristige Therapien mit Antibiotika, Kortikosteroiden und Zytostatika aber auch Immunmangelsyndromen wie AIDS und Leukämie (Bodey, 1993; Matthews, 1994; Morschhäuser *et al.*, 1997) steigern die Infektionsraten durch opportunistische Pathogene. Einer der wichtigsten opportunistischen Erreger ist der Pilz *C. albicans*. Seine Inzidenz ist in den letzten Jahrzehnten stetig gestiegen (Jarvis, 1995; Odds, 1988). Die Gattung *Candida* ist für mindestens 80 % aller humanen Mykosen in Deutschland verantwortlich. *C. albicans* wurde in 50 bis 70 % der Fälle als Haupterreger systemischer Infektionen isoliert (Pfaller, 1996) und ist für dreiviertel der nosokomialen Pilzinfektionen verantwortlich (Jarvis, 1995).

Im gesunden Menschen besiedelt *C. albicans* den Gastrointestinal- und Oraltrakt als Kommensale. In 30 bis 40 % aller Menschen können *Candida*-Isolate im Darm und bei über 50 % auf der Mudschleimhaut isoliert werden (McCulloch *et al.*, 1996). Liegt keine Prädisposition vor, verursacht *C. albicans* lediglich lokal begrenzte Candidosen. Diese sind aufgrund ihrer guten Zugänglichkeit mit Antimykotika relativ gut behandelbar. Leichtere, oberflächliche Candidosen sind die Windeldermatitis oder Vulvovaginitis, welche dreiviertel aller Frauen mindestens einmal im Leben befällt (Fidel *et al.*, 1999). In hospitalisierten oder durch eine verminderte Immunabwehr prädisponierten Menschen kann es zu systemischen Mykosen, die bis hin zur Sepsis führen, kommen. Die Zahl der systemischen Mykosen hat sich im Zeitraum von 1976 bis 1990 mehr als verdoppelt (Pfaller, 1994). Systemische Candidosen sind aufgrund ihrer schlechten Zugänglichkeit weitaus schwieriger zu behandeln. Sie zeigen bei einer Infektion eine Mortalität von 35 % (Fridkin und Jarvis, 1996). In Deutschland sterben etwa 8000 bis 10000 Menschen pro Jahr an *Candida* Infektionen (Morschhäuser *et al.*, 1997). Eine durch die Fortschritte der modernen Medizin absehbare Erhöhung der Zahl langfristig immunsupprimierter Personen wird die klinische Relevanz von *C. albicans* weiter steigen lassen. Diese Tendenz rückt die Entwicklung neuer potenter Antimykotika in den Mittelpunkt des wissenschaftlichen Interesses.

Die Gemeinsamkeiten von humanen Zellen und *C. albicans* als eukaryotische Zellen reduziert die Anzahl möglicher Zielorte für eine antimykotische Therapie. Die Ähnlichkeit zwischen beiden Organismen ermöglichte die Entwicklung nur weniger pilzspezifischer Substanzen. Das bis heute potenteste Antimykotikum ist das Polyen Amphotericin B. Es wurde bereits 1953 entdeckt. Polyene binden das Ergosterol in der Cytoplasmamembran und bewirken, nach Oligomerisierung, eine Permeabilisierung der Membran. Durch den auf diese Weise hervorgerufenen Verlust an Ionen kommt es schließlich zum Zelltod (Groll *et al.*, 1998). Zu den Polyenen gehört auch das häufig angewandte Nystatin. Durch die intrakorporale Anwendung der Polyene kann es zu Leber- und Nierenschädigungen kommen. Wegen dieser Nebenwirkungen und weiteren Kontraindikationen (z. B. Schwangerschaft) ist der Einsatz der Polyene bei systemischen Mykosen deutlich eingeschränkt (Jehn, 1997). Eine weitere Substanzklasse sind die Azole, zu ihnen gehören Fluconazol, Clotrimazol, Ketoconazol und Itraconazol. Azole sind die am häufigsten verwendeten Antimykotika. Sie inhibieren, durch

Interaktion mit dem Cytochrom P-450, die Demethylierung am C-14 von Lanosterol zu Ergosterol. Dies führt zu einer Anhäufung toxischer Sterolderivate in der Zellmembran (Tuite, 1992). Viele Antimykotika setzen an der Zellwand an, da vergleichbare Strukturen in Säugern nicht vorhanden sind. Nikkomycin wirkt als Substratanalogon zu UDP-N-Acetylglukosamin und verhindert eine Synthese des Zellwandbestandteils Chitin durch Inaktivierung der Chitinsynthasen (DiDomenico, 1999). Eine neue wirkungsvolle Substanzklasse sind die Echinocandine und Pneumocandine. Sie hemmen die pilzspezifische β 1,3-Glukansynthase, welche das β -1,3-Glucan, den Hauptbestandteil der Zellwand, synthetisiert (DiDomenico, 1999). Das erste Echinocandin, welches Marktreife erreichte, ist das Caspofungin. Caspofungin ist ein von Nebenwirkungen freies, synthetisches Derivat eines aus dem Pilz *Glarea lozoyensis* isolierten Naturproduktes. Es ist ein Lipopeptid, bestehend aus einem zyklischen Hexapeptid und einer aliphatischen Kette von variabler Länge. Einen anderen Wirkungsbereich besitzt 5-Fluorocytosin, ein Nukleosid-Analog, welches in der Pilzzelle zu 5-Fluorouracil desaminiert wird und die RNA-Synthese inhibiert (Georgopapadakou und Walsh, 1994).

Die Notwendigkeit zur Entwicklung neuer Antimykotika ist einerseits durch die Unverträglichkeit gegenüber vielen Substanzen gegeben und andererseits aufgrund der vermehrten Entstehung von Resistenzen. Insbesondere gegenüber Azolen haben sich durch eine vielfache und breite Anwendung von Antimykotika in der Medizin (White *et al.*, 1998; van den Bossche *et al.*, 1998) und möglicherweise auch durch einen flächendeckenden Einsatz von Azol-Fungiziden in der Landwirtschaft (Industrieverband Agrar 2000), Resistenzen gebildet. Resistenz gegenüber Azolen entsteht hauptsächlich durch eine Veränderung der Membranstruktur, sowie einen aktiven Ausschleusungsmechanismus, an dem so genannte „Multi Drug Resistance“ Transporter (MDR) beteiligt sind (van den Bossche *et al.*, 1998; Sanglard *et al.*, 1997; StGeorgiev, 2000). Die Resistenz von *C. albicans* gegenüber Antimykotika wird teilweise mit der hohen Variabilität des Genoms von *C. albicans* erklärt. Die Selektion von resistenten Mutanten auf Medien, die Fluconazol enthalten, führt z. B. zu einer veränderten Chromosomenzahl (Janbon *et al.*, 1998). Eine Erhöhung der Chromosomenzahl und damit einhergehend der Kopiezahl von resistenzvermittelnden Genen, war auch der Grund für die Entstehung einer Fluconazolresistenz bei *C. glabrata* (Marichal *et al.*, 1997). Die Fähigkeit von *C. albicans*, Biofilme zu bilden, erschwert zusätzlich eine Behandlung mit Antimykotika (Chandra *et al.*, 2001). *C. albicans* ist in der Lage eine Matrix auszubilden, in welcher der Pilz sich einbettet und nur noch schwer zugänglich für Substanzen ist. Die Formation von Biofilmen führt besonders in der Intensivmedizin bei längerer Anwendung von intravenösen Kathedern, aber auch in der Zahnmedizin bei der Benutzung von Zahnsparren, zu Problemen (Crump und Collignon, 2000). Die steigende klinische Relevanz von *C. albicans* macht die Entwicklung neuer Substanzklassen und die Entdeckung neuer pilzspezifischer Wirkorte notwendig. Dies sollte auf der Basis eines genauen molekularen Verständnis von *C. albicans* und seiner Virulenzfaktoren geschehen.

1.2 Virulenzfaktoren von *C. albicans*

Erst wenn die natürliche Immunität des Wirtes geschwächt ist, ergibt sich für *C. albicans* die Möglichkeit einer lokalen oder systemischen Infektion. Hierzu benötigt der Pilz eine Reihe

verschiedener Faktoren, welche seine Virulenz beeinflussen. Im Folgenden werden die verschiedenen Virulenzfaktoren näher beschrieben.

1.2.1. Adhäsion

Die Virulenz von *C. albicans* wird entscheidend von seiner Fähigkeit zur Adhäsion an epitheliale Wirtszellen bestimmt (Pendrak und Klotz, 1995; Kasper und Buzoni-Gatel, 1998). Man unterscheidet zwischen einer unspezifischen und einer spezifischen Adhäsion. Die unspezifische Adhäsion findet aufgrund hydrophober Wechselwirkungen zwischen der Zellwand von *C. albicans* und der Wirtsoberfläche statt (Glee *et al.*, 1995). Dabei ist die Hydrophobizität abhängig von Struktur und Menge von Oligomannosen, welche an der Zelloberfläche exponiert sind (Masuoka und Hazen, 1999). Weiter beeinflussen verschiedene Mannoproteine, wie z. B. CaAgp38 (Hazen *et al.*, 2001) die Hydrophobizität. Auch das Protein Csh1p spielt eine Rolle bei der Ausbildung der Oberflächenhydrophobizität der Zelle (Singleton und Hazen 2004). Die spezifische Adhäsion wird durch spezielle Rezeptoren, den Adhäsinen, vermittelt (Calderone und Braun, 1991). Adhäsine sind in der Lage an Proteine der extrazellulären Matrix der Säugerzelle, wie z. B. Fibronectin (Negre *et al.*, 1994), Laminin (Lopez-Ribot *et al.*, 1996) oder Fibrinogen (Casanova *et al.*, 1992) zu binden. Proteine mit dieser Fähigkeit sind die Als-Proteine, insbesondere Als1p und Als5p (Fu *et al.*, 1998). Die Als-Proteinfamilie besteht aus wenigstens acht Mitgliedern (Sheppard *et al.*, 2004). Sie zeigen typische Merkmale sekretierter Proteine und für Als1p wurde gezeigt, dass es N- und O-glykosyliert ist (Kapteyn *et al.*, 2000). Die über den Rest eines GPI-Ankers in der Zellwand lokalisierten Proteine binden über ihr Aminoende an Wirtsstrukturen (Hoyer, 2001). Weitere Adhäsine sind das Mannoprotein Hwp1p, welches ein Akzeptor für die Transglutaminaseaktivität des Wirtes ist (Staab *et al.*, 1999) und möglicherweise Int1p, ein dem Integrin ähnlichen Protein, dessen Deletion einen nahezu vollständigen Verlust der Virulenz verursacht (Gale *et al.*, 1998). Entscheidend bei der Adhäsion aller hier genannten Proteine ist die Interaktion von Glykoproteinen der Wirtszelle mit Glykoproteinen von *C. albicans*.

1.2.2. Dimorphismus

C. albicans wird als dimorpher Pilz bezeichnet. Hiermit ist seine Fähigkeit zum Wechsel der Wachstumsform gemeint (Odds, 1988). *C. albicans* ist in der Lage, reversibel von einer Hefeform zu einer filamentösen Wachstumsform zu wechseln (Shepherd, 1988). In der Hefeform, welche auch als Blastospore bezeichnet wird, knospt von der Mutterzelle eine Tochterzelle ab, wächst zu einer bestimmten Größe heran und trennt sich schließlich von der Mutterzelle. Bei der filamentösen Wachstumsform unterscheidet man zwischen Pseudohyphen und echten Hyphen (Odds, 1988). Ausdifferenzierte echte Hyphen und Pseudohyphen lassen sich nur schwer unterscheiden. Ihre Genese weist jedoch charakteristische Merkmale auf. Echte Hyphen entstehen durch das kontinuierliche apikale Wachstum eines Keimschlauches, der anschließend septiert wird. Die Pseudohyphe entsteht als Folge einer mehrfach unipolaren Knospung ohne Ablösung der Tochterzelle, wobei die Tochterzellen elongieren und so Filamente bilden. (Odds, 1988; Ernst, 2000). Die Hyphenbildung kann durch eine Vielzahl von Versuchsbedingungen induziert werden. Zum einen durch starke positive Stimuli wie Serum, N-Acetylglukosamin oder Prolin bei

gleichzeitiger Temperaturerhöhung auf 37° C, und zum anderen durch Hungerbedingungen auf so genanntem „Spider“- oder „Lee’s“- Medium (Ernst, 2000). Auch Sauerstofflimitierung (Riggle *et al.*, 1999) und ein neutraler pH-Wert (Buffo *et al.*, 1984) fördern die Bildung von Filamenten. Relativ neu ist die Erkenntnis, dass auch die Einbettung der Hefen in eine Matrix das Hyphenwachstum fördert (Riggle *et al.*, 1999).

Es wird angenommen, dass die hyphale Form die invasive Form darstellt. Hyphen sind beispielsweise besser in der Lage, an Epithelien zu binden und sie zu durchwachsen und tragen so zur Gewebeinvasion bei (Hostetter, 1994; Pendrak und Klotz, 1995; Weide und Ernst, 1999). Die Adhäsion der filamentösen Form von *C. albicans* ist aufgrund des höheren hydrophoben Zellwandbestandteile begünstigt (Odds, 1994; Cutler, 1991). Die Hefeform dient demgegenüber vor allem für die Besiedlung und Verbreitung im Wirt (Odds, 1988; Cutler, 1991). In klinischen Isolaten sind deshalb in der Regel sowohl Blastosporen als auch Filamente enthalten. Weiterhin stellt die Fähigkeit, von phagozytierten Blastosporen aus Makrophagen herauszuwachsen (Vazques-Torres und Balish, 1997), einen Abwehrmechanismus gegen das zelluläre Immunsystem dar. Mutanten, die nicht mehr fähig sind Filamente zu bilden, sind im Mausmodell avirulent. Dies ist für Stämme in denen die für die Morphogenese essentiellen Transkriptionsfaktoren Efg1p und Cph1p deletiert sind der Fall (Lo *et al.*, 1997; Stoldt *et al.*, 1997; Lui *et al.*, 1994). Dass der Dimorphismus jedoch kein Virulenzfaktor *per se* darstellt, verdeutlicht die Tatsache, dass es auch lebensbedrohliche Mykosen-hervorrufende pathogene Pilze gibt, die ausschließlich filamentös wachsen. Zu nennen ist hier z. B. *Aspergillus fumigatus*. Dabei ist zu beachten, dass gerade bei *A. fumigatus* eine Infektion durch Konidiosporen erfolgt, die in der Lunge auskeimen, d. h. es läuft auch bei diesem Erreger ein Wechsel zwischen einer kugelförmigen und filamentösen Zellform ab. Lange galten auch *C. glabrata* und *Cryptococcus neoformans* als nicht filamentöse, pathogene Pilze (Odds, 1988; Gimeno *et al.*, 1992). Inzwischen konnten jedoch auch filamentöse Formen nachgewiesen werden, allerdings nicht im infizierten menschlichen Wirt (Csank und Haynes, 2000; Wickes *et al.*, 1996).

C. albicans zeigt über den Dimorphismus hinaus weitere morphologische Formen. Bestimmte *C. albicans* Stämme sind in der Lage einen spontanen Phänotypwechsel ("phenotype switching") von einer als "opaque" bezeichneten stäbchenförmigen Zellform, die rauhe Kolonieformen ausbildet, zu einer "white" Form zu vollziehen, die typische Hefeformen und glatte Kolonieformen bildet (Rikkerink *et al.*, 1988). Die mit diesem Phänomen einhergehende Antigenvariation behindert eine Antwort des Immunsystems und stellt somit wahrscheinlich einen weiteren Virulenzfaktor dar (Slutzky *et al.*, 1985).

1.2.3 Invasion des Gewebes

Ergänzend zur Fähigkeit, in filamentöser Form Gewebe zu penetrieren, benötigt *C. albicans* eine Reihe sekretorischer Peptide bzw. Proteine um sein volles pathogenes Potential zu erreichen (Matthews, 1994). Hierzu gehören Siderophore (Sweet und Douglas, 1991; Heymann *et al.*, 2002) Phospholipasen (Ghannoum *et al.*, 2000), *N*-Acetylglukosaminidasen (Molloy *et al.*, 1994), Phosphatasen (Csank *et al.*, 1997), sowie die große Gruppe der gut untersuchten sauren Aspartatproteasen (Hube *et al.*, 1994; Hube *et al.*, 1997). Den hydrolytischen Enzymen werden neben Funktionen zur Ernährung auch Aufgaben bei der Zerstörung von Oberflächenproteinen des Wirtes und letztendlich bei der Invasion in Gewebe

zugeschrieben. Von den beschriebenen Phospholipasen A, B, C und D konnte bisher nur für Plb1p ein Zusammenhang zur Virulenz von *C. albicans* hergestellt werden (Ghannoum *et al.*, 2000). Die sauren Aspartatproteasen (SAP) bilden eine zehn Mitglieder große, differentiell exprimierte Genfamilie (Hube *et al.*, 1997; Naglik *et al.*, 2003). Die Expression einiger SAP-Gene wird beispielsweise, in Anpassung an die verschiedenen Umweltbedingungen, durch den pH-Wert reguliert. Im zeitlichen Verlauf einer Gewebeinvasion werden unterschiedliche SAP-Gene exprimiert (Schaller *et al.*, 2000; Schaller *et al.*, 2001). Der frühen Phase der Invasion mit der Expression von SAP1 und SAP2 schließt sich die Expression von SAP8 an. Während der abschließenden intensiven Hyphenbildung wird ausschließlich SAP6 exprimiert. Durch seine Vielzahl sezernierter Proteine und deren differentiellen Expression ist *C. albicans* in der Lage, sich variabel auf verschiedenste Umweltbedingungen im Wirt einzustellen.

1.3 Taxonomie und Genetik

C. albicans zeigt eine enge phylogenetische Verwandtschaft zu den Ascomyceten, insbesondere zu der Gattung *Saccharomyces* (Peterson, 2000). Dies macht sich auf der Ebene der Nukleotidsequenzen, z. B. der 5S-rRNA (Chen *et al.*, 1984), des GC-Gehalts des Genoms und der geringen Divergenz zwischen Proteinen beider Spezies bemerkbar (Odds, 1988; Hendriks *et al.*, 1991). Es ist daher möglich, *C. albicans*-Gene mit Hilfe einer Komplementation von auxotrophen *Saccharomyces cerevisiae*-Stämmen oder durch ein Screening von Genbank-Bibliotheken unter Berücksichtigung der Homologie zu den offenen Leserahmen (ORF-open reading frame) von *S. cerevisiae* zu identifizieren und zu isolieren (Scherer und Magee, 1990). Es ist davon auszugehen, dass gerade die Unterschiede zwischen *Candida*-Spezies und *S. cerevisiae* für die Pathogenität von *C. albicans* wichtig sind. Das haploide Genom von *C. albicans* ist 15,5 Megabasenpaare groß und ist auf acht Chromosomen verteilt (Doi *et al.*, 1992). *C. albicans* besitzt ein diploides Genom, es konnte jedoch noch kein sexueller Vermehrungszyklus nachgewiesen werden (Odds, 1988). Es gibt allerdings auch haploide *Candida*-Arten wie *C. guilliermondii* und *C. glabrata*, weshalb über einen kryptischen Vermehrungszyklus spekuliert wird (Suzuki *et al.*, 1986).

Anhand eines umfassenden Sequenzvergleichs von über 500 an der sexuellen Differenzierung von *S. cerevisiae* beteiligten Genen mit dem *C. albicans*-Genom konnten zahlreiche Homologe identifiziert werden (Tzung *et al.*, 2001). Zu nahezu allen Komponenten des Pheromon-Signalweges in *S. cerevisiae* gibt es homologe Gene in *C. albicans*. So auch zu Genen, deren Homologe in *S. cerevisiae* für die sexuelle Paarung verantwortlich sind (Hull und Johnson, 1999; Tzung *et al.*, 2001). Allerdings konnte lediglich unter experimentellen Bedingungen eine tatsächliche Rolle dieser Gene bei Paarungsvorgängen gezeigt werden (Hull *et al.*, 2000; Magee und Magee, 2000). Zahlreiche an der Meiose beteiligte Gene kommen nur in der Bäckerhefe vor. Im Vergleich zu Meiose-Genen anderer Organismen (*Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans*) wurden jedoch einige Homologe in *C. albicans* identifiziert und lassen die Existenz einer natürlichen, sexuellen Fortpflanzung möglich erscheinen. Aus den dargelegten Gründen wird *C. albicans* taxonomisch den Deuteromyceten zugeordnet, der Gruppe der imperfekten Pilze.

Die Verfügbarkeit der vollständigen Sequenz des *C. albicans* Genoms und der freie Zugriff auf verschiedene annotierte Datenbanken (<http://www-sequence.stanford.edu/group/candida/>; <http://genolist.pasteur.fr/CandidaDB/>; <http://candida.bri.nrc.ca/candida/index.cfm>) stellt ein

wichtiges Hilfsmittel für molekulargenetische Arbeiten dar. Die Tatsache, dass das *C. albicans* Genom diploid ist, erschwert hingegen genetische Untersuchungen. Für Mutationsanalysen ist es notwendig beide Allele eines Gens zu deletieren. Erst dann lassen sich, nach phänotypischer Analyse, Aussagen über deren Funktion machen. Das Fehlen eines sexuellen Vermehrungszyklus verhindert die Anwendung klassischer Kreuzungsgenetik, wie sie in *S. cerevisiae* angewendet wird. Eine weitere Schwierigkeit stellt der atypische Kodongebrauch von *C. albicans* dar. Das Basentriplett CUG kodiert nicht wie gewöhnlich Leucin, sondern Serin (Leuker und Ernst, 1994; Santos und Tuite, 1995). Dies führt dazu, dass viele heterologe Gene (z. B. *lacZ* aus *Escherichia coli* oder *GFP* aus *Aequorea victoria*) erst nach Kodonoptimierung funktionell exprimiert werden. Inzwischen sind jedoch verschiedene molekulargenetische Werkzeuge für die Arbeit mit *C. albicans* verfügbar (Pla *et al.*, 1996). Zur Gendisruption stehen mehrere Methoden zur Verfügung. Die klassische „URA-Blaster“-Methode mit FOA-Selektion (Fonzi und Irwin, 1993) wurde ergänzt durch die „URA-Flipper“-Methode. Diese verwendet zur gezielten Induktion der intrachromosomalen Rekombination eine Rekombinase unter der Kontrolle eines regulierbaren Promotors (Morschhäuser *et al.*, 1999). Des Weiteren existieren verschiedene Methoden, bei denen mit PCR-generierten Disruptionsfragmenten, welche verschiedene Auxotrophiemarker enthalten, gearbeitet wird (Wilson *et al.*, 1999 und 2000). Einen interessanten PCR-basierenden Ansatz entwickelten Enloe *et al.* (2000). Er macht es möglich, beide Allele eines Gens in einem Transformationsschritt zu disruptieren. Zusätzlich ist es mit dieser Methode möglich festzustellen, ob ein Gen essentiell ist. Der klassische Ansatz um die Essentialität eines Gens zu beweisen, bedient sich reprimierbarer Promotoren. Sie werden in das Genom vor das verbliebene Allel eines essentiellen Gens integriert. Hier sind zum einen der *MET3*-Promotor, reprimiert in Gegenwart von Methionin und Cystein (Care *et al.*, 1999) und zum anderen ein Tetracyclin-regulierter Promoter, der in Anwesenheit von Doxy- oder Tetracyclin reprimiert ist (Nakayama *et al.*, 2000), zu nennen. Beispiele für weitere regulierbare Promotoren sind der *MAL2*-Promotor (Backen *et al.*, 2000) und der *PCK1*-Promotor (Leuker *et al.*, 1997), die beide durch Glukose reprimiert werden.

1.4. Die Zellwand von *C. albicans*

Die Zellwand von *C. albicans* steht in ständigen Kontakt zu ihrer Umwelt. Sie ist ein elastisches Gebilde, welches der Zelle ihre Form gibt und sie vor osmotischen und physischen Umwelteinflüssen schützt (Shepherd 1987; Chaffin *et al.*, 1998). Als solches ist sie ein exzellentes Ziel für die Entwicklung neuer antifungizider Substanzen. Dieses wird durch die Tatsache unterstützt, dass die meisten in der Zellwand von Pilzen enthaltenen Komponenten keine vergleichbaren Strukturen in Säugerzellen besitzen.

Da die Zellwand von *C. albicans* der Zellwand von *S. cerevisiae* ähnlich ist, wird sie oft als Modell für das Studium der Zellwand in *Candida* verwendet (Klis *et al.*, 2002; Chaffin 1998). Betrachtet man elektronenmikroskopische Aufnahmen der Hefezelle, so erkennt man eine aus mehreren Schichten bestehende Zellwandstruktur (Tokunaga *et al.*, 1986; Chaffin *et al.*, 1998). Die Zahl und Dicke der Schichten variiert hierbei in Abhängigkeit der Wachstumsbedingungen. An die Plasmamembran schließt sich eine innere Schicht, hauptsächlich bestehend aus β 1,3-Glukan und Chitin, an. Die innere Schicht vermittelt der Zellwand ihre mechanische Stärke (Klis *et al.*, 2001 und 2002). Die dickere äußere Schicht

besteht aus stark glykosylierten Mannoproteinen, die kovalent an das Glukannetzwerk gebunden sind. Untereinander sind viele Mannoproteine durch Disulfidbrücken miteinander verbunden. Die äußere Schicht limitiert die Zugänglichkeit zur inneren Zellwandschicht und der Plasmamembran und schützt so beispielsweise vor fremden, die Zellwand degradierenden, Enzymen (Klis *et al.*, 2002).

Makromoleküle	Zellwand Trockengewicht (%)	
	<i>S. cerevisiae</i>	<i>C. albicans</i>
Mannoproteine	50	35-40
β1,6-Glukan	5	20
β1,3-Glukan	40	40
Chitin	1-3	1-2

Tab. 1.1: Zusammensetzung der Zellwand in *S. cerevisiae* und *C. albicans*. Angaben sind in % des Trockengewichtes gemacht. Die Tabelle ist aus Klis *et al.*, 2001 entnommen worden. Die Werte variieren abhängig von der Zusammensetzung des Mediums und den vorhandenen Umweltbedingungen.

In Tab. 1.1 sind die vier Hauptkomponenten der Zellwand von *S. cerevisiae* und *C. albicans* gegenübergestellt. Das Grundgerüst der Zellwand besteht aus β1,3-Glukan, welches etwa 40 % des Trockengewichts ausmacht (Tab. 1.1). β1,3-Glukan besteht aus Ketten von mindestens 1500 Glukosemonomeren, deren Polymere helikale Strukturen bilden. Diese Mikrofibrillen lagern sich lateral aneinander und bilden Wasserstoffbrücken aus (Kopecka und Gabriel, 1992; Klis *et al.*, 2002). Das β1,3-Glukan ist nur moderat verzweigt und besitzt einen Anteil von 3-4 % an β1,6 gebundenen Glukosemolekülen. Der Grad der Verzweigung und die Länge der Polymere variieren je nach Wachstumsbedingungen. Das β1,3-Glukan wird in *S. cerevisiae* von zwei β1,3-Glukan-Synthase-Komplexen synthetisiert, die je nach Umweltbedingungen entweder Fsk1p oder Fsk2p/Gsc2p enthalten (Cabib *et al.*, 1998). Das β1,3-Glukan dient als Gerüst für andere Makromoleküle. In Abb. 1.1 ist ein Überblick über die Architektur der Zellwand gegeben. Der Anteil an β1,6-Glukan der Zelle ist in *C. albicans* wesentlich höher als in *S. cerevisiae* (Tab. 1.1). Das β1,6-Glukan besteht aus Ketten zu etwa 140 Monomeren, die stark verzweigt sind. β1,6-Glukan ist mit dem β1,3-Glukan verbunden und dient als Verknüpfungsstelle für Zellwandproteine (Kapteyn *et al.*, 1996, Abb. 1.1). Es existiert nur eine limitierte Anzahl an Komplexen aus kovalent an die Zellwand gebundenen Proteinen (Klis *et al.*, 2001; Klis *et al.*, 2002 und Abb. 1.1). Kovalent gebundene Zellwandproteine sind entweder GPI-CWP (glycosyl-phosphatidylinositol anchor - cell wall protein) oder Pir-CWP (proteins with internal repeats-cell wall protein). GPI-CWP werden hauptsächlich über einen Rest ihres GPI-Ankers an das β1,6-Glukan-Gerüst gebunden (Orlean, 1997; Richard *et al.*, 2002), während Pir-Proteine mittels einer Transglutaminasereaktion (Ecker *et al.*, 2004a) kovalent an das β1,3-Glukan gebunden werden. Zu den GPI-CWP gehören beispielsweise viele Adhäsine, wie die Als-Proteine (Hoyer, 2001) und das hyphenspezifische Hwp1-Protein (Staab *et al.*, 1999). Die Mannoproteine machen den größten Teil des Zellwandtrockengewichtes aus (Tab. 1.1). Neben den kovalent gebundenen Zellwandproteinen gibt es in der Zellwand eine Vielzahl nicht kovalent gebundener Mannoproteine. Viele dieser auch als Scwp (soluble cell wall proteins) bezeichneten Proteine (Cappellaro *et al.*, 1998) sind am Aufbau der Zellwand aber auch an der Zellteilung beteiligt wie z. B. die Chitinsynthasen (Munro und Gow, 2001) oder

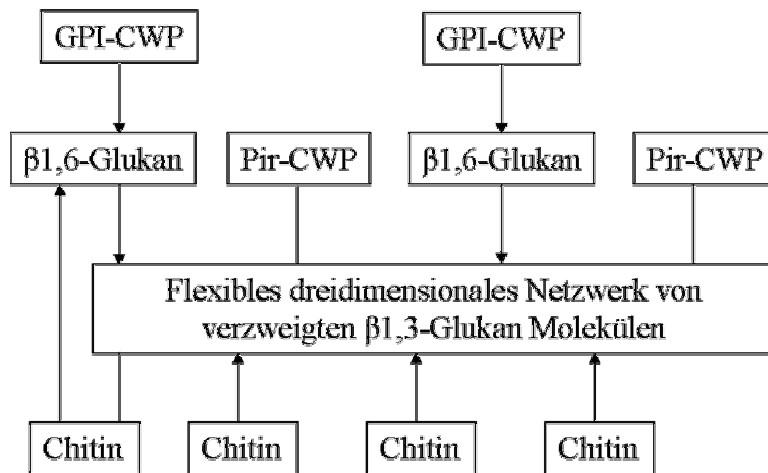


Abb. 1.1: Molekularer Aufbau der Zellwand in *C. albicans* und *S. cerevisiae*. Die Pfeilrichtung gibt die Orientierung vom nicht-reduzierenden Ende zum reduzierenden Ende an. Beachte das nur ein kleiner Teil des Chitins an das β 1,6-Glukan gebunden ist. Die Abbildung ist Richard *et al.* (2002) entnommen und modifiziert worden. Chitin, welches an β 1,6-Glukan gebunden ist, kann gleichzeitig an β 1,3-Glukan gebunden sein (Lipke und Ovalle, 1998).

die Endochitinasen und Exoglukanasen (Kuranda *et al.*, 1991; Vazquez *et al.*, 1991). Die Mannosepolymere sind über eine *N*-glykosidische Bindung an ein Asparagin oder über eine *O*-glykosidische Bindung an ein Serin oder Threonin der Proteine gebunden. Die vierte Hauptkomponente der Zellwand, das Chitin, macht nur 1-3 % des Trockengewichtes aus (Tab. 1.1). Chitin ist ein Polymer, bestehend aus unverzweigtem, β -1,4 verknüpftem *N*-Acetylglukosamin. Chitin ist nur zu einem geringen Anteil in den lateralen Zellwänden zu finden, wo es, als eine Brücke fungierend, sowohl an das β 1,3-, sowie das β 1,6-Glukan gebunden ist (Lipke und Ovalle, 1998). Den größten Teil des β 1,6-Glukans findet man in den Knospungsnarben der Zellen (Molano *et al.*, 1980; Cabib *et al.*, 2001). Es ist bekannt, dass Hefen als Antwort auf Zellwanddefekte, als Kompensationsmechanismus, die Chitin Synthese steigern (Kapteyn *et al.*, 2000) und den Grad der Quervernetzung, durch die gleichzeitige Bindung des Chitins an das β 1,3- und das β 1,6-Glukan, erhöhen. Einen höheren Chitingehalt findet man auch in Hyphen. Hier ist der Chitingehalt etwa dreimal so hoch wie in der Hefezelle (Braun und Calderone, 1978). Die Zellwand ist ein dynamisches Gebilde, welches auf verschiedenste Umweltbedingungen reagiert. Ihre Biogenese wird in Abhängigkeit vom Zellzyklus reguliert. Außerdem ist die Hefezelle in der Lage, über unterschiedliche Signalwege auf verschiedenste Arten von Stress zu reagieren (Smits *et al.*, 2001; Navarro-García *et al.*, 2001).

1.5 Glykosylierung

Proteinmodifikationen sind in Pro- und Eukaryoten essentiell. Sie determinieren unter anderem die Interaktion des Organismus mit ihrer Umwelt. Über eine durch Glykosylierung modifizierte Zelloberfläche findet die Interaktion von pathogenen Organismen mit Wirtsstrukturen statt. Von allen anderen Proteinmodifikationen ist es insbesondere die Glykosylierung von Zellwand- und Membranproteinen, die einen direkten Einfluss auf die Wechselwirkung der Zelle mit ihrer Umwelt ausübt. In Abb. 1.2 ist eine Übersicht über mögliche Formen der Glykosylierung gezeigt. In Hefen findet ausschließlich eine Mannosylierung statt. In höheren Eukaryoten sind die Formen der Glykosylierung komplex. Die beiden Hauptformen der Glykosylierung sind die *N*- und die *O*-Glykosylierung. Daneben existieren seltenere Formen wie die *C*-Glykosylierung. Bei der *N*-Glykosylierung wird im Endoplasmatischen Retikulum (ER) über eine *N*-glykosidische Verbindung mit einem Asparagin eine Zuckergrundstruktur, bestehend aus $\text{Glc}_3\text{-Man}_9\text{-GlcNAc}_2$, von dem

Enzymkomplex Oligosaccharyltransferase, an ein Asparagin der Konsensussequenz Asn-X-Ser/Thr geheftet (Tanner und Lehle, 1987; Orlean, 1997). Es wurde abgeschätzt, dass etwa 65 % aller Konsensussequenzen glykosyliert werden (Petrescu *et al.*, 1990). Dieser Prozess verläuft kotranslational (Tanner und Lehle, 1987). Die Grundstruktur der N-Glykosylierung ist in allen Varianten der N-Glykane von höheren Eukaryoten und Hefen gleich.

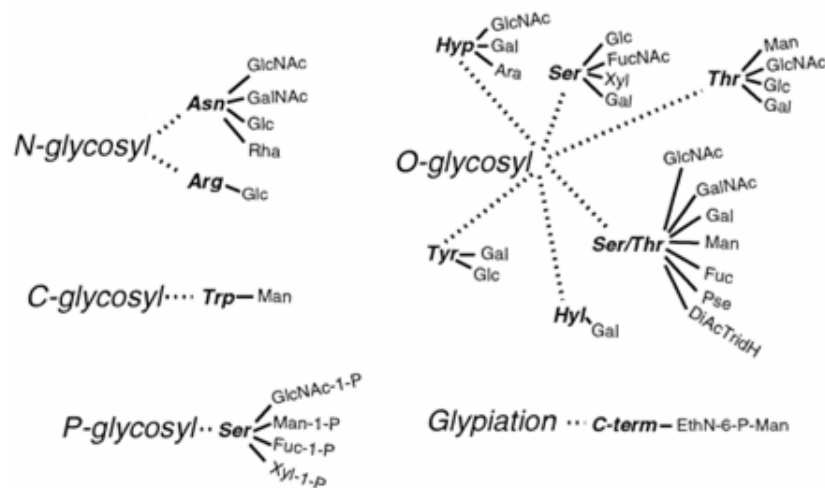


Abb. 1.2: Verschiedene Formen der Glykosylierung. Neben der N-Glykosylierung ist die O-Glykosylierung die häufigste und variantenreichste Form. Die Abbildung ist von Spiro (2002) entnommen.

Erst die weitere Prozessierung der N-Glykane im Golgi-Apparat verläuft in Säugern und Hefen unterschiedlich (Tanner und Lehle, 1987). In Hefen werden ausschließlich Mannosen zum Aufbau von Strukturen, die bis zu 200 Zucker enthalten, verwendet (Herscovics und Orlean, 1993). Dabei unterteilt man die Mannanstruktur in eine säurestabile, hauptsächlich α 1,2-gebundene Fraktion und eine säurelabile β 1,2-gebundene Fraktion, welche über eine Phosphodiesterbrücke an die säurestabile Fraktion gebunden ist (Cutler, 2001). Der Aufbau der N-Glykane in höheren Eukaryoten ist dagegen komplex. Die N-Glykosylierung erfüllt neben der Modifikation von extrazellulären Proteinen auch wichtige Aufgaben durch die Modifikation intrazellulärer sekretierter Proteine. So ist sie essentiell für die Qualitätskontrolle sekretorischer Proteine im Calnexin-Zyklus und den ER-assoziierten Abbau von Proteinen (Helenius und Aebi, 2001).

1.5.1 O-Glykosylierung

Bei der O-Glykosylierung werden Zucker O-glykosidisch an ein Serin oder Threonin des Akzeptorproteins gebunden. In den Hefen *C. albicans* und *S. cerevisiae* findet man ausschließlich unverzweigte α 1,2-verknüpfte O-Mannosylketten (Herscovics und Orlean, 1993). In *Schizosaccharomyces pombe* können zusätzlich Galaktosen in α 1,3- Verknüpfung vorkommen (Gemmell und Trimbel, 1999). Die Mannosylketten bei *S. cerevisiae* bestehen aus bis zu fünf Mannosen und bei *C. albicans* aus bis zu sieben Mannosen (Hayette *et al.*, 1992). Der häufigste Typ ist in beiden Organismen jedoch der Dimannosyl-Typ (Buurman *et al.*, 1998). In *S. cerevisiae* wurde darüber hinaus eine Phosphorylierung der zweiten Mannose nachgewiesen (Nakayama *et al.*, 1998; Jigami und Odani, 1999).

Die initiale Reaktion der O-Glykosylierung wird von Protein-O-mannosyltransferasen (Pmt) katalysiert (Abb. 1.3.) Diese Membranproteine des ER katalysieren den Transfer einer

Mannose unter Inversion der Konfiguration vom aktivierten Zucker Dolichol-*P*-Mannose auf ein spezifisches Serin oder Threonin des Zielproteins (Bause und Lehle, 1979). Die Reaktion verläuft, wie die der *N*-Glykosylierung, kotranslational, wobei neuere Erkenntnisse zeigen, dass die *O*-Glykosylierung mit der *N*-Glykosylierung in direkter Konkurrenz stehen kann. So wird das Pir- Protein Ccw5p aus *S. cerevisiae* nur *N*-glykosyliert, wenn das Threonin der Konsensussequenz aufgrund einer Mutation im *PMT4*-Gen nicht *O*-glykosyliert wird (Ecker *et al.*, 2003b).

Der aktivierte Zucker Dol-*P*- β -D-mannose wird im Cytoplasma von der in der ER-Membran verankerten Dolichol-*P*-Mannose-Synthase (Dpm1p) durch den Transfer einer Mannose von GDP-Man auf Dolichol-*P* synthetisiert (Orlean *et al.*, 1988; Orlean, 1990 und Abb. 1.4). Es wird vermutet, dass ScDpm1p neben anderen Faktoren ebenfalls an Translokation von Dol-*P*-Man durch die ER-Membran ins Lumen beteiligt ist (Helenius *et al.*, 2002). Dieser Prozess ist jedoch noch nicht vollständig aufgeklärt (Orlean, 1997). Die monomannosylierten Proteine gelangen anschließend auf dem Sekretionsweg in das Golgi, wo die Kettenelongation stattfindet (Abb. 1.3). Der Zuckerdonor für die Kettenelongation ist GDP-Mannose (Abeijon *et al.*, 1993), das im Cytoplasma durch die GDP-Mannose Pyrophosphorylase, kodiert von *SRB1*, bereitgestellt wird (Warit *et al.*, 2000). Nach dem Transfer der Mannose wird GDP von der GDPase Gda1p zu GMP hydrolysiert. GMP wird anschließend über einen Antiporter im Austausch gegen ein neues Molekül GDP-Mannose ins Cytoplasma transportiert (Abeijon *et al.*, 1989).

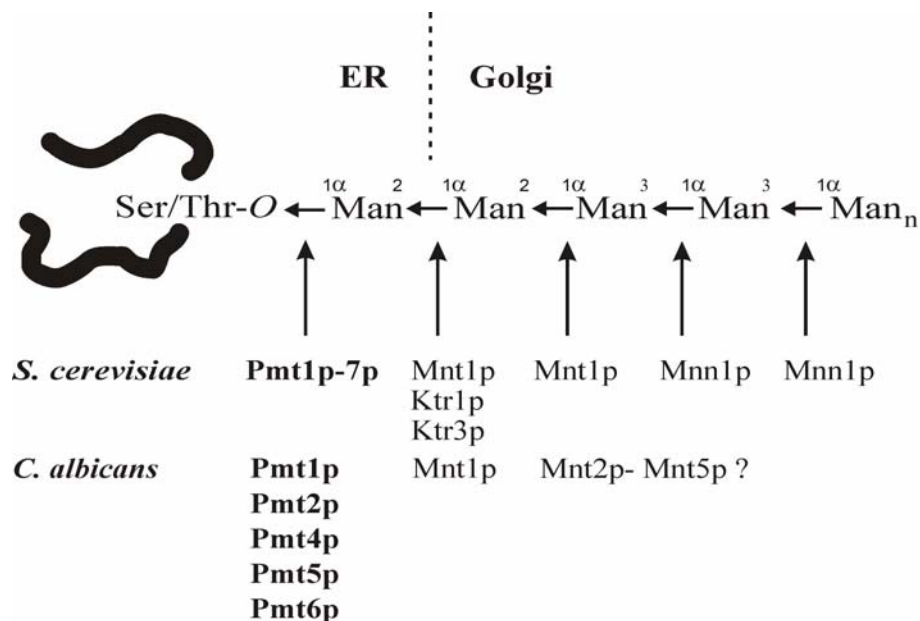


Abb. 1.3: Protein-O-glykosylierung in *S. cerevisiae* und *C. albicans*. Die Initialreaktion wird im ER durch Protein-O-mannosyltransferasen (Pmtp) katalysiert. Die Kettenelongation findet im Golgi statt. Die Mannosylketten können eine Länge von bis zu 5 Mannosen in *S. cerevisiae* und bis zu 7 in *C. albicans* haben. Der am häufigsten zu findende Typ besteht aus zwei Mannosen.

Im Lumen des Golgiapparates findet die Mn^{2+} -abhängige Addition von weiteren Mannosen an das Zielprotein statt. Diese Reaktionen werden von neun Proteinen der Ktr- und sechs Proteinen der Mnn-Proteinfamilie katalysiert (Lussier *et al.*, 1999). ScMnt1p, auch als ScKre2p bezeichnet, sowie ScKtr1p und ScKtr3p sind α -1,2-Mannosyltransferasen aus *S. cerevisiae*, welche die Addition der zweiten und dritten Mannose bei der O-Glykosylierung katalysieren (Lussier *et al.*, 1999). Sie sind ebenfalls an der Synthese äußerer N-Glykane

beteiligt. ScMnn1p ist eine im medialen Golgi Kompartiment vorkommende α -1,3-Mannosyltransferase, die in *S. cerevisiae* für die Addition der vierten Mannose verantwortlich ist (Orlean, 1997; Lussier *et al.*, 1997). In *C. albicans* sind fünf verwandte Gene für Mannosyltransferasen bekannt (Thomson *et al.*, 2000). CaMnt1p, das Homolog zu ScMnt1p, ist hierbei für die Addition der zweiten Mannose verantwortlich (Buurman *et al.*, 1998). Mnt2p und Mnt3p sind ebenfalls mit der ScMnt1p, ScKtr1p, ScKtr3 Gruppe verwandt und wahrscheinlich für die Addition der zweiten und dritten Mannose verantwortlich (Lussier *et al.*, 1999).

Die O-Glykosylierung verläuft in Säugern und Hefen prinzipiell verschieden. Während die O-Glykosylierung in höheren Eukaryoten generell posttranslational im Golgi-Apparat verläuft (Abeijon und Hirschberg, 1987) (mit der Ausnahme der POMT-Proteine, siehe unten), findet sie in Hefen im ER kotranslational statt (Haselbeck und Tanner, 1983; Tanner und Lehle, 1987). Es wurde jedoch auch beobachtet, dass ein artifizielles Protein *in vitro* posttranslational O-mannosyliert wurde (Harty *et al.*, 2001). Ein weiterer wichtiger Unterschied ist, dass die Glykosylketten in Hefen ausschließlich aus Mannose bestehen, wogegen sie in höheren Eukaryoten aus verschiedenen Zuckern zusammengesetzt sind (Hounsell *et al.*, 1996). Der erste Zucker ist in höheren Eukaryoten ein N-Acetylgalaktosamin (GalNAc), der als aktivierter Zucker in Form von UDP-GalNAc bereitgestellt wird (Roth, 1984). Die weiteren Zucker bestehen häufig, wie beim Mucin-Typ aus Sialinsäure und Galaktose (Hanisch, 2001), es kommen aber auch Zucker wie Xylose und Fucose vor (Nishimura *et al.*, 1992). Bis heute konnten nur wenige O-mannosylierte Proteine in höheren Eukaryoten identifiziert werden. Ein wichtiges derartiges Protein ist α -Dystroglykan (Endo, 1999), welches die Zuckerstruktur Sia(α 2-3)-Gal(β 1-4)-GlcNAc(β 1-2)-Man-Ser/Thr besitzt. Mutationen, die zu Änderungen dieser Zuckerstruktur führen, werden mit Muskeldystrophien assoziiert und resultieren in Krankheiten wie dem Walker-Warburg Syndrom (Beltran-Valero de Barnabe *et al.*, 2002).

1.5.2 Protein-O-mannosyltransferasen

Die für die initiale Reaktion der O-Glykosylierung verantwortlichen Pmt-Proteine sind nicht, wie lange angenommen, spezifisch für Pilze. Es konnten bei Datenbankanalysen gezeigt werden, dass die Pmt-Familie bei Pilzen und im Tierreich evolutionär konserviert ist (Willer *et al.*, 2003). Nicht-Pilz-Homologe der Pmt-Familie wurden bisher aus dem Mensch *Homo sapiens* (Jurado *et al.*, 1999; Many *et al.*, 2004), der Maus *Mus musculus* (Willer *et al.*, 2002) und der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* (Martin-Blanco *et al.*, 1996, Willer *et al.*, 2002) kloniert. Bemerkenswert ist, dass es in den vollständig sequenzierten Genomen des Protozoen *Plasmodium falciparum*, der Alge *Guillardia theta*, des Wurms *Caenorhabditis elegans* und der Pflanzen *Arabidopsis thaliana* sowie *Oryza sativa*, keine Sequenzübereinstimmungen mit Mitgliedern der Pmt-Familie gibt (Willer *et al.*, 2003). Orthologe von PMT-Genen in Pilzen wurden in *S. cerevisiae* (Strahl-Bolsinger *et al.*, 1999b), in *C. albicans* (Ernst und Prill, 2001), in *Aspergillus nidulans* (Shaw und Momany, 2002), in *Trichoderma reesei* (Zakrzewska *et al.*, 2003) und in *Schizosaccharomyces pombe* (Willer *et al.*, 2003) kloniert. Aufgrund ihrer Aminosäuresequenz lässt sich die Pmt-Proteinfamilie in eine Pmt1-, Pmt2- und eine Pmt4-Subfamilie einteilen (Ernst und Prill, 2001). In höheren

Organismen existieren interessanterweise nur Mitglieder der Pmt2- und Pmt4-Subfamilien (Willer *et al.*, 2003).

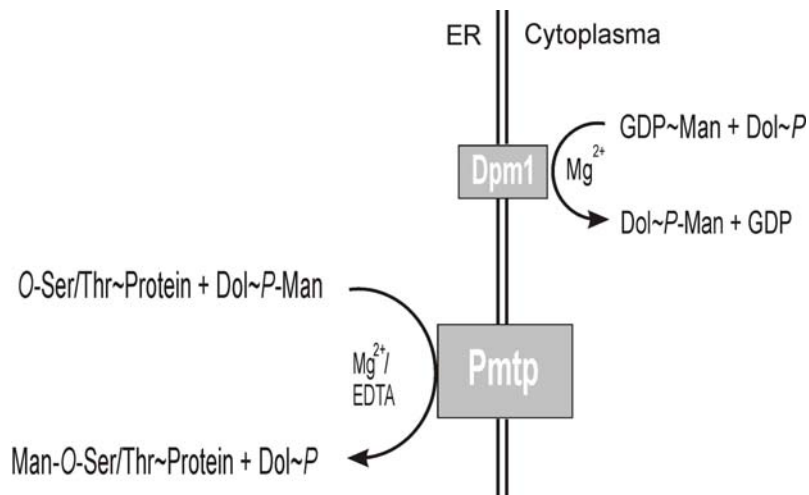


Abb. 1.4: Reaktionen der O-Glykosylierung. :Gezeigt sind die Bildung von Dolichol-P-Mannose und die Initialreaktion der Protein-O-Mannosylierung. Die Elongation der Mannosylketten findet im Golgi-Apparat statt (Abb. 1.3 und siehe Text). Mannosyltransferaseaktivität von Membranfraktionen in *C. albicans* wurde durch Zugabe von EDTA stimuliert (Arroyo-Florres *et al.*, 2004) in *S. cerevisiae* dagegen von Mg²⁺ (Sharma *et al.*, 1991).

Das meiste molekularbiologische Wissen über Pmt-Proteine stammt aus *S. cerevisiae*. In *S. cerevisiae* existieren sieben Mitglieder der *PMT*-Genfamilie. (Strahl-Bolsinger *et al.*, 1993; Lussier *et al.*, 1995; Immervoll *et al.*, 1995; Gentzsch und Tanner, 1996). Die *S. cerevisiae*-Proteine mit der genauen Bezeichnung Dol-P- β -D-Man:Protein-O- α -D-mannosyl-transferase (Pmt1p) sind ER-Membranproteine. Es konnte für ScPmt1p experimentell gezeigt werden, dass das Protein sieben Transmembrandomänen besitzt, wobei der Aminoterminal im Cytoplasma und der Carboxylterminus im ER-Lumen lokalisiert ist (Strahl-Bolsinger *et al.*, 1999a). Eine zentrale Schleife (Loop5) ist dem ER-Lumen zugewandt. Sie ist essentiell für die Enzymaktivität von ScPmt1p. ScPmt1p ist N-glykosyliert, wobei der Glykosylierungsstatus für die Enzymaktivität nicht essentiell ist (Strahl-Bolsinger *et al.*, 1999a). Eine Reihe invarianter Aminosäuren in den Pmt-Proteinfamilien erwiesen sich als essentiell für die Enzymaktivität von ScPmt1p (Girrbach *et al.*, 2000). Maximale Enzymaktivität der Pmt-Proteine bedingt die Bildung von Dimeren innerhalb der Proteinfamilie (Gentzsch *et al.*, 1995, Girrbach und Strahl, 2003). Mitglieder der Pmt1-Subfamilie bilden bevorzugt Heterodimere mit Proteinen der Pmt2-Subfamilie. Pmt4p bildet hingegen ausschließlich Homodimere (Girrbach und Strahl, 2003). In humanen Zelllinien ist die Coexpression der beiden Proteinmannosyltransferasen POMT1 und POMT2 notwendig um Enzymaktivität zu detektieren (Manya *et al.*, 2004).

Disruptionen in *ScPMT*-Genen führen zur Ausprägung pleiotroper Phänotypen. Die Phänotypen resultieren einerseits aus einem Verlust der Funktion einzelner Proteine und andererseits aus einer Destabilisierung der Zellwand, aufgrund fehlender O-Glykosylierung (Gentzsch und Tanner, 1996; Strahl-Bolsinger *et al.*, 1999b). So zeigen z. B. die Doppelnullmutante *Scpmt1 pmt2* und *Scpmt2 pmt4* von *S. cerevisiae* nur Wachstum, wenn sie osmotisch stabilisiert werden. Zusätzlich sind diese Mutanten resistent gegenüber dem K1 Killertoxin und erwiesen sich als sensitiv gegen Calcofluor White und Koffein (Gentzsch und Tanner, 1996). Verschiedene *Scpmt*-Dreifachmutanten sind trotz osmotischer Stabilisierung nicht wachstumsfähig. Dieses beweist, dass ein Minimum an O-Glykosylierung für die Hefe essentiell ist (Gentzsch und Tanner, 1996).

Bis heute konnte keine Konsensussequenz für die O-Glykosylierung gefunden werden. Es existieren allerdings Präferenzen. So begünstigt ein Prolin in Position -1 und +3 von

Serin/Threonin die O-Glykosylierung (Wilson *et al.*, 1991). In *C. albicans* wird Threonin als Substrat gegenüber Serin bevorzugt (Weston *et al.*, 1993). Des Weiteren sind die Aminosäuren, die als Substrat für die Proteinmannosyltransferasen fungieren, häufig in Serin/Threonin reichen Clustern angeordnet. Möglicherweise gibt es mehrere Konsensussequenzen für die O-Glykosylierung, da gezeigt wurde, dass ScPmt-Proteine Substratspezifität aufweisen (Gentzsch und Tanner, 1997). So sind z. B. die Proteine Bar1p, Pir2p, Cts1p, Kre1p und Kre9p hauptsächlich in *Scpmt1*- und *Scpmt2*-Mutanten unterglykosyliert, während Kex2p, Gas1p und Fus1p in *Scpmt4*-Mutanten betroffen sind (Gentzsch und Tanner, 1997). Auch das für die axiale Knospung benötigte Axl2/Bud10p wird nur von ScPmt4p O-glykosyliert (Sanders *et al.*, 1999). Für die Sensorkomponenten des PKC-Weges Mid2p, Wsc1p und Wsc2p konnte gezeigt werden, dass sie mindestens von Pmt2p und Pmt4p mannosyliert werden. In *pmt2 pmt4*-Mutanten werden diese Proteine inkorrekt prozessiert, was zur Schwächung des Zellwand-Integritäts-Weges und schließlich zum Zelltod führt (Lommel *et al.*, 2004).

In *C. albicans* gibt es fünf Isoformen der Protein-O-mannosyltransferase (Ernst und Prill, 2001). Die Charakterisierungen der Proteinmannosyltransferasen Pmt1p, Pmt4p, Pmt5p und Pmt6p (Timpel *et al.*, 1998; Prill, 2000; Klinkert, 2002; Timpel *et al.*, 2000) ergaben im Vergleich zu *S. cerevisiae* zum Teil andere Phänotypen. Die Mutationen *pmt1*, *pmt4*, und *pmt6* sind beispielsweise zusätzlich sensitiv gegen Hygromycin B, G418 und Clotrimazol; sie sind in der Morphogenese von Hyphen Defekt und *pmt1*- und *pmt6*-Mutanten haben eine verminderte Fähigkeit an Epithelzellen zu adhären. Für *pmt5* konnten zunächst keine Phänotypen festgestellt werden, obwohl *PMT5* exprimiert wird (Klinkert, 2002; Prill *et al.*, 2004). Erst im Mausmodell zeigte sich für *pmt5*, wie für alle anderen *pmt*-Mutanten, eine abgeschwächte Virulenz (Prill *et al.*, 2004). Des Weiteren war die *pmt5*-Mutante und in stärkerem Maße auch die *pmt1*-Mutante nicht in der Lage, ein artifizielles Hautmodell zu penetrieren (Rouabhia *et al.*, 2004). Homozygote *pmt1*-Mutanten waren sogar avirulent im Mausmodell (Timpel *et al.*, 1998). Einfachmutanten konnten von allen charakterisierten *PMT*-Genen konstruiert werden. Es war jedoch nicht möglich, eine *pmt1 pmt4*-Doppelmutante zu konstruieren (Prill, 2000). Dieses Ergebnis zeigt, dass die O-Glykosylierung auch in *C. albicans* ein essentieller Prozess ist. Kürzlich wurde ein spezifischer Inhibitor für CaPmt1p hergestellt (Duffy *et al.*, 2001). Wird dieser Inhibitor dem Wildtyp verabreicht, entstehen Phänotypen, die den Phänotypen einer *pmt1*-Deletion gleichen.

1.6 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war die erste vollständige funktionelle Analyse der *PMT*-Genfamilie eines pathogenen Pilzes. Dieses beinhaltet die Charakterisierung aller fünf Isoformen der Protein-O-mannosyltransferase. In diesem Zusammenhang sollte erstmals *PMT2* disruptiert werden. Damit einhergehend sollte eine vergleichende Analyse aller *pmt*-Disruptionsstämme erfolgen. Eine vollständige Phänotypisierung aller Pmt-Proteine sollte insbesondere hinsichtlich ihrer Rolle bei der Sensitivität gegenüber verschiedenen Substanzen, ihrer der Hyphen-Morphogenese und der Substratspezifität gegenüber verschiedenen Zielproteinen, erfolgen. Des Weiteren sollte eine Transkriptomanalyse aller *pmt*-Mutanten durchgeführt werden, um zu einem besseren Verständnis der molekularen Prozesse und der Faktoren zu kommen, welche durch die O-Mannosylierung beeinflusst werden.

2. Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Enzyme

Die Chemikalien wurden von den folgenden Firmen bezogen:

Restriktionsenzyme (NE Biolabs, Roche, MBI Fermentas, Gibco BRL)
 Hybond N (Amersham/Pharmacia)
 X-GAL (Biotech Trade & Service GmbH)
 Bradford-Reagenz (Bio Rad)
 Glukose (Caesar & Lorentz GmbH)
 Carrier-DNA (Clontech)
 YNB w/o amino acids, Casamino acids, Hefeextrakt, Pepton (Difco Laboratories)
 Röntgenfilme (Fuji Rx-Med)
 Maleinsäure (Fluka)
 Agarose (Gibco BRL)
 Bromphenol Blau (Janssen)
 ImmobilonP-Membran (Millipore)
 Agar, Nutrient Broth (Oxoid)
 DNA Purification Kit (Qiagen)
 Natriumchlorid, Isopropanol (Riedel de Haen)
 Klenow, Polymerase, Polynukleotidkinase, DIG-UTP-Labeling and Detection-Kit, Blocking-Reagenz (Roche)
 Glasperlen, Glycerin, Acrylamid-Bisacrylamid, PEG, KCl, Roti-Phenol (Roth)
 SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate (Pierce)
 Zymolyase (Seikagaku Kogyo Co. Ltd.)
 Antibiotika, BSA, Ethidiumbromid, NBT, SDS (Serva)
 IPTG, prestained HMW, Sorbitol, (Sigma)

Nicht aufgeführte Chemikalien wurden von den Firmen Merck, Roth und Sigma bezogen.

2.2 Stämme und Medien

2.2.1 *E. coli* - Stamm

DH5 α F' : F' [Φ 80 $\Delta(lacZ)M15$] $\Delta(lacZYA-argF)U169$ *recA1 endA1 hsdR17* r_K^- m_K^+ *supE44 thi-1 gyrA* (Hanahan, 1983; Woodcock *et al.*, 1989)

2.2.2 *C. albicans* - Stämme

Stamm	Genotyp	Quelle/Referenz
SC5314	: prototroph	(Fonzi und Irwin, 1993)
CAI4	: $\Delta ura3::imm434/\Delta ura3::imm434$	(Fonzi und Irwin, 1993)
CAF2-1	: $\Delta ura3::imm434/URA3$	(Fonzi und Irwin, 1993)
CAP1-3	: wie CAI4, aber <i>PMT1/pmt1Δ::hisG-URA3-hisG</i>	(Timpel <i>et al.</i> , 1998)
CAP1-312	: wie CAI4, aber <i>pmt1Δ::hisG-URA3-hisG/pmt1Δ::hisG</i>	(Timpel <i>et al.</i> , 1998)
CAP1-3121	: wie CAI4, aber <i>pmt1Δ::hisG/pmt1Δ::hisG</i>	(Timpel <i>et al.</i> , 1998)

SPCa2	: wie, CAP1-3121 aber <i>ura3Δ::imm434/URA3</i>	diese Arbeit
SPCa3	: wie SPCa2	diese Arbeit
P2-2	: wie CAI4, aber <i>PMT2/pmt2Δ::hisG-URA3-hisG</i>	diese Arbeit
P2-6	: wie P2-2	diese Arbeit
P2-22	: wie P2-2, <i>PMT2/pmt2Δ::hisG</i>	diese Arbeit
P2-67	: wie P2-22	diese Arbeit
P2-678	: wie P2-67, aber <i>MET3p-PMT2/pmt2Δ::hisG</i>	diese Arbeit
P2-679	: wie P2-678	diese Arbeit
P2-22tet1	: wie P2-22, aber <i>tetO-ScHOP1p-PMT2/pmt2Δ::hisG</i>	diese Arbeit
P2-22tet4	: wie P2-22, aber <i>tetO-ScHOP1p-PMT2/PMT2/pmt2Δ::hisG</i>	diese Arbeit
P24-1	: wie CAP4-2164, aber <i>PMT2/pmt2Δ::hisG</i>	diese Arbeit
P24-2	: wie P24-1	diese Arbeit
P26-5	: wie CAP2-2391, aber <i>PMT2/pmt2Δ::hisG</i>	diese Arbeit
P26-6	: wie P26-5	diese Arbeit
SPCa4	: wie P2-22, aber <i>ura3Δ::imm434/URA3</i>	diese Arbeit
SPCa5	: wie SPCa4	diese Arbeit
CAP4-216	: wie CAI4, aber <i>pmt4Δ::hisG/pmt4Δ::hisG-URA3-hisG</i>	(Prill, 2000)
CAP4-2164	: wie CAI4, aber <i>pmt4Δ::hisG/pmt4Δ::hisG</i>	(Prill, 2000)
SPCa6	: wie CAP4-2164, aber <i>ura3Δ::imm434/URA3</i>	diese Arbeit
SPCa7	: wie SPCa6	diese Arbeit
P5-571	: wie P5-574	(Klinkert, 2001)
P5-5744	: wie CAI4, aber <i>pmt5Δ::hisG/pmt5Δ::hisG</i>	(Klinkert, 2001)
SPCa10	: wie P5-5744, aber <i>ura3Δ::imm434/URA3</i>	diese Arbeit
SPCa11	: wie SPCa10	diese Arbeit
CAP2-239	: wie CAI4, aber <i>pmt6Δ::hisG/pmt6Δ::hisG-URA3-hisG</i>	(Timpel <i>et al.</i> , 2000)
CAP2-2391	: wie CAI4, aber <i>pmt6Δ::hisG/pmt6Δ::hisG</i>	(Timpel <i>et al.</i> , 2000)
SPCa8	: wie CAP2-2391, aber <i>ura3Δ::imm434/URA3</i>	diese Arbeit
SPCa9	: wie SPCA8	diese Arbeit
PP46-428	: wie CAP2-2391, aber <i>pmt4Δ::hisG/pmt4Δ::hisG-URA3-hisG</i>	(Prill, 2000)
PP46-4286	: wie CAP2-2391, aber <i>pmt4Δ::hisG/pmt4Δ::hisG</i>	(Prill, 2000)
CPP117	: wie CAP-3121, aber <i>pmt6Δ::hisG/pmt6Δ::hisG-URA3-hisG</i> (Timpel <i>et al.</i> , 1999)	
CPP1171	: wie CAP-3121, aber <i>pmt6Δ::hisG/pmt6Δ::hisG</i>	(Timpel <i>et al.</i> , 1999)
8535	: wie CAI4 aber, <i>AXL2/AXL2-HA (URA3)</i>	(Cheryl Gale, pers. Mitteilung)
8526	: wie CAP1-3121 aber, <i>AXL2/AXL2-HA (URA3)</i>	(Cheryl Gale, pers. Mitteilung)
8534	: wie P2-22 aber, <i>AXL2/AXL2-HA (URA3)</i>	(Cheryl Gale, pers. Mitteilung)
8532	: wie CAP4-2164 aber, <i>AXL2/AXL2-HA (URA3)</i>	(Cheryl Gale, pers. Mitteilung)
8529	: wie P5-5774 aber, <i>AXL2/AXL2-HA (URA3)</i>	(Cheryl Gale, pers. Mitteilung)
8537	: wie CAP2-2391 aber, <i>AXL2/AXL2-HA (URA3)</i>	(Cheryl Gale, pers. Mitteilung)
O8.2/25-2	: wie CAI4 aber <i>MET3p-OLE1/ole1Δ::hisG</i>	(Krishnamurthy, pers. Mitteilung)
SPCa12	: wie CAP1-3121, aber <i>FLO1p-RLUC (URA3)</i> [pTD72 (<i>Bst</i> 1107I) integriert in <i>FLO1p</i>]	diese Arbeit
SPCa13	: wie CAP1-3121, aber <i>FLO1p-RLUC (URA3)</i> [pTD72 (<i>Bst</i> 1107I) integriert in <i>FLO1p</i>]	diese Arbeit

SPCa14	: wie CAP1-3121, aber <i>FLO1p-RLUC (URA3)</i> [pTD81 (<i>Bst</i> 1107I) integriert in <i>FLO1p</i>]	diese Arbeit
SPCa15	: wie CAP1-3121, aber <i>FLO1p-RLUC (URA3)</i> [pTD81 (<i>Bst</i> 1107I) integriert in <i>FLO1p</i>]	diese Arbeit
SPCa16	: wie CAP4-2164, aber <i>FLO1p-RLUC (URA3)</i> [pTD72 (<i>Bst</i> 1107I) integriert in <i>FLO1p</i>]	diese Arbeit
SPCa17	: wie CAP2-2391, aber <i>FLO1p-RLUC (URA3)</i> [pTD72 (<i>Bst</i> 1107I) integriert in <i>FLO1p</i>]	diese Arbeit
SPCa18	: wie CAP2-2391, aber <i>FLO1p-RLUC (URA3)</i> [pTD72 (<i>Bst</i> 1107I) integriert in <i>FLO1p</i>]	diese Arbeit

2.2.3 Medien zur Anzucht von Hefen

YPD (Vollmedium)	: 1 % Hefeextrakt, 2 % Pepton, 2 % Glukose
SD (Minimalmedium)	: 0,67 % YNB (Yeast Nitrogen Base), 2 % Glukose, pH 7,0 mit NaOH eingestellt
SD Casa	: wie SD mit zusätzlich 4 % Casamino acids
SDMal	: 0,67 % YNB (Yeast Nitrogen Base), 0,2 % Glukose, 2 % Maltose
YP Casa	: wie YPD mit zusätzlich 4 % Casamino acids
YPS	: 1 % Hefeextrakt, 2 % Pepton, 2 % Saccharose
Spider	: 1 % Nutrient Broth (Oxoid), 1 % Mannitol, 0,2 % K ₂ HPO ₄ , 100 mM NaCl
Lee's	: Lee <i>et al.</i> , 1975
Na-Laktat-Medium	: 0,67 % YNB (Yeast Nitrogen Base, ohne Aminosäuren aber mit Ammoniumsulfat), 0,04 % Arginin, 0,08 % Asparaginsäure, 0,26 % Glutaminsäure, 0,02 % Glycin, 0,03 % Histidin, 0,06 % Isoleucin, 0,08 % Leucin, 0,09 % Lysin, 0,04 % Phenylalanin, 0,05 % Threonin, 0,01 % Tyrosin, 0,08 % Valin, 2 % Na-Laktat
FOA-Medium	: 0,02 % 5-Fluoro-Orotic Acid (FOA), 0,001 % Uridin, 2 %, Glukose, 0,17 % YNB, 0,1 % Prolin (McCusker und Davis, 1991)

Aminosäuren wurden hinzugefügt, wie bei Zimmermann (1975) beschrieben.

Festes Medium wurde durch Zugabe von 1,5 % Agar hergestellt. Das Wachstum der Hefen erfolgte, wenn nicht anders vermerkt, bei 30 °C.

2.2.4 Medium zur Anzucht von *E. coli*

Vollmedium (LB) : 1 % Trypton (Pepton 140), 0,5 % Hefeextrakt, 0,5 % NaCl
Die Selektion in *E. coli* erfolgte durch Zugabe von Ampicillin auf eine Konzentration von 100 µg/ml. Festes Medium wurde durch Zugabe von 1,5 % Agar hergestellt. Das Wachstum erfolgte bei 37 °C.

2.2.5 Hypheninduktion von *C. albicans* in Flüssigmedium

Die Hypheninduktion erfolgte mit 2,5 mM *N*-Acetylglukosamin, 5 % Pferdeserum oder mit „Spider“-Medium. Die Zellen einer Übernachtskultur wurden dreimal mit SB-Medium (0,335 % YNB ohne Aminosäuren; 0,45 % NaCl pH 5,5) gewaschen. Danach wurden die Zellen auf eine Zelldichte von 10^7 Zellen/ml verdünnt und in SB-Medium mit 10 mM Prolin oder Wasser für 1-3 Stunden gehungert. Anschließend wurden die Zellen in 37 °C warmes SB-Medium pH 6,5 mit GlcNAc, Wasser mit 5 % Pferdeserum oder „Spider“-Medium auf eine $OD_{600\text{ nm}}$ von 0,1-0,5 verdünnt. Die Hypheninduktion bei 37 °C wurde über drei bis vier Stunden unter dem Mikroskop verfolgt.

2.2.6 Hypheninduktion von *C. albicans* auf festem Medium

Hypheninduktion erfolgte zum einem auf Serumplatten, welche 2 % Agar und 5 % Pferdeserum enthielten. Die Hyphenbildung wurde bei 37 °C induziert und über mehrere Stunden beobachtet.

Zum anderen wurde die Hyphenbildung durch Wachstum auf Mangelmedium induziert. Hierzu wurden so genannte "Spider-Platten" hergestellt (Liu *et al.*, 1994). Sie bestanden aus 1 % Nutrient Broth, 1 % Mannitol, 0,2 % K_2HPO_4 und 1,35 % Agar. Die Stämme wurden für 4-5 Tage bei 30 °C oder für 3 Tage bei 37 °C inkubiert.

2.2.7 Hypheninduktion von *C. albicans* in flüssigen Medium

Die Hypheninduktion erfolgte mit 2,5 mM *N*-Acetylglukosamin, 5 % Pferdeserum oder „Spider“-Medium. Die Zellen einer Übernachtskultur wurden dreimal mit SB-Medium (0,335 % YNB ohne Aminosäuren; 0,45 % NaCl pH 5,5) gewaschen. Danach wurden die Zellen auf eine Zelldichte von 10^7 Zellen/ml verdünnt und in SB-Medium mit 10 mM Prolin oder Wasser für 1-3 Stunden gehungert. Anschließend wurden die Zellen in 37 °C warmes SB-Medium pH 6,5 mit GlcNAc, Wasser mit 5 % Pferdeserum oder „Spider“-Medium auf eine $OD_{600\text{ nm}}$ von 0,1-0,5 verdünnt. Die Hypheninduktion bei 37 °C wurde über drei bis vier Stunden unter dem Mikroskop verfolgt.

2.2.8 Medien mit verschiedenen Substanzen

Zur Phänotypisierung der verschiedenen *C. albicans* Stämme wurde deren Sensitivität gegen verschiedene Chemikalien getestet. Dazu wurden SD- oder YPD-Platten angefertigt, denen nach dem Autoklavieren die entsprechenden Chemikalien (Tab. 2.1) zugesetzt wurden. Der Agar wurde vor Zugabe der zu testenden Substanzen auf mindestens 50 °C abgekühlt.

Testsubstanz	Firma	Stammlösung	Lösungsmittel	Konzentration
Amphotericin B	Sigma	25 mg/ml	DMSO	1 µg/ml
Caspofungin (Cancidas MK-0991)	Merck	1 mg/ml	dH ₂ O	10 µg/ml
CaCl ₂	Acros	10 M	dH ₂ O	200 mM
Calcofluor	Sigma	25 mg/ml	dH ₂ O	10 µg/ml
Canavanin	Sigma	100 mg/ml	dH ₂ O	2 mg/ml
Clotrimazol	Sigma	50 mg/ml	dH ₂ O	2 µg/ml

Congo red	Sigma	20 mg/ml	dH ₂ O	400 µg/ml
Cycloheximid	Sigma	50 mg/ml	dH ₂ O	200 µg/ml
Fluconazol	Sigma	5 mg/ml	Aceton	3 µg/ml
G418	Calbiochem	50 mg/ml	dH ₂ O	1,2 mg/ml
Glycerin	Roth	40 %	dH ₂ O	3 %
H ₂ O ₂	Merck	30 %	dH ₂ O	5µl/25ml
Hygromycin B	Calbiochem	398 mg/ml	dH ₂ O	100-200 µg/ml
Ketoconazol	Sigma	25 mg/ml	DMSO	2 µg/ml
Koffein	Sigma	100 mM	dH ₂ O	10-20 mM
NaCl	Roth	-	-	2 M
Nystatin	Serva	10 mg/ml	PBS	10-15 µg/ml
Nikkomycin	Sigma	5 mg/ml	dH ₂ O	20 µg/ml
Phloxin B	Sigma	10 mg/ml	dH ₂ O	5 µg/ml
SDS	Serva	10 %	dH ₂ O	0,06 %

Tab. 2.1: Testsubstanzen und ihre Konzentrationen

2.3 Primer und Plasmide

2.3.1 Synthetisch Oligonukleotide

p1PMT2	: 5'-TTAGAATTCATGTCTACTTCTGTTGAACC-3'
p2PMT2	: 5'-TTAGAATTCCTAGGTGTATTGATCATCAG-3'
1-PMT2mp	: 5'-TTATTGTACCAAAGATATCAACAAAC-3'
2-PMT2mp	: 5'-TTACCCGGGCTCTGTTTGTCTATGTATTAG-3'
i-p2-URA3ver	: 5'-TTACAATCAAAGGTGGTCC-3'
p3-URA3ver	: 5'-GGTACAGTTGTTTCCTCACA-3'
pcURA3	: 5'-GGTAAAGGAAGAGATCCAG-3'
p2verFOA	: 5'-GTTGCTGGTGAACCAATCAT-3'
verP1	: 5'-ACTCTTTGAACAATGTGGTG-3'
p2verTET	: 5'-GCGCAACGCAATTAATGTG-3'
verP2k	: 5'-GAGCATTGGTAATATCTGC-3'
p1-verFLO1p	: 5'-CGTGTTACTACCGACTAAAC-3'
SK-1	: 5'-GGCCCACCACTGCGGACCAG-3'

Die unterstrichenen Sequenzen markieren Erkennungsstellen für Restriktionsendonukleasen.

2.3.2 Plasmide

pRC18	: <i>URA3</i> markierter <i>CaARS</i> -Vektor (Cannon <i>et al.</i> , 1992) mit Polylinker Region aus pUC18 (Stoldt <i>et al.</i> , 1997)
pUC18	: <i>E. coli</i> Klonierungsvektor (Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985)
pCaDis	: <i>URA3</i> markiertes Plasmid mit dem <i>C. albicans</i> <i>MET3</i> -Promotor vor einer Polylinker Region (Care <i>et al.</i> , 1999)
p5921	: pUC18 mit <i>hisG-URA3-hisG</i> -Kassette (Gow <i>et al.</i> , 1994)

pFLAG-Mal2-CDR1	: <i>CDR1</i> C-terminal mit FLAG-Epitop markiert unter Kontrolle des <i>MAL2p</i> , in einem Vektor mit <i>RP10</i> Locus zur Integration (Umeyama <i>et al.</i> , 2002)
pSP-PMT2	: mit den Primern p1PMT2 und p2PMT2 auf genomischer DNA des Stammes SC5314 amplifizierter <i>PMT2</i> ORF, in pUC18 kloniert
pSP-CaPMT2	: mit den Primern 1-PMT2mp und 2-PMT2mp auf genomischer DNA des Stammes SC5314 amplifizierter <i>PMT2</i> ORF mit eigenem Promotor, in pUC18 kloniert
pSP16-1	: ein <i>CaPMT2</i> -Fragment wurde mit <i>SmaI</i> und <i>XbaI</i> aus pSP-CaPMT2 herausgeschnitten und in pRC18 <i>XbaI SmaI</i> inseriert (Zwischenklon)
pSP16	: <i>PMT2</i> unter eigenem Promotor in dem <i>C. albicans</i> Vektor pRC18 nach Insertion eines 1,7 kb Fragmentes, welches mit <i>XbaI</i> aus pSP-CaPMT2 geschnitten wurde
pSP17	: mit <i>BamHI</i> aus pSP-PMT2 herausgeschnittenes 320 bp großer 5'-Bereich des <i>PMT2</i> Orfs in <i>BamHI</i> Schnittstelle von pCaDis kloniert
pSP18	: Plasmid p5921 wurde mit den Enzymen <i>BamHI</i> und <i>XmnI</i> geschnitten und das Fragment mit der Disruptionskassette mit Klenow Enzym zum Auffüllen des überhängenden Endes der <i>BamHI</i> Schnittstelle behandelt. Das so behandelte Fragment wurde mit <i>BglII</i> geschnitten und mit einem Fragment, welches mit <i>BsmFI</i> aus pSP-CaPMT2 herausgeschnitten wurde, mit Klenow Enzym behandelt und anschließend mit <i>BglII</i> geschnitten wurde, ligiert.
pCaPMT2mp	: <i>C. albicans</i> Vektor mit <i>PMT2</i> unter Kontrolle seines nativen Promotors (M. Gerads, pers. Mitteilung)
pBI-CaPMT2	: <i>C. albicans</i> Vektor mit <i>PMT2</i> unter Kontrolle des <i>PCK1</i> -Promotors (M. Gerads, pers. Mitteilung)
p2151C-CaPMT2T	: 1.4 kb <i>XbaI</i> -Fragment mit 5'-region des <i>PMT2</i> ORF wurde in die <i>XbaI</i> Stelle stromabwärts des <i>tetO-SchOP1-Promotors</i> , in das Plasmid p2151C kloniert
pSP27	: PCR von <i>PMT2</i> zur Einführung von <i>BglII</i> Schnittstellen
pSP28	: <i>PMT2</i> mit <i>BglII</i> aus pSP27 in pBI-1 stromabwärts des <i>PCK1</i> -Promotors
pSP1	: gesamter <i>PMT4</i> -ORF mit Promotor und 3'UTR mit <i>SalI</i> aus pCT50 geschnitten und in pRC18 inseriert
pSP2	: 0,6 kb <i>BglII</i> -Fragment aus pSP1 in pCaDis
pCT30	: <i>CaARS</i> Vektor mit <i>URA3</i> –Marker und gesamten <i>PMT1</i> -ORF mit Promotor (Timpel <i>et al.</i> , 1998)
pCT35	: <i>CaARS</i> Vektor mit <i>URA3</i> –Marker und gesamten <i>PMT6</i> -ORF mit Promotor (Timpel <i>et al.</i> , 2000)
pBK1b	: enthält <i>PMT5</i> stromabwärts vom <i>PCK1p</i> in pBI-1
pLJ19	: <i>CPH1</i> unter der Kontrolle des <i>ADH1</i> Promotors (Csank <i>et al.</i> , 1997)
pCaTPK2	: <i>CaARS</i> Vektor mit <i>URA3</i> Marker und <i>TPK2</i> (Sonneborn <i>et al.</i> , 2000)
pCCa4	: <i>CaARS</i> Vektor mit <i>URA3</i> Marker und <i>CEK1</i> (Csank <i>et al.</i> , 1998)

pBJ-HAHD	: <i>EFG1</i> mit Hämagglutinin-Tag-Region fusioniert unter der Kontrolle des <i>PCK1</i> Promotors (Sonneborn <i>et al.</i> , 2000)
pSP9	: <i>CaKRE9-FLAG</i> unter Kontrolle des <i>ACT1</i> -Promotors
pCT50	: enthält als Fragment den gesamten <i>PMT4</i> -ORF mit 5' und 3'UTR
p1595/3	: <i>ACT1</i> in pBR322 (Delbrück und Ernst, 1993)
pCT51	: enthält ein 1,2 kB Fragment des <i>PMT4</i> ORF mit der 5'UTR
pCT52	: enthält ein 0,65 kB Fragment des <i>PMT4</i> ORF mit der 3'UTR
pCT53	: pCT51 wurde mit <i>Sall</i> und <i>Bam</i> HI geschnitten und der mit <i>Sall</i> und <i>Bgl</i> II aus p5921 herausgeschnittene URA-Blaster inseriert
pCT54	: enthält gesamtes URA-Blaster Fragment 4 kB mit jeweils 500 bp flankierenden Sequenzen von <i>PMT4</i> und Umgebung
HB5	: enthält genomischen <i>CaURA3</i> -Locus (Losberger und Ernst, 1989)
p2297HU	: <i>CaARS</i> Vektor mit <i>URA3</i> -Marker und synthetischem Ubiquitin-Gen unter Kontrolle des <i>ACT1</i> Promotors
pYW7	: <i>SEC20</i> unter Kontrolle des <i>PCK1</i> -Promotors (Weber, 2001)
pYW69	: <i>SEC20_{c-myc}</i> unter Kontrolle des <i>PCK1</i> -Promotors (Weber, 2001)
pYW69ΔK(245)	: wie pYW69 aber mit L245K Austausch
pYW69ΔK(253)	: wie pYW69 aber mit L253K Austausch
pYW69ΔK(268)	: wie pYW69 aber mit L268K Austausch
pYW69ΔK(294)	: wie pYW69 aber mit L294K Austausch

2.4 Präparation, Konstruktion und Analyse von Nukleinsäuren

Soweit nicht anders beschrieben wurden alle Arbeiten nach Standardmethoden durchgeführt (Sambrook *et al.*, 1989).

2.4.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Zur Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde eine modifizierte Methode der alkalischen Lyse (Sambrook *et al.*, 1989) verwendet. Für präparative Zwecke und für die Isolation von Plasmiden, welche zur Sequenzierung verwendet wurden, erfolgte die Isolierung der Plasmid-DNA mit Qiagen-Säulen. Dabei wurde dem Protokoll der Hersteller Firma (Qiagen, Hilden) gefolgt.

2.4.2 Isolierung von Gesamt-DNA aus Hefen

Gesamt-DNA aus *C. albicans* wurde nach einer modifizierten Methode von Sherman *et al.* (1986) isoliert. Die Zellen einer 5 ml großen stationären Übernachtskultur wurden einmal in destilliertem Wasser gewaschen. Danach wurde das Pellet in 400 µl SCE/Zymolyase-Lösung (1,2 M Sorbitol; 0,1 M Natriumcitrat; 10 mM EDTA pH 7,0; 200 µg/ml Zymolyase (100T); 20 mM 1,4-Dithiothreitol) resuspendiert. Die Suspension wurde 1 h bei 37 °C inkubiert. Die erhaltenen Sphäroplasten wurden abzentrifugiert (5 min, 4000 Upm) und in 500 µl 50 mM EDTA pH 8,0 aufgenommen. Durch Zugabe von 50 µl 10 % SDS-Lösung und 15 – 30 min Inkubation bei 65 °C erfolgte die Lyse der Zellen und die Denaturierung der Proteine. Nach Abkühlung der Suspension auf Raumtemperatur wurden die Proteine durch Zugabe von 100 µl einer 5 M Kaliumacetat-Lösung pH 6,0 für 30 – 90 min auf Eis gefällt. Nach einem Zentrifugationsschritt (15 min, 13000 Upm, 4 °C) zur Abtrennung der Proteine und der

Zellreste wurde die DNA im Überstand mit 900 µl Ethanol gefällt und abzentrifugiert (15 min, 15000 g, 4 °C). Das Pellet wurde in 400 µl RNase-Lösung (150 mM Natriumacetat pH 5,9; 200 µg/ml RNase A; 10 mM Tris/HCL pH 7,5; 1 mM EDTA pH 8,0) gelöst. Nach einer Inkubationszeit von 30 – 60 min bei 37 °C wurde eine Phenol-Chloroform Extraktion durchgeführt. Die DNA aus der wässrigen Phase wurde durch Zugabe von 800 µl Ethanol gefällt. Nach einer Zentrifugation (30 min, 13000 Upm, 4 °C) wurde das Pellet in 100 µ TE-Puffer aufgenommen.

2.4.3 Restriktionsverdau

Restriktionsenzyme wurden unter den vom Hersteller empfohlenen Bedingungen in den mitgelieferten Puffern eingesetzt.

2.4.4 Entfernen von 3'-überhängenden Enden

Die zu behandelnden Fragmente wurden mit 2,5 U T4-Polymerase (Roche), je 0,5 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP in Anwesenheit des entsprechenden Puffers für 20 min bei 16 °C inkubiert. Danach wurde die Reaktion durch Zugabe von 20 mM EDTA gestoppt. Nach einer Phenol/Chloroform-Extraktion wurden die Fragmente über ein Agarosegel aufgetrennt und isoliert (siehe 2.4.5)

2.4.5 Auffüllen von 5'-überhängenden Enden

Um kohäsiv geschnittene DNA-Enden nach einer Restriktionsendonukleolyse in stumpfe Enden umzuwandeln, wurde eine Auffüllreaktion durchgeführt. Hierzu wurden 5'-überhängende DNA-Enden durch zugegebene dNTP (0,5 µl einer 25 mM Lösung) und Klenow-Fragment (3 U) in 30 min bei 37 °C zu Doppelsträngen ergänzt. Nach Inkubation von 15 min bei 72 °C und anschließender Phenol-/Chloroformextraktion wurde die DNA mit Ethanol gefällt und in TE-Puffer aufgenommen.

2.4.6 Dephosphorylierung von DNA

Die Dephosphorylierung von 5'-Enden lineare DNA wurde mit alkalischer Phosphatase nach den Angaben des Herstellers (Roche) durchgeführt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 20 mM EDTA gestoppt und das Enzym 10 min bei 65 °C inaktiviert. Daran schloss sich eine Phenol/Chloroform – Extraktion, gefolgt von einer Ethanol – Fällung der geschnittenen und dephosphorylierten DNA, an.

2.4.7 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Zur Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen (Agarose von Pharmacia) wurde der "QiexII DNA Gel Extraktion"- Kit der Firma Qiagen nach Vorschrift der Hersteller Firma Qiagen verwendet.

2.4.8 Molekulargewichts- und Größenstandards

DNA-Standard : λ-DNA (MBI Fermentas), welche mit *EcoRI/HindIII* oder mit *HindIII* geschnitten wurde.

Protein-Standard :HMW (prestained, von Sigma) mit 27, 37, 49, 58, 84, 116 und 180 kDa. 10 kDa Leiter (Gibco BRL)

2.4.9 Konzentrationsabschätzung von Nukleinsäuren

2.4.9.1 Photometrisch

Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm (Sambrook *et al.*, 1989). Die Berechnung erfolgte nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz:

$$A_{260} \cdot \varepsilon = c \text{ [ng/}\mu\text{l]}$$

Die Extinktion $E_{260} = 1$ entspricht 50 $\mu\text{g/ml}$ doppelsträngiger DNA bzw. 40 $\mu\text{g/ml}$ RNA sowie 33 $\mu\text{g/ml}$ Einzelstrang-DNA (Müller *et al.*, 1993)

2.4.9.2 Abschätzung im Agarosegel

Die Konzentration von Plasmid-DNA wurde in Agarosegelen anhand von Fragmenten vergleichbarer Größe und bekannter Konzentration abgeschätzt.

Chromosomale DNA wurde im Vergleich zu bekannten Mengen ungeschnittener DNA des Bakteriophagen λ abgeschätzt.

2.4.10 Nachweis spezifischer Sequenzen über Southernblot-Analyse

(Southern, 1977; Sambrook *et al.*, 1989)

2.4.10.1 Sondenmarkierung

Zur Markierung von DNA - Fragmenten wurde das Prinzip des "random priming" verwendet (Feinberg und Vogelstein, 1983). Die nicht-radioaktive Markierung von DNA erfolgte mit dem "DIG DNA Labeling and Detection Kit non radioactive" der Firma Roche. In einem Reaktionsansatz wurden 100-500 ng DNA über Nacht markiert. Die Konzentration der Sonde wurde vor der Hybridisierung im Vergleich mit einer Verdünnungsreihe mit markierter Kontroll-DNA abgeschätzt.

2.4.10.2 Transfer auf eine Nylonmembran durch Vacuum-Blot

1,5 bis 2 μg der zu untersuchenden DNA wurde in 100 μl Volumen über Nacht mit den entsprechenden Restriktionsenzymen (jeweils 10 U) geschnitten und dann in einem 1 %igen Agarosegel aufgetrennt, um anschließend in einer Vakuum-blotkammer (LKB 2016 VacuGene von Pharmacia) auf eine Hybond N-Nylonmembran (Amersham/Braunschweig) transferiert zu werden. Nach dem Anlegen eines konstanten Vakuums erfolgte eine dreiminütige Denaturierung (0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl), eine ebenfalls dreiminütige Neutralisierung (3 M NaAc, pH 5,5) und der Transfer der DNA für 45 min in 20x SSC (3 M NaCl; 0,3 M Na-Citrat, pH 7).

Zur Fixierung der DNA wurde die Membran für 3 min unter UV-Licht inkubiert oder bei 80 °C für 2 h gebacken.

2.4.10.3 Hybridisierung und Detektion

Einer mindestens einstündigen Prähybridisierung (5x SSC; 1 % Blockierungslösung [Roche]) in Maleinsäurepuffer [0,1 M Maleinsäure; 3 M NaCl; 0,3 % Tween20]; 0,1 % N-Laurylsarkosinat; 0,02 % SDS) der Membran bei 68 °C folgte die Hybridisierung, in der 10 ng, der kurz vorher für 10 min bei 95 °C denaturierten Sonde, pro ml Prähybridisierungslösung eingesetzt wurden. Der Hybridisierung bei 68 °C über Nacht folgten zwei Waschschrte in Lösung I (2x SSC; 0,1 % SDS) für je 15 min bei Raumtemperatur und ein

Waschschritt in Lösung II (0,1x SSC; 0,1 % SDS) für 15 min bei 68 °C. Nach der Blockierung unspezifischer Bindungsstellen für 45 min in 1 % Blockierungslösung bei Raumtemperatur erfolgte eine Inkubation für 45 min bei Raumtemperatur mit Antikörperkonjugat (polyklonale Schaf-Anti-Digoxigenin-Fab-Fragmente konjugiert mit alkalischer Phosphatase). Darauf folgten mindestens zwei Waschschritte in Maleinsäurepuffer für mindestens je 15 min. Nach einer Äquilibration der Membran in Puffer 3 (0,1 M Tris-HCl, pH 9,5; 0,1 M NaCl; 0,05 M MgCl₂) für 2 min folgte die Detektion in Puffer 3 mittels des durch die alkalische Phosphatase katalysierten Umsatzes von NBT (0,338 mg/ml) und X-Phosphat (0,175 mg/ml) zu einem blauen Farbstoff.

2.4.11 Nachweis spezifischer mRNA-Sequenzen über Northern Blot-Analyse

Für die Northern Blot-Analyse wurden 30 µg Gesamt-RNA mit einem denaturierenden Formaldehyd-Agarosegel aufgetrennt (4 h 100 V) und anschließend mit Hilfe eines Kapillarblots (Sambrook *et al.*, 1989) auf eine Nylonmembran (Hybond N, Amersham) übertragen. Die Fixierung der RNA auf der Membran erfolgte durch Bestrahlung mit UV-Licht (254 nm, 3 min) und anschließender Inkubation bei 80 °C (2 h). Vor der Zugabe der Sonde wurde die Membran für 1 h bei 42 °C mit Prähybridisierungslösung (5x SSPE; 50 % deionisiertes Formamid; 1 % Ficoll; 1 % Polyvinylpyrrolidon; 1 % BSA; 0,5 % SDS; 50 ng denaturierte Heringssperma-DNA) prähybridisiert. Anschließend wurde die markierte Sonde hinzugegeben und die Membran für 16 h bei 42 °C inkubiert. Die radioaktive Markierung der Sonde erfolgte nach dem Prinzip des „random priming“ (Feinberg und Vogelstein, 1983). In einem Reaktionsansatz von 20 µl kamen hierbei 20-50 ng denaturierter DNA sowie 50 µCi [α -³²P] dATP zum Einsatz. Die markierte DNA wurde anschließend über Sephadex -Säulen (Mobispin S200, MoBiTec) aufgereinigt und nach Denaturierung (10 min, 95 °C) zur Hybridisierung eingesetzt. Der Hybridisierung über Nacht folgten zwei je zehnminütige Waschschritte mit Waschlösung I (2x SSPE; 0,1 % SDS; Raumtemperatur) und Waschlösung II (1x SSPE; 0,1 % SDS; 50 °C). Die Detektion erfolgte durch Autoradiographie unter Verwendung von Röntgenfilmen (X-OMAT AR, Kodak) und eines Expositionsverstärkers (Biomax MS Screen, Kodak) bei -70 °C.

1x SSPE-Lösung: 180 mM NaCl; 10 mM NaH₂PO₄; 1 mM EDTA; pH 7,4

2.4.12 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) (Mullis und Fallona, 1987) diente zur Amplifizierung von DNA und zur Verifizierung von Transformanten. Sie wurde in einem Thermozykler der Firma Biometra durchgeführt. Zur Klonierung bestimmte PCR Fragmente wurden mit dem "QIAquick PCR-Purification"-Kit der Firma Qiagen aufgereinigt. Zur Verifizierung von Transformanten wurde die PCR auf ganzen Zellen einzelner Kolonien durchgeführt. Dazu wurde etwas Kolonie in 15 µl 0,02 M NaOH Lösung resuspendiert und für 10 min bei 95 °C inkubiert. Danach wurden die Zellen auf Eis aufbewahrt. Zur PCR wurden 2 µl der Suspension in einem Gesamtvolumen von 50 µl eingesetzt. Als Polymerase diente die „High Fidelity-Polymerase“ von Roche. In jedem Ansatz waren außerdem 2 % DMSO, 0,1 % Tween, 200 µM dNTP's, sowie je 20 pM des 3'- und des 5'-Primers enthalten. Als Puffer wurde einfach konzentrierter komplett Puffer von Hybaid mit MgCl₂ verwendet. Nach einer

Denaturierung des PCR-Ansatzes für drei Minuten bei 94 °C wurde die DNA über 20 Zyklen für Klonierungen und 40 Zyklen für Verifikationen amplifiziert. Danach folgte ein zehnminütiger Schritt (72 °C) zur Amplifikation nicht vollendeter DNA-Ketten. Die PCR zur Amplifizierung von DNA wurden auf chromosomaler DNA des Wildtypstammes SC5314 durchgeführt. Die Konzentrationen an dNTP's, Puffer und Primern entsprachen denen der Verifikations-PCR.

Primerkombinationen	Produktgröße	Annealing	Elongation
pcURA3/p2verFOA	1,7 kb	1 min, 50 °C	2 min, 68 °C
verP1/p2verFOA	1,2 und 2,0 kb	1 min, 50 °C	2 min, 72 °C
PMT2-1/p2verFOA	1,8 kb	1 min, 50 °C	2 min, 72 °C
verP1/p2verTET/	1,0 kb	1 min, 50 °C	1 min, 72 °
verP1/verP2k	1,0 kb	1 min, 50 °C	1 min, 72 °

Tab. 2.2: Primerkombinationen der Verifikations-PCR.

2.5 Transformation

2.5.1 Transformation von *E. coli*

Die Transformation von *E. coli* erfolgte nach der Rubidiumchlorid-Methode von Hanahan (1983).

2.5.2 Transformation von *S. cerevisiae*

Die Transformation von *S. cerevisiae* erfolgte nach der Li-Acetat Methode (Gietz und Schiestl, 1995).

2.5.3 Transformation von *C. albicans*

Die Transformation in *C. albicans* erfolgte nach der Sphäroplastenmethode von Sherman *et al.* (1986) bzw. nach der modifizierten Methode von Srikantha *et al.* (1996). Eine 200 ml YPD-Kultur wurde bei einer OD_{600 nm} von 0,6-0,8 durch fünfminütiges abzentrifugieren bei 3000 Upm geerntet. Die Zellen wurden in 20 ml dH₂O gewaschen und für 10 min bei 30 °C in 20 ml SED (1 M Sorbitol; 25 mM EDTA pH 8,0; 10 mM DTT) inkubiert. Nach einer erneuten Waschung in 1 M Sorbitol wurden die Zellen in 20 ml SCE (1 M Sorbitol; 0,1 M Na-Citrat pH 5,8; 10 mM EDTA pH 8,0) mit 0,1 mg Zymolyase 100T bei 30 °C für 10-20 min sphäroplastierte. Der Abbau der Zellwand wurde lichtmikroskopisch überprüft. Anschließend wurden die Zellen zweimal in 20 ml 1 M Sorbitol und einmal in 20 ml STC (1 M Sorbitol; 10 mM CaCl₂; 10 mM Tris-HCl pH 7,5) gewaschen und in 1 ml STC resuspendiert. Die so erhaltenen Zellen konnten bei 4 °C für vier Wochen ohne Verringerung ihrer Transformationskompetenz gelagert werden. Zur Transformation wurden 100 µl Sphäroplasten mit 10 µg Carrier-DNA und 1,5 – 2,5 µg DNA zusammengegeben und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 1 ml PEG-Lösung (20 % PEG400; 10 mM CaCl₂; 10 mM Tris-HCl pH 7,4) erfolgte eine weitere Inkubation für 10 min bei Raumtemperatur. Nach einer Zentrifugation für 5 min bei 2500 Upm folgte ein

Regenerationsschritt bei dem die Zellen in 150 µl SOS (1 M Sorbitol; 33,5 % YPD; 6,5 mM CaCl₂) für 20 min bei 30 °C inkubiert wurden. Die Zellen wurden dann in 5 ml Top-Agar auf SD-Sorbitol Platten ausplattiert und für 3-5 Tage bei 30 °C inkubiert.

Alternativ wurde für die Transformation von Plasmiden eine Li-Acetat-Methode verwendet. Hierbei wurden 200 µl einer über Nacht Kultur abzentrifugiert und in 100 µl 10 x OSB-Mix (0,2 ml 1 M LiAc; 0,8 ml 50 % PEG 8000; 15 mg DTT; 250 µg Einzelstrang-DNA) aufgenommen. Nach Zugabe der zu transformierenden DNA wurden die Zellen gemischt und 60 min bei 43,5 °C inkubiert. Anschließend wurden sie auf Selektionsplatten ausplattiert und bei 30 °C drei Tage inkubiert.

2.6 Analyse von Proteinen

2.6.1 Antikörper

Primärantikörper	Anti-Flag, monoklonal, Maus, 1:1000 (Stratagene)
	Anti-Myc, monoklonal, Maus 1:500,(Roche)
	Anti-HA, monoklonal Maus 1:500 (Roche)
	Anti-Pir2 Serum, polyklonal Kaninchen 1:1000 (Marja Makarow)
	Anti-Als1p, polyklonal, Kaninchen, 1:10.000 (L.L. Hoyer)
	Anti-Gp115, polyklonal, Kaninchen, 1:3000 L- Popolo (Vai <i>et al.</i> , 1996)
	Anti-Int1p, polyklonal, Kaninchen, 1:100, M.K. Hostetter (Gale <i>et al.</i> , 1998)
	Anti-Ubiquitin, polyklonal Maus, 1:200 (Babco)
Sekundärantikörper	Anti-Maus, polyklonal Ziege, konjugiert mit Peroxidase, 1:60000 (Jackson Immunologie Research Lab. Inc.)
	Anti-Kaninchen, polyklonal Ziege, konjugiert mit Peroxidase, 1:100000 (Jackson Immunologie Research Lab. Inc.)

2.6.2 Herstellung von Hefe-Rohextrakten

Zur Herstellung der Rohextrakte wurde eine Vorkultur in 5 ml SD Casa auf eine OD_{600 nm} von 0,15 angeimpft und über Nacht auf eine OD_{600 nm} von 4-6 wachsen gelassen. Die Kultur wurde für 5 min bei 3500 Upm abzentrifugiert und das Pellet in 5 ml RE-Puffer (50 mM HEPES-KOH, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1 % Triton-X-100) gewaschen. Das Pellet wurde über Nacht bei -20 °C eingefroren. Danach wurden die Zellen in 500 µl RE-Puffer resuspendiert und mit 500 µl Glasperlen in einem 2 ml Reaktionsgefäß auf einem Vibrax (VX 2E, Janke und Kunkel) bei 4 °C bei 2200 Upm für 10 min aufgeschlossen. Anschließend wurde der Überstand abgenommen, die Glasperlen mit 500 µl RE-Puffer gewaschen und der Überstand erneut abgenommen. Die Überstände wurden vereinigt und Zelltrümmer und Glasperlen wurden von dem klaren Überstand durch Zentrifugation (3 min, 3500 Upm) abgetrennt. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration wurden die Extrakte eingefroren.

2.6.3 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Die Proteingehaltsbestimmung nach Bradford (1976) beruht darauf, dass der Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G 250 sein Absorptionsmaximum nach der Bindung an Proteine von

465 nm auf 595 nm verschiebt. Es wurden 1-15 µg Protein auf ein Gesamtvolumen von 0,8 ml mit Wasser verdünnt und mit 0,2 ml „BioRad Protein Assay Dye Reagent“ (BioRad) versetzt. Das Gemisch wurde 15 min bei RT inkubiert und die Messung erfolgte in einem Photometer bei 595 nm. Als Standard wurde eine Eichkurve mit 1-15 µg BSA erstellt.

2.6.4 Bestimmung der Luziferase Aktivität

Die Luziferase-Aktivität wurde unter Verwendung des „Dual-Luziferase Assay System“ der Firma Promega in einem Luminometer der Marke Fluoroskan Ascent FI der Firma Labsystems bestimmt. In weißen 96er Platten der Firma Labsystems (cliniplate) wurden 100 µl LARII-Reagenz vorgelegt und die Reaktion durch Zugabe von 10 µl Rohextrakt gestartet. Über einen Zeitraum von 10 Sekunden wurde unmittelbar nach Zugabe des Rohextraktes die Hintergrundaktivität bestimmt, welche jedoch unter der Nachweisgrenze lag. Nach Zugabe von 100 µl Stop&Glo-Reagenz wurde über 10 Sekunden die Aktivität der Luziferase bestimmt. Die Enzymaktivität wurde nach der Bestimmung der Proteinkonzentration (siehe 2.6.3) auf den Proteingehalt der Probe bezogen.

2.6.5 N-Glykosylierung

Zum Nachweis der Art der Glykosylierung wurde eine PNGase F (Peptid:N-glycosidase F aus *Flavobacterium meningosepticum*, Roche) Behandlung der Rohextrakte durchgeführt. PNGase F ist eine Amidase, die zwischen dem Asparagin und dem ersten GlcNAc (N-Acetylglukosamin) der Glykosylketten in N-glykosylierten Proteinen spaltet. Rohextrakte (30 µg Protein) wurden mit 1/10 Volumen Denaturierungspuffer (5 % SDS, 10 % β-Mercaptoethanol) versetzt und für 10 min auf 95 °C erhitzt. Nach Zugabe von 1/10 Volumen Reaktionspuffer (0,5 M Na-Citrat pH 7,5), 1/10 Volumen 10 % Detergenz NP-40 (hebt aus unbekannten Gründen die Hemmung der PNGase F durch SDS auf) und 1 µl PNGase F (10 U) wurde der Ansatz für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Der Ansatz wurde mit Probenpuffer versetzt und es folgte ein immunologischer Nachweis der Proteine.

2.6.6 Immunpräzipitation

Der Zellaufschluss erfolgte zunächst wie in 2.6.2 beschrieben. Zu 200 µl denaturierter Probe wurden 800 µl IP-Dilutionspuffer (1,25 % Triton X-100; 6 mM EDTA; 60 mM Tris/HCl; pH 7,6) gegeben. Nach zweiminütiger Zentrifugation bei 13000 Upm wurde unlösliches Zellmaterial abgetrennt und der Überstand in 1,5 ml „Safe-Lock“ Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. Nach Inkubation mit 5 µl Anti-Flag-Antikörper (Stratagene) bei 4 °C, über Nacht und leichtem Invertieren wurden die Proben mit 50 µl 20 %iger Protein-A-Sepharose-Lösung (20 % Protein-A-Sepharose in IP-Puffer, siehe unten) versetzt und weitere 4 h bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde dreimal mit IP-Puffer (1 % Triton X-100; 0,2 % SDS; 150 mM NaCl; 50 mM Tris/HCl, pH 7,6; 5 mM EDTA) gewaschen. Das Sepharose-Pellet wurde mit 50 µl IP-Puffer, 50 µl 2x Laemmli-Puffer und 100 mM DTT versetzt und 10 min bei 95 °C inkubiert. Zur Auftrennung wurden 20 µl auf ein 8%iges SDS-Gel geladen und elektrophoretisch aufgetrennt.

2.6.7 Pulse-Chase

Für Pulse-Chase-Experimente wurden Hefezellen in Na-Laktat-Medium über Nacht vorgezogen und aus dieser Vorkultur wurde wiederum über Nacht eine 40 ml Kultur in Na-Laktat-Medium angeimpft. Es wurden 20 OD_{600 nm}-Einheiten logarithmisch wachsender Zellen abzentrifugiert und in 2,5 ml frischem Na-Laktat-Medium aufgenommen. Nach 20 min Vorinkubation bei 30 °C wurde die radioaktive Markierung neu synthetisierter Proteine durch Zugabe von 100 µCi [³⁵S]-Methionin („Pulse“) begonnen (TRAN³⁵S-LABEL™, ICN). Nach den im Ergebnisteil angegebenen Zeiten wurde 1/50 Volumen konzentrierter „Chase-Lösung“ (0,3 % Cystein; 0,4 % Methionin) zugegeben („chase“). Nach den angegebenen Zeiten wurden Aliquots zu je 500 µl abgenommen, 1 min bei 13000 Upm zentrifugiert und in 1 ml kalter 10 mM NaN₃-Lösung aufgenommen. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet in 110 µl Lysis-Puffer (0,3 M Sorbitol; 50 mM HEPES; 10 mM NaN₃; pH 7,5) aufgenommen und in ein 2 ml „Safe-Lock-Eppendorf-Reaktionsgefäß“ mit 250 mg Glasperlen (0,25-0,50 mm Glasperlen, ROTH) überführt. Der Aufschluß erfolgte durch siebenminütiges Schütteln auf einem Vibrax (VX 2E, Janke & Kunkel). Nach Zugabe von 100 µl 2x Laemmli-Puffer wurden die Zellextrakte 10 min bei 95 °C denaturiert und bis zur weiteren Verarbeitung auf Eis gesammelt.

2.6.8 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen erfolgte nach einer modifizierten Methode von Laemmli (1970). Hierzu wurden denaturierende SDS-Gele verwendet, deren Polyacrylamid-Konzentration zwischen 8 und 12 % variierte. Zunächst wurde das untere Trenngel (0,375 M Tris pH 8,8; 0,1 % SDS; 0,8 % APS; 0,1 % TEMED; 8-12 % Acrylamid) gegossen, welches sofort nach dem Gießen mit Wasser gesättigtem Butanol überschichtet wurde. Nach erfolgter Polymerisation (ca. 1 h) wurde der Butanol mit Wasser herausgespült und das Sammelgel (0,125 M Tris pH 6,7; 0,1 % SDS; 0,8 % APS; 0,1 % TEMED; 5 % Acrylamid) über das Trenngel gegossen. Zum Gießen der Gele wurde eine Apparatur von Hoefer Scientific (San Francisco, USA) verwendet. Alternative wurde die XCell SureLock™ Mini-Cell Gelapparatur der Firma Invitrogen verwendet.

Vorbereitung der Proben:

Die aufzutrennenden Proteine wurden sofort nach der Präparation im Verhältnis 2:1 mit 3x Laemmli-Puffer (30 % Glycerin, 6 % SDS, 188 mM Tris/HCl pH 6,8, 15 % β-Mercaptoethanol, 0,006 % Bromphenolblau; Laemmli, 1970) vermischt und 10 min bei 95 °C denaturiert. Die Proteine im Gel wurden ggf. mit Coomassie [0,3 g Coomassie-Brilliantblue G250; 1,5 ml Methanol; 30 g TCA; ad 30 ml aqua bidest., filtrieren; 180 ml 50 % (w/v) TCA] angefärbt und anschließend wurde das Gel bis zur gewünschten Blaufärbung wieder entfärbt [15 % (v/v) Methanol; 7,6 % (w/v) Essigsäure].

Molekulargewichtsstandard:

Als Größenstandard für Proteine wurde der „High molecular weight marker“ (HMW, prestained) der Firma Sigma genutzt. Die Proteine haben eine molekulare Masse von 185, 116, 84, 61,5, 55, 360 und 310 kDa. Alternativ wurde der SeeBlue Plus2 Proteinstandard der Firma Invitrogen benutzt. Die Proteine haben molekulare Massen von 250, 148, 98, 64, 50, 36, 22, 16, 6 und 4 kDa

2.6.9 Nachweis spezifischer Proteine durch Immunoblot-Analyse

Der Transfer elektrophoretisch aufgetrennter Proteine aus dem SDS-Polyacrylamidgel auf eine Immobilon-P-Membran (PVDF-Membran von Millipore, Eschborn) erfolgte im Tankblot-Verfahren (Towbin *et al.*, 1979). Die Membran wurde wie vom Hersteller empfohlen vorbehandelt. Die Übertragung der Proteine auf die Membran erfolgte im Transferpuffer (25 mM Tris; 192 mM Glycin; 20 % Methanol) über Nacht bei 150 mA. Alternativ erfolgte der Proteintransfer mit dem „XCell Blot Module“ auf eine Nitrocellulosemembran nach Angaben des Herstellers Invitrogen.

Potentielle unspezifische Bindestellen auf der PVDF-Membran wurden, nach kurzem Anfeuchten in TBS (50 mM Tris; 150 mM NaCl; pH 7,5), für 1 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C in 1 % „Blocking“-Lösung (Roche) blockiert. Anschließend wurde die Membran mindestens 1 h unter leichtem Schütteln mit dem ersten Antikörper inkubiert. Zur Entfernung nichtgebundener Antikörper wurden die Filter zweimal mit TBST-Puffer [0,1 % (w/w) Tween-20 in TBS] und zweimal mit 0,5 % „Blocking“-Lösung bei RT jeweils 10 min gewaschen. Es folgte eine Inkubation (1 h) mit dem entsprechenden Zweitantikörper in 1 % „Blocking“-Lösung.

Zur Entfernung unspezifischer Bindungen wurde die Membran viermal mit TBST-Puffer für 15 min gewaschen. Nach kurzem Waschen in PBS (140 mM NaCl; 3 mM KCl; 8 mM Na₂HPO₄; 1,8 mM KH₂PO₄; pH 7,4) erfolgte die Detektion durch die Verwendung des Chemilumineszenz-substrates „Super-SignalULTRA“ (Pierce) entsprechend der Anweisung des Herstellers und Röntgenfilmen (Fuji).

2.7. DNA-Mikroarrays

Die Methode der DNA-Mikroarrays ermöglicht den Vergleich von genomweiten Genexpressionsprofilen. Es können Gene identifiziert werden, welche nur unter bestimmten Bedingungen exprimiert sind. Hierbei wird aus Gesamt-RNA mittels einer Reversen-Transkriptase-Reaktion eine mit den Fluorochromen Cy3 oder Cy5 markierte Komplementär-DNA (cDNA) hergestellt. Die unterschiedlich markierte cDNA von zwei zu vergleichenden Proben wird vereinigt und zur Hybridisierung auf einen DNA-Chip gegeben. Auf diesem Glasobjekträger ist die DNA der zu untersuchenden offenen Leseraster (ORF) fixiert. Durch Scannen der DNA-Chips mit zwei verschiedenen Wellenlängen (532nm für Cy3 und 640 nm für Cy5) erfolgt anschließend eine Quantifizierung der hybridisierten cDNA. Der Vergleich der Signalintensitäten der beiden Wellenlängen liefert dann eine Aussage über die Regulation einzelner Gene. Die Beschreibung der Methode wurde bei Doedt (2003) entnommen.

2.7.1. Anzucht der Zellen

Für den Vergleich von Deletionsmutanten mit dem Wildtyp, wurden die Stämme ausgehend von einer Übernachtskultur in 50 ml frisches YPD-Medium auf eine OD_{600 nm} = 0,05 angeimpft. Die Zellen wurden dann bis zu einer OD_{600 nm} = 0,5 wachsen gelassen und durch Zentrifugation geerntet (5 min, 3.500 Upm).

2.7.2 Präparation von RNA aus *C. albicans*

Für die Isolierung von Gesamt-RNA wurden die Zellen einer 50 ml Kultur bei einer OD_{600 nm} = 0,6 durch Zentrifugation (5 min, 3500 Upm) pelletiert. Nach Abgießen des Überstandes

wurde das Zellpellet im verbleibenden Überstand resuspendiert. Die Zellsuspension wurde langsam in flüssigen Stickstoff getropft, so dass gefrorene Zellkugeln entstanden. Die gefrorenen Zelltropfen wurden bei -80 °C gelagert. Zum Zellaufschluss wurden die gefrorenen Zelltropfen zusammen mit einem Metallkügelchen ($\varnothing$ 7mm) in ein gekühltes Teflongefäß gegeben und in einem Micro-Dismembrator (B. Braun Biotech International GmbH, Melsungen) für 2 min bei 2.600 Upm gerüttelt. Der Zellstaub wurde anschließend in 2 ml Trizol[®] (Invitrogen) resuspendiert und nach Überführung in 2 Reaktionsgefäße (Eppendorf) für 1 min geschüttelt. Nach fünfminütiger Inkubation bei RT wurden die Zelltrümmer durch Zentrifugation (10 min, 12000 Upm) pelletiert und der Überstand zusammen mit 0,4 Volumen Chloroform in ein neues Gefäß überführt. Die Proben wurden nun für 15 sec geschüttelt und erneut nach 10 min Inkubation zentrifugiert (5 min, 12000 Upm). Anschließend wurde die obere Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die RNA durch Zugabe von 0,5 Volumen Isopropanol für 15 min bei RT präzipitiert. Die RNA wurde nun pelletiert (10 min, 12000 Upm) einmal mit 70 % Ethanol (4 °C) gewaschen und nach lufttrocknen in 500 µl mit DEPC (0,1 %) behandeltem Wasser aufgenommen. Anschließend wurde die RNA erneut durch Zugabe von 500 µl LiCl-Puffer (4 M LiCl; 20 mM Tris/HCl pH 7,5; 10 mM EDTA) bei -20 °C über Nacht präzipitiert. Nach Auftauen der Probe wurde die RNA durch Zentrifugation (30 min, 13000 Upm) pelletiert und anschließend 2-mal mit 70 % Ethanol (4 °C) gewaschen. Das RNA-Pellet wurde dann für 15 min luftgetrocknet und anschließend in 50 µl mit DEPC behandeltem Wasser aufgenommen.

2.7.3 Synthese der Komplementär-DNA

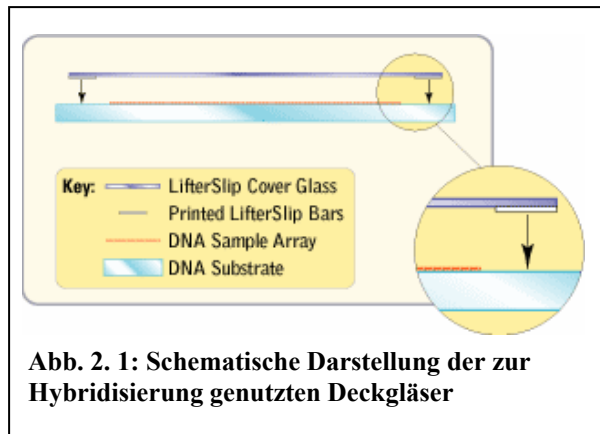
Mit Hilfe einer Reversen-Transkriptase-Reaktion und Fluorochrom-modifizierter Nukleotide (Cy3- bzw. Cy5 dCTP) wurde eine farblich markierte cDNA aus Gesamt-RNA hergestellt. Die folgenden Reaktionen wurden soweit wie möglich unter Lichtausschluss durchgeführt, da die benutzen Fluorochrome lichtempfindlich sind. Der Reaktionsansatz (Tab. 2.3) wurde nach fünfminütiger Denaturierung bei 65 °C für 5 min auf 42 °C abgekühlt, mit 3 µl Rnasin (Promega) sowie mit 3 µl Superscript II RT (Invitrogen) versetzt und für 2 h bei 42 °C inkubiert. Nach 1 h wurden weitere 3 µl Enzym hinzugefügt. Durch Zugabe von 15 µl EDTA (50 mM, pH 8,0) wurde die Reaktion gestoppt. Zur Degradation der RNA wurde der Ansatz dann mit 10 µl NaOH-Lösung (10 M) versetzt und für 20 min bei 65 °C inkubiert. Nach Neutralisierung des Ansatzes mit 20 µl Essigsäure (5 M) wurde die cDNA mit Hilfe des Qiaquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben aufgereinigt. Die Elution der cDNA von den Säulen erfolgte abweichend vom Herstellerprotokoll mit 2 x 50 µl auf 42 °C vorgewärmtem Wasser. Nach Vereinigung der zwei Eluate wurden diese mit Hilfe von Microcon-YM30 Säulen (Millipore) auf ein Volumen von 10 µl aufkonzentriert.

Komponente	Volumen [µl]
5x Erststrang Puffer	24
<i>C. albicans</i> specific primer mix (0,1 pmol/µl)	3
AncT mRNA primer (1,5 µg/µl)	3
Oligo dT18-21 (0,5 µg/µl)	6
10 mM dNTP-dCTP	18

1 mM dCTP	3
1 mM Cy3- oder Cy5 dCTP	4,5
0,1 M DTT	12
RNAsin	3
Gesamt RNA	x µl (30 µg)
	ad H ₂ O 120 µl

Tab. 2.3: Reaktionsansatz zur Herstellung von markierter cDNA aus Gesamt-RNA

2.7.4 Hybridisierung und Waschen der DNA-Mikroarrays



Es wurden Mikroarrays der Firma Eurogentec, Belgien genutzt, welche die DNA von 6039 offenen Leserastern des *C. albicans* Stammes SC5314 tragen. Jedes PCR-Produkt ist hierbei zweimal auf einem Glasobjektträger platziert. Zum Zweck der Hybridisierung wurden die Objektträger mit einem Deckglas mit seitlichen Rändern (Erie Scientific Componay, USA) bedeckt. Je 10 µl der zu vergleichenden markierten cDNA (Cy3 und Cy5) wurden zusammen mit 10 µl

Heringsperma-DNA (10 mg/ml) für 2 min bei 95 °C denaturiert und anschließend für 2 min auf Eis gekühlt. Die Probe wurde nun mit 60 µl Hybridisierungspuffer (Roche) versetzt und dann seitlich unter den Rand des Deckglases pipettiert. Durch Kapillarkräfte wird die Hybridisierungslösung unter das Deckglas gezogen. Der Objektträger wurde dann in eine Hybridisierungskammer (Corning) gelegt und am Rand mit zweimal 10 µl Wasser versehen. Die Hybridisierung erfolgte im Wasserbad für 24 h bei 42 °C. Die Objektträger wurden anschließend aus den Hybridisierungskammern entnommen und mit mäßiger Bewegung zweimal für 10 min mit Waschlösung 1 (30 mM NaCl, 3 mM Citrat, 0,1 % SDS) und zweimal für 10 min mit Waschlösung 2 (30 mM NaCl, 3 mM Citrat) gewaschen. Anschließend wurden die Objektträger durch Zentrifugation (6 min, 550 Upm) getrocknet.

2.7.5 Scannen der DNA-Mikroarrays

Die DNA-Mikroarray Objektträger wurden mit einem Scanner der Firma Fuji (FLA-8000) bei einer Auflösung von 10 µm eingescannt. Für Cy3 markierte DNA wurde mit einer Wellenlänge von 532 nm und für Cy5-markierte DNA bei einer Wellenlänge von 640 nm gescannt. Die Quantifizierung der Signale und des Signalhintergrunds erfolgte mit dem Programm AIDA Array Metrix (Raytest).

2.7.6 Normalisierung und statistische Auswertung

Die Rohdaten wurden mit Hilfe des Programms Genespring (Silicon Genetics) ausgewertet. Hier wurde eine Intensitätsabhängige (niedrigste) Normalisierung durchgeführt. Die normalisierten Daten wurden anschließend in das Programm Excel (Microsoft) exportiert. Da jedes Gen auf den benutzten Arrays doppelt vorhanden ist und pro Experiment mindestens drei

Replikate durchgeführt wurden, ergeben sich so für jedes Gen mindestens sechs Signalintensitätsverhältnisse (Intensität Experiment dividiert durch Intensität Referenz). Als reguliert wurde nur diese Gene bezeichnet, bei denen der Mittelwert aus den sechs Einzelwerten eine mindestens 1,5-fache Änderung zeigte und welche eine durch das Programm SAM (<http://www-stat.stanford.edu/~tibs/SAM>) ermittelte statistische signifikante Abweichung zeigten. Bei der statistischen Auswertung mit SAM wurde ein Delta-Wert nach folgenden Kriterien ausgewählt. Wenn der minimal angezeigte FDR-Wert (false discovery rate) über 5 % lag wurde dieser entsprechende Delta-Wert für die statistische Auswertung genommen. Falls der minimale FDR-Wert unter 5 % lag, wurde ein Delta-Wert der einem 5 %igen FDR-Wert entspricht gewählt, außer wenn dies zu über 1000 signifikant regulierten Genen führte. In diesem Fall, wurde ein Delta-Wert gewählt, der einer FDR von 1 % entspricht.

2.7.7 Clusteranalysen

Für Clusteranalysen wurden die Daten aller Replikate eines Experimentes gemittelt und dann in das Programm Genespring importiert. Die Clusteranalysen mit den jeweils angegebenen Genen wurden mit Genespring nach Standardbedingungen durchgeführt.

2.8 Zellwandanalyse

Die Zellwandanalyse erfolgte nach einer von A. Martinez (Universität Valencia) zur Verfügung gestellten Anleitung, wie in Moreno *et al.* (2003) beschrieben.

2.8.1 Isolierung von SDS extrahierten Zellwänden

Es wurden 500 ml Kulturen der zu analysierenden Stämme bis zu einer OD_{600 nm} von etwa 2,5 (18-20h) in SD-Medium wachsen gelassen. Diese 500 ml sollten in etwa 1g SDS extrahierte Zellwände resultieren. Die Zellen wurden durch Zentrifugation für 5 min bei 3500 Upm geerntet. Die Zellen wurden anschließend dreimal mit 50 ml eiskaltem Wasser, welches 1mM PMSF enthielt, gewaschen. Die Zellen wurden nun für mehrere Stunden eingefroren. Nach dem Auftauen wurde das gleiche Volumen an Glassperlen zugesetzt und die Zellen mindestens 10 x 1min gevortext. Nach jeweils einer Minute wurden die Zellen immer wieder für eine Minute auf Eis gestellt. Der Zellaufschluss wurde mikroskopisch überprüft. Die Extrakte wurden nur bei nahezu 100 %igem Aufschluss zur Analyse verwendet. Die Extrakte mit den Glasperlen wurden nun vier-fünfmal mit 50 ml eiskaltem Wasser + 1 mM PMSF gewaschen und die Überstände durch Dekantieren gesammelt. Die gesammelten Überstände wurden für 10 min bei 3000 Upm zentrifugiert. Die erhaltenen Zellwände wurden in 3 Volumen 2 % SDS aufgenommen und für 10min bei 100 °C erhitzt. Danach wurden sie für 5 min bei 3500 Upm abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Diese Extraktion wurde einmal wiederholt. Das SDS wurde anschließend durch mindestens zehnmaliges waschen mit eiskaltem, 1mM PMSF enthaltenden, Wasser entfernt. Von den erhaltenen SDS extrahierten Zellwänden wurden Aliquots von 2x 100 mg und einmal 50 mg Nassgewicht abwogen.

2.8.2 Bestimmung des Mannoproteingehalts

100 mg Nassgewicht der SDS-extrahierten Zellwänden wurden lyophilisiert und das Trockengewicht der lyophilisierten Zellwände notiert. Den Zellwände wurde 1 ml 1 M NaOH

hinzugefügt und für 30 min bei 100 °C erhitzt. Nach einer 10minütigen Zentrifugation bei 12000 Upm wurde der Überstand abgenommen und der Proteingehalt bestimmt (siehe 2.6.3).

2.8.3 Bestimmung des Chitingehalts

Die Bestimmung des Chitingehalts wurde wie bei Specht *et al.* (1996) beschrieben durchgeführt. Im Detail wurden 50 mg Nassgewicht der SDS extrahierten Zellen lyophilisiert und das Trockengewicht bestimmt. Anschließend wurden die Zellwände mit 1 ml 6 N HCl versetzt und in Glassampulle verschlossen bei 100 °C für 17 h inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Flüssigkeit unter dem Abzug bei 65 °C verdampft. Der Rückstand wurde in 1ml Wasser resuspendiert. GlcNAc Konzentrationen wurden wie bei Reissig *et al.* (1955) bestimmt. Zu 0,1 ml der erhaltenen Suspension wurde 0,1 ml Lösung A (1,5 N Na₂CO₃ in 4 % Acetylaceton) hinzugefügt und für 20 min bei 100 °C erhitzt. Darauf wurden 0,7 ml EtOH (96 %) hinzugefügt und die Proben für 1h bei RT stengelassen. Nach Zugabe von 0,1 ml Lösung B (1,6 g p-dimethylaminobenzaldehyde in 30 ml konz. HCl und 30 ml ETOH) wurde die Absorption bei 520 nm gemessen. Eine Standardkurve wurde mit Glukosamin (0-200 mg) hergestellt, dabei wurden die Proben der Standardkurve genauso wie die anderen Proben, einschließlich des HCl Schrittes, behandelt.

2.8.4 Bestimmung des Glukangehalts

Nach einer von Dijkgraaf *et al.* (1996) modifizierten Methode wurde der Glukangehalt bestimmt. Dazu wurde 100 mg Nassgewicht der SDS extrahierten Zellwände lyophilisiert und deren Trockengewicht protokolliert. Den lyophilisierten Zellwänden wurde 1 ml 3 % NaOH hinzugefügt, anschließend wurden sie bei 75 °C für 1 h erhitzt. Nach einem Zentrifugationsschritt von 10 min bei 3000 Upm wurde der Überstand verworfen und der NaOH Schritt zweimal wiederholt. Anschließend wurde das Pellet zweimal mit 0,1 M Tris-HCl pH 7,5 und einmal mit 10 mM Tris-HCl pH 7,5 gewaschen. In einem Volumen von 1ml 10 mM Tris-HCl pH 7,5 mit 1 mM PMSF wurde 1 mg/ml Zymolyase 20T pro Gramm Nassgewicht zugegeben. Das ganze wurde über Nacht bei 37 °C inkubiert. Unlösliches Material wurde durch zentrifugieren bei 13000 Upm für 15 min entfernt. 400 µl des Überstandes (beinhaltet β1,6-Glukan und geschnittenen β1,3-Glukan) wurden aufbewahrt. Die restlichen 600 µl wurden über Nacht gegen Wasser dialysiert, dabei wurde dreimal das Wasser gewechselt. Das Dialysat, welches das β1,6-Glukan enthielt wurde aufbewahrt. Die Kohlenhydrate der Proben wurden mittels der Dubois Methode (siehe 2.8.5) bestimmt, wobei der Unterschied zwischen nicht dialysiertem und dialysiertem Material den β1,3-Gehalt ausmacht.

2.8.5 Kohlenhydrat-Bestimmung mittels der Dubois Methode

Zur Kohlenhydrat-Bestimmung nach Dubois (Dubois *et al.*, 1956) wurden die zu analysierenden Proben mit Wasser auf ein Volumen von 2 ml abgeschätzt. Der Probe wurden 50 µl Phenol (80 %) hinzugefügt und danach sofort mit 5 ml Schwefelsäure (98 %)versetzt. Nachdem die Probe gut gemischt wurde folgte eine 30minütige Inkubation. Anschließend wurde die Absorbion bei 490 nm gemessen. Die Ergebnisse wurden anhand einer Standardkurve mit Glucose (0-100 µg) quantifiziert. Die Ergebnisse wurden in µg/100 mg

Nassgewicht oder in Trockengewicht der Zellwände (das Trockengewicht ist etwa 1/10 des Nassgewichts) oder in relativem Verhältnis zum Wildtyp (Wert =1) angeben

2.9 Knospenzählung/ Calcofluor White-Färbung

Zur Zellwand- bzw. Knospenfärbung von *C. albicans* wurde der Farbstoff Calcofluor White, der in das Chitin der Zellwand interkaliert (Pringle, 1991) genutzt. Hierzu wurde der Farbstoff in einer Konzentration von 2 µg/ml den Zellen hinzugefügt. Die Zellen wurden nach fünfminütiger Inkubation dreimal in dH₂O gewaschen und anschließend im Fluoreszenzmikroskop bei einer Wellenlänge 365 nm betrachtet. Zur Bestimmung des Knospungsverhaltens wurden sowohl die Knospungsnarben, als auch die tatsächlichen Knospen ausgezählt. Es wurden je Zählung 200 Zellen ausgezählt und das Verhältnis von axial zu bipolar knospenden Zellen in Prozent angegeben.

2.10 Mikroskopische Untersuchungen

Alle mikroskopischen Untersuchungen wurden mit einem Zeiss Axioskop durchgeführt. Die Bilder wurden mit einer CCD-Kamera (Sony) aufgenommen und mit dem Programm „Corel Photopaint 9.0“ nachbearbeitet.

2.11 Elektronenmikroskopie

Es wurde eine Zellfixierung durch Kaliumpermanganat gewählt. Dazu wurden die *C. albicans* Zellen während ihrer logarithmischen Wachstumsphase für 10 min bei RT mit Glutaraldehyd (0,6 %) versetzt und anschließend geerntet und mit dH₂O gewaschen. Durch Rücklösen in Kaliumpermanganat (4 %ig in dH₂O) und wenigstens 4 Stunden Schütteln bei 4 °C wurden die Zellen vollständig fixiert. Anschließend wurden die Zellen fünfmal mit dH₂O gewaschen und in Uranylacetat (2 %ig in dH₂O) über Nacht bei 4 °C gelagert. Es folgte eine stufenweise Entwässerung der Zellen in Ethanol (15 %ig, 30 %ig, 50 %ig, 70 %ig in 200 mM Cacodylatpuffer), wobei je 30 min pro Stufe gewaschen wurde. Nach mindestens 8 Stunden in 70 % Ethanol bei 4 °C wurden die Zellen in 100 %igem Ethanol vollständig dehydriert. Nach einer Reihe von Waschungen mit 1,2-Epoxypropylenoxid (30 %ig, 50 %ig, 70 %ig und 100 %ig in Ethanol) wurden die Zellen dann in Harz (Epon 812) eingebettet. Die Harzeinbettung wurde wie bei Luft *et al.* (1961) angegeben durchgeführt. Anschließend wurden Schnitte von den Präparaten angefertigt, die mit 2 %igem wässrigem Uranylacetat und Reynold's Eisencitrat angefärbt wurden. Für die elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurde ein Philips Model 301 eingesetzt. Die Präparation der Zellen wurde unter Anleitung von Dr. U. J. Santore (Universität, Düsseldorf) durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1 Datenbankanalyse und Sequenzvergleich der Pmt-Proteinfamilie

Im Rahmen der vollständigen Sequenzierung und Annotierung des *C. albicans* Genoms (<http://www-sequence.stanford.edu/group/candida/>) wurde ein weiteres Mitglied der *PMT*-Genfamilie entdeckt. Aufgrund seiner Sequenzidentität zu den in *S. cerevisiae* existierenden sieben *PMT*-Genen wurde der *orf6.8819* mit *PMT2* bezeichnet (Tab. 3.1). *CaPMT2* besitzt zu 60 % die gleichen Aminosäuren wie sein Homolog aus *S. cerevisiae*. Zu *ScPMT3* besitzt *CaPMT2* noch 56 % Sequenzidentität und zu *ScPMT6* 46 %. Die hohen Sequenzidentitäten mit den genannten Homologen aus *S. cerevisiae* führen zur Einordnung der Pmt-Proteine in Subfamilien. Wie in dem phylogenetischen Stammbaum in Abb. 3.1 zu sehen ist, lässt sich die Pmt-Proteinfamilie in Pilzen in drei Subfamilien unterteilen. Die Pmt1-Familie beinhaltet neben Pmt1-Proteinen zusätzlich Pmt5p und Pmt7p. In der Pmt2-Familie sind neben Pmt2p zusätzlich Pmt3- und Pmt6-Proteine enthalten. Die Pmt4-Familie besteht ausschließlich aus Pmt4-Proteinen. In allen vollständig sequenzierten Genomen von Pilzorganismen beträgt die Mindestanzahl an Proteinmannosyltransferasen drei, sie besitzen mindestens ein Protein jeder Subfamilie. Lediglich in *C. albicans* und *S. cerevisiae* sind mehr als drei Proteinmannosyltransferasen vorhanden. Neben den im phylogenetischen Stammbaum gezeigten Organismen wurden Datenbankanalyse aus *Magnaporthe grisea*, *Ustilago maydis*, *Aspergillus niger*, *Cryptococcus neoformans* und dem Basidiomyceten *Coprinus cinereus* durchgeführt. Diese ergaben, dass diese Organismen ebenfalls nur ein Protein jeder Subfamilie besitzen.

	CaPmt1p	CaPmt2p	CaPmt4p	CaPmt5p	CaPmt6p
CaPmt1p	100	36	22	34	30
CaPmt2p		100	29	28	44
CaPmt4p			100	29	27
CaPmt5p				100	27
CaPmt6p					100
ScPmt1p	54	32	32	35	29
ScPmt2p	36	60	31	29	43
ScPmt3p	34	56	31	29	42
ScPmt4p	31	32	52	29	28
ScPmt5p	44	28	26	31	28
ScPmt6p	34	46	30	28	46
ScPmt7p	23	22	20	25	22

Tab. 3.1: Sequenzidentität in % der Proteinmannosyltransferasen aus *C. albicans* und *S. cerevisiae*. Identitäten wurden durch BLAST Vergleiche (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) der Vollängenproteine ermittelt.

CaPMT2 ist neben *PMT1*, *PMT6* (Timpel *et al.*, 1998 und 2000), *PMT4* (Prill, 2000) und *PMT5* (Klinkert, 2002) das fünfte Mitglied der für die Pmt-Isoformen kodierenden Genfamilie in *C. albicans*. Der offene Leserahmen von *PMT2* umfasst 2310 Nukleotide. Diese kodieren für 769 Aminosäuren, die einer theoretischen molekularen Masse von 88.3

kDa entsprechen. An der Position 2146 besitzt *PMT2* mRNA ein CUG-Codon. Dieses bedeutet, dass in Pmt2p an der Positionen 716, aufgrund des spezifischen Codongebrauchs von *C. albicans*, anstelle der Aminosäure Leucin die Aminosäure Serin vorhanden ist (Leuker und Ernst, 1994; Santos und Tuite, 1995; White *et al.*, 1995). Alle *PMT*-Gene befinden sich auf unterschiedlichen Chromosomen. *PMT2* ist auf Chromosom 3 lokalisiert, *PMT1* befindet sich auf Chromosom 7, *PMT4* auf Chromosom 2, *PMT5* auf Chromosom 5 und *PMT6* auf Chromosom 4 (<http://genolist.pasteur.fr/CandidaDB>).

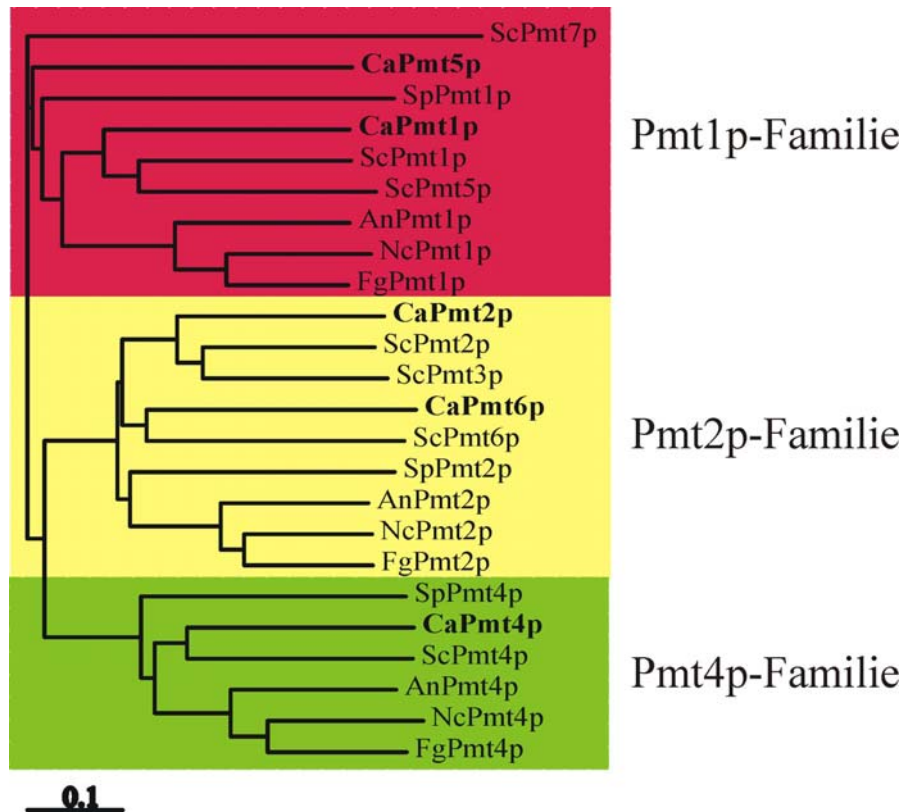


Abb. 3.1: Phylogenetischer Stammbaum der Pmt-Proteinfamilie. Ein Sequenzvergleich der Voll-längenproteine wurde mit ClustalX durchgeführt und mit Treeview dargestellt. Die Länge des Balkens repräsentiert eine evolutionäre Distanz von 0,1 Austauschen je Stelle. Die Sequenzen stammen im Fall von *Aspergillus nidulans* (An) und *Fusarium graminearum* (Fg) von <http://www.broad.mit.edu/annotation>, bei *Schizosaccharomyces pombe* (Sp) von http://www.sanger.ac.uk/Projects/S_pombe und bei *S. cerevisiae* (Sc) von <http://genome-www.stanford.edu/Saccharomyces>.

Für ScPmt1p wurde experimentell gezeigt, dass es an drei Stellen *N*-glykosyliert ist (Girrbach *et al.*, 2000). Zwei Stellen davon befinden sich in einer für die enzymatische Aktivität essentiellen, zentralen, hydrophilen Schleife und eine am Carboxyende. Mit Hilfe des Onlineprogramms NetNGlyc 1.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc>) wurden Vorhersagen über eine mögliche *N*-Glykosylierung der Pmt-Proteine aus *C. albicans* gemacht. Alle Pmt-Proteine besitzen potentielle *N*-Glykosylierungsstellen. Eine Verwendung dieser potentiellen *N*-Glykosylierungsstellen unter physiologischen Bedingungen ist nur wahrscheinlich, wenn sie den Mindestschwellenwert des Computerprogramms von 0,5 überschreiten. Dies sind für Pmt1p die Asparagine der Positionen 83, 195, 395, 721, für Pmt2p die Asparagine der Positionen 8, 132, 226, 324, 408, 453, 462, für Pmt4p die Asparagine der Positionen 11 und 445, für Pmt5 das Asparagine der Positionen 212 und 409 und für Pmt6 die Asparagine der Positionen 20, 59, 357 und 453. Keine der fünf Isoformen besitzt an ihrem Aminoende eine Signalsequenz für die Sekretion.

ATGATTTTCTATTTTATCTCGCGCGTTGTATTATTTTGTGTATTGTTGTTGTCTGAGACTTAATAATACTTACGTGTTCACTTA
* -160 * -120 *
CATTATTTGCTTATGAGCCTAGGCGTTATTTTTTTTTTCTCTCTCTCTCCCACTTTCTACTCTTTGAACAATGTGGTGAAAAA
-80 * -40 *
AAATAGAACCAGATCTTTTTATTCATATATTTCAAACCGACTTGTTCCTTTTTCTTTTACAACCAATTAATACAAAAAGAGACA
0 * 40 * 80
ACAATCATAATGTCTACTTCTGTTGAACCCAATGAACAGAGCTTTGTTGAGAAAGCAGAATGATCTTTCCACAACCTGCCTCAATTGAA
M S T S V E P N E T E A L L R K Q N D L S T T A S I E
* 120 * 160
GAAAAATATCCTCACCAACAAGGAGAGGCTGCAGAAGACGATGACGACACTCTTAAAGAACCCAATATGATGAAGCTAAAGAACCGCT
E K Y P H Q Q G E A A E D D D T L K R T Q Y D E A K E T A
* 200 * 240 *
GAATCTTTAAACAAGTTGAATCGATATTAGCACCTTGTCTTCTGCTGACATGTCATTTTCGTGAGATTTTATCGTATTTTCAGTGAAT
E S L K Q V E S I L A P I V F T A L S F F V R F Y R I S V I
* 280 * 320 *
GACCATGTTGTTTGGGATGAAGCTCATTTTGGTAAATTGGATCCTATTATTTACGACACGAATTTTATCATGATGTTTCATCTCCCTG
D H V V V W D E A H F G K F G S Y Y L R K H E F Y H D V H P P L
* 360 * 400 * 440
GGTAAATGTTAGTTGGTTTATCTGGTTATTTGGCTGGATCAATGGATCTGGGATTTCCCAAGTGGTGAAAAATACCCTGATTATATT
G K M L V G L S G Y L A G Y N G S W D F P S G E K Y P D Y I
* 480 * 520 *
GATTATACTAAATGAGATTGTTTAAATGCCACTTTCTCTGCCTTGTGTGTACCATTGGCTTATTTCACTGGGAAAGATTGGATTTTCC
D Y T K M R L F N A T F S A L C V P L A Y F T G K E V G F S
* 560 * 600 *
ATGTTTACTACTTGGTTATTTACTTTGATGGTGGCTCTTGAATCAAGTATGTCTACTTTAGGTAAATCATTGTTGATTCAATGTTG
M F T T W L F T L M V A L E S S Y V T L G K F I L L D S M L
* 640 * 680 *
TTATTCTTACCCTGTTACTGTTTCTGTTTTTACGTTTCAACAATTTTAAACAATTAACAAGAATTTTCTAGAAAAATGGTGGAAA
L F F T G A T V F C F S R F N N F N N K S Q E F S R K W W K
* 720 * 760 * 800
TGGATTCTTTAACTGGTGTTCATTGGTTGTACTTGTCTGTAAAAATGGTTGGATTGTTTGTACCACATTGGTCGGGATTTACAT
W I L L T G V S I G C T C S V A K M V G L F V T T L V G I Y T
* 840 * 880 *
GTTGTTGACCTTTTGAATAAATTGAGTGATAAATCTATTTCATGGACAAAATACATTCAACATTGGTTTGTCTAGAAATGTTGCTTTGATT
V V D L W N K L S D K S I S W T K Y I Q H W F A R I V A L I
* 920 * 960 *
CTTGTCCTCAATTTTCACTTTTATGCTTTTAAAGTTTCACTTTGATTGTTGTATAAATCGGGTACTGGTGATGCCAATATGTCTATCA
L V P I F I F M L S F K V H F D L L Y K S G T G D A N M S S
* 1000 * 1040 *
CTTTTCCAAGCTAATTTGGCTGGTTCCGATGTTGGTGGTGGCCACGTGAAGTATCCATGTTTCCACTCGGTTATCACTTTTAAAGAATCAA
L F Q A N L A G S D V G G G P R E V S M F H S V I T L K N Q
* 1080 * 1120 * 1160
GGTTTAAAGTGGTGGCTTTTCACTCCCACTTCAACATTCCCAAGGTTTCAAAACAACAACAGTTACTACTTATGGTCACAAAGAT
G L S G G L L H S H V Q T F P E G G S K Q Q Q V T T Y G H K D
* 1200 * 1240 *
TCAAACAACAATTTGATTTTCCAAGAGCTAGAGGACAACCTTATTATGATACTTCTGGTAACACCACTGACATTGAATATATTTTGAC
S N N N W I F Q R A R G Q P Y Y D T S G N T T D I E Y I F D
* 1280 * 1320 *
GGTATGCATGTAAGATTGATGCATCCACAACTGGTAGAACTTACATACTCATGATATTCCAGCTCCAGTGTCTAAATCTGAATATGAA
G M H V R L M H P Q T G R N L H T H D I P A P V S K S E Y E
* 1360 * 1400 *
GTTGCATGTTATGGTAATTTGACTATTGGTGATCCTAAAGATAATTGGACTGTTGAAATTATGGAACAAGCAAGTGATGAAGATAAATG
V A C Y G N L T I G D P K D N W T V E I M E Q A S D E D K M
* 1440 * 1480 * 1520 *
AGATTACCTCTTTGACTTCGTCTATTAGATTGAAGATGAAGTATGATGAATTTGTTTGGGGTCACTGGTACTACATTACCTCAATGG
R L H P L T S S F R L K N E V M N C Y L G V T G T T L P Q W
* 1560 * 1600 *
GGGTTTCAACAAGGTGAAGTTGTTTGTACAAGAACCATTAAAAAAGACAAGAGAATCTGGTGAATATTGAAAACAATCGTAATGCA
G F R Q G E V V C Y K N P F K K D K R T W W N I E N N R N A
* 1640 * 1680 *
GTTTACCACAGCTCCAGAAGATTCAAAATTACCTAAACTAAGTTTATCTGTTGATTTTCACTCAATTTGAATTTGGCCATGATGGCTACT
V L P P A P E D F K L P K T K F I R D F I Q L N L A M M A T
* 1720 * 1760 *
AACAAATGCTTTAGTTTCCAGACTGAAAAGCAAGATGATTGGCTTCATCATTTTGGCAATGGCCAATGGAATGTTGGTATTAGAATG
N N A L V P D T E K Q D D L A S S F W Q W P T L N V G I R M
* 1800 * 1840 * 1880 *
TGTGGATGGGGACCAGAAAATCTAAATATTATGATTGGTTTACCAGCAACTACTTGGACTTCTACTGTTGGTGTATATTATTGCT
C G W G G P E N P K Y Y M I G S P A T T W T S T V G V I L F A
* 1920 * 1960 *
TTCATTGTTTGTATTATTGATTAGATGGCAAAGACAACTGTTGATTCCCAAGTACAAATCCACACAAATTGAAATATTCTCTTATG
F I V L Y Y L I R W Q R Q Y V D F P S T N P H K L K L F L M
* 2000 * 2040 *
GGAGGTATTTTCCAATGTTTGGATGGGATTACATTCTTACCATTGGCATTATGGGAAGAGTTACATATGTTTCATCATTATGTTCTCT
G G I Y P M F G W G L H F L P F A I M G R V T Y V H H Y V P
* 2080 * 2120 *
GCACTTTATTTTGGCATGCTTTTCTGTTATGAAGTTGAATCATTTTCTTCAAGATTAAATAAACCTAATGCTTCTCCAGTGCTGAAA
A L Y F A M L V F C Y E V E S F S S R L N K P N A S P V L K
* 2160 * 2200 * 2240 *
TTATTATTTTGGCCATTTATATTGTTTACTCTCTTTAGTGGCTGGTACTTTCTGGTATTTTCAATATTTGCTTGGGGTATGGGAAGGA
L L Y L A I Y I G L L S L V A G T F W Y F R Y L S W G M E G
* 2280 * 2320 *
CCAAAAGAAGATTGGAAACATTGAAATATTGGAATCTGGAGAGTTTCTGATGATCAATACACCTAGAAATAAATGGTGGAAGTTAAG
P K E D W K H L K L L E S W R V S D D Q Y T
* 2360 * 2400 *
AAGACATTACCTTTTTTGGATACATTTATTTGAAATAGTTTCAAAGGTTATTATATTTTATGTTTACTT

Abb. 3.2: Nukleinsäure- und Aminosäuresequenz von *CaPMT2*. Zusätzlich zu der kodierenden Region sind 279 Nukleotide des Promotors und 91 Nukleotide der 3'-untranslatierten Region abgebildet. Unter physiologischen Bedingungen wahrscheinlich verwendete potentielle N-Glykosylierungsstellen sind grau unterlegt, unwahrscheinliche sind eingerahmt.

In Abb. 3.2 ist die Nukleinsäure- und die Aminosäuresequenz von *PMT2* dargestellt. In dem Promotorbereich von *CaPMT2* konnten keine Bindemotive für bestimmte Transkriptionsfaktoren gefunden werden. Dies ist anders bei den Promotoren der übrigen *PMT*-Gene, bei denen sich SRE (stress response element)-Sequenzen (Martinez-Pastor *et al.*, 1996) in den Promotoren von *PMT1*, *PMT5* und *PMT6* befinden. Im Promotor von *PMT1* befindet sich zusätzlich an Position -453 ein MCB Element (*MluI* cell cycle box) mit der Sequenz ACGCGTAA (McIntosh *et al.*, 1994a, 1994b). Im Promotorbereich von *PMT4*, *PMT5* und *PMT6* befinden sich stromaufwärts vom Startcodon Konsensussequenzen für SCB Elemente (Swi4, 6-dependent cell cycle box), wie auch bei *PMT*-Genen von *S. cerevisiae* (Strahl-Bolsinger *et al.*, 1999). An diese Elemente bindet der SBF-Faktor (SCB binding factor) bestehend aus Swi4p und Swi6p. Er bewirkt eine Cln3p-Cdc28p-abhängige Genexpression in der späten G₁-Phase (Koch *et al.*, 1994). Zur besseren Übersicht sind die Promotorelemente und ihre Positionen in Tab. 3.2 dargestellt.

In Proteinmannosyltransferasen gibt es funktionelle Domänen. So wurde festgestellt, dass ScPmt1p eine große hydrophile Schleife besitzt, die in das Lumen des ER weist. Diese Schleife ist für die Transferaseaktivität von ScPmt1p essentiell. Des Weiteren demonstrierten Girrbach *et al.* (2000), dass ScPmt1p eine Reihe invarianter Aminosäuren besitzt, die für die Transferaktivität des Enzyms essentiell sind. Diese Aminosäuren sind konserviert und auch in allen Pmt-Proteinen *C. albicans* vorhanden. In Abb. 3.3 sind diese Aminosäuren besonders gekennzeichnet. Eine weitere funktionelle Domäne stellt das Aminoende dar. Er ist notwendig für die Dimerisierung der Pmt-Proteine. In Abb. 3.3 ist ein Aminosäurevergleich aller *C. albicans* Pmt-Proteine mit ScPmt1p dargestellt, in dem alle relevanten Elemente der Pmt-Proteine gekennzeichnet sind. Der aus Abb. 3.3 ersichtliche, für Proteinmannosyltransferasen typische Aufbau aus sieben Transmembrandomänen, lässt sich auch für Pmt2p in einem Hydropathieplot erkennen (Abb. 3.4).

Promoter (1500bp)	SRE (stress response element) -CCCCT-	SCB-Element -CACGAAA-	MCB-Box - ACGCGTAA-
<i>PMT1p</i>	-91; -526; -1244	-	-453
<i>PMT2p</i>	-	-	-
<i>PMT4p</i>	-	-845	-
<i>PMT5p</i>	-50; -1088	-120	-
<i>PMT6p</i>	-91	-861	-

Tab. 3.2: Promotorelemente der *PMT*-Gene.

```

      *          20          *          40          *          60          *          80          *
ScPmt1p : -----MSEKTYKRVEQDDPVPELD-----IKQG-----PVRPFIVTDPSSAELASLRT-----MVTL-----K : 48
CaPmt1p : --MAKKPVTPTASKVAAKQAAVRSRHQEDVFTLDPLDIPFQKG-----ELRSYLVTSPSPVLKKR-----LIHT-----K : 64
CaPmt5p : -----MTKELPSG-----YFQ-----G-----PFRPYKTFQPSLTERPLS-----K : 31
CaPmt2p : MSTSVEPNTEALLRKQNDLSTTASIEEYKPHQGBAABEDDD-----TLKRTQYDEAKETAESLK-----QVES----- : 65
CaPmt6p : MATGYSTGVSPFDLDENNHNDSIHRRHQNHSSQSHDSLGERDDTEIEDIIQKTSKLNINTSTSTKLNKFFQSSNRHSDSNSPPLREVFI : 90
CaPmt4p : -----MSQTLKKRGGNSSGRKSPTTSNIEFD-----DKTEFDLNAIVPPKEPE-----YK : 46

```

TM I

```

      100          *          120          *          140          *          160          *          180
ScPmt1p : EKLLVACLAVTAVTRTHGLAWEDSVVFDEVHFPGGASQVTRGTTFMDVHPPLAKMLYAGVASLGGFQCDFFDENIGDSFFEST-TPYVLM : 137
CaPmt1p : EYWMLSLLLLAFYVRMYNLNSNNSVVFDEVHFPGGARKYILGTFMDVHPPLAKMLFGAVGATGCKGDFEKSIGDKPFDS-TPYIFM : 153
CaPmt5p : FEQFAVFSALCLISLRFLYKLYIEDRVVFDETHLIKIKKMYDGSIFVDIHPPGLKLIYFYITKLFEDKDFQIDIIICLDYFED-FPYLWL : 120
CaPmt2p : -LLAPIVFTALSFYRFRYISVNDHVVDAAHFGKFGSYLRHEFYVDVHPPLGKMLVGLSGYLACVNGSWDPSG-EKYPDY-IDYTKM : 152
CaPmt6p : KTIINPLILTAISSFVRLYRIDVANSVVDAAHFGKFGSOYLKRQFYFDVHPPLGKLLIGLSGYLADYDGNFDESS-NVYEDN-VNYVFM : 178
CaPmt4p : YLAALTVLVTLAIYTRFTLKLGTENKVVVFDEVHFPGGASVYLYERTYFDFLHPPFAKLLIAFVGWLIQYDCKFKGEATGDSIENNVPYIAY : 136

```

```

      200          *          220          *          240          *          260          *
ScPmt1p : RFSASLCAALTILMMMTIRYSGVRMWVALMSAICFAVENSVTISRYILLAPLMHFAAAVYSKKYEMYP-----ANSLNAY : 217
CaPmt1p : RQRPALLCVGTIILCYLTLRQSEVRPIIAYITTFLLIENSNVTISRYILLSPLIIEIAAAIYAKKKEIQI-----PFTFGWY : 233
CaPmt5p : RLFSGICIGHVLLTFTLRIT-CNLVISIVITILICLNSMTVSRLLILLEGPSLVQSLVYNNKATTRI-----PFTGCWY : 199
CaPmt2p : RLNNATFSALCLPLAFYFTGKVFCSMFTTWFTLMALSSSYVTLKGFILLSMLEFTVATVFCGSRNNFN-----NKSQEFSSRKWY : 236
CaPmt6p : RLNNCFGLLVFTPLAVILCYNQFTCWLIAFMVIFQLSLTLSEKILLSMLEFTVLTMYCLVKVHTLAIARVGSNSKTPLLTKLEI : 268
CaPmt4p : RSLLAIQSAATIPIMELTMTLGFSAACLFSSIIYCFDNAQVDSRLILLDATLILSVALTIFSSKSKSTFR-----KQPFSSKWY : 218

```

TM V

```

      280          *          300          *          320          *          340          *          360
ScPmt1p : KSLATGIALGMASSSKWGLFTVTWVGLCWRLLWFMIG-----DLTKSSKSIKVAFAKLAFLLCVFPALYLVEFYTHFQSLTL : 298
CaPmt1p : RSLATGIALGLALSSKWGLFTVAVWVGLCLYQLWFLIG-----DLSVSTKIKWGFPAFGIILLGVPIALYLGFPAHFQLLNK : 314
CaPmt5p : FNLFTVGIALGLNISLKIISGLFTFAWVGLTCTVQLWEILG-----DLRHSIQFIKHLVLRVVAFTMVPLTIYCSVFYTHFENLPN : 280
CaPmt2p : KWLILTGVSIGCTCSVKWGLFVTTLVGLYTVDLWN-----KLSDKLSWTKYIQHWFARVALILVPIFIIMLSFKVHFDLLK : 317
CaPmt6p : KWIILTGISIGCVCSVKWVGLFVTALVGFYTVDLWIKFYQTFADKKSPKKMSVNYLIHWVVRFTLIIIPMTIYVATFKHFMVLNH : 358
CaPmt4p : TWLITAGVSLSCVISPKYGVFTYLTIGIAVHELWILLD-----YRKGILTQEFAKHFFARWALILVFCIYLYWFLHFAILTR : 300

```

```

      380          *          400          *          420          *          440          *
ScPmt1p : DEDGSAFSPERSTIKNNKIPQNVVADVIGISIIISLRHLSTMGGLHSHSHNYEAGSEQQOQSTLPHMANNDDWLEL-----YNAP- : 381
CaPmt1p : EEDGSAFMSAARAGLQGNKIPRDITEQVGLGSVVTIRHVDTOGGYLSHSEHFYQTSKQOQOITLPHLDSNNKWLTEP-----YNG-- : 396
CaPmt5p : EEPGSGFITPHSRSTDDYQQQP---LQVLYGSTITIKHN-ALEKYLHSHDLTYPRGSNNQOVTLDFFPQVNNNEWVLET-----KQKYN : 360
CaPmt2p : SETEDANSSLLQANLAGSDVGGGPREVSMFHSVITLKNQGLSHSHVQTFPESSKQOQOVTTYGHKSNNNWFQRP-----ARQOPY : 402
CaPmt6p : TEPDDGTLLSTLLQGLSGLNDLQSGPRSV-AFGSLVTIRSQGLSPNLHSHPHNYPQSSQOQOVTTYGFKDNNNEFLFEFGVDAGLRNQHA : 447
CaPmt4p : SEPEDAFMSSEQEDLLESPLAAHS-KPVQYFDQITIKKH-DTGASLHSHOHEBPLRYEDGRSSNGQOQVTCVQENAAAN---DPNNQWE : 385

```

```

      460          *          480          *          500          *          520          *          540
ScPmt1p : -GESLITTFQN-----LIDGTKVRLFTVTRCRLLHSHDHKPPVSESSDWQKEVSCYGYSGFDGDANDDWVVEIDKKN----SAP : 454
CaPmt1p : -TIHNETFVN-----LIMGKIRLKHINTERRHSHDEKPPVSEER-DWQKHCSCYGYDGFPAGDANDDWVVEIVNYR-----SQK : 468
CaPmt5p : EBKLMTDQRE-----VKQGDVVRLYHKATCHYLHVNDIRPPISEH-EYSYEVNGNETRGLLGNEDYBEKIRMLVKKPH---AEN : 435
CaPmt2p : YDTSGNIT-----IFDGMHVRLMHPQTERNLHTEIPAPVSKS---EYEVACYG-NLTIGDPKDNWTEIMEQAS----- : 472
CaPmt6p : TLENENSTRNGNDDDYHYVILHEDGTVRNHNKNTESYLRANAVGAPISSS---SYEVSCEG-DVESNDWADQWVIEIQSQDQSPDPMFQ : 533
CaPmt4p : IVPTELEGANKG-----TKVYTNDIVRFHVGTGGYLLTHEVASPLKPTN--EFTTVVVDVDAQRYNETILREIRLHVPGSN---PKK : 462

```

```

      560          *          580          *          600          *          620          *
ScPmt1p : GVAQERVIALDKFKRLRHMGTGCYLFSH-EVKLPANGFBOQEVTCAS---SGRHDLILWYVENNSNPLLP-EDTKRISYKPASTISKEIES : 540
CaPmt1p : GEAQTFVKALNTIFRLRHMTGHYLFSS-EVKLPBWGEFCQCEVTSAS---QGKRALHMYLETNENSILPSEAKIINYPKLSLWQKVVES : 555
CaPmt5p : DLPLIKRITTEITFQILHQATRCNLMSH-EQKLPDNGEYQNEVLCKV---EPTIPNLWYVELSSHPLLK-DTKKLKTFPKFSSWSKLIET : 521
CaPmt2p : DEDKMLRLHPLTSSFRLLKNEVMNCYLGVTTGTLPOWGFQCEVVCYKNPFKKDKRWNNENNRNAVLP-PAPEDFKLPKTKIRDEIQL : 560
CaPmt6p : DEDPLEHHSVSSTFRLLKHQLWCYLAT-TGKSYPAWGYQCEVVCYKSVFSRDKRWNNIEKHVNDKLP-LPATEYVPPKPKWKEFILL : 621
CaPmt4p : EKNKKELKTLAADLRILHVDTVVAMWTHDELPEEABNQCEVSGNKKIPDKNIWNFDLITNLQSTDPRNQVVPKKVKTLPRLRKWBL : 552

```

TM VI

```

      640          *          660          *          680          *          700          *          720
ScPmt1p : HKMMWHINKNVEP---HVVYSQPTSWFFLLRGISYWG-----ENNRNVYLLGNATVWMAVTAF---IGIFGLIITELFSQOLG : 614
CaPmt1p : HKRMKINGQITSH---HHWQSSPSEWPLILRGINYNW---KEHKQVYLLGNATVWMAATLS---HITGTYLVTVFRHLG : 629
CaPmt5p : HKVMENLKGFTNP---HPYASKPLDWPLSRGIAFFSNYNLKSIDEBSLLYYLGNVAIYLYLVFVGLIAIFKCAIYSFIKLNVPASP : 607
CaPmt2p : NLAMMATNNAIPDPEKQDDLASFFWQWPTLNVGIRMG---WGPNPKYIMIGSPATTWTSTVG---VILFAFIVLYLIRQRO : 640
CaPmt6p : NYAMMASNNAIPDPRDFDKLSSEWWEWPTLNTGLRMNS---WGDADIKYFLGNPLITMSTIA---HIVCPLYLYLVGIKQRO : 701
CaPmt4p : QMLVHEHNNQLSSE---HPFATQPGEWPLALSGVSFYN---DNTEKKQIFFGNIIIGWLEVCF---LSIYIGILLADQITRRRN : 628

```

```

      740          *          760          *          780          *          800          *
ScPmt1p : KPILKDS-----KVVNFHVQVIHYLLGFVAHYAFSFLMQRQMLHHHYLPAYYFGIALGHALDIIVSYVF---RSK-----RQM : 685
CaPmt1p : TPLSTNK-----HVFNFNVQTFSYVIGWALHYLPFFIMGRQLFLHHYLPALYFGIALGHFFEIFFTGYLTS---RSKYF---QQV : 703
CaPmt5p : PSSSSKS-----PYANFYNNSWPYLYGWFINIYIPYCLMSRNLYLHHYLLALNFGHLLLSQYLYNRVAKNK-----II : 674
CaPmt2p : YVDFPST-----NPHKLKFLMGGIYPMGFWGLHFLPFAIMGRVTVVHHVVPALYFAMLVFCYBVESFSSRLKNPNASPVL---KLL : 719
CaPmt6p : WILLSATDTSNANPANSQSLSLAARALLPLAGWVLYHYVPTILMGRVVKYLLHHYVPALYFAFVAGFTVDAIILNLDFFSYHNNKFQ---YIF : 788
CaPmt4p : VHVLSDR-----ARSRLYNTLGLFLVGVAAHYLPLFFLNMROKFLHHYLPALHVAALFSGGLVEFICSNNSARPNGKPVGVNKYK : 707

```

TM VII

```

      820          *          840          *          860          *          880          *          900
ScPmt1p : GYAVVITFLAASVYFESKSPILYIGTPWTOELCQKSQWLSGDYNCNTYFSSLEEYKNQT-----LTK : 748
CaPmt1p : AFVLVGLFSILSLVFNYSLLIYCTPWTASCETLTPFSGDINCGTFFDTLGEYDIQEKSLASESEIPTETVVVEAKQTPKAEPKLAK : 793
CaPmt5p : GGIITATIPVSAIYCYBERIPTIYGLPWTLLCQNSHGWFPNDIDICMTYTG----- : 725
CaPmt2p : YLATIYIGLLSLVAGTFWYRYLSWGMEGPKEDWKHLKLESIRVSDDOYT----- : 769
CaPmt6p : KVVVYSTLYLVICISFWYFKDLSFGMEGSSVDYRHLRLGSSMI----- : 832
CaPmt4p : ITAVVAACSTAILWFEYERPLIYGDVYLTPEEVKARQWLDDKLHYGK----- : 755

```

```

      920          *          940          *          960          *          980
ScPmt1p : RE---SQPAATSTVEEITIEGDGPSYEDLMN---EDGKKIFKDTTEGNELDP-----EVVKMLEEGANILKVEKRAVLE--- : 817
CaPmt1p : QDDHIESPAAAEFVEEKEVKEVEQLAPLAVDFEETPKVEDPQVADVASSNDEKSVEEKQQEQEQEQEQVEDESHVQVQQ : 877

```

Abb. 3.3: Sequenzvergleich der *C. albicans* Proteinmannosyltransferasen und Pmt1p aus *S. cerevisiae*. Schwarz gekennzeichnete Aminosäuren sind identisch, grau markierte Aminosäuren sind solche mit gleichen Eigenschaften. Der Sequenzvergleich wurde mit dem Programm ClustalW angefertigt und mit Genedoc bearbeitet. Transmembrandomänen (TM) sind mit einem schwarzen Balken gekennzeichnet. Zwischen TM V und TM VI befindet sich die für die katalytische Aktivität essentielle Schleife. Mit einem roten Punkt gekennzeichnete Aminosäuren sind essentiell für eine maximale Aktivität (Girrbach *et al.*, 2000).

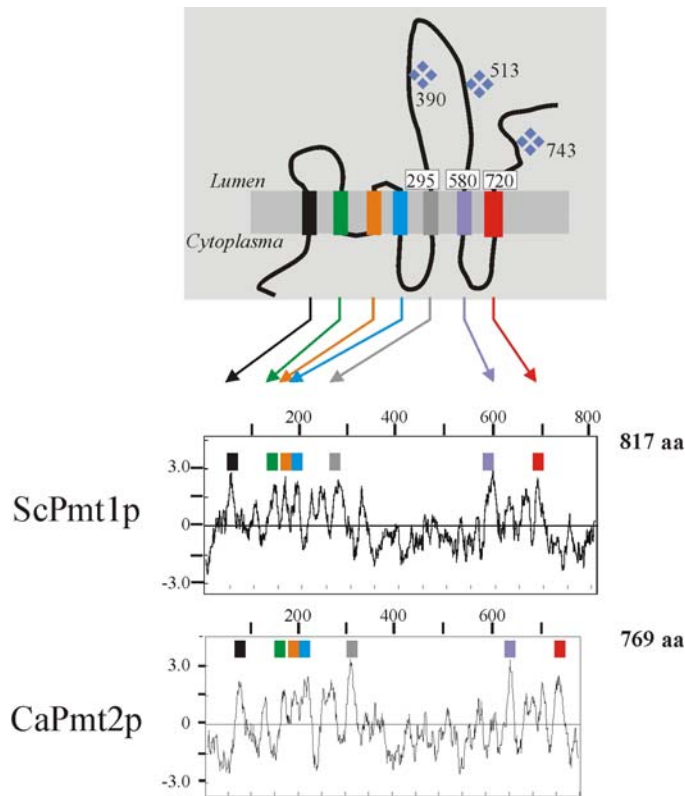


Abb. 3.4: Hydropathieplot der *C. albicans* Proteinmannosyltransferase Pmt2p im Vergleich zu ScPmt1p. Der Hydropathieplot wurde mit dem Programm WinPep durchgeführt. Anzahl und Lage der Transmembrandomänen wurden für ScPmt1p experimentell bestimmt. Der Aminoterminus von ScPmt1p weist ins Cytoplasma, der Carboxylterminus ins ER Lumen (Strahl-Bolsinger, *et al.*, 1999). Die mit Karos markierten Positionen stellen *N*-Glykosylketten dar.

3.2 Disruption von *CaPMT2*

Zur Untersuchung der Eigenschaften des *PMT2*-Genproduktes in *C. albicans* sollten beide Allele des Gens in Stämmen mit unterschiedlichen genetischen Hintergründen disruptiert werden. Dieses war zum einen der Stamm CAI4 (Wildtyp) und zum anderen die Stämme CAP1-3121 (*pmt1*), CAP4-2164 (*pmt4*), P5-5774 (*pmt5*), CAP2-2391 (*pmt6*), die bereits Mutationen in Genen für Proteinmannosyltransferasen tragen.

Um das *PMT2*-Gen zu disruptieren, wurde die so genannte "URA-Blaster"-Technik verwendet (Fonzi und Irwin, 1993). Das verwendete Plasmid pSP18 enthält den 4 kb großen „URA-Blaster“, der von 1 kb aus dem 5'- und 900 bp aus dem 3'- Bereich des *PMT2*-Gens flankiert wird. Aus Plasmid pSP18 wurde mit dem Enzym *PvuII* ein 6 kb großes Disruptionsfragment herausgeschnitten. Das Disruptionsfragment wurde in die Stämme CAI4 (Wildtyp), CAP1-3121 (*pmt1Δ::hisG/pmt1Δ::hisG*), CAP4-2164 (*pmt4Δ::hisG/pmt4Δ::hisG*), CAP2-2391 (*pmt6Δ::hisG/pmt6Δ::hisG*) und PP46-4286 (*pmt4Δ::hisG/pmt4Δ::hisG*) transformiert. Die Transformanten wurden mittels Kolonie-PCR auf korrekte Integration in den *PMT2*-Locus verifiziert. Die PCR ergab mit dem Primerpaar pcURA3 und p2verFOA bei korrekter Integration ein 1,7 kb großes Fragment (siehe Abb. 3.5 und Abb. 3.6). Die so erhaltenen, heterozygoten Stämme wurden P2-2, P2-6

(*PMT2/pmt2Δ::hisG-URA3-hisG*), P24-1, P24-2 (*pmt4Δ::hisG/pmt4Δ::hisG PMT2/pmt2Δ::hisG-URA3-hisG*), P26-5, P26-6 (*pmt6Δ::hisG/pmt6Δ::hisG PMT2/pmt2Δ::hisG-URA3-hisG*) und P246-1, P246-3 (*pmt4Δ::hisG/pmt4Δ::hisG pmt6Δ::hisG/pmt6Δ::hisG PMT2/pmt2Δ::hisG-URA3-hisG*) benannt. Zur Wiederherstellung der *URA3* Auxotrophie wurden die Stämme P2-2, P2-6, P24-1 und P246-1 auf Medium mit 0,02 % 5-Fluoroorotsäure (FOA) ausplattiert. Dieses Medium erlaubt Wachstum nur von Stämmen, welche das *URA3*-Gen durch intrachromosomale Rekombination zwischen den beiden heterologen *hisG* Regionen verloren haben. Diese Stämme können das für die Zelle toxische FOA nicht mehr metabolisieren (Abb. 3.5). Kolonien, welche auf FOA-Medium aber nicht mehr auf Minimalmedium wachsen konnten, wurden durch PCR mit dem Primerpaar verP1/p2verFOA verifiziert. Eine Kolonie-PCR mit diesen Primern ergab nach Entfernung des *URA3* Markers ein 1,2 kb großes Fragment (Abb. 3.5 und Abb. 3.6). Die so positiv verifizierten Stämme wurden als P2-22, P2-67 (*PMT2/pmt2Δ::hisG*), P24-13 (*pmt4Δ::hisG/pmt4Δ::hisG PMT2/pmt2Δ::hisG*) und P246-13 (*pmt4Δ::hisG/pmt4Δ::hisG pmt6Δ::hisG/pmt6Δ::hisG PMT2/pmt2Δ*) bezeichnet.

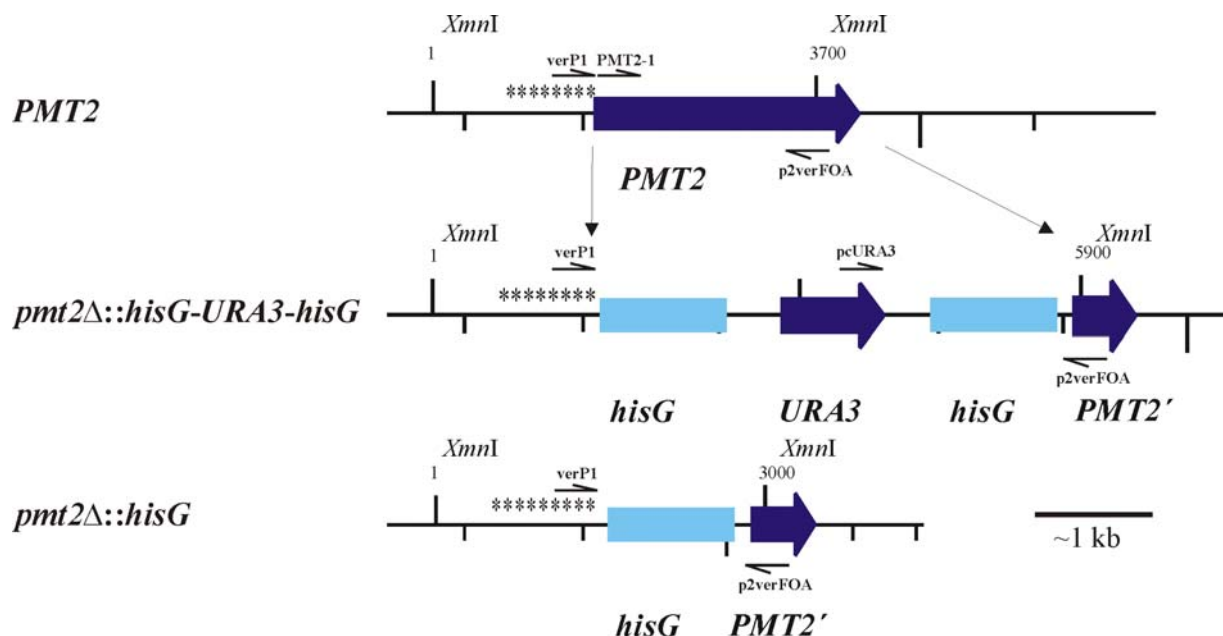


Abb. 3.5: Disruptionsschema für die Disruption von *CaPMT2*. Die mit einem * gekennzeichneten Regionen geben die Bindungsstelle der im Southernblot verwendeten Sonde an. Die kleinen Pfeile stellen die synthetischen Oligonukleotide zur Verifizierung der einzelnen Transformanten dar. Die großen Pfeile stellen den *PMT2*-ORF bzw. Teile davon dar.

Zur Disruption des zweiten *PMT2*-Allels wurde erneut das Disruptionsfragment in diese transformiert. Zur Bestimmung des Status der *PMT2*-Disruption wurden Kolonie-PCR-Reaktionen durchgeführt. Zum einen wurde mit dem Primerpaar pcURA3 und p2verFOA die korrekte Integration des Disruptionsfragmentes getestet. Zum anderen wurde mit den Primern verP1 und p2ver-FOA, welche in der PCR für das *PMT2*-Allel ein Produkt von 2,0 kb ergeben, überprüft, ob beide Allele des *PMT2*-Gens disruptiert wurden. Überraschend stellte sich heraus, dass in 80 auf diese Weise getesteten Transformanten das Wildtyp-Allel noch intakt war. Bei einer Überprüfung der Transformanten mittels Southernblot-Analyse wurde festgestellt, dass in etwa der Hälfte der Fälle das Disruptionsfragment in das bereits disruptierte *pmt2Δ::hisG*-Allel integriert hatte. In der anderen Hälfte der Fälle konnte sowohl

das Wildtyp-Allel, das *pmt2Δ::hisG*-Allel, als auch das *pmt2Δ::hisG-URA3-hisG*-Allel detektiert werden (Daten nicht gezeigt). In diesen Stämmen lagen somit drei *PMT2*-Allele vor. Dieses wurde bereits von Enloe *et. al.* (2000) beschrieben und gilt als Merkmal dafür, dass ein Gen essentiell ist.

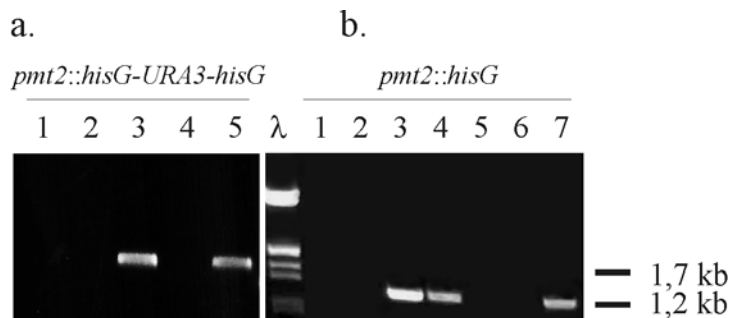


Abb. 3.6: Verifizierungs-PCR. Gezeigt ist exemplarisch eine Verifizierungs-PCR von a.) Allelen mit dem Genotypen *pmt2Δ::hisG-URA3-hisG* mit den Primer pcURA3/p2verFOA und in b.) von *pmt2Δ::hisG*-Allelen mit den Primern verP1/p2verFOA. In Spur 1 wurde jeweils als Negativkontrolle eine PCR-Reaktion ohne DNA aufgetragen.

3.2.1 Konstruktion konditionaler Mutanten

Um den Beweis zuführen, dass es sich bei *PMT2* um ein essentielles Gen handelt, wurden konditionale Mutanten hergestellt. In diesen Stämmen sollte das verbliebene *PMT2*-Allel unter die Kontrolle des reprimierbaren *MET3*-Promotors gestellt werden.

Hierfür wurde ein 320 bp großes Fragment, welches den 5'-Bereich des *PMT2* Orf enthält, mit *Bam*HI aus pSP-*PMT2* herausgeschnitten. Das erhaltene Fragment wurde in den mit *Bam*HI geschnittenen Vektor pCaDis stromabwärts vor den regulierbaren *C. albicans* *MET3*-Promotor (*MET3p*) inseriert (Care *et al.*, 1999). Das so erhaltene Plasmid wurde mit pSP17 bezeichnet. Nach Restriktionsverdau mit *Cla*I wurde das linearisierte Plasmid in die Stämme P2-22 und P2-67 (*pmt2Δ::hisG/PMT2*) transformiert. Durch homologe Rekombination sollte das linearisierte Fragment und so der *MET3*-Promotor vor das verbliebene *PMT2*-Allel integrieren (Abb. 3.7). Die erhaltenen Transformanten wurden durch Kolonie-PCR mit den Primern verP1 und verP2k verifiziert (1,0 kb großes PCR-Produkt). Positiv verifizierte Stämme wurden mittels einer Southernblot-Analyse überprüft (siehe Abb. 3.1). Die so erhaltenen Stämme wurden als P2-678 und P2-679 bezeichnet (*pmt2Δ::hisG/MET3p-PMT2*). Es stellte sich jedoch heraus, dass die Stämme P2-678 und P2-679 auch unter reprimierenden Bedingungen, d.h. in Gegenwart von 2,5 mM Methionin und Cystein wachsen konnten. Sie zeigten lediglich einen schwachen Wachstumsdefekt sowohl in flüssigem als auch auf festem Medium (Abb. 3.8). Es ist möglich, dass eine noch ausreichende Restaktivität des reprimierten Promotors noch hinreichend für das Wachstum der Mutanten ist. Ein anderer Grund könnte sein, dass durch eine fehlende O-Glykosylierung der Aminosäuretransport eingeschränkt ist und so keine ausreichenden Mengen Methionin und Cystein zur Repression des *MET3p* vorhanden sind. Ein eingeschränkter Aminosäuretransport könnte aufgrund einer Funktionseinschränkung der Aminosäuretransporter oder durch eine veränderte Zellwandstruktur bedingt sein. Das Wachstum des Stamms P2-678 änderte sich jedoch auch nicht bei einer erhöhten Konzentration Methionin und Cystein (Daten nicht gezeigt).

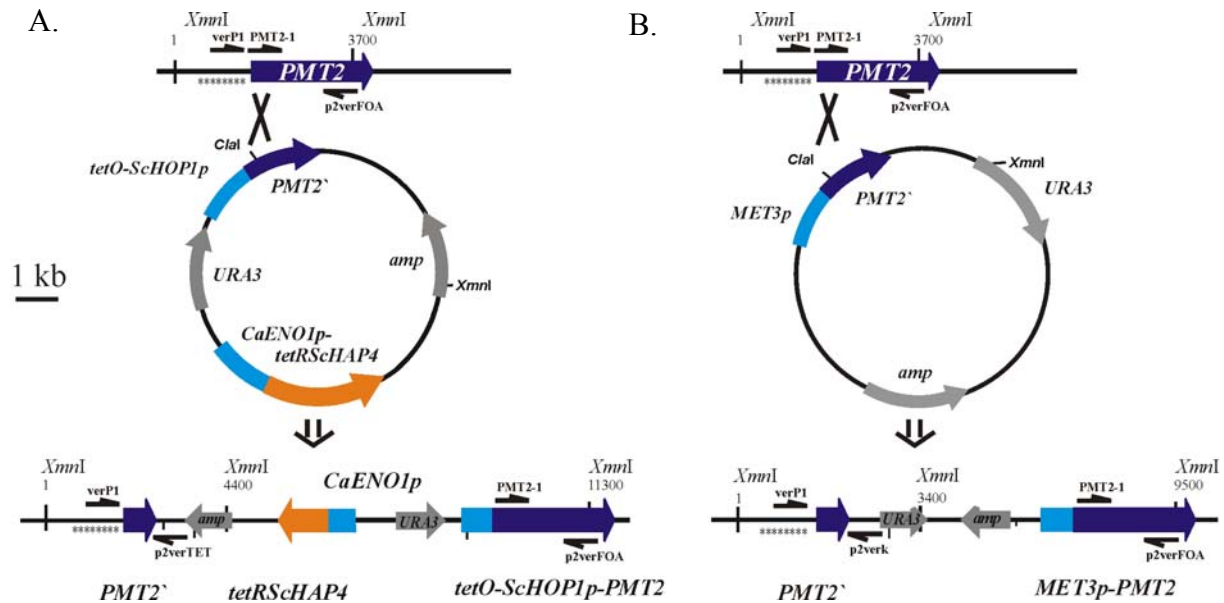


Abb. 3. 7: Schema zur Konstruktion konditionaler Mutanten. Über homologe Rekombination im 5'-Bereich von *PMT2* integriert A. das Plasmid p2151C-CaPMT2T oder B. pSP17 nach Restriktionsverdau mit *Clal* ins Genom. Die mit einem * gekennzeichneten Regionen geben die im Southernblot verwendete Sonde an.

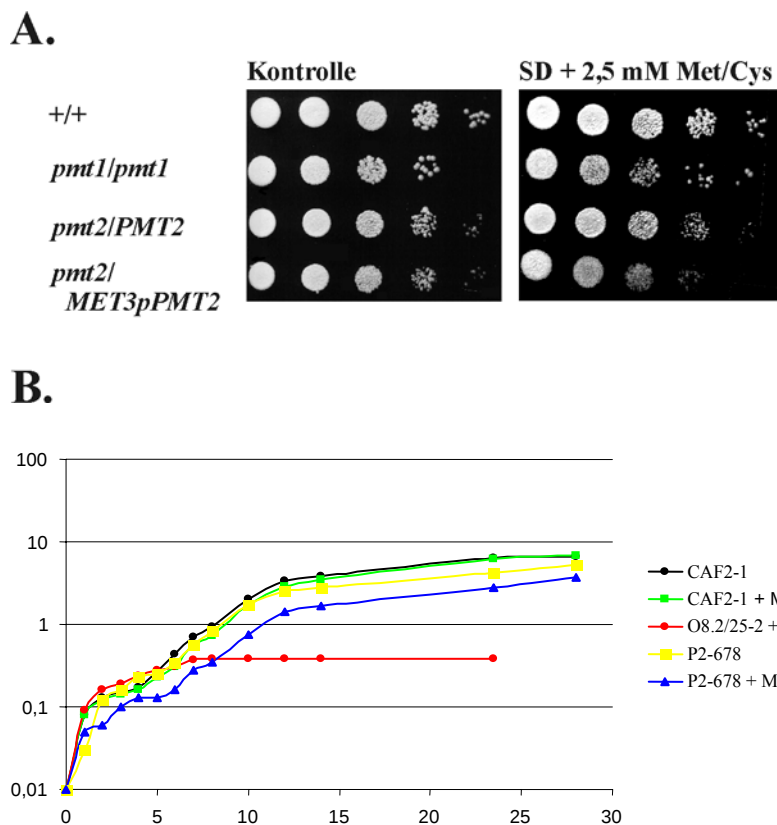


Abb. 3.8: Wachstum der konditionalen Mutante P2-678. A.) 10^5 bis 10^7 Zellen der Stämme CAF2-1 (Wildtyp), CAP1-312 (*pmt1/pmt1*), P2-2 (*pmt2/PMT2*) und P2-678 (*pmt2/MET3p-PMT2*) wurden in einem Volumen von 5 μ l auf SD Platten aufgetropft und bei 30 °C für zwei Tage inkubiert. Die Aminosäuren wurden den Agarplatten nach Abkühlung auf mindestens 50 °C hinzugefügt. B.) Wachstum der Stämme CAF2-1 (Wildtyp), P2-2 (*pmt2/PMT2*), P2-678 (*pmt2/MET3p-PMT2*) und als Kontrolle O8.2/25-2 (*ole1/MET3p-OLE1*) (Plaine, 2003) in flüssigem Medium mit und ohne Methionin und Cystein..

Daher wurde ein weiteres System zur Herstellung konditionaler Mutanten verwendet. Nakayama *et al.* (2000) adaptierten ein vielfach in Eukaryoten angewandtes Tetracyclin-regulierbares Expressionssystem für *C. albicans*. Es basiert auf der molekularen Interaktion des Repressors *tetR* mit dem Operator *tetO*. In Abwesenheit von Doxycyclin bindet das Fusionsprotein aus *tetR* und der Aktivierungsdomäne von ScHap4 als Dimer die *tetO* Operator Sequenz, was eine Transkription bewirkt. In Anwesenheit von Doxycyclin, welches

an TetR bindet, zerfallen die Dimere und die Transkription ist inhibiert. Zur Herstellung konditionaler Mutanten wurde Plasmid p2151C-CaPMT2T hergestellt. p2151C-CaPMT2T beinhaltet eine *ENO1p-tetR-ScHAP4* Fusion, einen *URA3* Marker und 1,4 kb der 5'-Region von *PMT2* abwärts eines *tetO-ScHOP1*-Promotorkonstruktes. Das Plasmid wurde mit *ClaI* linearisiert und in die Stämme P2-22 und P2-67 (jeweils *pmt2Δ::hisG/PMT2*) transformiert. Erhaltene Transformanten wurden mit dem Primerpaar verP1 und p2verTET verifiziert (1,0 kb). Zusätzlich wurde das zweite Allel mit dem Primerpaar verP1/p2verFOA überprüft. Dieses Primerpaar ergibt für ein *pmt2Δ::hisG*-Allel ein Produkt von 1,2 kb und für ein *PMT2*-Allel ein Produkt von 2,0 kb (Abb. 3.5). In Abb. 3.9 ist eine Verifizierungs-PCR exemplarisch gezeigt. In Stämmen, die für die Integration des Promotorkonstruktes positiv getestet wurden, konnte in 78 % der Fälle (n=30) drei Allele des *PMT2* Locus festgestellt werden (Abb. 3.9 Stamm P2-22tet4). In den restlichen Fällen hatte das Promotorkonstrukt in das *pmt2Δ::hisG*-Allel integriert (Abb. 3.9 Stamm P2-22xy). Nur eine Transformante mit dem Genotyp *pmt2Δ::hisG/tetO-ScHOP1p-PMT2* konnte verifiziert werden (Abb. 3.9, Stamm P2-22tet1). Der Stamm wurde mit P2-22tet1 bezeichnet.

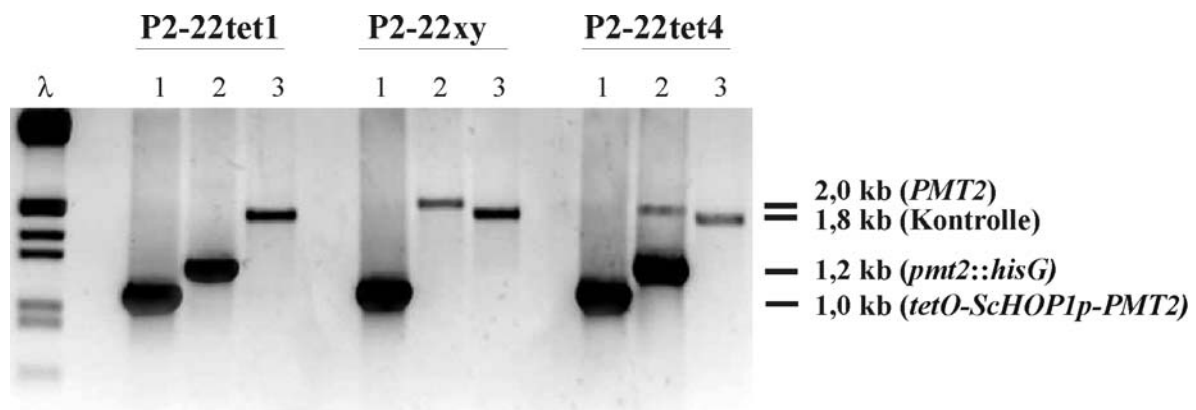


Abb. 3.9: Verifizierungs-PCR. Exemplarisch ist die Verifizierung der konditionalen *pmt2Δ::hisG/tetO-ScHOP1p-PMT2* Mutante gezeigt. Primerpaar verP1/p2verTET ergibt ein 1,0 kb großes Produkt für das *tetO-ScHOP1p-PMT2*-Allel (1); verP1/p2verFOA ergibt ein 1,2 kb-Produkt für das *pmt2Δ::hisG*-Allel und ein 2,0 kb-Produkt für das *PMT2*-Allel (2) *PMT2*-1/p2verFOA diente als PCR-Kontrolle und ergibt für das *PMT2*-, sowie das *tetO-ScHOP1p-PMT2*-Allel ein 1,8 kb großes Produkt (3). P2-22tet1 hat den Genotypen *pmt2Δ::hisG/tetO-ScHOP1p-PMT2*; P2-22xy *tetO-ScHOP1p-PMT2/PMT2* und P2-22tet4 *pmt2Δ::hisG/tetO-ScHOP1p-PMT2/PMT2*. Vergleiche auch Abb. 3.5, sowie Abb. 3.7

In Abb. 3.10 ist exemplarisch das Bandenmuster einer Southernblot-Analyse der verschiedenen Disruptionsstämme gezeigt. Mit chromosomaler DNA des Stammes SC5314, die durch *XmnI* geschnitten wurde, ergab das Wildtyp-Allel eine Bande von 3,7 kb (Spur 1). Nach Integration des "URA-Blasters" wurde zusätzlich eine Bande von 5,9 kb detektiert (Spur 2). Exision des *URA3*-Markers resultierte in eine 3,0 kb große Bande (Spur 3). Neben der 3,0 kb großen Bande für das *pmt2Δ::hisG*-Allel, wurde für Stamm P2-22tet1 eine Bande von 4,4 kb für das *tetO-ScHOP1p-PMT2*-Allel detektiert. Zusätzlich zeigte sich eine Bande von etwa 6,9 kb (Spur 4). Eine Erklärung dafür ist eine Verunreinigung der Sonde. Beim Restriktionsverdau des Plasmides pSP-CaPMT2, zur Elution der Sonde, entsteht auch ein 390 bp großes Fragment. Dieses kleinere Fragment kann bei der Gelelektrophorese, zu einem gewissen Teil, von der über ihr laufenden, größeren Bande zurückgehalten werden. Das Fragment bindet im 5'-Bereich des *PMT2*-ORF und ergibt nach einem Restriktionsverdau der

genomischen DNA des Stammes P2-2tet1 mit *XmnI* in der Southernblot-Analyse eine Fragmentgröße von 6,9 kb. Eine weniger wahrscheinliche Möglichkeit ist die, dass eine Umordnung des Locus stattgefunden hat. In Spur 5 ist das Bandenmuster für Stamm P2-678 gezeigt. Die 5,4 kb große Bande entspricht dem *pmt2Δ::hisG/MET3p-PMT2*-Allel.

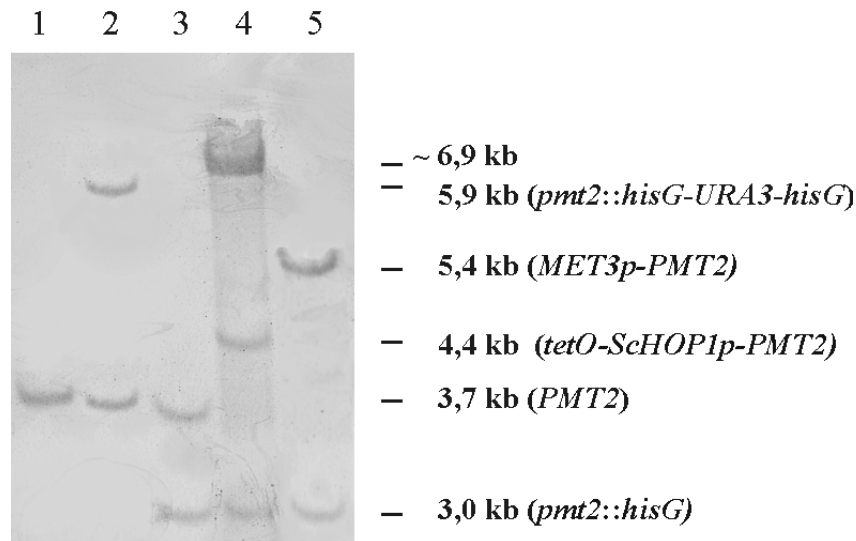


Abb. 3.10: Southernblot-Analyse verschiedener *C. albicans* Stämme. Die chromosomale DNA wurde mit *XmnI* geschnitten. Als Sonde wurde ein 1 kb großes Fragment mit *Bam*HI und *Bgl*III aus pSP-CaPMT2 herausgeschnitten (siehe Abb. 3.5 und Abb. 3.7). In Spur 1 wurde der Stamm SC5314 (*PMT2/PMT2*), in Spur 2 P2-2 (*PMT2/pmt2Δ::hisG-URA3-hisG*), in Spur 3 P2-22 (*PMT2/pmt4Δ::hisG*), in Spur 4 P2-22tet1 (*pmt2Δ::hisG/tetO-ScHOP1p-PMT2*) und in Spur 5 P2-678 (*pmt4Δ::hisG/MET3p-PMT4*) aufgetragen.

Um zu demonstrieren, dass die Mutante P2-22tet1 (*pmt2Δ::hisG/tetO-ScHOP1p-PMT2*) unter reprimierenden Bedingungen nicht mehr lebensfähig ist, wurden 10^5 Zellen auf SD-Medium und auf SD-Medium mit 30 μ g/ml Doxycyclin ausgestrichen (Abb. 3.11). Bei dieser Konzentration ist der *tetO-ScHOP1*-Promotor vollständig reprimiert (Nakayama *et al.*, 2000). Zusätzlich wurde die Mutante P2-22tet4, welche drei *PMT2*-Allele besitzt, die Halbdisruptante P2-2 (*PMT2/pmt2Δ::hisG-URA3-hisG*), sowie der Wildtyp aufgetragen (Abb. 3.9). Während der Stamm P2-22tet4, sowie die Halbdisruptante und der Wildtyp ohne Einschränkung wuchsen, zeigte der Stamm P2-22tet1 einen völligen Wachstumsarrest auf Medium, welches 30 μ g/ml Doxycyclin enthielt (siehe Abb. 3.11). Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass es sich bei *PMT2* tatsächlich um ein essentielles Gen handelt, wobei ein *PMT2* Allel für das Wachstum *C. albicans* hinreichend ist.

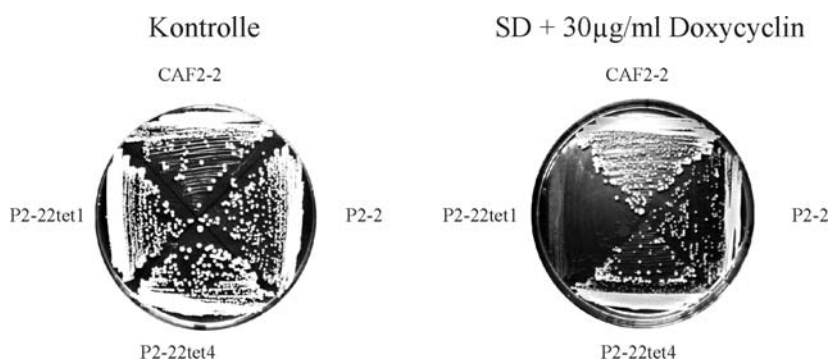


Abb. 3.11.: Wachstum verschiedener *C. albicans* Stämme auf SD-Medium und SD-Medium mit 30 μ g/ml Doxycyclin. Es wurden jeweils 10^5 Zellen aufgetragen. Die Platten wurden für 3 Tage bei 30 °C inkubiert. Genotypen der Stämme: CAF2-2 (Wildtyp), P2-2 (*pmt2Δ/PMT2*), P2-22tet4 (*pmt2Δ::hisG/tetO-ScHOP1p-PMT2/PMT2*) und P2-22tet1 (*pmt2Δ::hisG/tetO-ScHOP1p-PMT2*)

3.2.2 Rekonstituierung des *URA3*-Gens an seinem nativen Locus

Es ist bekannt, dass die Expression des *URA3*-Gens vom Integrationsort abhängt (Lay *et al.*, 1998; Cheng *et al.*, 2003). Daher wurde das *URA3*-Gen in allen auxotrophen *pmt*-Deletionsstämmen an seinem nativen Locus rekonstituiert. Damit lassen sich Positionseffekte hinsichtlich der *URA3* Expressionsstärke ausschließen und es wird ein besserer Vergleich mit dem Kontrollstamm CAF2-1 ($\Delta ura3::imm434/URA3$) ermöglicht.

Zur Rekonstituierung wurde aus Plasmid HB5, welches den genomischen *URA3*-Locus enthält (Losberger und Ernst, 1989), ein 4,3 kb großes *Pst*I und *Xho*I Fragment isoliert und auf Wachstum ohne Uridin selektioniert. Das Fragment, das den *URA3* Locus enthielt, wurde in die zu rekonstituierenden Stämme transformiert. Mittels PCR wurde überprüft, ob das Fragment den *URA3* Locus rekonstituiert hatte. Mit den Primern i-p2-*URA3*ver und p3-*URA3*ver ergab die PCR bei korrekter Integration ein 800 bp großes Fragment (Daten nicht gezeigt).

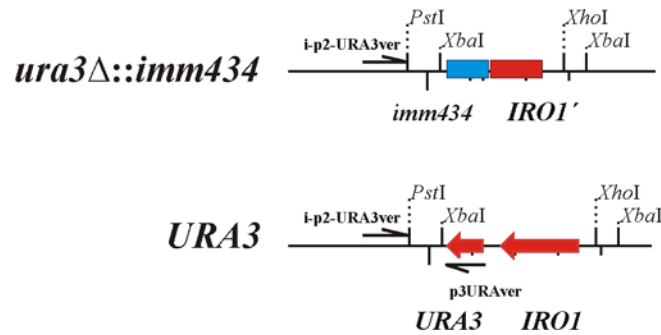


Abb. 3.12: Schema zu Rekonstituierung des *URA3*-Gens an seinem nativen Locus. Nach Integration eines 4,3 kb großes Fragment, welches mit *Pst*I und *Xho*I aus Plasmid HB5 heraus geschnitten wurde, ist sowohl das *URA3*-Gen, als auch das *IRO1*-Gen rekonstituiert.

3.3 Phänotypische Charakterisierung der *pmt*-Mutanten

Nach Disruption aller *PMT*-Gene in *C. albicans* sollte eine abschließende und vergleichende Beschreibung aller Merkmalsausprägungen der kompletten Serie der *pmt*-Mutanten erfolgen. Die Auswirkungen, welche die Disruption von *PMT*-Genen in Bezug auf Morphologie, Sensitivität gegen Antibiotika und andere Substanzen, sowie auf die Substratspezifität von *C. albicans* erkennen ließen, sollten helfen, die unterschiedlichen Funktionen der verschiedenen Pmt-Proteine zu verstehen.

3.3.1 Wachstum der *pmt*-Mutanten

Wachstumsanalysen der *pmt*-Mutanten ergaben, dass lediglich *pmt1*-Mutanten ein langsames Wachstum als der Wildtyp aufweisen. Timpel *et al.* (1999) ermittelten eine Generationszeit von 150 min für den Stamm CAP1-312 (*pmt1/pmt1*) in SD-Medium. Dieselbe Generationszeit ergab sich auch bei einer Wachstumsanalyse des Stammes SPCa2 (*pmt1/pmt1*), in dem das *URA3*-Gen an seinem nativen Locus rekonstituiert wurde. Der Wildtypstamm CAF2-1, sowie die Stämme P2-2 (*pmt2/PMT2*), CAP4-216 (*pmt4/pmt4*), P5-577 (*pmt5/pmt5*) und CAP2-312 (*pmt6/pmt6*) (Timpel, 1998) erreichten in SD-Medium eine Generationszeit von jeweils 100 min.

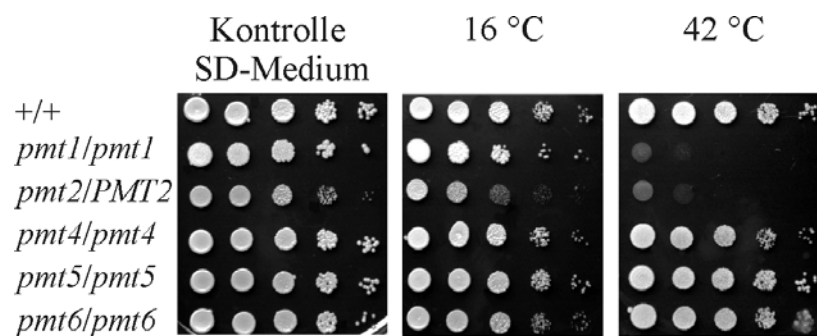


Abb. 3. 13: Temperatursensitivität der *pmt*-Mutanten. Zellen einer Übernacht-Kultur wurden auf 10^5 bis 10^8 Zellen verdünnt und in einem Volumen von 5 μ l SD-Platten aufgetropft. Die Inkubation erfolgte bei 30 °C und 42 °C für zwei bis drei Tage und bei 16 °C für fünf Tage.

Es stellten sich heraus, dass *pmt1*- und *pmt2/PMT2*-Mutanten temperatursensitiv sind (Abb. 3.22). Sie waren in der Lage bis zu einer Temperatur von 37 °C wie der Wildtyp zu wachsen, aber bei einer Temperatur von 42 °C wurde ihr Wachstum nahezu vollständig verhindert. Als geringfügig kältesensitiv stellte sich lediglich die *pmt2/PMT2*-Mutante heraus (Abb. 3.22). Ihr Wachstum war bei einer Temperatur von 16 °C moderat eingeschränkt.

3.3.2 Aggregation

Stämme mit Mutationen in Genen für Proteinmannosyltransferasen zeigen verschieden stark ausgeprägte Tendenzen zur Aggregation. *pmt1*-Mutanten aggregieren stark, *pmt4*-Mutanten leicht und Stämme mit Mutationen im *PMT5*- oder *PMT6*-Gen aggregieren nicht (Timpel *et al.*, 1998; Prill, 2001; Klinkert, 2002). Lichtmikroskopische Beobachtungen der heterozygoten *pmt2*-Mutante ließen keine Aggregation erkennen. Es fielen aber überdurchschnittlich viele Zellen durch eine abnorme Zellmorphologie auf. Dabei waren die meisten abnormen Zellen elongiert oder geschwollen. In Abb. 3.14 sind zur Übersicht der unterschiedlich starken Aggregation der *pmt*-Mutanten lichtmikroskopische Aufnahmen aller *pmt*-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp gezeigt. Die Rekonstituierung des *URA3*-Gens hatte keinen Einfluss auf die Bildung von Aggregaten (Daten nicht gezeigt).

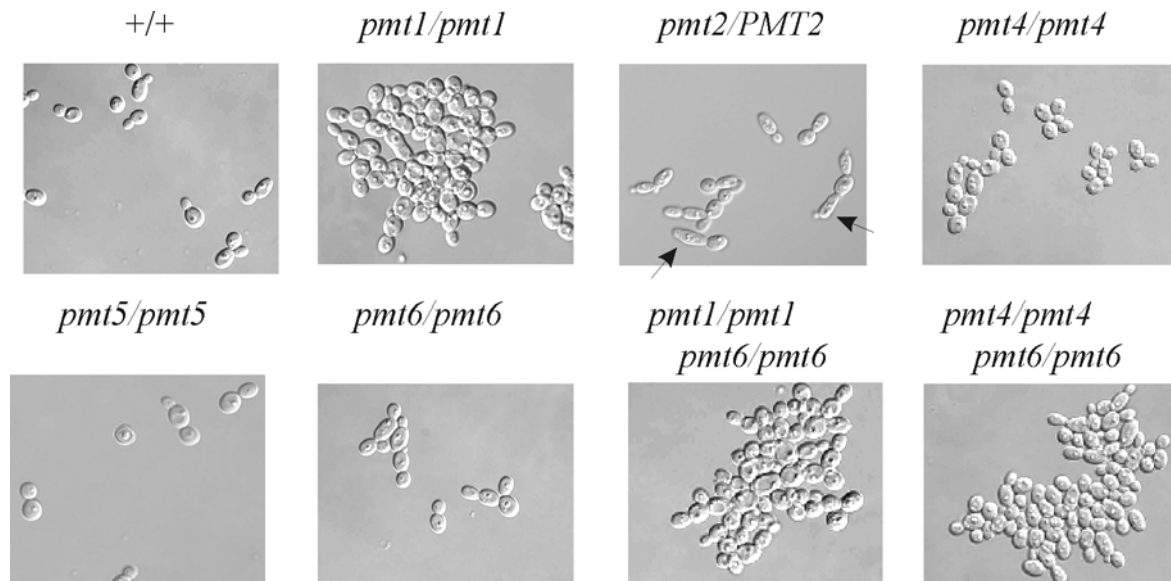


Abb. 3.14: Zellmorphologie verschiedener *C. albicans* Stämme. Die Stämme CAF2-1 (Wildtyp), CAP1-312 (*pmt1/pmt1*), P2-2 (*pmt2/PMT2*), CAP4-216 (*pmt4/pmt4*), P5-577 (*pmt5/pmt5*), CAP2-213 (*pmt6/pmt6*), CPP117 (*pmt1/pmt1 pmt6/pmt6*), PP46-428 (*pmt4/pmt4 pmt6/pmt6*) wurden in SD-Medium bis zu einer optischen Dichte ($OD_{600\text{ nm}}$) von 0,8 angezogen und mikroskopiert. Die Photos wurden mit einem Zeiss Axioscop Mikroskop bei 400facher Vergrößerung aufgenommen. Abnorme Zellen der *pmt2/PMT2*-Mutante sind mit einem Pfeil gekennzeichnet.

Um die Aggregationsstärke quantifizieren zu können, wurde ein Aggregationsindex erstellt. Hierzu wurden Flüssigkulturen der *pmt*-Mutanten, mit einer $OD_{600\text{ nm}}$ von 1, für 15 min bei Raumtemperatur stehen gelassen, um den Zellen Gelegenheit zu geben sich abzusetzen. Danach wurden Proben des Mediums entnommen und ihr $OD_{600\text{ nm}}$ -Wert auf den $OD_{600\text{ nm}}$ -Wert zum Zeitpunkt $t=0$ bezogen. Wie in Abb. 3.15 zu erkennen ist, bestätigt das Experiment die Beobachtungen, welche mit dem Lichtmikroskop erzielt wurden. Neben den gleich stark aggregierenden Mutanten *pmt1*, *pmt1 pmt6* und *pmt4 pmt6* zeigt lediglich die *pmt4*-Mutante eine signifikante Tendenz zur Aggregation.

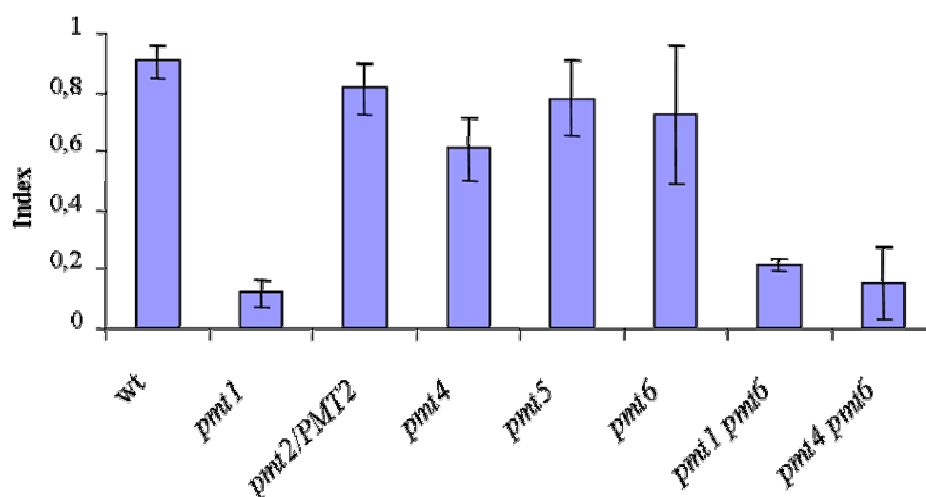


Abb. 3.15: Aggregationsindex der *pmt*-Mutanten. Flüssigkulturen der Stämme CAF2-1 (Wildtyp), SPCa2 (*pmt1/pmt1*), SPCa4 (*pmt2/PMT2*), SPCa6 (*pmt4/pmt4*), SPCa10 (*pmt5/pmt5*), SPCa8 (*pmt6/pmt6*), CPP117 (*pmt1/pmt1 pmt6/pmt6*) und PP46-428 (*pmt4/pmt4 pmt6/pmt6*) einer $OD_{600\text{ nm}}$ von 1 wurden für 15 min bei Raumtemperatur stehen gelassen, um den Zellen Gelegenheit zu geben sich am Boden abzusetzen. Danach wurden Proben entnommen und deren $OD_{600\text{ nm}}$ ins Verhältnis zur $OD_{600\text{ nm}}$ zum Zeitpunkt $t=0$ gesetzt. Gezeigt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung von vier unabhängigen Experimenten.

Wildtyp

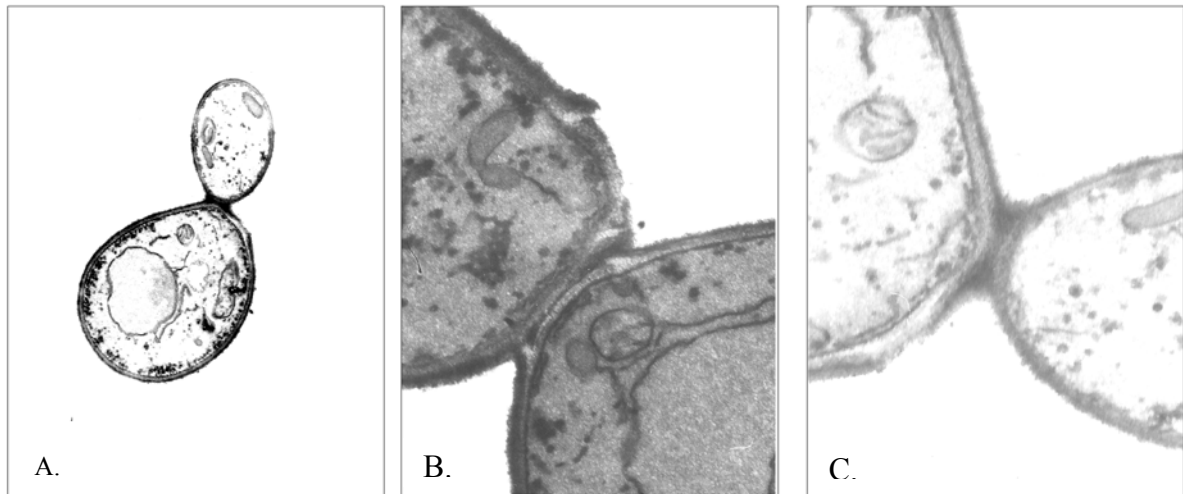
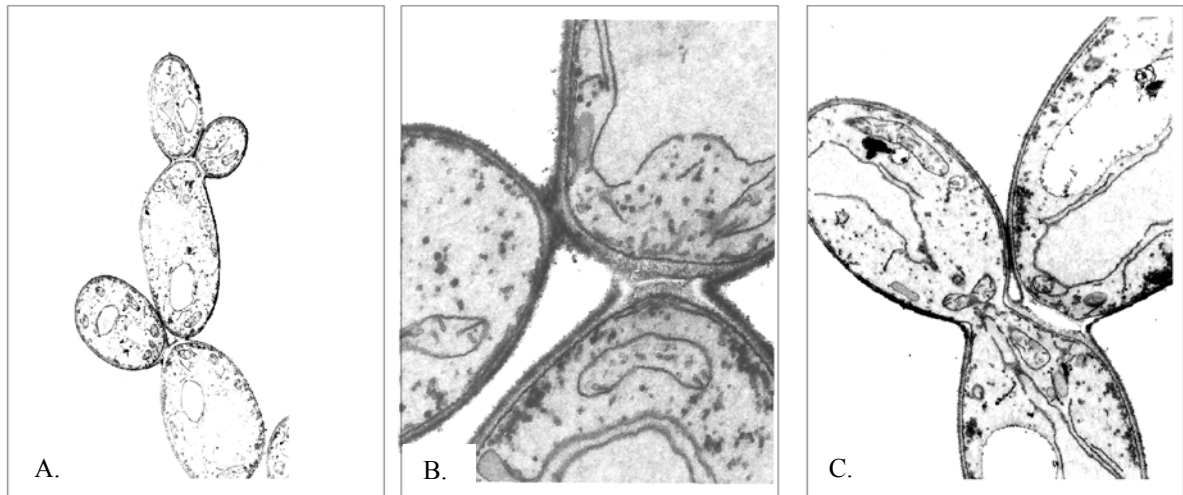
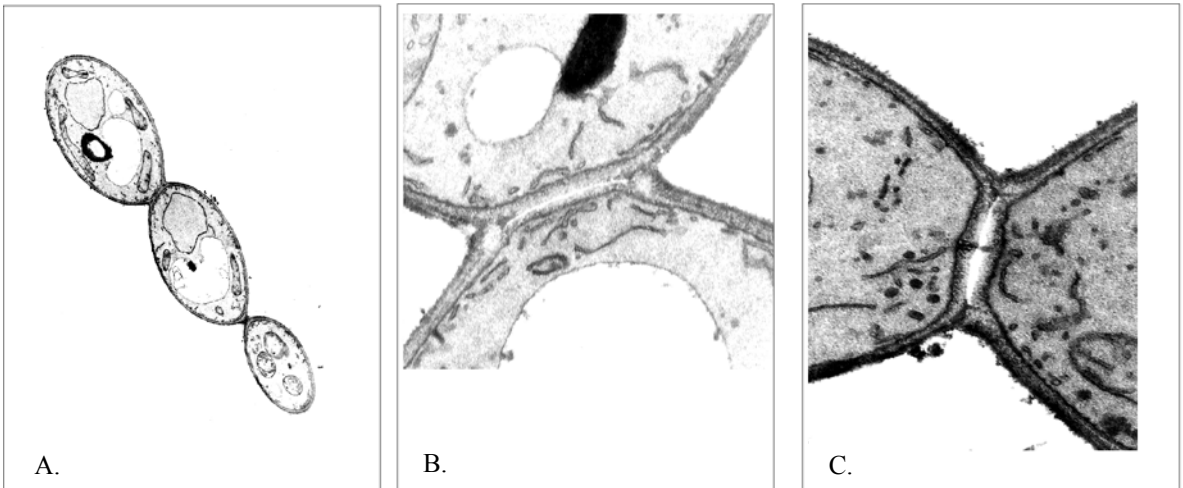
*pmt1**pmt4 pmt6*

Abb. 3.16: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von verschiedenen *C. albicans* Stämmen. Gezeigt sind in der ersten Spalte eine Übersichtsaufnahme des Wildtyps (CAF2-1), einer *pmt1*-Mutante (CAP1-312) und einer *pmt4 pmt6*-Mutanten (PP46-428). In der zweiten und dritten Spalte sind jeweils Vergrößerungen der Knospungsregion gezeigt. Die Stämme wurden in SD-Medium angezogen. Die Zellen wurden in der logarithmischen Wachstumsphase geerntet und für die Elektronenmikroskopie vorbereitet. Es wurde eine Kaliumpermanganat-Fixierung durchgeführt (2.12).

Um Aussagen über die Natur der Aggregate machen zu können, wurden elektronenmikroskopische Aufnahmen der *pmt1*-Mutante und der *pmt4 pmt6*-Mutante im Vergleich zum Wildtyp gemacht. Dabei wurde eine Fixierung der Zellen mit Kaliumpermanganat gewählt. Bei der Kaliumpermanganat-Fixierung wird selektiv Manganoxid an Membranen gelagert, daher nur diese fixiert und später sichtbar. Im Gegensatz zur Glutaraldehyd-Fixierung, lassen sich jedoch auch Strukturen der Zellwand erkennen (U. Santore, persönliche Mitteilung).

In den elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden im Wildtyp keine Zelleaggregate detektiert. Es wurden nur Zellen mit höchstens einer Knospe detektiert (Abb. 3.16). In der *pmt1*- und der *pmt4 pmt6*-Mutante wurden Zelleaggregate detektiert, die aufgrund der Zellfixierung jedoch eine verminderte Größe besaßen (Abb. 3.16). Dabei waren die Aggregate in der *pmt1*-Mutante größer als in der *pmt4 pmt6*-Mutante. Da während der Fixierungsprozedur alle Aggregate, welche auf hydrophilen oder hydrophoben Wechselwirkungen beruhen, aufgelöst werden, beruhen die verbliebenen Aggregate der *pmt1*- und der *pmt4 pmt6*-Mutante auf kovalenten Verbindungen.

Des Weiteren lässt sich erkennen, dass in der *pmt1*-Mutante das primäre Septum in einigen Fällen bereits hydrolysiert wurde, die Zellen jedoch weiter aneinander haften (Abb. 3.16 *pmt1* B.). Das primäre Septum wird in Hefen von den Chitinasen hydrolysiert (Cabib *et al.*, 2001), von denen in *C. albicans* nachgewiesen wurde, dass sie von einer verminderten O-Glykosylierung betroffen sind (Timpel *et al.*, 1998). Die Ergebnisse hier zeigen, dass ein Funktionsverlust der Chitinasen nicht der alleinige Grund für die Entstehung von Aggregaten ist, sondern, dass noch andere Proteine daran beteiligt sind.

3.3.3 Zelloberflächenhydrophobizität

Die Zelloberflächenhydrophobizität (cell surface hydrophobicity: CSH) von *C. albicans* Zellen wirkt sich direkt auf die Fähigkeit des Pilzes zur Adhäsion aus (Glee *et al.*, 1995). Dass *pmt1*-Mutanten sowohl an Epithel- als auch Endothelzellen schlechter adhäreren als der

Genotyp	Zellen in der wässrigen Phase
+/+	10%
<i>pmt1/pmt1</i>	30%
<i>pmt2/PMT2</i>	5%
<i>pmt4/pmt4</i>	29%
<i>pmt5/pmt5</i>	10%
<i>pmt6/pmt6</i>	7,5%

Tab. 3. 3: Anteil an *C. albicans* Zellen in der wässrigen Phase. Zellen einer Übernachtskultur wurden in Wasser auf eine OD von 1 verdünnt und mit Oktan überschichtet. Nach dreiminütigem Vortexen wurde die OD der wässrigen Phase ins Verhältnis zur Anfangs-OD gesetzt (Reynolds und Fink, 2001)

Wildtyp (Timpel *et al.*, 1998), legt die Vermutung nahe, dass in *pmt*-Mutanten die CSH verändert ist. Des Weiteren kann es aufgrund von verstärkten hydrophoben Wechselwirkungen zur Aggregation kommen, wie sie die *pmt*-Mutanten zeigen (3.3.2). Daher wurden mit *URA3* rekonstituierte *pmt*-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp daraufhin getestet, ob ihre Verteilung, in einem Zwei-Phasen-System aus Wasser und Oktan, verändert ist. Dazu wurden die Stämme CAF2-1 (Wildtyp), SPCa2 (*pmt1/pmt1*), SPCa4 (*pmt2/PMT2*), SPCa6 (*pmt4/pmt4*), SPCa10 (*pmt5/pmt5*) und SPCa8 (*pmt6/pmt6*) verwendet. Wie in Tab. 3. 3 zu sehen ist, sind insbesondere *pmt1*- und *pmt4*-Mutanten wesentlich weniger hydrophob als der Wildtyp. Etwa 30 % der Zellen dieser Stämme befinden sich nach ausgiebigem Schütteln (Vortex) in der wässrigen Phase, während sich nur 10 % der

Wildtypzellen in ihr befinden. Stämme mit Mutationen in den Genen *PMT5* und *PMT6* verhielten sich nahezu wie der Wildtyp. Hingegen befanden sich nur 5 % der Zellen einer *pmt2/PMT2*-Mutante in der wässrigen Phase, was für eine gesteigerte CSH in diesen Stamm spricht. Aufgrund der hier gezeigten Ergebnisse und den Daten aus Abschnitt 3.3.2 kann man eine Aggregation der *pmt*-Mutanten aufgrund hydrophober Wechselwirkungen ausschließen.

3.3.4 Morphogenese

Die Bildung von Hyphen in *C. albicans* wird durch eine Reihe verschiedener Umweltbedingungen induziert. Die verschiedenen Reize induzieren über verschiedene Signaltransduktionswege die Transkription von Genen, die zur Entwicklung der Hyphen nötig sind (Ernst, 2000). Da gezeigt werden konnte, dass *pmt1*- und *pmt4*-Mutanten nicht mehr in der Lage sind auf festem „Spider“-Medium Hyphen auszubilden (Timpel *et al.*, 1998; Prill, 2000) und die Fähigkeit von *pmt6*-Mutanten, auf „Spider“-Medium Hyphen auszubilden, eingeschränkt ist (Timpel *et al.*, 2000), wurde der Einfluss von *PMT2* auf die Hyphenbildung untersucht. Des Weiteren wurde überprüft, ob der *URA3* Status Einfluss auf die Hyphenbildung in den verschiedenen *pmt*-Mutanten hat.

Unter Einwirkung positiver Stimuli, wie Serum oder *N*-Acetylglukosamin (Odds, 1988), war die Fähigkeit von *pmt2/PMT2*-Mutanten Hyphen zu bilden weder in flüssigem Medium noch auf festem Medium beeinträchtigt. Die Stämme begannen zum gleichen Zeitpunkt wie der Wildtyp CAF2-1 mit der Bildung von Hyphen. Auch war kein Unterschied in Art oder Menge der Hyphenbildung unter dem Mikroskop zu erkennen. In Abb. 3.17 ist die Hyphenbildung einer *pmt2/PMT2*-Mutanten (SPCa4) nach Induktion mit 5 % Pferdeserum gezeigt. Als Kontrollen wurde die Hyphenbildung des Wildtyps (CAF2-1) und einer *pmt1*-Mutante (CAP1-3121), sowie einer *pmt1*-Mutante (SPCa2), welche mit dem *URA3*-Gen an ihrem nativen Locus rekonstituiert worden war, protokolliert. Die *pmt1*-Mutante war in ihrer Fähigkeit Hyphen zu bilden stark eingeschränkt. Nachdem bereits 100 % der Wildtypzellen Hyphen gebildet hatten, zeigte lediglich 20 % der *pmt1*-Zellen Hyphen (Abb. 3.17). Der Status des *URA3*-Gens hatte auf die Hyphenbildung der *pmt1*-Mutante keinen Einfluss. Auf festem Medium mit 5 % Pferdeserum bildeten sich in der *pmt1*-Mutante erst nach zwei Tagen Hyphen, im Wildtyp hingegen bereits nach einem Tag (Abb. 3.17).

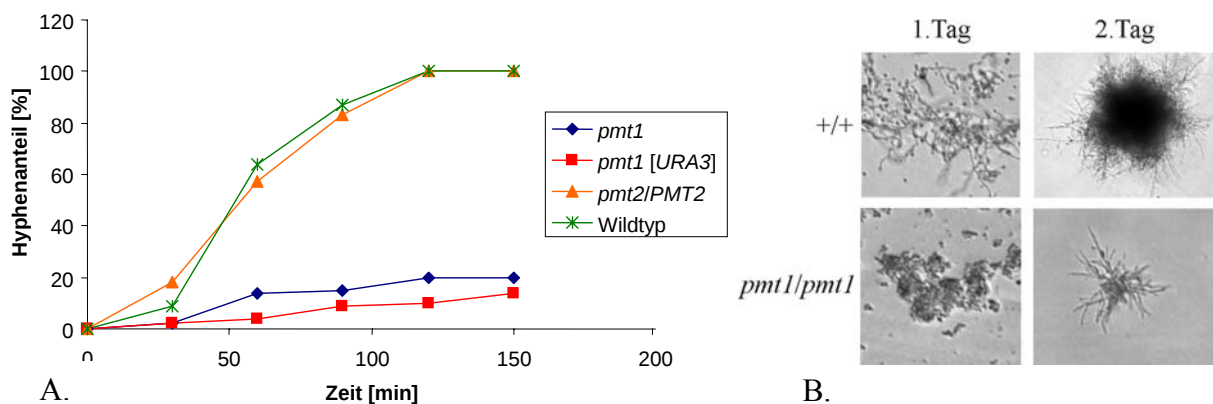


Abb. 3.17: Hyphenbildung verschiedener *C. albicans* Stämme. A. Hyphenbildung in flüssigem Medium mit 5 % Pferdeserum bei 37 °C. B. Hyphenbildung auf festem Medium mit 5 % Pferdeserum bei 37 °C.

pmt2/PMT2-Mutanten waren in der Lage, ohne Einschränkungen in flüssigem „Spider“-Medium Hyphen zu bilden. „Spider“-Medium enthält Mannitol als C-Quelle und eine

komplexe Stickstoffquelle (Nutrient Broth). Dagegen stellte sich heraus, dass die heterozygote *pmt2/PMT2*-Mutante sowohl auf festem „Spider“-Medium, als auch auf festem Lee's-Medium (Abb. 3.18) nur noch eingeschränkt fähig war Hyphen auszubilden. Wie in Abb. 3.18 zu sehen ist, hatte die Rekonstituierung von *UAR3* keinen Effekt auf die Hyphenbildung der verschiedenen *pmt*-Mutanten.

Durch Transformation des *PMT2*-Gens auf Plasmid pSP16 sollte der Phänotyp des Wildtyps in der *pmt2/PMT2*-Mutante wiederhergestellt werden. Jedoch waren *pmt2/PMT2*-Mutanten auch nach Transformation nicht in der Lage, wie der Wildtyp Hyphen zu bilden (Daten nicht gezeigt). Auch mit Plasmid pSP28, in dem *PMT2* unter Kontrolle des *PCK1*-Promotors steht, sowie den unabhängig hergestellten Plasmiden pBI-CaPMT2, mit *PMT2* unter Kontrolle des *PCK1*-Promotors, und pCaPMT2mp mit *PMT2*, unter Kontrolle seines nativen Promotors (M. Gerads, persönliche Mitteilung), schlug eine Rekonstituierung des Phänotyps der heterozygoten Mutante aus unbekannten Gründen fehl.

In Epistase-Experimenten konnte gezeigt werden, dass der Phänotyp einer *pmt6*-Mutante auf „Spider“-Medium durch Überexpression von Komponenten verschiedener Signaltransduktionswege komplementiert worden war (Timpel *et al.*, 2000). Um zu überprüfen, ob dies auch der Fall in einer *pmt2/PMT2*-Mutanten ist, wurden Plasmid pCCa4, auf dem sich die MAP-Kinase Cek1p befindet, Plasmid pLJ19 mit dem Transkriptionsfaktor Cph1p, Plasmid pCaTPK2, das das Proteinkinase A-Homolog Tpk2p trägt und Plasmid pBJ-HAHYD, mit Efg1p in einer *pmt2/PMT2*-Mutanten überexprimiert. Es stellte sich jedoch heraus, dass, wie in *pmt1*- (Timpel *et al.*, 2000) und *pmt4*-Mutanten (Prill, 2000) der Wildtyp-Phänotyp durch Überexpression dieser Komponenten nicht wiederhergestellt werden kann (Daten nicht gezeigt).

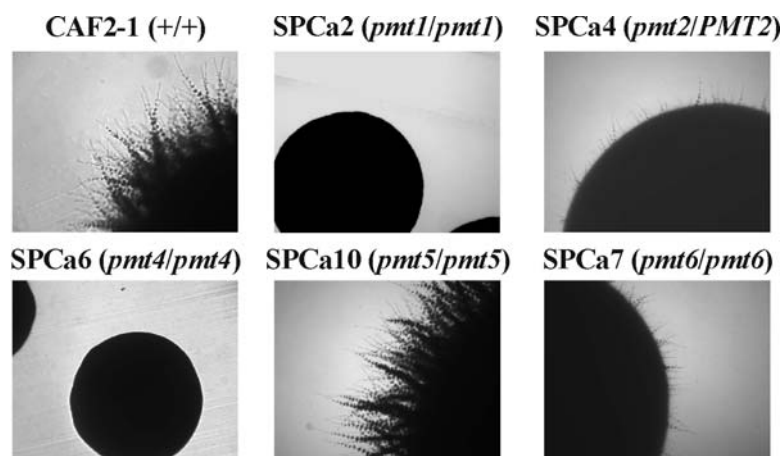


Abb. 3.18: Hyphenbildung verschiedener *C. albicans* Stämme auf Lee's-Medium. Gezeigt sind Kolonieränder in einer 50 fachen Vergrößerung. Die Stämme wurden für zwei Tage bei 37 °C inkubiert. Es wurden die Ränder von Einzelkolonien mit einem Axioscop mit 15facher Vergrößerung aufgenommen.

Ein noch nicht näher definierter Signaltransduktionsweg, der für die Formierung von Hyphen unter eingebetteten und sauerstofflimitierenden Bedingungen zuständig ist, wurde zuerst von Sonneborn *et al.* (1999) beschrieben. Die am nativen *URA3* Locus rekonstituierten *pmt*-Mutanten wurden auf ihre Fähigkeit zur Hyphenbildung nach Einbettung in Agar und unter Sauerstoff limitierenden Bedingungen getestet (Abb. 3.19). Sowohl die *pmt1*-, als auch die *pmt1 pmt6*-Mutante waren unter beiden Bedingungen lediglich in der Lage, kurze, nicht vollständig entwickelte Hyphen zu bilden. Demgegenüber filamentierte die *pmt2/PMT2*-Mutante unter eingebetteten Bedingungen stärker als der Wildtyp. Unter hypoxischen Bedingungen verhielt sie sich jedoch wie der Wildtyp. Die *pmt4*-Mutante filamentierte unter

eingebetteten Bedingungen stärker als der Wildtyp und bildete vermehrt dicksträngige Filamente. Unter hypoxischen Bedingungen filamentierte die *pmt4*-Mutante verstärkt. Diese verstärkte Filamentierung war in einer *pmt4 pmt6*-Mutante unter beiden Versuchsbedingungen noch stärker. Stämme mit Mutationen in Genen für *PMT5* oder *PMT6* verhielten sich unter den jeweiligen Bedingungen wie der Wildtyp (Daten nicht gezeigt).

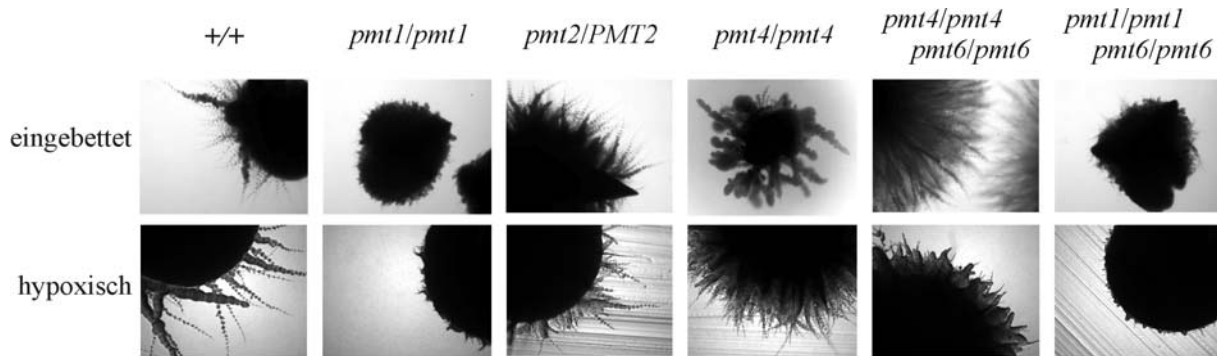


Abb. 3.19: Hyphenbildung verschiedener *C. albicans* Stämme unter eingebetteten und hypoxischen Bedingungen. Zellen der Stämme CAF2-1 (Wildtyp), SPCa2 (*pmt1/pmt1*), SPCa4 (*pmt2/PMT2*), SPCa6 (*pmt4/pmt4*), PP46-428 (*pmt4/pmt4 pmt6/pmt6*) und CPP117 (*pmt1/pmt1 pmt6/pmt6*) wurden für sieben Tage in YPS-Agar eingebettet, bei 24 °C inkubiert oder auf YPS-Agar aufgetragen und in einer anaeroben Kammer mit 99.9 % Stickstoff begast und bei 24 °C für sieben Tage inkubiert.

3.3.4.1 Expression von *CaPMT2* und *CaPMT4* während der Hyphenbildung

Die Proteinmannosyltransferasen in *C. albicans* sind, wie im letzten Abschnitt verdeutlicht, an der Ausbildung von Hyphen beteiligt. Um zu untersuchen, ob zwischen Hyphenbildung und Transkription der *PMT*-Gene eine Korrelation besteht, wurden Northern-Analysen durchgeführt. Für *PMT6* konnte ein leichter Rückgang des Transkriptes während der Hyphenentwicklung beobachtet werden (Timpel *et al.*, 2000). Die Transkription von *PMT1* war nicht mit der Entwicklung von Hyphen korreliert (Timpel *et al.*, 1998). Dabei konnte beobachtet werden, dass *PMT1* stärker als *PMT6* transkribiert wird (Timpel, 1998). *PMT5* konnte aufgrund eines sehr niedrigen Expressionslevels nicht mittels einer Northern-Analyse detektiert werden. Es war aber möglich ein *PMT5*-Transkript durch RT-PCR nachzuweisen (Klinkert, 2001). Hier sollten nun die Transkriptmenge von *PMT2* und *PMT4* im Verlaufe der

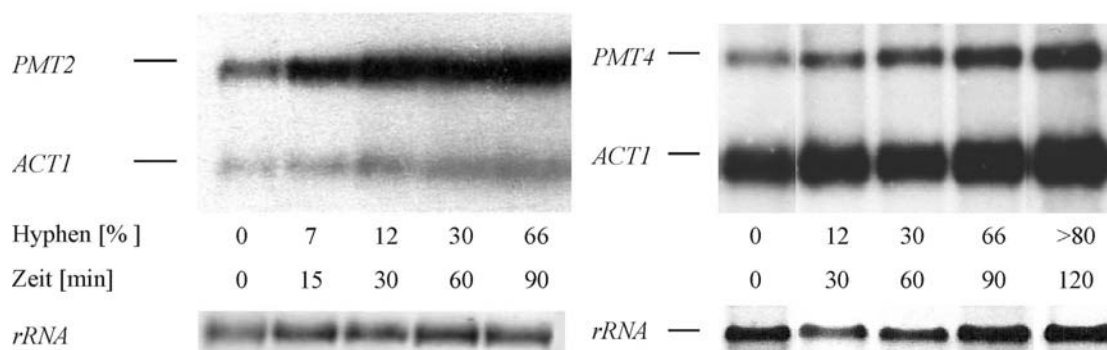


Abb. 3.20. Northern-Analyse von *PMT2* und *PMT4* während der Hyphenbildung von *C. albicans*. Vergleich der Transkriptmengen von *PMT2* und *PMT4* während der Hyphenentwicklung in Stamm CAF2-1 (Wildtyp). Als Sonde wurde für *PMT2* ein 1,3 kb Fragment mit *XmnI/XbaI* aus pSP-CaPMT2 und für *PMT4* ein 1,2 kb Fragment mit *BglII/EcoRI* aus pCT50, herausgeschnitten. Als Sonde für *ACT1* fungierte ein 1,5 kp *Clal/Sall*-Fragment aus p1595/3. Als weiterer Größen- und Mengenstandard ist die 1,8 kb große rRNA gezeigt.

Hyphenentwicklung untersucht werden. Die Hypheninduktion erfolgte, bei geringer Zelldichte nach einer dreistündigen Hungerperiode in 10 mM Prolin durch Zugabe von 2,5 mM GlcNAc und Erhöhung der Temperatur auf 37 °C (2.2.7).

Wie in Abb. 3.20 zu sehen ist, war es möglich die Transkripte von *PMT2* und *PMT4* sowohl in Abwesenheit, als auch in Anwesenheit von Hyphen zu detektieren. Dabei konnte ein zwei- bis dreifacher Anstieg der Transkripte im Verlauf der Hyphenentwicklung beobachtet werden. Dieser Anstieg ist dem Anstieg des als Kontrolle verwendeten *ACT1*-Genes (Abb. 3.20), als auch anderer „Housekeeping“-Gene (Dellbrück und Ernst, 1993; Swoboda *et al.*, 1994), ähnlich. Daher ist anzunehmen, dass trotz der relativ gleich bleibenden Stärke der als Mengenstandard aufgetragenen kleinen rRNA von 1,8 kb, keine enge Korrelation zwischen der Entwicklung von Hyphen und dem Anstieg der *PMT2*- und *PMT4*-Transkripte besteht.

3.3.4.2 Invasives Wachstum

Als invasives Wachstum wird die Fähigkeit haploider *S. cerevisiae* Zellen bezeichnet, in den Agar zu wachsen (Roberts und Fink, 1994; Gimeno *et al.*, 1992). Dieser Prozess wird in einigen haploider Stämme von ScTpk2p reguliert (Robertson und Fink, 1998). Auch bei *C. albicans* konnte nachgewiesen werden, dass die Überexpression von *TPK2* den Stamm CAI8 zu invasivem Wachstum befähigt (Sonneborn, 1999). Da Tpk2p eine entscheidende Rolle in der Regulation der Morphogenese von *C. albicans* spielt (Ernst, 2000) und auch die Proteinmannosyltransferasen in die Morphogenese involviert sind, sollte überprüft werden, ob Deletionen in Genen für Proteinmannosyltransferasen einen Einfluss auf das invasive Wachstum von *C. albicans* haben. Wie in Abb. 3.21 zu sehen ist, ließen sich die Zellen der *pmt1*- und der *pmt4 pmt6*-Mutante unter den gewählten Bedingungen vom Agar nicht abwaschen. Während die Zellen der *pmt4 pmt6*-Mutante noch teilweise abgewaschen werden konnten, ließen sich die Zellen der *pmt1*-Mutante gar nicht entfernen. Alle anderen getesteten

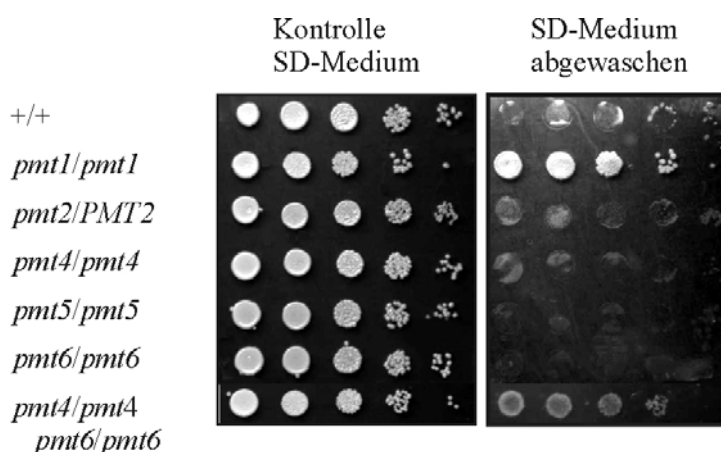


Abb. 3.21: Invasives Wachstum von *pmt1*- und *pmt4 pmt6*-Mutanten. Zellen einer Übernacht-Kultur, der Stämme CAF2-1 (Wildtyp), SPCa2 (*pmt1/pmt1*), SPCa4 (*pmt2/PMT2*), SPCa6 (*pmt4/pmt4*), SPCa10 (*pmt5/pmt5*), SPCa8 (*pmt6/pmt6*) und PP46-4286 (*pmt4 pmt6*), wurden auf 10^5 bis 10^6 Zellen verdünnt und in einem Volumen von 5 µl auf SD-Platten aufgetropft. Die Inkubation erfolgte für drei Tage bei 30 °C. Gezeigt sind die Zellen vor und nach dem Abwaschen mit Wasser einem Wasserstrahl.

Stämme verhielten sich wie der Wildtyp. Zur genaueren Untersuchung der invasiven Zellen wurden diese mit einem Zahnstocher aus dem Agar entnommen und mikroskopisch untersucht. Sowohl die invasiven Zellen der *pmt1*-, als auch der *pmt4 pmt6*-Mutante bestanden etwa zur Hälfte aus Hyphenzellen (Daten nicht gezeigt).

3.3.5 Untersuchungen zur Sensitivität der *pmt*-Mutanten

Aufgrund von Sensitivitäten gegenüber spezifischen Substanzen lassen sich differenzierte Aussagen über Art und Weise der durch Mutationen hervorgerufenen Schädigungen machen. Mit der Ausnahme der *pmt5*-Mutante zeigten alle bereits charakterisierten *pmt*-Mutanten in verschiedener Ausprägung Sensitivitäten gegenüber verschiedenen Aminoglykosiden und Zellwand destabilisierenden Agenzien (Ernst und Prill, 2000). Hier wurde zusammenfassend eine vergleichende Studie über die Sensitivitäten aller *pmt*-Mutanten erstellt. Dabei wurden, soweit nicht besonders erwähnt, die mit *URA3* am nativen Locus rekonstituierten Stämme SPCa2 (*pmt1/pmt1*), SPCa4 (*pmt2/PMT2*), SPCa6 (*pmt4/pmt4*), SPCa10 (*pmt5/pmt5*), SPCa8 (*pmt6/pmt6*), sowie der Wildtyp CAF2-1 verwendet.

3.3.5.1 Sensitivitäten gegen verschieden Substanzen

Der Farbstoff Phloxin B kann dazu genutzt werden, abgestorbene Zellen und Zellen, die sich in der "Opaque"-Form befinden, rot anzufärben. Wie in Abb. 3.22 zu sehen ist, färbten sich *pmt2/PMT2*-Mutanten als einzige der getesteten Stämme rot an. Dieses verdeutlicht die verringerte Vitalität, den bereits die Deletion eines *PTM2*-Allels hervorruft.

In *pmt*-Mutanten könnte es zu einer Anhäufung falsch gefalteter Proteine im ER kommen. Durch Canavanin, einem Aminosäureanalog, sollte die Menge falsch gefalteter Proteine gesteigert werden, wodurch *pmt*-Mutanten sensitiver als der Wildtyp reagieren müssten (Leggett *et al.*, 2002). Wie in Abb. 3.22 zu sehen ist, zeigte lediglich die *pmt2/PMT2*-Mutante ein vermindertes Wachstum auf Medium, welches 2 mg/ml Canavanin enthielt.

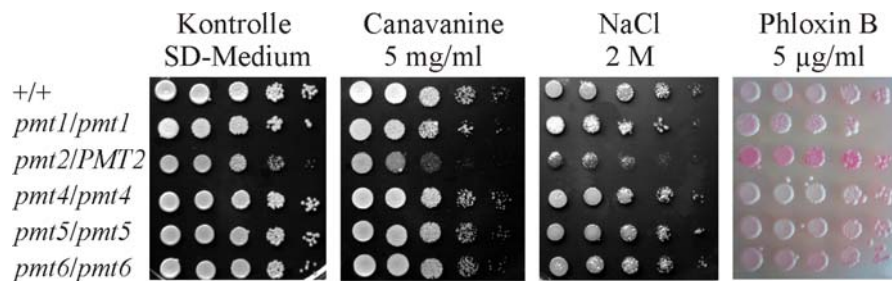


Abb. 3.22: Sensitivität gegenüber verschiedenen Substanzen. Zellen einer Übernacht-Kultur wurden auf 10^5 bis 10^6 Zellen verdünnt und in einem Volumen von 5 µl auf SD-Platten mit den oben angegebenen Substanzen aufgetropft. Die Inkubation erfolgte bei 30 °C für zwei bis drei Tage.

In *S. cerevisiae* sind verschiedene *pmt* Doppel- und Dreifachmutationen nur überlebensfähig, wenn sie durch 1 M Sorbitol osmotisch stabilisiert werden (Gentzsch und Tanner, 1996). Schon bei einer Temperatur von 29 °C kann beispielsweise eine *pmt2 pmt4*-Mutation auf Medium ohne 1 M Sorbitol nicht mehr wachsen. Daher ist es überraschend, dass selbst bei einer hohen Salzkonzentration von 2 M die *pmt*-Mutanten noch lebensfähig sind (Abb. 3.22). Lediglich die *pmt2/PMT2*-Mutante zeigt einen geringfügigen Wachstumsdefekt. Auch ein Versuch, in dem nach Inkubation in destilliertem Wasser, die Ausplattierungs-Effizienz der *pmt*-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp überprüft wurde, zeigte keine erhöhte Osmosensitivität der *pmt*-Mutanten (Daten nicht gezeigt). Auch das oxidativen Stress hervorruufende H_2O_2 bewirkte keine Unterschiede im Wachstum zwischen *pmt*-Mutanten und Wildtyp (Daten nicht gezeigt).

Kürzlich wurden spezifische Inhibitoren für CaPmt1p hergestellt (Duffy *et al.*, 2001). Wird der Inhibitor dem Wildtyp verabreicht, entstehen Phänotypen die dem einer *pmt1*-Deletion gleichen. Sechs unterschiedliche Varianten des Inhibitors wurden uns von Oxford Glycoscience zur Verfügung gestellt. Wie in Abb. 3.23 zu sehen ist, erwiesen sich bis auf die *pmt1*-Mutante alle *pmt*-Mutanten als sensitiv gegen verschiedene Derivate des Inhibitors. Dabei war die Sensitivität gegen OGT2468, OGT2371 und OGT2599 ausgeprägter und gegen OGT2185, OGT2078 und OGT2356 moderater. Für *pmt5*-Mutanten ist dies der erste beschriebene Phänotyp.

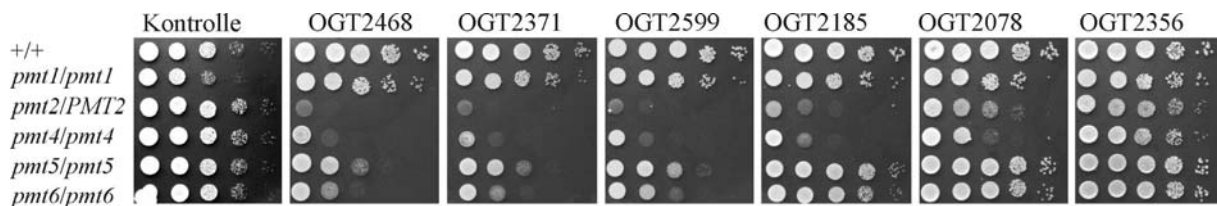


Abb. 3.23: Sensitivität gegenüber verschiedenen Derivaten eines Pmt-Inhibitors. Zellen einer Übernachtskultur wurden auf 10^5 bis 10 Zellen verdünnt und in einem Volumen von $5\ \mu\text{l}$ auf YPD- oder SD-Platten mit den oben angegebenen Substanzen aufgetropft. Die Inkubation erfolgte bei $30\ ^\circ\text{C}$ für zwei bis drei Tage. Die Konzentration der Inhibitoren betrug $1\ \mu\text{M}$.

Phr1p und Phr2p sind zwei Glykoproteine der Zellwand aus *C. albicans*, deren Expression abhängig vom pH-Wert reguliert wird (Vai *et al.*, 1996; Mühlischlegel und Fonzi, 1997). Da eine *phr2*-Mutante einen Wachstumsdefekt bei saurem pH-Wert erkennen lässt, könnte man, falls das Protein in den *pmt*-Mutanten betroffen ist, eine Sensitivität beim Wachstum unter extremen pH-Werten vermuten. Es war jedoch weder bei einem saurem pH-Wert von 4, noch bei einem alkalischen pH-Wert von 9, ein Unterschied im Wachstum von Wildtyp und *pmt*-Mutanten zu erkennen (Daten nicht gezeigt). Keine Veränderung zeigten die verschiedenen *pmt*-Mutanten bei einem Wachstum auf 3 % Glycerin oder 200 mM CaCl_2 .

3.3.5.2 Sensitivitäten gegen verschiedene Chemotherapeutika

Aus *S. cerevisiae* ist seit längerem bekannt, dass viele Glykosylierungsmutanten aus bisher unbekannten Gründen eine erhöhte Sensitivität gegenüber Aminoglykosiden zeigen (Dean, 1995). Auch für die Mutanten *pmt1*, *pmt4* und *pmt6* konnte eine erhöhte Sensitivität gegen Aminoglykosidantibiotika beobachtet werden (Timpel *et al.*, 1998 und 2000; Prill, 2001). Aminoglykoside agieren im Inneren der Zellen, wo sie an den Ribosomen störend auf die Proteinbiosynthese wirken. Hygromycin B induziert beispielsweise Fehlesungen und produziert abgewandelte Proteine, indem es spezifisch an die kleine Untereinheit des Ribosoms bindet (Brodersen *et al.*, 2000).

In Abb. 3.24 ist zu sehen, dass die *pmt1*-, die *pmt2/PMT2*- und die *pmt4*-Mutante stark sensitiv gegen Hygromycin B sind. Während in *pmt2/PMT2*-Mutanten noch ein Hintergrundwachstum zu erkennen ist, wachsen die *pmt1*-, und *pmt4*-Mutante nicht mehr. Eine erhöhte Sensitivität konnte schon bei einer Hygromycin B Konzentration von $100\ \mu\text{g/ml}$ festgestellt (Daten nicht gezeigt) werden. Deutlicher ist der Defekt jedoch, wie in Abb. 3.24 gezeigt, bei einer Konzentration von $200\ \mu\text{g/ml}$. Obwohl für die *pmt6*-Mutante eine Hygromycin B-Sensitivität beschrieben wurde (Timpel *et al.*, 2000) konnte sie unter den hier gewählten Bedingungen nicht reproduziert werden. Gegen Geneticin 418 (G418), einem

anderen Aminoglykosid, konnte für *pmt2/PMT2*-Mutanten eine starke und für *pmt4*-Mutante eine schwächere Sensitivität beobachtet werden (Abb. 3.24). G418 unterbricht den Elongationszyklus indem es mit der kleinen Untereinheit des Ribosoms interagiert (Bar-Nun *et al.*, 1983). Anzumerken ist, dass die starke Sensitivität gegen Aminoglykoside besonders auf Vollmedium (YPD) zu detektieren war. Auf Minimalmedium (SD) war die Hygromycin-Sensitivität wesentlich geringer (Daten nicht gezeigt).

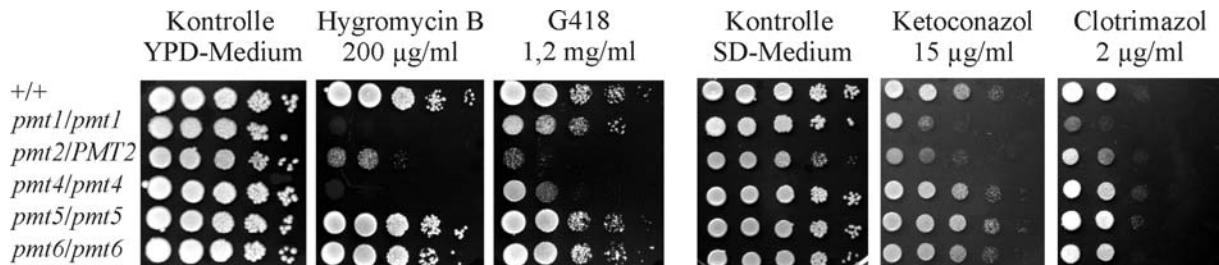


Abb. 3.24: Sensitivitäten gegen verschiedene Chemotherapeutika. Zellen einer Übernachtskultur wurden auf 10^5 bis 10^6 Zellen verdünnt und in einem Volumen von 5 µl auf YPD- bzw. SD-Platten mit den oben angegebenen Substanzen aufgetropft. Die Inkubation erfolgte bei 30 °C für zwei bis drei Tage.

Cycloheximid ist ein Antibiotikum, welches ebenfalls in die Translation eingreift. Im Gegensatz zu Hygromycin und G418 bindet es an die große Untereinheit des Ribosoms (Rao und Grollman, 1967). Zwar war keine der *pmt*-Mutanten sensitiv gegen Cycloheximid (Daten nicht gezeigt), es sollte aber geprüft werden, ob durch Überexpression des Ubiquitin Gens die Sensitivität der *pmt*-Mutanten gegen Hygromycin B korrigiert werden kann (Hanna *et al.*, 2003). Dazu wurde Plasmid p2297HU in den Wildtyp sowie die *pmt1*- und *pmt4*-Mutante transformiert und ein Tropftest auf Medium mit 200 µg/ml Hygromycin B durchgeführt. Die Überexpression von Ubiquitin konnte jedoch den Wildtyp Phänotyp nicht wiederherstellen (Daten nicht gezeigt).

Wie in Abb. 3.24 zu sehen ist, erwiesen sich insbesondere die *pmt1*-Mutante und zu einem geringeren Grad auch die *pmt2/PMT2*-Mutante gegen die Azole Ketoconazol und Clotrimazol als sensitiv. Bemerkenswert ist hierbei, dass keine Sensitivität gegen Fluconazol beobachtet werden konnte. Des Weiteren wurden die Serie der *pmt*-Mutanten auf Sensitivität gegen die Polyene Nystatin und Amphotericin B getestet. Es stellte sich jedoch keine erhöhte Sensitivität im Vergleich zum Wildtyp heraus (Daten nicht gezeigt).

3.3.5.3 Sensitivitäten gegen verschiedene Zellwand-destabilisierende Substanzen

Congo red ist ein fluoreszierender Farbstoff, der Komplexe mit Glukan-Mikrofibrillen bildet, wodurch deren laterale Interaktion behindert wird und es zu einer Destabilisierung der Zellwand kommt (Kopecka' und Gabriel, 1992). In Sensitivitätstests waren *pmt1*- und *pmt2/PMT2*-Mutanten dieser Substanz gegenüber sensitiv (Abb. 3.25). Dabei konnte in *pmt1*-Mutanten kein Wachstum und in *pmt2/PMT2*-Mutanten ein Restwachstum festgestellt werden. Calcofluor White ist ein fluoreszierender Farbstoff, der an naszierende Chitin-Mikrofibrillen bindet und deren Zusammenbau negativ beeinflusst, sowie einen negativen Effekt auf die Glukansynthese ausübt (Ram *et al.*, 1994). Wieder zeigten lediglich *pmt1*- und *pmt2/PMT2*-Mutanten einen Effekt, bei Wachstum auf Medium mit 10 µg/ml Calcofluor White (Abb. 3.25). Auch hier war der Wachstumsdefekt der *pmt1*-Mutante ausgeprägter als in

einer *pmt2/PMT2*-Mutante. Die Proteinkinase C (PKC) ist die zentrale Komponente des Signaltransduktionsweges, welcher die Expression von Zellwandkomponenten kontrolliert (Banuett, 1998). Viele Mutanten des PKC-Weges in *S. cerevisiae* sind sensitiv gegen niedrige Konzentrationen SDS, sowie gegen den Diesterase-Inhibitor Koffein (Costigan *et al.*, 1992). Ein Tropftest der *pmt*-Mutanten auf diesen Medien ergab, dass lediglich die *pmt2/PMT2*-Mutante leicht sensitiv gegen Koffein war und, dass die *pmt1*-Mutante nicht mehr auf Medium mit 0,06 % SDS wachsen konnte.

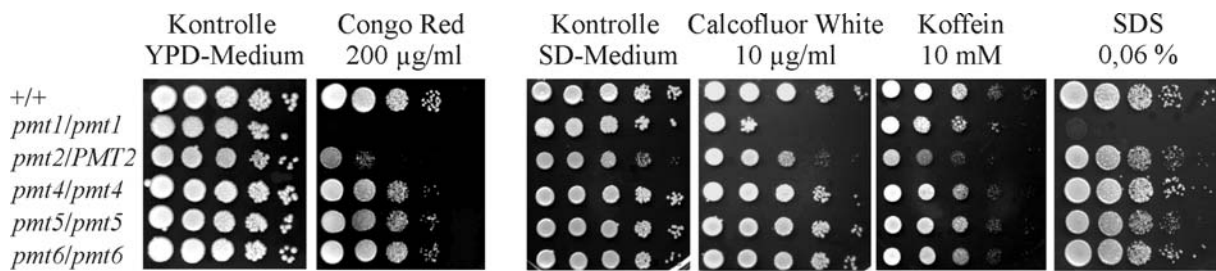


Abb. 3.25: Sensitivitäten gegen verschiedene Zellwand destabilisierende Substanzen. Zellen einer Übernachtskultur wurden auf 10^5 bis 10 Zellen verdünnt und in einem Volumen von 5 µl auf YPD- oder SD-Platten mit den oben angegebenen Substanzen aufgetropft. Die Inkubation erfolgte bei 30 °C für zwei bis drei Tage.

Als Kompensationsmechanismus gegen Schädigungen der Zellwand erhöht die Zelle ihren Chitinanteil (Kapteyn *et al.*, 2000). Für die *pmt1*-Mutante wurde bereits gezeigt, dass sie einen höheren Anteil an Chitin im Vergleich zum Wildtyp besitzt (Kapteyn *et al.*, 2000). Trotz dieser Tatsache war keine der *pmt*-Mutanten gegen das, als Substratanalogon zu UDP-*N*-Acetylglukosamin auf die Chitinbiosynthese wirkende Antimykotikum Nikkomycin sensitiv (Daten nicht gezeigt).

Ein anderes Antimykotikum, welches als Inhibitor der β 1,3-Glukan Synthase fungiert, ist das Caspofungin. Unerwartet war, dass Stämme in denen *PMT1* deletiert ist resistent gegen Caspofungin sind (Abb. 3.26). Lediglich die *pmt4 pmt6*-Doppelmutante zeigte eine leichte Sensitivität. Alle anderen Stämme verhielten sich wie der Wildtyp. *pmt5*-Mutanten waren nicht sensitiv gegenüber Caspofungin (Klinkert, 2001).

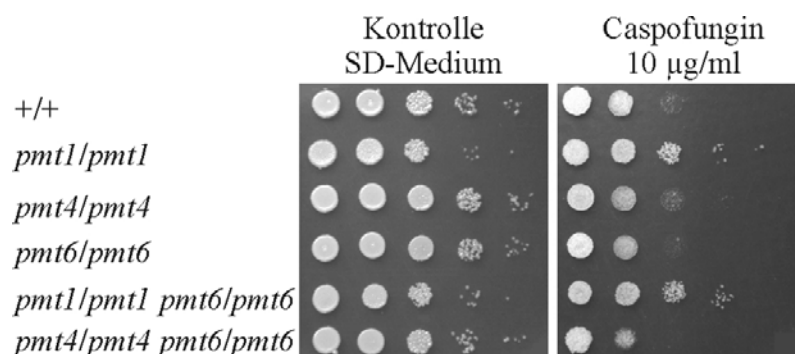


Abb. 3.26: Wachstum verschiedener Mutanten auf Medium mit Caspofungin. Zellen einer Übernachtskultur der Stämme CAF2-1 (Wildtyp), CAP1-312 (*pmt1/pmt1*), CAP4-216 (*pmt4/pmt4*), CAP2-213 (*pmt6/pmt6*), CPP117 (*pmt1/pmt1 pmt6/pmt6*), PP46-428 (*pmt4/pmt4/ pmt6/pmt6*) wurden auf 10^5 bis 10 Zellen verdünnt und in einem Volumen von 5 µl auf SD-Platten mit 10 µg/ml Caspofungin aufgetropft. Die Inkubation erfolgte bei 30 °C für zwei bis drei Tage.

3.3.6 Knospungsverhalten der verschiedenen *pmt*-Mutanten

In *S. cerevisiae* zeigen *pmt4*-Mutanten einen Defekt in der Wahl der Knospungsstelle, der durch Destabilisierung von Axl2p aufgrund unzureichender O-Glykosylierung verursacht wird (Sanders *et al.*, 1999). Es sollte daher untersucht werden, ob die *pmt*-Mutanten in *C. albicans* einen Defekt in ihrem Knospungsmuster aufweisen. Wie in Abb. 3.27 zu sehen ist, zeigten die *pmt2/PMT2*-, die *pmt4*- und die *pmt6*-Mutante das gleiche Knospungsmuster wie der Wildtyp. In *pmt1*-Mutanten war eine korrekte Quantifizierung der Knospungsmuster aufgrund der Größe der gebildeten Aggregate aber nicht möglich. Einzelne Zellen der Aggregate besaßen in *pmt1*-Mutanten sowohl axiale, als auch bipolare Knospen (Daten nicht gezeigt).

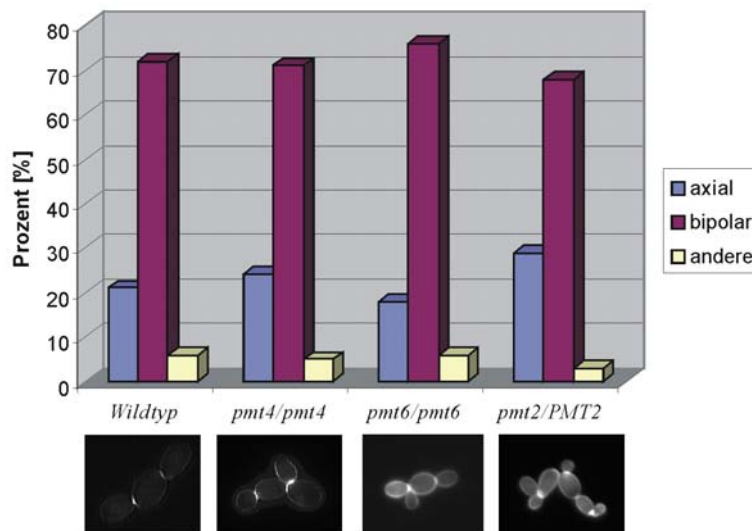


Abb. 3.27: Knospungsmuster verschiedener *pmt*-Mutanten. Logarithmisch wachsende Zellen der Stämme CAF2-1 (Wildtyp), CAP4-216 (*pmt4/pmt4*), CAP2-213 (*pmt6/pmt6*) und P2-2 (*pmt2/PMT2*) wurden mit Calcofluor White gefärbt (2.8). Anschließend wurden axial und bipolar knospende Zellen ausgezählt und quantifiziert.

3.4 Analyse der Zellwand von *pmt*-Mutanten

Viele der in 3.4.4. beschriebene Wachstumsdefekte deuten auf eine veränderte Zusammensetzung der Zellwand in den *pmt*-Mutanten. Für *pmt1* *pmt2* und *pmt2 pmt3*-Mutanten in *S. cerevisiae* wurde eine veränderte Zusammensetzung der Zellwand beschrieben (Gentzsch und Tanner, 1996). Im Vergleich zum Wildtyp ist in den beiden Doppelmutanten der Chitingehalt um das zwei-dreifache erhöht, sowie der prozentuale Anteil an Glukose vermindert. Auffällig ist der höhere Anteil an Mannose in einer *pmt2 pmt3*-Mutante. Auch für den *C. albicans* Stamm CAP1-312 (*pmt1/pmt1*) wurde eine etwa zweifache Erhöhung des Chitingehaltes beschrieben (Kapteyn *et al.*, 2000).

	Wildtyp	<i>pmt1</i>	<i>pmt2/PMT2</i>	<i>pmt4</i>	<i>pmt5</i>	<i>pmt6</i>
gesamt Glukan	58,8	44,3	69,7	81	60,9	62,3
β1,3-Glukan	38,5	32,2	50,7	59,9	40,2	40,5
β1,6-Glukan	20,3	12,1	19	21,1	20,7	21,8
Mannan	21,4	1,6	28,2	3,4	14,7	27
Chitin	0,82	0,71	0,4	0,97	0,88	0,79

Tab. 3.4: Chemische Zusammensetzung SDS extrahierter Zellwände. Die Analyse wurde, wie in 2.8 beschrieben, durchgeführt. Die Daten sind in $\mu\text{g mg}^{-1}$ Zellwand Trockengewicht angegeben.

Um Aussagen über die Art der Veränderungen in der Zellwand der *pmt*-Mutanten machen zu können, wurden deren Bestandteile Biochemisch analysiert. Die Analyse erfolgte wie in 2.8 beschrieben. Zur Analyse der Zellwandkomponenten wurden SDS-extrahierte Zellwände der Stämme CAF2-1 (+/+), SPCa2 (*pmt1/pmt1*), SPCa4 (*pmt2/PMT2*), SPCa6 (*pmt4/pmt4*), SPCa8 (*pmt6/pmt6*) und SPCa10 (*pmt5/pmt5*) hergestellt. Durch die Extraktion mit SDS werden alle nicht kovalent gebundenen Proteine von der Zellwand entfernt.

In Tab. 3.4 sind die ermittelten Mengen in $\mu\text{g mg}^{-1}$ Zellwand Trockengewicht angegeben. Um eine bessere Vergleichbarkeit der Werte innerhalb der getesteten Stämme, als auch mit veröffentlichten Daten zu erzielen, wurden die Angaben aus Tab. 3.4 in Tab. 3.5 in % des Trockengewichtes wiedergegeben. Die so erhaltenen Werte für den Wildtyp in Prozent des Trockengewichtes (Tab. 3.5) stimmen gut mit Werten aus anderen Studien überein (Tab. 1.1)

	Wildtyp	<i>pmt1</i>	<i>pmt2/PMT2</i>	<i>pmt4</i>	<i>pmt5</i>	<i>pmt6</i>
β 1,3-Glukan	47,5	69,1	51,6	70,2	52,6	45
β 1,6-Glukan	25,1	26	19,3	24,7	27,1	24,2
Mannoproteine	26,4	3,4	28,7	4	19,2	30
Chitin	1	1,5	0,4	1,1	1,1	0,8

Tab. 3.5: Zellwandzusammensetzung in Prozent des Zellwandtrockengewichts. Die Angaben in Prozent des Zellwandtrockengewichtes wurden aus den Daten in Tab. 3.4 berechnet.

Wie aus Tab. 3.5 ersichtlich wird, ist der β 1,3-Glukananteil in den *pmt1*- und *pmt4*-Mutanten um mehr als 20 % erhöht. Die *pmt2/PMT2*- und die *pmt5*-Mutante zeigen eine moderate Erhöhung des β 1,3-Glukananteiles um 4-5 %. Betrachtet man den Anteil an β 1,6-Glukan, so lässt sich für die *pmt2/PMT2*-Mutante eine Verringerung um 5,8 % auf 19,3 % erkennen. Alle anderen Mutanten weisen ähnliche Werte wie der Wildtyp auf. Aus Abb. 3.28 wird das veränderte Verhältnis von β 1,3-Glukan zu β 1,6-Glukan in den Mutanten *pmt1*, *pmt2/PMT2* und *pmt4* deutlich. In diesen Mutanten beträgt das Verhältnis 2,7 während in den übrigen Mutanten ein Verhältnis von 1,9 wie im Wildtyp besteht.

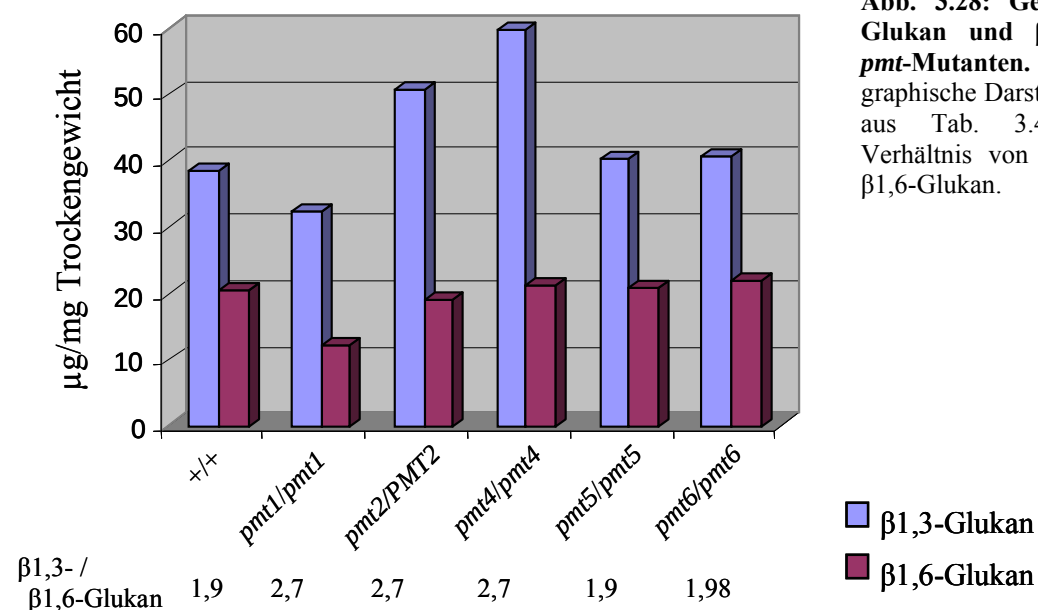


Abb. 3.28: Gehalt von β 1,3-Glukan und β 1,6-Glukan in *pmt*-Mutanten. Gezeigt ist eine graphische Darstellung der Daten aus Tab. 3.4, sowie das Verhältnis von β 1,3-Glukan zu β 1,6-Glukan.

Der drastischste Unterschied in der Zusammensetzung der Zellwandkomponenten besteht in dem Mannoprotein-Anteil. Aus Tab. 3.5 wird ersichtlich, dass der Mannoprotein-Anteil in der *pmt1*- und *pmt4*-Mutante von ca. 26 % auf 3-4 % gesunken ist. Auch in der *pmt5*-Mutante lässt sich eine moderate Verringerung des Mannoprotein-Anteils registrieren. Die extreme Reduzierung des Mannoprotein-Anteils ist in Abb. 3.29 veranschaulicht. Hier wurde der Mannoproteingehalt der verschiedenen *pmt*-Mutanten in Verhältnis zum Wildtyp gesetzt. In dieser Darstellungsform wird deutlich, dass sich in der *pmt1*-Mutante weniger Mannoproteine in den SDS-extrahierten Zellwänden befinden als in der *pmt4*-Mutante. Betrachtet man den Chitingehalt der *pmt*-Mutanten, so erkennt man eine deutliche Erhöhung in der *pmt1*-Mutante, während der Gehalt in der *pmt2*/*PMT2*-, *pmt4*- und *pmt6*-Mutanten mit dem des Wildtyps vergleichbar ist. Für die *pmt2*/*PMT2*-Mutante fällt hingegen eine drastische Reduzierung des Chitinanteils von 1 auf 0,4 % auf.

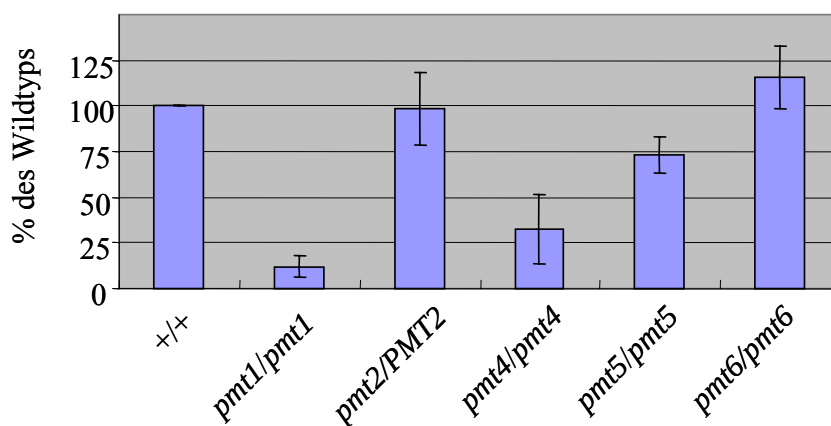


Abb. 3.29: Mannoprotein-Anteil in *pmt*-Mutanten in % relativ zum Wildtyp. Graphische Darstellung der Daten aus Tab. 3.4.

3.5 Substrate der Proteinmannosyltransferasen aus *C. albicans*

In *S. cerevisiae* sind für die verschiedenen Proteinmannosyltransferasen inzwischen dreizehn verschiedene Substrate bekannt. Der Großteil von ihnen wird durch Pmt1p und Pmt2p modifiziert, dies sind die sechs Proteine α -Agglutinin, Bar1p, Pir2p, Cts1p, Kre1p und Kre9p (Gentzsch und Tanner, 1997). Substrate für die Pmt4p vermittelte O-Mannosylierung sind Kex2p, Gas1p, Fus1p und Axl2p (Gentzsch und Tanner, 1997; Sanders *et al.*, 1999). Für Mid2p, Wsc1p und Wsc2p konnte gezeigt werden, dass sie mindestens von Pmt2p und Pmt4p mannosyliert werden (Lommel *et al.*, 2004). Hier sollten potentielle Substrate für die Proteinmannosyltransferasen aus *C. albicans* identifiziert werden.

3.5.1 Pir2p

Pir2p (protein with internal repeats), welches auch als HSP150 bezeichnet wird, ist in *S. cerevisiae* ein kovalent an das β 1,3-Glukangerüst gebundenes Zellwandprotein (Russo *et al.*, 1992; Kapteyn *et al.*, 1999). *CaPIR2* (*orf19.220* und sein Allel *orf19.7851*) kodiert für ein aus 346 Aminosäuren bestehendes Protein, welches eine theoretische molekulare Masse von 36,5 kDa besitzt. Mit einem Anti-Serum gegen ScPir2p, welches verschiedene, mit Pir2p verwandte, Proteine erkennt (Russo *et al.*, 1992; Kandasamy *et al.*, 2000), wurden Zellextrakte der verschiedenen *pmt*-Mutanten und des Wildtyps CAF2-1 nach gelelektrophoretischer Auftrennung untersucht. Zusätzlich wurde eine Probe jedes Extraktes zur Entfernung von N-Glykosylketten mit PNGase F behandelt.

Wie in Abb. 3.30 zu sehen ist, kann Pir2p in mehreren Formen aus verschiedenen Reifestadien detektiert werden. Die kleinste mobile Form läuft dabei im Wildtyp nach PNGase F Behandlung auf einer Höhe von etwa 64 kDa. Eine mittlere Form kann bei einer molekularen Masse von etwa 90 kDa und die größte Form bei einer Größe von 250 kDa ohne, bzw. bei 140 kDa mit PNGase F-Behandlung identifiziert werden. Das Laufverhalten verändert sich in einer *pmt1*-Mutante drastisch. Anstelle von distinkten Banden kann nur ein Proteinschmier auf eine Höhe zwischen ungefähr 80 und 55 kDa detektiert werden (siehe Abb. 3.30). Die größeren Banden von 250 kDa bzw. 140 kDa nach PNGase F-Behandlung können in einer *pmt1*-Mutante nicht mehr detektiert werden. Nur in der *pmt4*-Mutante lassen sich mehrere spezifische Banden geringerer Größe identifizieren, bei denen es sich um Abbauprodukte handeln könnte. Die Produkte haben eine molekulare Masse, die kleiner als 90 kDa ist. In Stämmen mit Mutationen in den Genen *PMT2*, *PMT5* und *PMT6* ist das Laufverhalten von Pir2p nicht verändert.

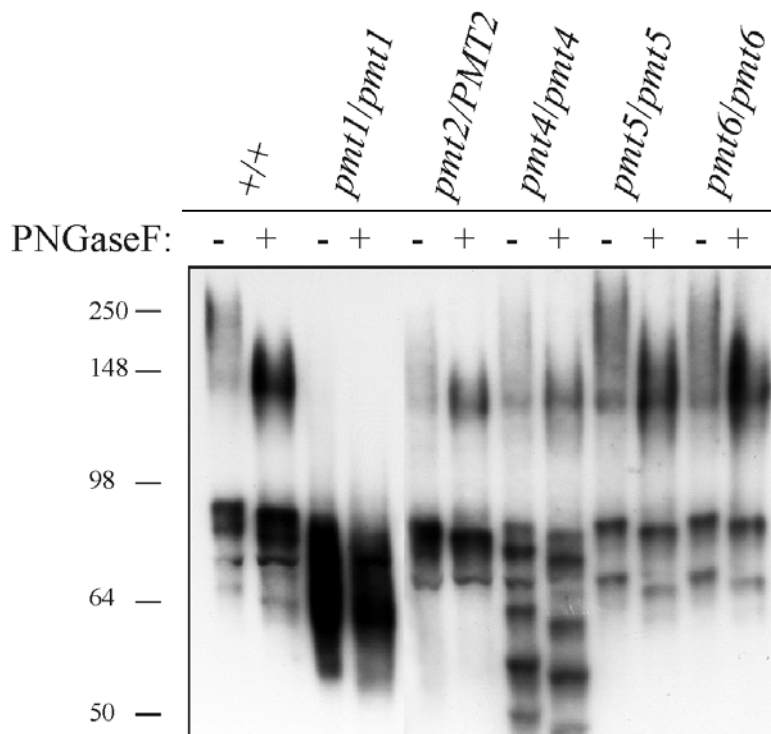


Abb. 3.30: Immunoblot-Analyse von Pir2p in verschiedenen *pmt*-Mutanten. Ganze Zellextrakte wurden in einer 8%igen SDS-PAGE aufgetrennt. Die Extrakte wurde jeweils ohne und mit PNGase F-Behandlung aufgetragen. Nach Transfer auf eine Nitrocellulosemembran erfolgte die Detektion mittels eines Anti-Pir2p Antiserums (2.6.)

3.5.2 Axl2p

CaAXL2 (*orf19.5292*) kodiert für ein Protein von 955 Aminosäuren, das einer theoretischen molekularen Masse von 105 kDa entspricht. Es ist bekannt, dass Axl2p in *S. cerevisiae* von Pmt4p mannosyliert wird (Sanders *et al.*, 1999). Um CaAxl2p in einer Immunoblot-Analyse detektieren zu können, wurde *AXL2* in den auxotrophen Stämmen CAI4 (Wildtyp), CAP1-3121 (*pmt1/pmt1*), P2-22 (*pmt2/PMT2*), CAP4-2164 (*pmt4/pmt4*), P5-5771 (*pmt5/pmt5*) und CAP2-2391 (*pmt6/pmt6*) genomisch mit einer HA-Epitop-Sequenz versehen (C. Gale, persönliche Mitteilung). In Abb. 3.31. A. wurden verschiedene Stämme, in denen *AXL2* mit einem HA Epitop markiert wurde, getestet. Alle Extrakte aus den Stämmen ergaben ein Signal bei einer ungefähren Größe von 140 kDa. Es konnte jedoch kein verändertes Laufverhalten in den Stämmen erkannt werden. Auffallend war ein spezifisches Produkt bei einer Größe von etwa 70 kDa, welches ausschließlich in *pmt4*-Mutanten vorkam. Um Unterschiede im Laufverhalten von Axl2p zu detektieren, welche unabhängig von einer N-

Glykosylierung sind, wurde zusätzlich wie in Abb. 3.31. B. gezeigt ist, eine PNGase F-Behandlung durchgeführt. Das Ergebnis zeigt, dass Axl2p *N*-glykosyliert ist; es konnte jedoch auch unter diesen Bedingungen keine Änderung des Laufverhaltens in den verschiedenen *pmt*-Mutanten registriert werden. In der *pmt4*-Mutante wurde erneut ein kleineres Produkt detektiert, bei dem es sich wahrscheinlich um ein spezifisches Abbauprodukt von Axl2p handelt. Ein spezifisches Abbauprodukt von ScAxl2p wird auch in einer *Scpmt4*-Mutante detektiert, obwohl in diesem System Axl2p vollständig degradiert wird (Sanders *et al.*, 1999).

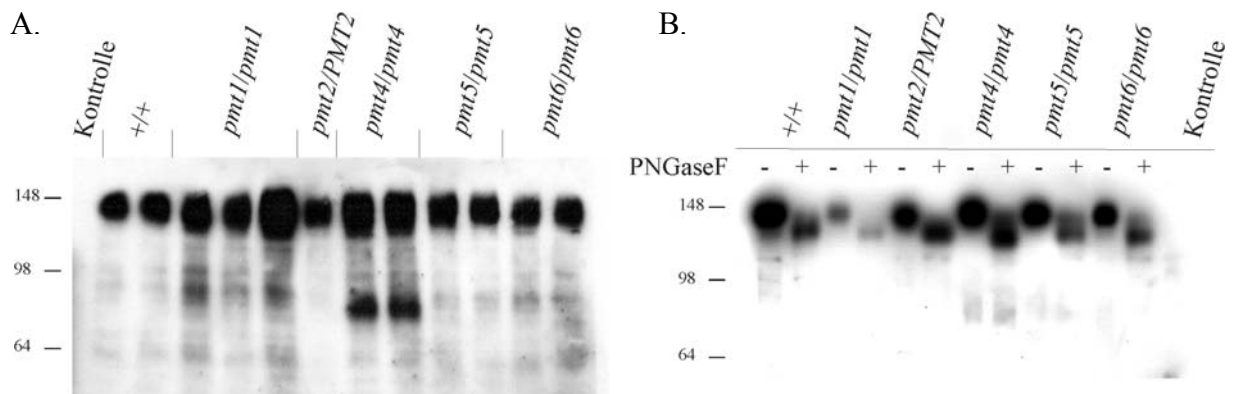


Abb. 3.31: Immunoblot-Analyse von Axl2-HA in verschiedenen *pmt*-Mutante. Ganze Zellextrakte wurden in einem 8%igen SDS-PAGE aufgetrennt. Nach Transfer auf eine Nitrocellulosemembran erfolgte die Detektion mittels eines monoklonalen HA-Antikörpers (2.6.). A. Detektion von Axl2-HA in verschiedenen Integranten. B. Analyse ohne und mit PNGase F-Behandlung der Extrakte.

3.5.3 Als1p

CaALS1 (*orf6.1115*) kodiert für ein Zellwandprotein der aus wenigstens acht Mitgliedern bestehenden Als-Proteinfamilie (Sheppard *et al.*, 2004). Für Als1p wurde bereits gezeigt, dass es *N*- und *O*-glykosyliert ist (Kapteyn *et al.*, 2000). Als1p zeigte ein verändertes Laufverhalten in *pmt1*-Mutanten (Timpel *et al.*, 1998). Hier sollte überprüft werden, ob Als1p auch von anderen Mitgliedern der *Pmt*-Proteinfamilie mannosyliert wird. Als1p ist ein großes Protein, das aus 1260 Aminosäuren besteht. Diese ergeben eine theoretische molekulare Masse von 133 kDa. Mit dem Als1p-Antiserum wurden mindestens zwei Formen unterschiedlicher Größe detektiert. Die größere Form läuft bei einer molekularen Masse von weit über 250 kDa und die kleinere bei etwa 155 kDa. Wie in Abb. 3. 32 zu sehen ist, ist das

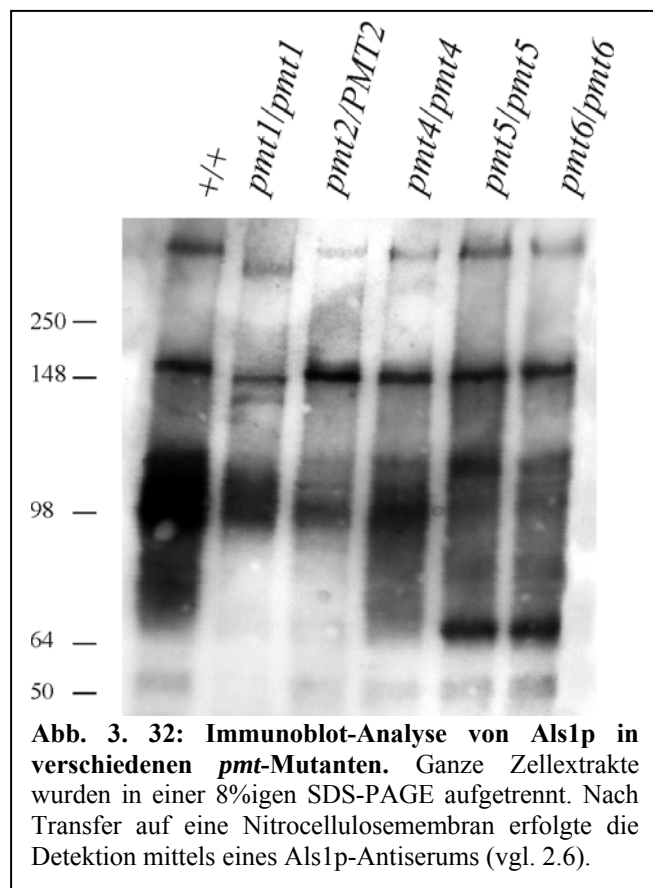


Abb. 3. 32: Immunoblot-Analyse von Als1p in verschiedenen *pmt*-Mutanten. Ganze Zellextrakte wurden in einer 8%igen SDS-PAGE aufgetrennt. Nach Transfer auf eine Nitrocellulosemembran erfolgte die Detektion mittels eines Als1p-Antiserums (vgl. 2.6).

Laufverhalten dieser beiden Formen ausschließlich in der *pmt1*-Mutante verändert. Dabei ist der Laufunterschied der größeren Form ausgeprägter als bei der kleineren Form. Des Weiteren lässt sich unterhalb der kleineren Form in der *pmt1*-Mutante noch eine zusätzliche Bande erkennen. In den *pmt5*- und *pmt6*-Mutanten fällt eine distinkte Bande von etwa 70 kDa auf. Diese ist im Wildtyp und den *pmt2/PMT2*- und *pmt1*-Mutanten nicht zu erkennen. Somit beeinflussen die *pmt1*-, aber auch die *pmt5*- und *pmt6*-Mutanten das Laufverhalten von Als1p.

3.5.4 Kre9p

Aus *S. cerevisiae* ist bekannt, dass ScKre9p mit einer theoretischen molekularen Masse von 28 kDa im Wildtyp bei einer Masse von 60 kDa detektiert werden kann. Das Laufverhalten von ScKre9 ist in *Scpmt1*- und *Scpmt2*-Deletionsstämmen verändert (Gentzsch und Tanner, 1997). Für das *S. cerevisiae* Homolog von *KRE9* in *C. albicans* (*orf19.5861*) konnte mit einem Kre9p-flag Fusionsprotein, mit einer molekularen Masse von 29 kDa, gezeigt werden, dass es in *pmt1*-Mutanten ein beschleunigtes Laufverhalten aufweist (Prill, 2000). Das Kre9-Flag-Fusionsprotein läuft im Wildtypstamm bei einer molekularen Masse von 50 kDa. Das Laufverhalten von Kre9p-flag in den Stämmen mit *pmt1* Mutation und Mutationen in *pmt1* und *pmt6* zeigt hingegen eine molekulare Masse von ca. 45 kDa. Hier sollte getestet werden ob das Laufverhalten von Kre9p-flag auch in Stämmen mit Mutationen in *PMT2* oder *PMT5* Veränderungen aufweist. Dazu wurde Plasmid pSP9 in die Stämme P2-22, P2-67 und P5-5744 transformiert. Die Analyse von Zellextrakten der verschiedenen Transformanten zeigte aber kein verändertes Laufverhalten gegenüber dem Wildtyp (Daten nicht gezeigt).

3.5.5 Sec20p

Das *CaSEC20*-Genprodukt (*orf6.4468*) ist ein essentielles, integrales Typ II ER-Membranprotein. Es besitzt zusammen mit Ufe2p im Komplex eine Funktion als tSNARE Komponente im retrograden Vesikeltransport sowohl in *S. cerevisiae*, als auch in *C. albicans* (Sweet und Pelham, 1992 und 1993; Weber *et al.*, 2001 und 2002). Für *S. cerevisiae* konnte zusätzlich gezeigt werden, dass *sec20*-Stämme einen Glykosylierungsdefekt des Golgi aufweisen (Schleip *et al.*, 2001). Für CaSec20p_{c-myc} wurde bewiesen, dass es mannosyliert ist (Weber, 2001; Weber *et al.*, 2004). CaSec20p_{c-myc} lässt sich in Immunoblot-Analysen als nicht glykosylierte 38 kDa Form, als glykosylierte Hauptform von 50 kDa und als 110 kDa-Form detektieren. Eine Mutation der einzigen potentiellen N-Glykosylierungsstelle verändert das Laufverhalten von Sec20p nicht, was eine O-Mannosylierung durch Pmt-Proteine vermuten lässt. Während Sec20_{c-myc} in *pmt6*-Mutanten detektierbar war, schlug eine Detektion in *pmt1*- und *pmt4*-Mutanten fehl (Weber, 2001).

Hier sollte überprüft werden, ob Sec20p_{c-myc} in *pmt1*- bzw. *pmt4*-Mutanten über einen Proteasom abhängigen Degradierungsweg abgebaut wird. Hierzu wurde ein Pulse-Chase-Experiment durchgeführt, in dem die *pmt1*-Mutante transformiert mit Plasmid pYW69 (Sec20_{c-myc}), in An- und Abwesenheit von 200 µM Lactacystin, getestet wurde. Lactacystin ist ein β-Lacton und fungiert als Inhibitor des Proteasoms (Lee und Goldberg, 1996). Wie in Abb. 3.33 zu sehen ist, wird zum einen die unglykosylierte 38 kDa Form durch die Gabe von 200 µM Lactacystin stabilisiert. Es wurde deutlich mehr Protein dieser Größe präzipitiert, als in den unbehandelten Fraktionen. Zum anderen entstand im Verlauf des „Chase“ in den mit Lactacystin behandelten Proben ein Produkt von 52 kDa, dessen Menge jedoch nicht

äquivalent zu der unglykosylierten 38 kDa Form war. Dieses Ergebnis zeigt, dass Sec20p zumindest zum Teil über einen proteasomalen Degradierungsweg abgebaut wird.

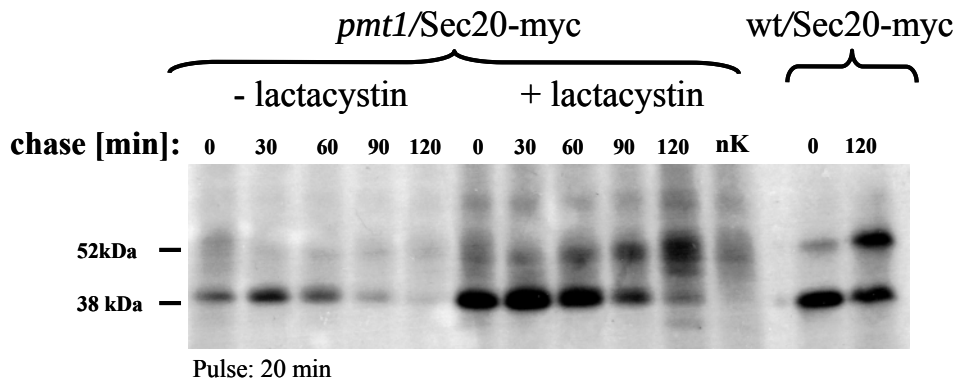


Abb. 3.33: Pulse Chase von Sec20p. Der WT-Stamm CAI4 und die *pmt1*-Mutante CAP1-3121 wurden mit dem Plasmid pYW69 (*PCK1p-SEC20_{c-myc}*) bzw. mit pYW7 (*PCK1p-SEC20*) für die Negativkontrolle (nK) transformiert. Die Zellen wurden 20 min mit [³⁵S]-Trans-Label markiert; nach Zugabe eines Überschusses nicht markierten Methionins/Cysteins wurden alle 30 min Proben zur Bestimmung der Sec20-Menge entnommen. Der spezifische Nachweis erfolgte durch Immunpräzipitation, SDS-PAGE und Autoradiographie (siehe auch 2.6.7)

Da der Abbau von Proteinen über das Proteasom die Markierung mit Ubiquitin voraussetzt wurden Varianten konstruiert, in denen einzelne Lysine in der Sec20p-Domäne, die sich im ER-Lumen befinden, gegen Alanine ausgetauscht. Die Plasmide pYWΔK(245), (K245A), pYWΔK(253) (K253A), pYWΔK(268) (K268A) und pYWΔK(294) (K294A) die je einen Aminosäureaustausch trugen, wurden in den Stamm CAP1-3121 (*pmt1/pmt1*) transformiert. Eine Detektion der Muteine in der Immunoblot-Analyse schlug jedoch fehl (Daten nicht gezeigt). Auch eine Variante, die von Plasmid pSP35 exprimiert wurde, in denen alle vier Lysine ausgetauscht sind, konnte nicht detektiert werden, so dass durch den Verlust einzelner, sowie aller Ubiquitinierungsstellen, kein stabilisiertes Sec20p_{c-myc} konstruiert werden konnte. Weiter wurde versucht, einen direkten Nachweis der Ubiquitinierung von Sec20_{c-myc} zu führen. Dazu wurde Sec20p_{c-myc} immunpräzipitiert (2.6.6) und das Präzipitat anschließend mit einem monoklonalen, gegen Ubiquitin gerichteten, Antikörper detektiert. Es zeigte sich jedoch, dass das Präzipitat lediglich mit dem gegen das Epitop gerichteten myc-Antikörper, nicht aber mit dem Ubiquitin Antikörper detektierbar war. Möglicherweise wird ubiquitiniertes Sec20p_{c-myc} sehr schnell abgebaut.

3.5.6 Proteine mit unverändertem Laufverhalten

Im Folgenden wurden weitere potentielle Substrate für die von Proteinmannosyltransferasen vermittelte O-Glykosylierung untersucht.

3.5.6.1 Cdr1p

Cdr1p ist ein zu der Familie der ABC-Transporter gehörendes Membranprotein in *C. albicans* (Sanglard *et al.*, 1995 und 1997). *CaCDR1* (*orf6.9037*) kodiert für 1501 Aminosäuren, welche eine theoretische molekulare Masse von 170 kDa ausmachen. Zur Detektion von Cdr1p wurde das von Umeyama *et al.*, 2002 konstruierte Plasmid pFLAG-Mal2-CDR1 in die Stämme CAI4 (Wildtyp), CAP1-3121 (*pmt1/pmt1*), P2-22 (*pmt2/PMT2*), CAP4-2164 (*pmt4/pmt4*), P5-5771 (*pmt5/pmt5*) und CAP2-2391 (*pmt6/pmt6*) transformiert. Zur Induktion des MAL2-Promotors wurden die Stämme in SD-MAL Medium angezogen. Die hergestellten Rohextrakte wurden in einer 8%igen SDS-PAGE aufgetrennt und in einer Immunoblot-

Analyse mit Anti-Flag Antikörpern detektiert. Es konnte eine Bande von etwa 170 kDa detektiert werden, die in keiner der *pmt*-Mutanten ein verändertes Laufverhalten zeigte (Daten nicht gezeigt).

3.5.6.2 Int1p

CaInt1p ist ein dem Integrin ähnliches Protein. Die Deletion von *INT1* (*orf6.1732*) verursacht einen nahezu vollständigen Verlust der Virulenz (Gale *et al.*, 1998). *INT1* kodiert für 1661 Aminosäuren, welche einer molekularen Masse von 187 kDa entsprechen. Es wurden Extrakte der Stämme mit Mutationen in Genen für Proteinmannosyltransferasen hergestellt. Diese wurden lediglich für 5 min bei 65 °C denaturiert und nach Auftrennung in einer 8%igen SDS-PAGE mit 1:100 verdünntem Anti-Int1p Antiserum detektiert. Es wurde eine Bande von etwa 200 kDa detektiert, die in allen *pmt*-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp unverändert migrierte.

3.5.6.3 Phr1p/Gas1p

CaPhr1p ist ein zu Gas1p bzw. gp115 aus *S. cerevisiae* homologes Protein. *PHR1* (*orf6.7524*) wird in *C. albicans* pH-Wert abhängig reguliert (Vai *et al.*, 1996). Für gp115 aus *S. cerevisiae* konnte gezeigt werden, dass es O-glykosyliert ist. Mit einem gegen ScGp115 gerichteten Antiserum, welches auch in der Lage ist Phr1p zu detektieren (Vai *et al.*, 1996), sollte das Laufverhalten von Phr1p in den verschiedenen *pmt*-Mutanten überprüft werden. Phr1p hat eine theoretische molekulare Masse von 60 kDa. In der Immunoblot-Analyse konnte eine spezifische Bande von etwa 115 kDa detektiert werden. Das Laufverhalten für das Protein war jedoch in den *pmt*-Mutanten gegenüber dem des Wildtyps nicht verändert (Daten nicht gezeigt). Nach einer Behandlung mit PNGase F verringerte sich die Größe des Proteins auf etwa 60 kDa, es konnten allerdings immer noch keine Unterschiede im Laufverhalten ausgemacht werden (Daten nicht gezeigt).

3.6 Genomweite Transkriptomanalyse

Wie in den vorangegangenen Kapiteln zu sehen ist, verursachen Mutationen in Genen für Proteinmannosyltransferasen eine Vielzahl unterschiedlicher Phänotypen. Defekte in der Morphogenese, Sensitivitäten gegen unterschiedliche Stoffklassen, Veränderungen der Zellwand und auch Defekte sekretorischer Komponenten werden durch Deletionen der *PMT*-Gene verursacht. Um zu erfahren, wie die Zelle auf diese pleiotropen Veränderungen reagiert, wurden genomweite Transkriptomanalysen der *pmt*-Mutationsstämme durchgeführt. Im Detail wurden DNA-Mikroarrays der Stämme, CAP1-312 (*pmt1/pmt1*), P2-2 (*pmt2/PMT2*), CAP4-216 (*pmt4/pmt4*), P5-577 (*pmt5/pmt5*) und CAP2-239 (*pmt6/pmt6*) im Vergleich zum Wildtyp CAF2-1 durchgeführt (2.7).

Es wurden kommerzielle DNA-Mikroarrays der Firma Eurogentec genutzt, welche mit 6039 offenen Leserastern etwa 98 % der Gene von *C. albicans* enthalten. Die markierte cDNA von zwei zu vergleichenden Proben wurde mit einem DNA-Mikroarray hybridisiert. Nach dem Waschen und dem Scannen der Arrays erfolgte die Normalisierung und statistische Auswertung der Daten mit Hilfe der Computerprogramme Genespring (Silicon Genetics) und SAM (<http://www-stat.stanford.edu/~tibs/SAM>, Tusher *et al.*, 2001).

In Abb. 3.34 ist exemplarisch das Ergebnis eines Vergleichs der *pmt6*-Mutante mit dem Wildtyp als so genannter „Scatterplot“ dargestellt. Hierbei werden die Signalintensitäten jedes einzelnen Gens unter den beiden Bedingungen graphisch dargestellt. Gene, welche unter

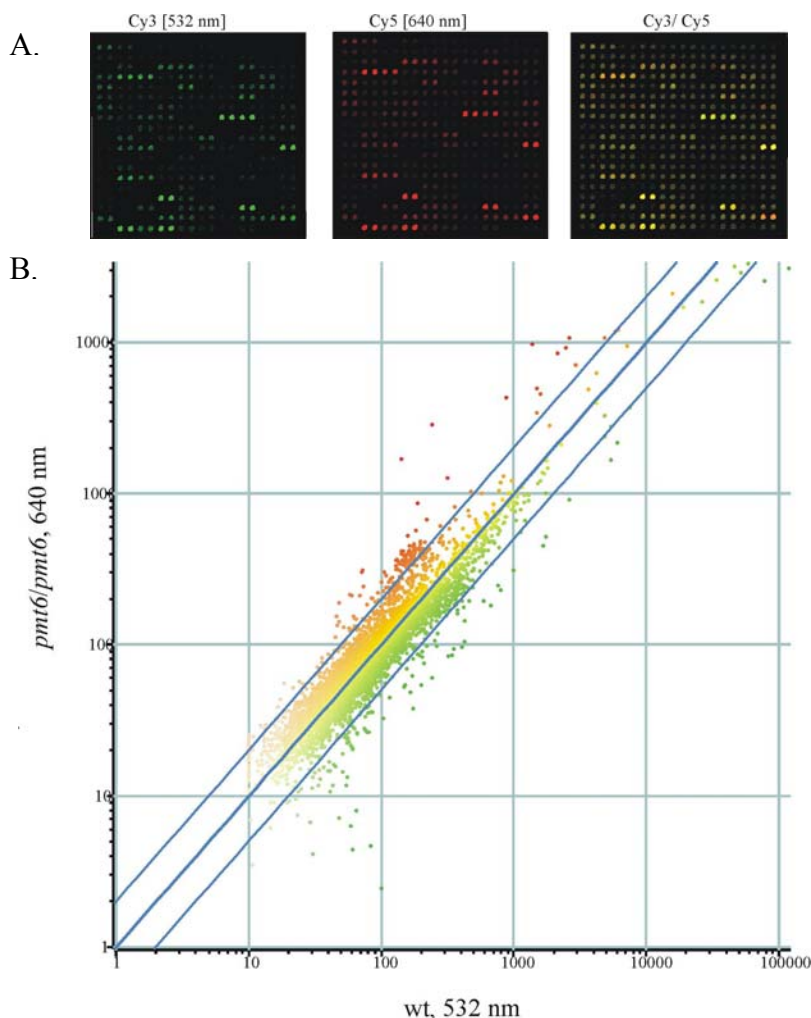


Abb. 3.34: DNA-Mikroarrays.

A. Ausschnitt von 200 je zweifach hybridisierten ORF eines Mikroarrays. Über das Verhältnis von Signalintensität des Experimentes (cy3) zur Referenz (cy5) können Aussagen über die differentielle Expression einzelner Gene gemacht werden. B. Darstellung der Signalintensitäten von 6039 ORF als Scatterplot. Gezeigt ist der Vergleich einer *pmt6/pmt6*-Mutante (CAP2-239) mit dem Wildtyp (CAF2-1). Die Zellen wurden bei 30 °C in YPD bis zu einer OD_{600 nm} von 0,5 angezogen. In der Mutante stärker exprimierte Gene sind als rote, schwächer exprimierte Gene als grüne Punkte dargestellt. Die äußeren diagonalen Striche markieren eine 1,5-fache Signalintensitätsänderung.

beiden Bedingungen in gleichem Maße exprimiert werden, sind bei dieser Art der Darstellung auf der Winkelhalbierenden zu finden. Differenziell exprimierte Gene hingegen sind oberhalb bzw. unterhalb dieser Linie lokalisiert. Um auch kleine Veränderungen im Expressionsniveau einzelner Gene beobachten zu können, ist es notwendig, die Ergebnisse aufgrund experimenteller und biologischer Variabilität statistisch abzusichern. Im Verlauf dieser Arbeit wurden deshalb für jede Auswertung mindestens drei Hybridisierungen (Replikate) durchgeführt. Die cDNA dieser drei Hybridisierungen stammte von drei unabhängigen RNA-Präparationen. Da die zur Markierung der cDNA genutzten Fluorochrom-Farbstoffe mit einer leicht unterschiedlichen Effizienz in die DNA eingebaut werden, wurde bei jeweils einem der drei Experimente ein Farbtasch durchgeführt („dye swap“). Jedes offene Leseraster ist auf den eingesetzten DNA-Chips zweimal vorhanden, so dass sich für einen ORF sechs Verhältniswerte ergeben. Die Verhältnisse (Signalintensität des Experimentes dividiert durch die Signalintensität der Referenz) der sechs Einzelwerte wurden für weitere Analysen gemittelt.

Abb. 3.35 zeigt exemplarisch anhand von drei unabhängigen Hybridisierungen zweier verschiedener Mutanten bei einer Auswahl bestimmter Gene, dass leichte Unterschiede in den einzelnen Replikaten vorhanden sind. Diese weisen insgesamt jedoch ein ähnliches Expressionsmuster auf. Als reguliert wurden in allen Experimenten nur die Gene bezeichnet, die eine mit Hilfe des Programms SAM ermittelte statistisch signifikante Abweichung von der Referenz zeigten. Des Weiteren wurden in die im Anhang aufgeführten Genlisten lediglich die Gene aufgenommen, die zusätzlich im Mittel eine mindestens 1,5-fache Änderung zur Referenz zeigten.

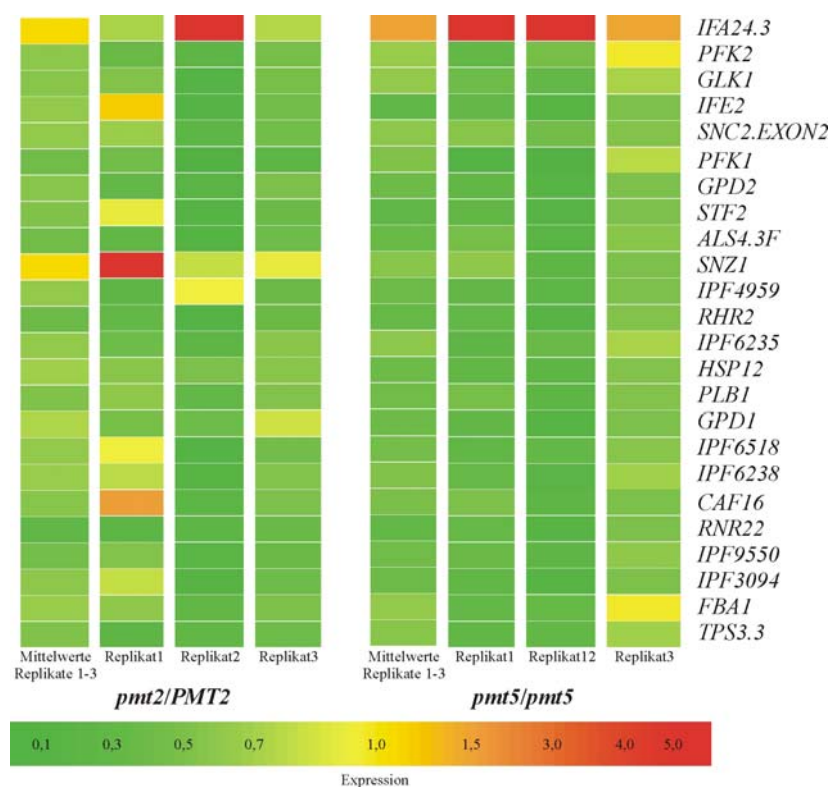


Abb. 3.35: Vergleich von Genexpressionsverhältnissen. Die Hybridisierungen jeweils dreier Replikate der *pmt2/PMT2*- und *pmt5*-Mutante sind als Beispiel abgebildet. Gezeigt ist ein zweidimensionales Cluster einer Auswahl von 24 Genen, welche in mindestens drei *pmt*-Mutanten signifikant reguliert sind. Als Referenz diente in allen Experimenten cDNA des Wildtyp-Stammes CAF2-1. Die Verhältnisse der Genexpression von Experiment und Referenz sind als Rot-Grün-Skala dargestellt.

3.6.1 Einfluss von *pmt*-Mutationen auf das Transkriptom von *C. albicans*

Es sollte eine vergleichende Transkriptomanalyse aller *pmt*-Mutanten erfolgen. Dafür wurden Standardwachstumsbedingungen (Vollmedium bei 30 °C bis zu einer OD_{600 nm} von 0,5) gewählt. Nach Normalisierung der Daten und einer statistischen Auswertung (wie in 2.7 beschrieben) konnten in allen fünf Mutanten insgesamt 418 verschiedene, statistisch signifikante Gene mit einer mindestens 1,5fach abweichenden Expression identifiziert werden. Listen der regulierten Gene für die einzelnen *pmt*-Mutanten befinden sich im Anhang (Tab. 8.1). Sie wurden nach Einteilung in funktionelle Kategorien geordnet (nach MIPS: munich information center for protein sequences: <http://mips.gsf.de/proj/yeast/CYGD/db/>; Mewes *et al.*, 1997).

Expression:	<i>pmt1/pmt1</i> (CAP1-312)	<i>pmt2/PMT2</i> (P2-2)	<i>pmt4/pmt4</i> (CAP4-216)	<i>pmt5/pmt5</i> (P5-577)	<i>pmt6/pmt6</i> (CAP2-239)
insgesamt	101	57	131	174	48
erhöht	43	10	69	30	2
erniedrigt	58	47	62	143	46

Tab. 3.6: Anzahl signifikant regulierter Gene in *pmt*-Mutanten. Alle Gene waren mindestens 1,5fach reguliert. Insgesamt wurden 418 verschiedene Gene gefunden, die mindestens einmal in einer der *pmt*-Mutanten reguliert waren.

Von den 418 regulierten Genen waren 64 Gene in mindesten zwei Versuchen reguliert und davon wiederum 24 in mindesten drei unterschiedlichen *pmt*-Mutanten reguliert. Die Expression der Gene *PFK1* (Phosphofruktokinase 1), *STF2* (Regulationsfaktor der ATP-Synthase) und *TCA2* (Retrotransposon) war in vier verschiedenen *pmt*-Mutanten erniedrigt. Das Gen *PLB1* (Phospholipase B) war in allen fünf Mutanten reguliert. Die Expression von *PLB1* war nur in der *pmt4*-Mutante erhöht, aber in den übrigen *pmt*-Mutanten erniedrigt. Auffällig ist, wie in Tab. 3.6 zu sehen ist, dass in den Mutanten tendenziell mehr Gene eine erniedrigte Expression aufweisen. Die *pmt4*-Mutante bildet hier die einzige Ausnahme. In der *pmt6*-Mutante konnten lediglich zwei Gene (*SNZ1* und *HIS7*) identifiziert werden, die statistisch signifikant waren und eine um den Faktor 1,5 erhöhte Expression aufwiesen. Auch bei einer weniger stringenten Auswahl, nur nach statistischer Signifikanz, hätten lediglich fünf Gene in ihrer Expression als erhöht gegolten. Im Vergleich dazu waren 244 Gene mit erhöhter Expression in der *pmt1*-Mutante statistisch signifikant, von denen 43 mindestens um den Faktor 1,5 verstärkt exprimiert waren. Die höchste Anzahl an verstärkt exprimierten Genen konnte in der *pmt5*-Mutante identifiziert werden. In der *pmt4*-Mutante wurden mit 69 Genen die meisten Gene identifiziert, deren Expression erhöht war.

In Abb. 3.36 sind so genannte Venn-Diagramme zur Darstellung gemeinsam regulierter Gene abgebildet. Die *pmt2/PMT2*- und *pmt5*-Mutante besitzen, genau wie die *pmt5*- und die *pmt6*-Mutante, mit jeweils 26 regulierten Genen, die meisten gemeinsam regulierten Gene. Gleiche Gene, die in mindesten drei verschiedenen Mutanten reguliert werden, sind in der mittleren Schnittmenge der Venn-Diagramme zu finden. Dies sind insgesamt 24 Gene. Diese Gene kodieren neben drei unbekannten Genen (*IPF6518*, *IFE2*, *IFA24.3*) und zwei Genen eines Retrotransposons (*IPF6235*, *IPF6238*) hauptsächlich für Gene, die in die Stressantwort

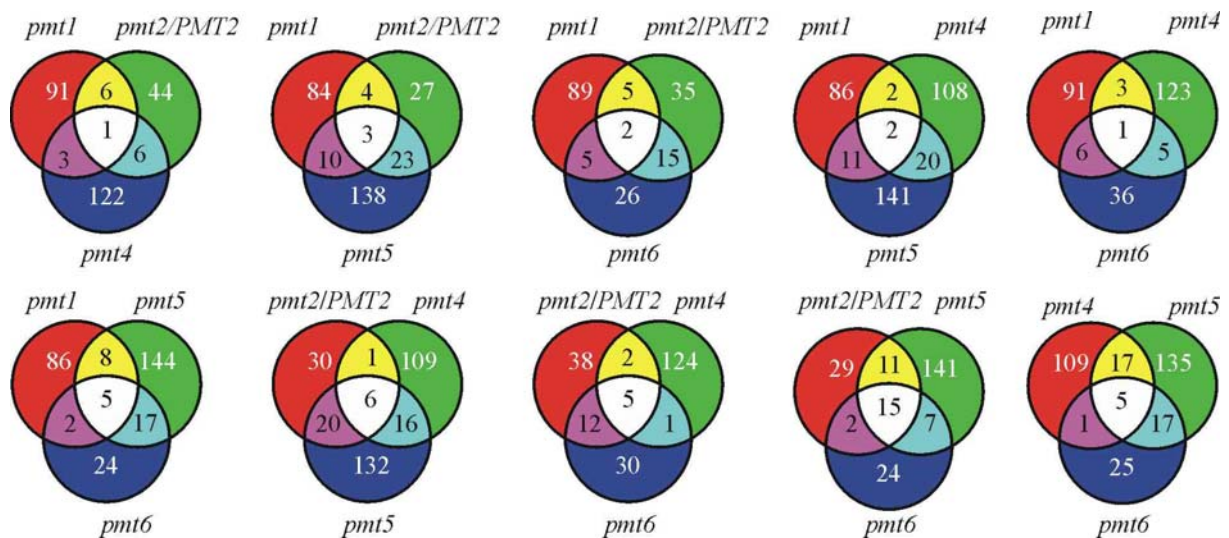


Abb. 3.36: Venn-Diagramme zur Darstellung gemeinsam regulierter Gene. Gezeigt sind alle möglichen Kombinationen von jeweils drei *pmt*-Mutanten. Die Schnittmengen geben die Anzahl der gemeinsam regulierten Gene in den angegebenen Experimenten an.

involviert sind (*RHR2*, *GPD1*, *GPD2*, *HSP12*, *SNC2.EXON2*, *SNZ1*, *TPS3.3*, *IPF9550* [*OSM1*]), sowie für Gene des Metabolismus (*PFK1*, *PFK2*, *FBA1*, *GLK1*, *IPF4959*, *IPF3094*). Dabei ist zu erwähnen, dass insbesondere die Gene der Stressantwort, die in den Glycerinmetabolismus involviert sind, überraschenderweise eine erniedrigte Expression aufweisen. Des Weiteren befinden sich unter den 24 Genen ein für ein Zellwandprotein kodierendes Gen (*ALS4.3F*), das für die Phospholipase B kodierende *PLB1*, sowie *STF2* (Regulationsfaktor der ATP-Synthase) und *CAF16* (ABC-ATPase). Um festzustellen, ob sich die 24 Gene in allen Mutanten gleich verhalten, wurden sie in einem zweidimensionalen Cluster angeordnet. In Abb. 3.37 ist zu erkennen, dass die meisten dieser Gene gleichsinnig reguliert werden. Für die Mutanten *pmt1* und *pmt4* lassen sich jedoch Ausnahmen erkennen.

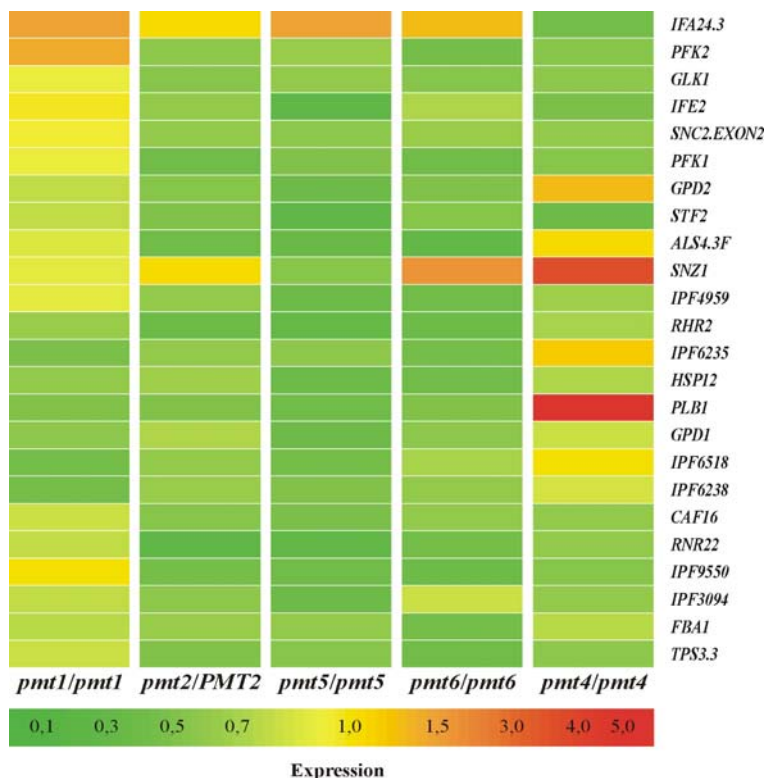


Abb. 3.37: Zweidimensionale Clusteranalyse von Genen, welche in mindestens drei verschiedenen Experimenten reguliert wurden. Gezeigt sind 24 Gene, die in Abb. 3.36 in den mittleren Schnittmengen der Venn-Diagramme zu finden sind und somit in mindestens drei verschiedenen Experimenten statistisch signifikant vorlagen, sowie eine Regulation von mindestens 1,5 aufwiesen.

Von den 64 Genen, welche in mindestens zwei der Versuche statistisch signifikant um das mindestens 1,5fache reguliert wurden, befinden sich 22 unbekannte Gene. Unter den restlichen Genen befinden sich als größte Gruppe 15 Gene, welche größtenteils direkt oder indirekt an der Synthese von Glycerin beteiligt sind. Aus der Familie der *ALS*-Gene sind *ALS1*, *ALS4* und *ALS12* in mindestens zwei *pmt*-Mutanten reguliert. Weitere interessante Genen dieser Gruppe sind *KAR2*, *HSP12* und *OSM1* (*IPF9550*) als Vertreter der Stressproteine.

In Abb. 3.38 sind alle 1,5fach signifikant regulierten Gene nach Einteilung des MIPS (Mewes *et al.*, 1997) dargestellt. Anhand der Abbildung lässt sich erkennen, dass neben der größten Gruppe der unbekannten Gene, die zweitgrößte Gruppe Gene des Metabolismus sind. Die beiden nächst größeren Gruppen sind die der Proteinbestimmung und die der zellulären Überlebensmechanismen. Weitere größere funktionelle Kategorien sind die der Transkription und die des Transportes.

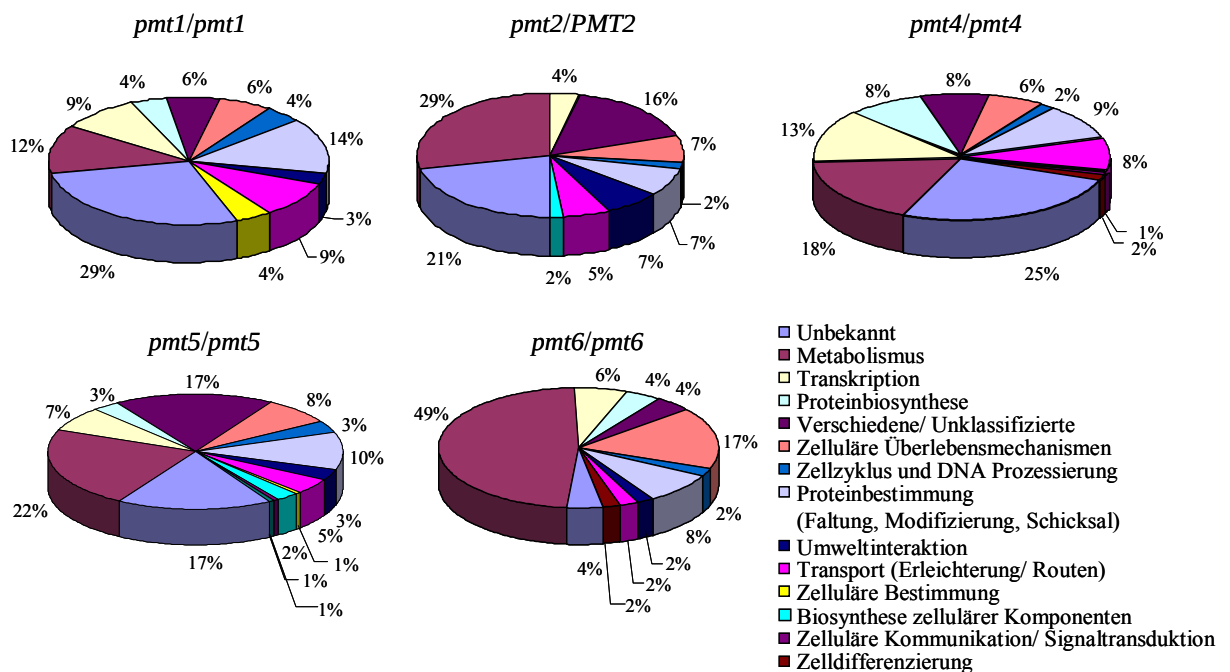


Abb. 3.38: Funktionale Charakterisierung aller regulierten Gene Die funktionellen Kategorien basieren auf homologe Proteine aus *S. cerevisiae* der Datenbank „*S. cerevisiae* Comprehensive Yeast Genome Database“ und sind nach MIPS (<http://mips.gsf.de/proj/yeast/CYGD/db/index.html>) eingeteilt.

3.6.1.1 Einfluss der *pmt1*-Mutante auf das Transkriptom von *C. albicans*

Im Einzelnen ergibt die Einteilung in funktionelle Kategorien für die 101 regulierten Gene der *pmt1*-Mutante folgendes Bild (Tab. 8.1). Neben der mit 29 % größten Gruppe der unbekannten Gene ist die größte funktionelle Kategorie mit 14 % die der Proteinbestimmung (Faltung, Modifizierung, Schicksal) (Abb. 3.38.). Die stärkste negative Regulation zeigt hier *PMT1*, da in der Mutante kein *PMT1*-Transkript vorhanden ist. Neben *PMT1* werden zehn weitere Proteine dieser Kategorie negativ reguliert, darunter beispielsweise die Carboxypeptidasen *PRC1* und *CPS2*, sowie die Golgi-Mannosyltransferase *ANP1* und ein Sortierungsprotein der Vacuole *VPS27*. Positiv reguliert in dieser Gruppe ist beispielsweise *IPF20016*, dessen Genprodukt ähnlich Sec63p, einem Protein des Translokationkomplexes, ist. 9 % der Gene gehören zu der Kategorie Transkription, darunter interessanterweise drei verstärkt exprimierte Gene der bis zu 95 % homologen Familie der *CTA*-

Transkriptionsfaktoren (*CTA21*, *CTA24*, *CAT27*). Mit ebenfalls 9 % sind verhältnismäßig viele Gene des Transports reguliert. Unter diesen ausnahmslos verstärkt exprimierten Genen befinden sich unter anderem Gene für zwei mutmaßliche Hexosetransporter, *IPF9240* und *IPF8610*. Weitere interessante Gene sind die in ihrer Expression erhöhten Gene *KAR2* und *SSR1* der Kategorie „zelluläre Bestimmung“, sowie *DDR48* und *CDR1* der „zellulären Überlebensmechanismen“. Auch *ALS1*, der Kategorie Umweltinteraktion zugeordnet, ist in *pmt1*-Mutanten stärker exprimiert.

3.6.1.2 Einfluss der *pmt2/PMT2*-Mutante auf das Transkriptom von *C. albicans*

In der *pmt2/PMT2*-Mutante machen die Gruppen der unbekannten (29 %) und die der unklassifizierten Gene (16 %) mit zusammen 45 % den größten Teil aller regulierten Gene aus. Gene des Metabolismus haben einen Anteil von 29 %. Davon sind drei Gene positiv und 13 negativ reguliert (Tab. 8.2). Unter den übrigen positiv regulierten Genen befindet sich beispielsweise das Gen für eine Mannosyltransferase der *N*-Glykosylierung *ALG2*. Im Hinblick auf die veränderte Zellwandzusammensetzung der *pmt2/PMT2*-Mutante ist es bemerkenswert, dass die in die Zellwandsynthese involvierten Gene *KRE1* (β 1,6-Glukansynthese) und *CHS21* (Chitinsynthese) eine verminderte Expression aufweisen. In der Gruppe der Gene mit erniedrigter Expression befinden sich außerdem noch drei Gene der *ALS*-Genfamilie (*ALS1*, *ALS4* und *ALS12*).

3.6.1.3 Einfluss der *pmt4*-Mutante auf das Transkriptom von *C. albicans*

Auch in der *pmt4*-Mutante fällt der größte Teil der regulierten Gene in die Kategorie „Unbekannt“ (25 %). Die Gene des Metabolismus machen 18 % aller in der *pmt4*-Mutante regulierten Gene aus. Die 18 % verteilen sich auf 11 weniger stark exprimierte, größtenteils glykolytische (*PFK1*, *PFK2*) Gene und auf 11 verstärkt exprimierte Gene, darunter unter anderem *FEN12*, dessen Genprodukt an der β 1,3-Glukansynthese beteiligt ist (Tab. 8.3). Die Gene der Kategorie „Transkription“ liegen mit 13 % in der *pmt4*-Mutante prozentual am Höchsten unter allen *pmt*-Mutanten. Auffällig ist zudem, dass in der *pmt4*-Mutante ein relativ hoher Anteil an Genen, welche in die Proteinbiosynthese involviert sind, vorkommt. Diese weisen ausnahmslos eine erhöhte Expression auf und sind neben ribosomalen Komponenten Gene, die in die Translation involviert sind (*TIF1*). Am stärksten positiv reguliert ist *PLB1*, am stärksten negativ reguliert *SFT1*, ein für ein SNARE-Protein kodierendes Gen. Weitere interessante, erhöht exprimierte Gene sind *CDC42* und das Hitzeschockprotein *SSE1*.

3.6.1.4 Einfluss der *pmt5*-Mutante auf das Transkriptom von *C. albicans*

Mit 174 Genen konnten für die *pmt5*-Mutante die meisten regulierten Gene identifiziert werden. Die Kategorien „Unbekannte“ bzw. „Unklassifizierte“ machen mit jeweils 17 % zusammen den größten Teil der regulierten Gene in der *pmt5*-Mutante aus. 22 % der regulierten Gene stammen aus der Kategorie „Metabolismus“. Davon sind 4 Gene verstärkt- und 14 Gene vermindert exprimiert (Tab 8.3). Die in ihrer Expression verminderten, Gene des Metabolismus sind ähnlich wie in den anderen *pmt*-Mutanten auf Gene der Glykolyse und Gene des Glycerinstoffwechsels (*RHR2*, *GPD1*, *GPD2*) verteilt. Auch in der *pmt5*-Mutante werden die Gene *ALS4* und *ALS12* weniger stark exprimiert. Im Gegensatz zur *pmt4*-Mutante

ist auch *SFT1* hier weniger stark exprimiert (3.6.1.3). Interessanterweise sind die beiden Gene für die Mannosyltransferasen des Golgis, *MNT1* und *MNT2*, stärker exprimiert.

3.6.1.5 Einfluss der *pmt6*-Mutante auf das Transkriptom von *C. albicans*

Mit 48 Genen wurde für die *pmt6*-Mutante die geringste Zahl signifikant regulierter Gene identifiziert. Die beiden positiv signifikanten Gene sind *SNZ1* und *HIS7*. Auffällig ist, dass mit 49 % fast die Hälfte aller Gene in die Kategorie des Metabolismus einzuordnen sind. Auch hier ist der Hauptteil dieser Gene in die Glykolyse oder den Glycerinstoffwechsel involviert. Wie in den Mutanten *pmt2/PMT2* und *pmt5* ist auch hier das Gen *ALS4* geringer exprimiert.

3.6.2 Clusteranalysen

Um Ähnlichkeiten zwischen den Transkriptomprofilen der verschiedenen *pmt*-Mutanten aufzuzeigen, wurden so genannte Clusteranalysen (Eisen *et al.*, 1995) durchgeführt. Hierbei werden Gruppen (Cluster) von Genen gebildet, die in den vorgegebenen Experimenten ein ähnliches Expressionsniveau zeigen. Des Weiteren kann anhand eines Vergleiches der Expressionsniveaus dieser Gene die Ähnlichkeit bzw. die Unterschiede verschiedener Experimente gezeigt werden.

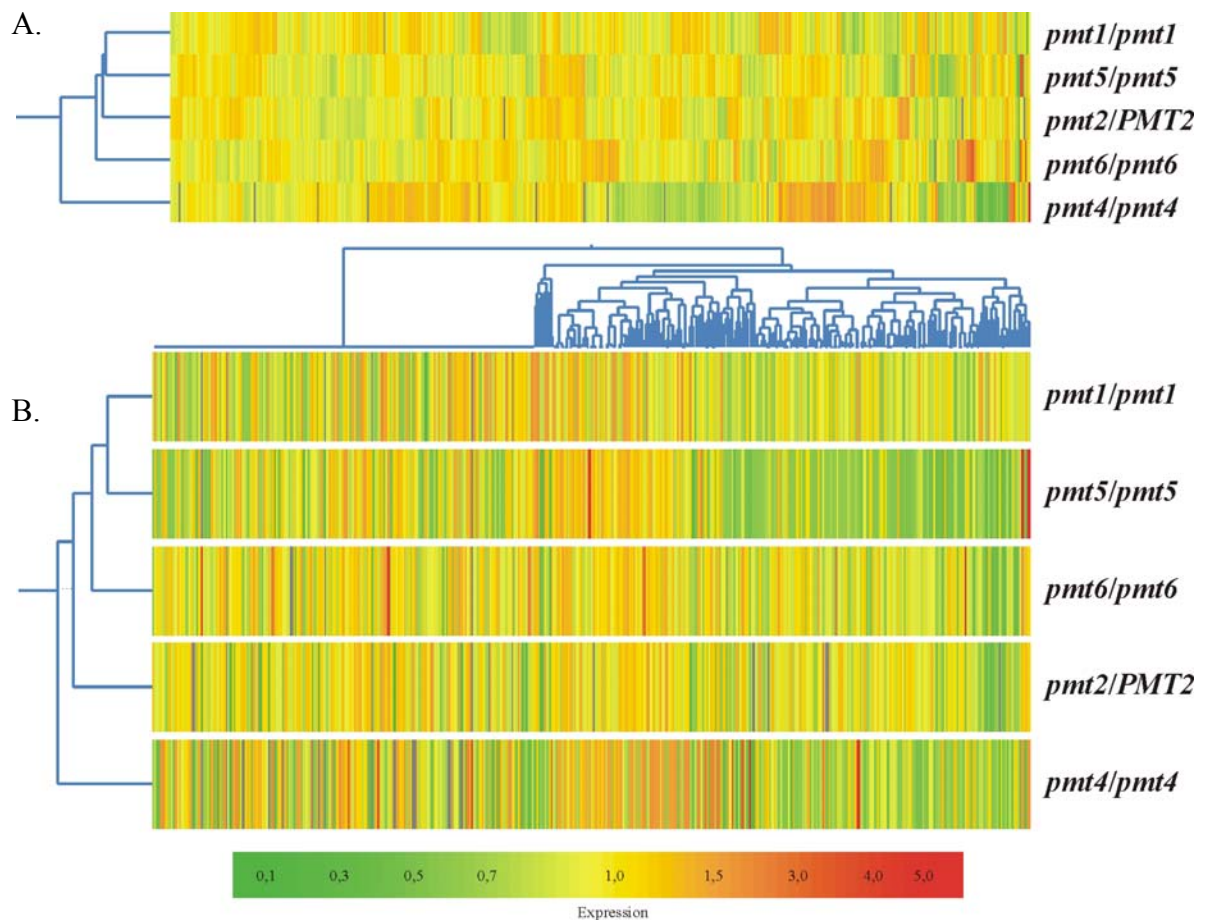


Abb. 3.39: Zweidimensionale Clusteranalyse von Genexpressionsverhältnissen. Die Clusteranalyse wurde in A. mit allen etwa 6000 ORF und in B. mit 418 Genen durchgeführt, welche zumindest in einem der 5 Experimente eine 1,5-fache signifikante Abweichung von der Referenz zeigten. Die Verhältnisse der Genexpression von Experiment und Referenz sind als Rot-Grün-Skala dargestellt. Ähnlichkeiten zwischen Genexpressionsmustern werden durch das horizontale Dendrogramm angezeigt. Das vertikale Dendrogramm zeigt Ähnlichkeiten zwischen den verschiedenen Experimenten an.

Die Abb. 3.39 zeigt eine zweidimensionale Clusteranalyse aller Gene sowie der 418 Gene, welche in zumindest einem der Experimente eine 1,5-fache signifikante Abweichung von der Referenz zeigten. Wie aus der Abbildung ersichtlich wird, zeigen die Transkriptionsprofile der verschiedenen *pmt*-Mutanten nur wenig Ähnlichkeiten. Das horizontale Dendrogramm, welches Ähnlichkeiten der Genexpressionsmuster zeigt, ist dennoch sowohl in A, als auch in B. ähnlich der phylogenetischen Verwandtschaft der *Pmt*-Proteine entsprechend angeordnet (Abb. 3.1). Unterschiedlich ist in beiden Fällen lediglich die Anordnung der *pmt2*/*PMT2*- und *pmt6*-Mutante. Auffällig ist, dass viele Gene nur schwach reguliert sind und deshalb in der Abbildung gelb erscheinen.

Um zu überprüfen, wie die Gene, welche in einem der Experimente besonders stark reguliert wurden, in den anderen *pmt*-Mutanten reguliert sind, wurden diese Gene gesondert in einem zweidimensionalen Cluster angeordnet. In Abb. 3.40 A. sind 22 Gene dargestellt, welche in einem der fünf Experimente mindestens um den Faktor 2,0 in der Mutante verstärkt exprimiert waren. In Abb. 3.40 B. sind 29 Gene dargestellt, welche in einem der fünf Experimente eine mindestens um den Faktor 0,4 erniedrigte Expression in der Mutante im

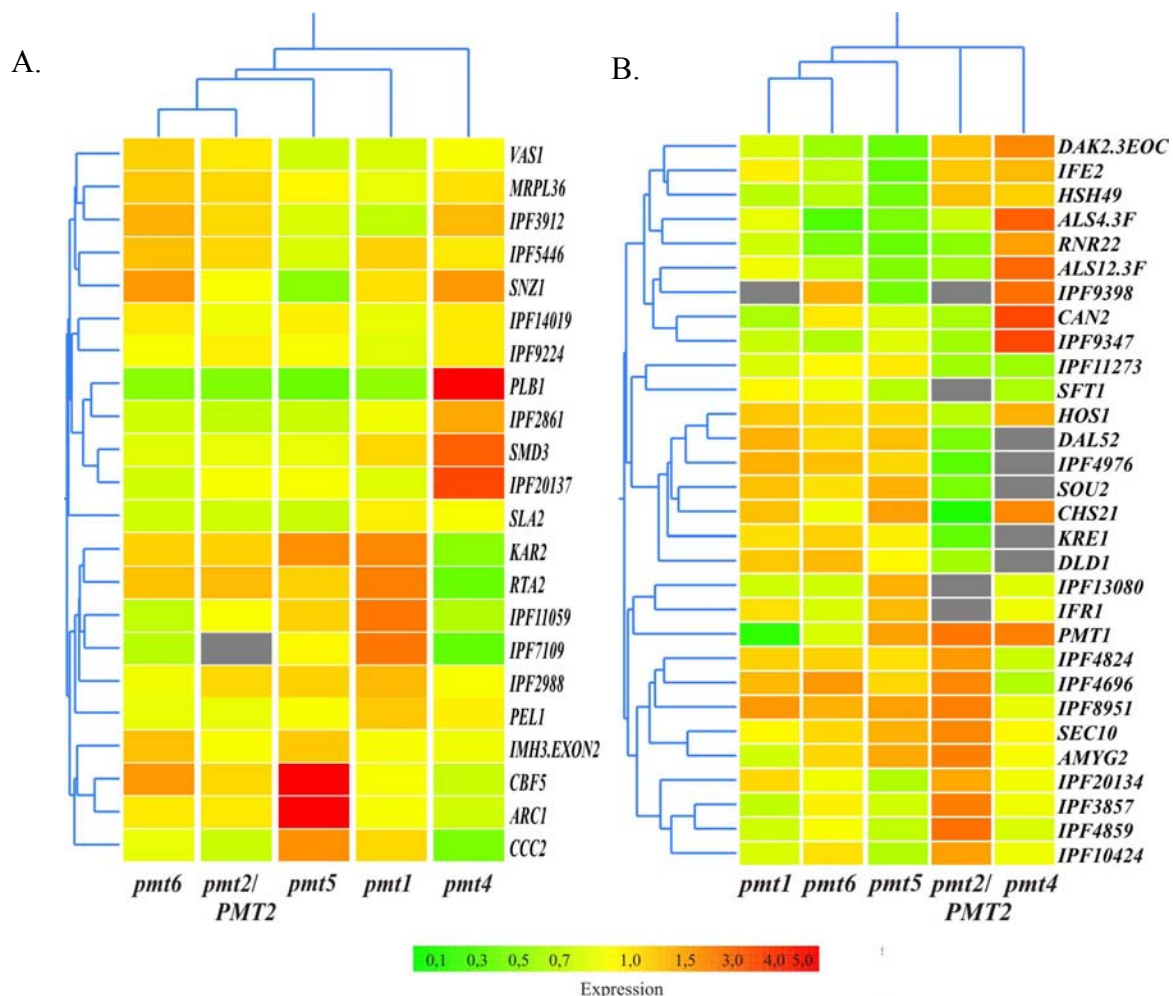


Abb. 3.40: Zweidimensionale Cluster von stark regulierten Genen. Gezeigt ist in A. eine Clusteranalyse von Genen, welche in mindestens einem Experiment eine um den Faktor 2,0 verstärkte Expression aufweisen und in B. von Genen, welche in mindestens einem Experiment eine um den Faktor 0,4 niedrigere Expression als der Wildtyp aufweisen. Beachte, dass nicht alle Gene in allen Experimenten statistisch signifikant reguliert sind. Graue Felder bedeuten, dass keine Daten für das Experiment zur Verfügung standen.

Vergleich zum Wildtyp aufwiesen. Wie aus den Abbildungen deutlich wird, ist insbesondere die *pmt4*-Mutante oftmals anders reguliert als die anderen Mutanten. Besonders auffällig ist, dass z. B. für die Gene *PBL1*, *SMD3*, *IPF20137*, *KAR2* und *RTA2* in (A.) und für *ALS4.3F*, *IPF9347* und *CAN2* in (B.). Auch in der *pmt2/PMT2*-Mutante sind eine Reihe von Genen entgegen den Genen der anderen *pmt*-Mutanten reguliert, wie aus der Abb. 3.40 B. ersichtlich ist. Deutlich wird die abweichende Regulierung auch an der Aufteilung des vertikalen Dendogramms. Anhand der horizontalen Dendogramme sind Ähnlichkeiten der Genexpression auszumachen.

Um weitere Gegensätze bzw. Gemeinsamkeiten in der Expression verschiedener Gene in den einzelnen *pmt*-Mutanten zu finden, wurden Clusteranalysen mit Gruppen von Genen durchgeführt, die von besonderem Interesse sind.

Da die *pmt*-Mutanten in ihrer Virulenz abgeschwächt sind und in ihrer Fähigkeit an humane Zellen zu adhären bzw. diese zu penetrieren eingeschränkt sind (Timpel *et al.*, 1999; Rouabhia *et al.*, 2004), wurde eine Clusteranalyse mit wichtigen Adhäsions- bzw. Virulenzfaktoren durchgeführt (Calderone und Fonzi, 2001).

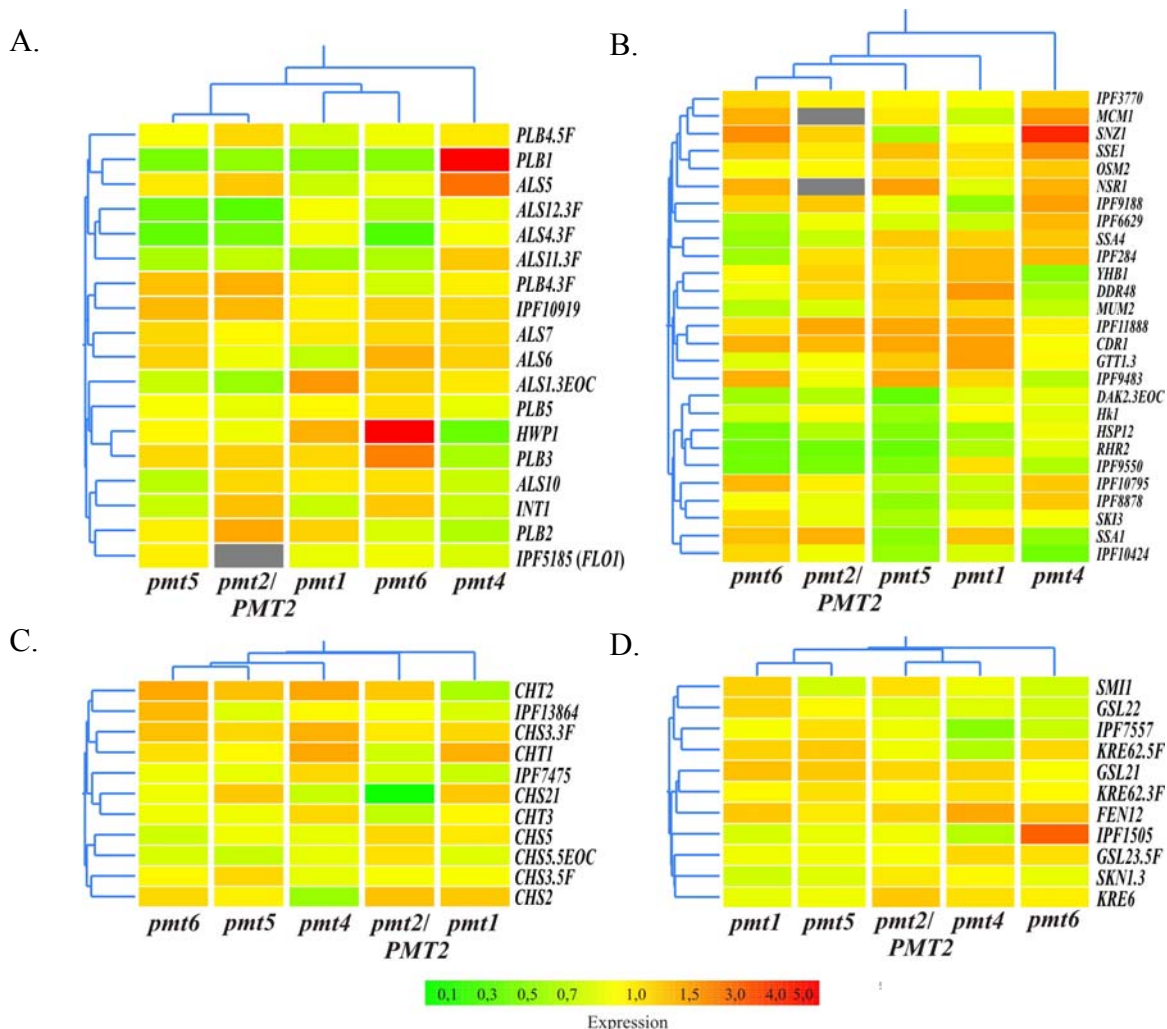


Abb. 3.41: Zweidimensionale Clusteranalyse ausgesuchter Gene. Gezeigt ist in A. eine Clusteranalyse von Genen, welche in die Virulenz *C. albicans* involviert sind. In B. sind Gene dargestellt, welche in mindestens einem Experiment statistisch signifikant reguliert waren und welche in die MIPS Kategorie „Zelluläre Überlebensmechanismen“ fallen. In C. wurden Gene in einem Cluster dargestellt, welche an der Chitinsynthese beteiligt sind sowie die drei Chitinasen. In D. sind Gen, welche an der β 1,3-Glukansynthese beteiligt sind dargestellt. Beachte, dass nicht alle Gene in allen Experimenten statistisch signifikant reguliert sind. Graue Felder bedeuten, dass keine Daten für das Experiment zur Verfügung standen.

In Abb. 3.41 A. ist zu erkennen, dass viele dieser Gene gegenüber dem Wildtyp in den Mutanten nicht reguliert sind. Die Expression einiger Virulenzfaktoren ist jedoch in einzelnen *pmt*-Mutanten spezifisch stärker bzw. schwächer als im Wildtyp. Auffällig ist hierbei eine Erhöhung des *HWP1* Transkriptes in der *pmt1*- und besonders in der *pmt6*-Mutante, während es in der *pmt4*-Mutante verringert ist. Des Weiteren fällt auf, dass die Gene *ALS4*, *ALS11* sowie *PLB1* in allen außer der *pmt4*-Mutante eine schwächere Expression aufweisen.

Da Gene der Kategorie „zelluläre Überlebensmechanismen“ eine der am stärksten vertretenen Kategorien war, wurde in Abb. 3.41 B. eine Analyse aller Gene dieser Kategorie, welche in mindestens einem der Experiment statistisch signifikant reguliert war, durchgeführt. Wiederum lassen sich sowohl Gemeinsamkeiten als auch Unterschiede in der Expression dieser Gene in den verschiedenen Mutanten erkennen. Beispielhaft seien hier eine in allen Mutanten zu beobachtende Verringerung des *HSP12* Transkriptes und eine gegensätzliche Expression von *SNZ1* genannt. Beide Gene wurden in verschiedenen Mutanten als statisch signifikant reguliert erkannt.

Aufgrund ihrer Veränderungen in der Zellwandstruktur wurde in Abb. 3.41 C. an der Synthese des Chitins beteiligte Gene, sowie die drei Chitinasen *CHT1*, *CHT2* und *CHT3* untersucht. In D. wurden Gene, welche vermutlich an der β 1,3-Glukansynthese beteiligt sind, untersucht. Tendenziell ist hier eine Übereinstimmung in der Regulation dieser Gene zu erkennen. Allerdings fallen auch einige Ausnahmen auf, wie z. B. *CHS21* in *pmt2*/*PMT2*-Mutanten, *IPF1505* in *pmt6*-Mutante und *IPF7557*, *KRE6*, *CHS2* in *pmt4*-Mutanten.

3.7 Expression von *FLO1* in *pmt*-Mutanten

Das bisher uncharakterisierte Gen *IPF5185* kodiert für ein Protein, welches eine hohe Homologie zu dem Zellwandprotein Flo1p aus *S. cerevisiae* zeigt. Dieses O-glykosylierte Protein ist an der Knospenspitze lokalisiert und an der Zellaggregation sowie der Zelladhäsion von *S. cerevisiae* beteiligt (Watari *et al.*, 1994). In *C. albicans* bezeichneten Nantel *et al.* (2002) und Sohn *et al.* (2003) das Gen als *FLO1* bzw. *YWP1* („yeast wall protein“) und konnten zeigen, dass dieses Gen nach Hypheninduktion reprimiert wird. Aufgrund der Homologie wird das Gen *IPF5185* im Folgenden als *FLO1* bezeichnet. Da es sich um ein O-glykosyliertes Protein handelt, welches nach Deletion den *pmt*-Mutationen ähnliche Phänotypen verursacht, und außerdem in den DNA-Mikroarrays eine moderate Verringerung der Expression in verschiedenen *pmt*-Mutanten aufwies (Abb. 3.41 A.), sollte experimentell überprüft werden, wie dessen Transkription in den *pmt*-Mutanten beeinflusst ist.

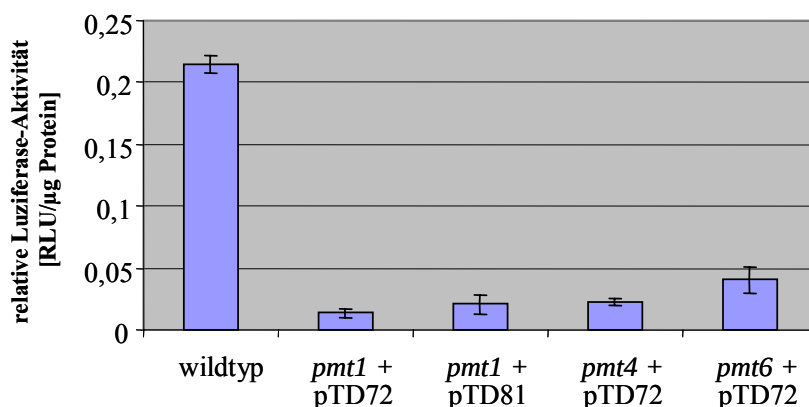


Abb. 3.42: Aktivität des *FLO1*-Promotors in verschiedenen Stämmen. Transformanten der im CAI4 (+/+), CAP13121 (*pmt1/pmt1*), CAP4-2164 (*pmt4/pmt4*), und CAP2-2391 (*pmt6/pmt6*) Stammhintergrund integrierten *FLO1p*-Reporterplasmide pTD72 (+MCB) und pTD81 (-MCB) wurden in SD-Medium angezogen. Die relative Luciferase-Aktivität von drei unabhängigen Transformanten wurde bestimmt und gemittelt.

Zur Analyse des *FLO1*-Promotors wurden das Plasmide pTD72 verwendet, das eine *FLO1-RLUC*-Sequenz enthält (Doedt, 2003). Das *RLUC*-Gen kodiert für eine Luziferase, deren Aktivität mittels einer Lumineszenz-Messung gemessen werden kann (siehe 2.6.4). *FLO1*, als auch *PMT1* besitzen ein MCB-Elementes in ihrem Promotor. Um zu überprüfen, ob das MCB-Element einen Einfluss hat, wurde außerdem Plasmid pTD81, in dem die 6 bp-lange Nukleotidsequenz des MCB-Elementes durch eine PCR-Mutagenese deletiert wurde (Doedt, 2003), verwendet. Die Plasmide, welche keine autonom replizierende Sequenz (*ARS*) tragen, wurden zur Integration in den *FLO1*-Locus mit dem Restriktionsenzym *Bst*1107I linearisiert, und in den Wildtyp, sowie die *pmt1*-, *pmt4*- und *pmt6*- Mutanten transformiert. Die korrekte Integration des Fragmentes wurde mittels PCR mit dem Primer p1-verFLO1p und SK-1 verifiziert (Daten nicht gezeigt). Je drei isogene Stämme wurden daraufhin in SD-Medium angezogen, und die Luziferase-Aktivität (bezogen auf den Gesamt-Proteingehalt) bestimmt. Das Ergebnis ist in Abb. 3.42 zu sehen. In allen drei Mutanten war die Expression des *FLO1*-Promotors deutlich reduziert. Dabei hatte eine Deletion des MCB-Elementes keinen Einfluss auf die Expressionsstärke.

4. Diskussion

Die Bedeutung opportunistischer Krankheitserreger ist in den letzten Jahren stetig gestiegen und wird auch in den kommenden Jahren weiter zunehmen. Dies ist bedingt durch eine steigende Zahl immunsupprimierter Menschen, welche durch die fortschreitende medizinische Entwicklung hervorgerufen wird. Der vermehrte Einsatz von Chemotherapeutika, Immunsuppressiva und häufige chirurgische Eingriffen schwächen das Immunsystem des Menschen (Kao *et al.*, 1999). Hinzu kommen Krankheiten wie beispielsweise AIDS. Als einem der wichtigsten opportunistischen Erreger kommt *C. albicans* damit eine besondere Bedeutung zu (Pfaller *et al.*, 1999). Ein weiterer Punkt ist die Zunahme von Resistenzen gegen Antimykotika, hervorgerufen durch eine unsachgemäße Anwendung in der Medizin einerseits und möglicherweise durch eine extensive Anwendung in der Landwirtschaft andererseits. Dadurch wird die Zahl der gegen Pilzinfektionen wirksamen Medikamente zunehmend eingeschränkt.

4.1 Sequenzanalyse der Pmt-Proteine

Der in Abb. 3.1 dargestellte phylogenetische Stammbaum verdeutlicht die Einteilung der Pmt-Proteine in drei Subklassen, bestehend aus der Pmt1-, der Pmt2 und der Pmt4-Familie. Zudem fällt auf, dass die beiden Spezies *C. albicans* mit fünf Isoformen und *S. cerevisiae* mit sieben Isoformen die bislang einzigen sind, welche mehr als ein Mitglied jeder Subfamilie besitzen. Es wurden insgesamt elf komplett sequenzierte Genome verschiedener Pilzspezies untersucht (3.1), von denen in neun Genomen jeweils nur ein Vertreter der Pmt1-, der Pmt2 und der Pmt4-Familie identifiziert werden konnte. Ein Grund für die ungewöhnlich hohe Zahl an Pmt-Proteinen könnte die Duplikation des kompletten Genoms von *S. cerevisiae* sein (Wolfe und Shields, 1997). Nach einer weiteren Duplikation eines einzelnen *PMT*-Gens käme man so auf sieben Proteinmannosyltransferasen. Für *C. albicans* hingegen besteht die Möglichkeit, dass einzelne Isoformen spezielle, für die Virulenz relevante Funktionen erworben haben, welche dem Pilz einen Selektionsvorteil boten. So zeigt beispielsweise die *pmt5*-Mutante keine *in vitro* Phänotypen, ist jedoch im Maus- und Hautmodell in ihrer Virulenz eingeschränkt, was für eine spezielle Funktion von Pmt5p in der Virulenz spricht (Rouabhia *et al.*, 2004).

Die unterschiedlichen Motive für verschiedene Transkriptionsfaktoren in den Promotorbereichen der *PMT*-Gene lassen vermuten, dass die Funktionen einzelner Pmt-Proteine zu unterschiedlich Zeitpunkten benötigt werden (Tab. 3.2). So spricht die Anwesenheit des SCB-Elementes in den Promotoren von *PMT4*, *PMT5* und *PMT6* dafür, dass sie zellzyklusspezifisch, wie viele an der Zellwandsynthese beteiligten Gene, an der Grenze zur G1/S Transition exprimiert werden (Iyer *et al.*, 2001). Auch *PMT1* wird wahrscheinlich zellzyklusspezifisch an der Grenze zur G1/S Transition exprimiert; allerdings über ein MCB-Element (McIntosh, 1999). Der Grund für die zeitlich nah beieinander liegende Expression verschiedener *PMT*-Gene über zwei verschiedene Zellzyklusfaktoren ist unklar. Die Anwesenheit von SRE-Elementen in den Promotoren von *PMT1*, *PMT5* und *PMT6* spricht dafür, dass deren Genprodukte eine zusätzliche Rolle in der Stressantwort obliegt. Für *PMT2* konnten keine spezifischen Promotorelemente gefunden werden, was aufgrund seiner Bedeutung als essentielles Gen auf eine konstitutive Expression hindeutet.

Die hohe Sequenzidentität zu Pmt-Proteinen aus *S. cerevisiae* (60 % für Pmt2p) macht einen ähnlichen strukturellen Aufbau der *C. albicans* Pmt-Proteine, wie er für ScPmt1p experimentell herausgefunden (Girrbach *et al.*, 2000) wurde, sehr wahrscheinlich. Diese Annahme wird unterstützt durch die ähnlichen Hydropathieplots der Proteine (Ernst und Prill, 2001 und Daten nicht gezeigt).

4.2 Die Protein O-Mannosylierung ist eine essentielle Proteinmodifikation

In dieser Arbeit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass die Präsenz eines einzelnen Gens für eine Proteinmannosyltransferase für das Überleben eines Pilzes essentiell ist. Ein Stamm, in dem die Expression eines verbliebenen *PMT2*-Allels von dem *tetO-ScHOP1*-Promotor Konstrukt reguliert wird, erwies sich unter reprimierenden Bedingungen als nicht lebensfähig (Abb. 3.1). Während es kein Problem war das erste Allel zu disruptieren, erwies sich die Disruption von *PMT2* bzw. die Konstruktion einer konditionalen Mutante als ungleich schwieriger. Es wurde beispielsweise nach der Transformation des Disruptionsfragmentes zur Deletion des zweiten Allels immer eine angemessene, höhere Zahl an Transformanten erzielt. Im Vergleich zur Disruption von *PMT4* in einer *pmt1/pmt1*-Mutante war dies anders. Hier wurden im Versuch, das zweite Allel zu zerstören, keine oder nur sehr wenige Transformanten erhalten, so dass die Vermutung, dass *PMT4* in einem Stamm mit *pmt1/pmt1* als genetischem Hintergrund essentiell ist, nahe lag (Prill, 2000). Der Grund für die adäquate Menge an Transformanten war, dass es nach Integration des Disruptionsfragmentes in das verbliebene Wildtyp-Allel zu einer Verdopplung des Locus kam. Es lagen somit drei *PMT2*-Allele vor (*pmt2Δ::hisG-URA3-hisG/pmt2Δ::hisG/PMT2*). Der genaue Mechanismus, der diese Verdopplung des Locus verursacht, ist unbekannt. Auch bei der Konstruktion der konditionalen Mutante *pmt2Δ::hisG/tetO-ScHOP1p-PMT2* kam es in den meisten Fällen zur Bildung von drei *PMT2*-Allelen. Dies geschah obwohl in diesem Fall kein Selektionsdruck vom essentiellen *PMT2* ausging, da eine Transkription vom *tetO-ScHOP*-Promotor stattfand. Der Grund dafür, dass die Mutante P2-678 (*pmt2Δ::hisG/MET3p-PMT2*) weiterhin in der Lage war, auf Medium mit 2,5 mM Methionin und Cystein zu wachsen, ist unklar. Die plausibelste Begründung ist, dass eine Restaktivität des *MET3*-Promotors für ein Wachstum der Mutante auf repressivem Medium noch hinreichend gewesen ist. Allerdings war eine Repression verschiedener anderer essentielle Gene durch den *MET3*-Promotor ausreichend, um das Wachstum zu hemmen (Prill, 2000; Plaine, 2001). Eine andere Möglichkeit ist, dass durch eine verminderte O-Glykosylierung der Aminosäuretransport eingeschränkt ist und so keine ausreichenden Mengen Methionin und Cystein zur Repression des *MET3p* vorhanden sind. Ein eingeschränkter Aminosäuretransport könnte aufgrund einer Funktions-einschränkung der Aminosäuretransporter oder durch eine veränderte Zellwandstruktur bedingt sein.

Die Tatsache, dass sich die alleinige Deletion von *PMT2* als essentiell erwies, konnte aus den gegebenen Sachverhalten heraus nicht erwartet werden und ist der erste beschriebene Fall. Es gibt jedoch Hinweise darauf, dass *PMT2* auch in *S. pombe* ein essentielles Gen ist (Strahl S., persönliche Mitteilung). Bei *S. cerevisiae* ist lediglich die gleichzeitige Disruption von drei Proteinmannosyltransferasen letal, während *pmt2 pmt4*- oder *pmt2 pmt3*-Doppelmutanten bei osmotischer Stabilisierung überlebensfähig sind (Genztsch und Tanner, 1996). Daraus lässt sich ableiten, dass die Proteinmannosyltransferasen in *C. albicans* andere, für die Zelle

lebensnotwendige Funktionen ausüben bzw. für die Funktion oder Stabilität andere lebensnotwendiger Proteine verantwortlich sind.

4.3 Mutationen in Genen für Proteinmannosyltransferasen verursachen pleiotrope Phänotypen

4.3.1 Aggregation

Wie in Abb. 3.14 und in Abb. 3.15 dargestellt ist, aggregieren die Mutante *pmt1*, sowie die Doppelmутanten *pmt1 pmt6* und *pmt4 pmt6* stark, während die *pmt4*-Mutante leicht aggregiert. Bislang wurde angenommen, dass dieser Phänotyp einzig durch eine eingeschränkte Funktion der Chitinase verursacht wird. Dafür spricht, dass in *S. cerevisiae* gezeigt wurde, dass die Chitinase Cts1p durch ScPmt1p und zu einem geringen Anteil von ScPmt4p mannosyliert wird (Gentzsch und Tanner, 1996). Des Weiteren wurde in *C. albicans* in *pmt1*-Mutanten eine verminderte Chitinaseaktivität an der Zelloberfläche und eine erhöhte Aktivität im Mediumüberstand im Vergleich zum Wildtyp gemessen (Timpel *et al.*, 1998). Dagegen spricht, dass weder für die *pmt4*-Mutante, noch für die *pmt4 pmt6*-Doppelmутante, welche im gleichen Maße wie die *pmt1*-Mutante aggregiert, eine veränderte Chitinaseaktivität gemessen werden konnte (Prill, 2000) und, dass die Chitinaseaktivität an der Zelloberfläche der *pmt1*-Mutante lediglich auf etwa 70 % der Wildtypaktivität reduziert ist (Timpel, 1998).

An den elektronenmikroskopischen Aufnahmen in Abb. 3.16 B. erkennt man, dass die Chitinasen der *pmt1*-Mutante fähig sind das aus Chitin bestehende primäre Septum zu hydrolysieren. Da die *pmt1*-Mutante, durch den hohen Verlust von Zellwandproteinen (3.4), hydrophiler als der Wildtyp geworden ist (3.3.3), kann auch eine Aggregation aufgrund hydrophober Wechselwirkungen ausgeschlossen werden. An den elektronenmikroskopischen Aufnahmen (Abb. 3.16) sieht man des Weiteren, dass die Zellen unabhängig vom primären oder sekundären Septum miteinander verbunden sind. Die Strukturen, die diese Verbindung bewirken, könnten kovalent verknüpfte Mannoproteine sein, welche an der Zellteilung beteiligt sind. Eine weitere Möglichkeit ist, dass es sich hierbei um miteinander verbundene Strukturen des Glukangerüsts handelt. Bei Stämmen, in denen das Gen für eine Endo- β -1,3-Glukanase *ENG1* disruptiert ist, bilden sich beispielsweise ebenfalls den *pmt*-Mutanten ähnliche Aggregate (Baladron *et al.*, 2002; Martin-Cuadrado *et al.*, 2003). Dieses lässt vermuten, dass die Aggregate aufgrund eines Funktionsverlustes von Eng1p oder einer anderen Glukosidase entstanden sein könnte. In diesem Zusammenhang ist es interessant, dass *SUN42*, ein für eine mutmaßliche β -1,3-Glukosidase kodierendes Gen, in *pmt5*-Mutanten statistisch signifikant um den Faktor 1,55 stärker exprimiert wird als im Wildtyp. In einer *pmt4*-Mutante ist *SUN42* ebenfalls 1,6fach stärker exprimiert, jedoch nicht in statistisch signifikanter Weise. In der *pmt1*-Mutante ist *SUN42* in einem Experiment stärker- und in zwei Experimenten weniger stark exprimiert. Entweder ist eine der Glukosidasen in den *pmt*-Mutanten unterglykosyliert und kann seine Funktion nicht mehr vollständig ausüben, oder die Glukosidasen können aufgrund veränderter Zellwandstrukturen ihre enzymatischen Funktionen nur zum Teil ausüben.

4.3.2 Pmt-Proteine sind in die Morphogenese von *C. albicans* involviert

Die Bildung von Hyphen wird als ein wichtiger Virulenzfaktor von *C. albicans* angesehen. Daher ist die Beobachtung, dass Mutationen in verschiedenen *PMT*-Genen unterschiedliche Defekte in der Bildung von Hyphen zeigen von besonderem Interesse.

In Abb. 3.17 ist ein Überblick über das Verhalten der verschiedenen *pmt*-Mutanten auf Lee's-Medium gezeigt. Wie zu erkennen ist, reicht die Disruption eines *PMT2*-Allels aus, um einen Defekt bei der Filamentierung auf festem Mangelmedium zu bewirken. Es handelt sich hiermit, wie bei der *pmt1*- und der *pmt6*-Mutante, um einen Gendosiseffekt. Lediglich die *pmt4*-Mutante ist erst nach Disruption beider Allele nicht mehr fähig auf festem Mangelmedium Hyphen zu bilden. Da *pmt2/PMT2*-Mutanten in flüssigem Medium uneingeschränkt in der Lage waren, Hyphen zu bilden, kann man wie in der *pmt4*- und *pmt6*-Mutante davon ausgehen, dass kein Defekt in strukturellen Komponenten vorliegt, der für den Verlust der Hyphenbildung verantwortlich ist. Dies könnte jedoch in der *pmt1*-Mutante der Fall sein, da hier auch nach Hypheninduktion durch Serum eine zeitlich starke Verzögerung in der Hyphenbildung zu beobachten ist (Abb. 3.17). Ein anderer Grund für die zeitliche Verzögerung in der Hyphenbildung der *pmt1*-Mutante könnte eine gesteigerte Anforderung an die Chitinsynthese sein. Wie in Tab. 3.5 zu erkennen ist, ist der Chitingehalt in der Zellwand der *pmt1*-Mutante erhöht. Da in der Zellwand von Hyphen dreimal mehr Chitin eingelagert ist (Braun und Calderone, 1978) könnte die Chitinsynthese der verzögernde Schritt in der Hyphenbildung sein. Allerdings konnte in den DNA-Mikroarrays keine Erhöhung der Transkription in einem der Chitinsynthese Genen gefunden werden.

Die Hypheninduktion durch Hungerbedingungen wird von zwei Signalwegen reguliert. Zum einen über eine MAP Kinase (Cek1p in *C. albicans*) und den Transkriptionsfaktor Cph1p und zum anderen über die Proteinkinase A (Tpk2p in *C. albicans*) und den Transkriptionsfaktor Efg1p (Ernst, 2000). In der *pmt6*-Mutante ist es gelungen, den Hyphendefekt auf „Spider“-Medium durch Überexpression von Komponenten der beiden Signaltransduktionswege zu komplementieren (Timpel *et al.*, 2000). Es wurde vermutet, dass eine glykosylierte Sensorkomponente der beiden Signaltransduktionswege, die sich in der Zellwand oder der Plasmamembran befindet, durch mangelnde O-Glykosylierung einen Funktionsverlust erleidet. Obwohl in den anderen *pmt*-Mutanten eine Komplementation durch Komponenten der beiden Signaltransduktionswege fehlschlug, ist es dennoch wahrscheinlich, dass zumindest in der *pmt2/PMT2*- und in der *pmt4*-Mutante ein glykosylierter Sensor defekt ist. Unter eingebetteten und hypoxischen Bedingungen reagieren beide Mutanten nämlich verschieden. Die *pmt2/PMT2*-Mutante filamentiert unter eingebetteten Bedingungen stärker, zeigt aber unter hypoxischen Bedingungen den gleichen Phänotyp wie der Wildtyp. Die *pmt4*-Mutante hingegen bildet eingebettet in eine Matrix aberrante dicke Filamente und hyperfilamentiert unter hypoxischen Bedingungen (Abb. 3.19). Da in den Mutanten kein struktureller Defekt vorliegt, welcher eine Filamentierung behindert, muss die unterschiedliche Bildung von Hyphen unter verschiedenen Bedingungen von einer defekten Signalübermittlung ausgehen. Dies spricht dafür, dass verschiedene Sensoren unter den unterschiedlichen Bedingungen entweder defekt oder im Fall der Hyperfilamentierung auch konstitutiv aktiviert sind. In *S. cerevisiae* wurde beschrieben, dass verschiedene Glykosylierungsmutanten einen Signalweg aktivieren, welcher die Transkription von verschiedenen Komponenten der Zellwand bewirkt (Cullen *et al.*, 2000). Dieser Signalweg

aktiviert Ste12p, einen zu Cph1p in *C. albicans* homologen Transkriptionsfaktor. Als Sensorprotein dieses Signalweges fungiert Sho1p, ein glykosyliertes Membranprotein das auch der Sensor des HOG Signalweges ist. Ein zu Sho1p homologes Protein in *C. albicans* könnte eines von verschiedenen Sensorproteinen sein. Eine Datenbankanalyse ergab, dass *CaSSU81* (CA2188) für ein Protein kodiert, welches 27 % Sequenzidentität und 39 % Sequenzähnlichkeit zu ScSho1p besitzt. *CaSSU81* war in den DNA-Mikroarrays jedoch in keiner der *pmt*-Mutanten stärker als 1,5fach reguliert. Da in den DNA-Mikroarrays das Gen *ALS4*, dessen *S. cerevisiae* Homolog als Signaltransduktor des hyphalen Wachstums beschrieben wird, mehrfach schwächer exprimiert ist könnte auch über eine Rolle von Als4p in der Hyphenentwicklung spekuliert werden.

Der Grund für das invasive Wachstum einer *pmt4 pmt6*-Mutante (Abb. 3.21) wird klar, wenn man sich den Phänotyp der *pmt4 pmt6*-Mutante unter eingebetteten Bedingungen anschaut (siehe Abb. 3.19). Bei Kontakt der Zellen mit einer Matrix wird in der *pmt4 pmt6*-Mutante eine verstärkte Filamentierung induziert. So kann man sich vorstellen, dass in der unteren Schicht der Zellen einer *pmt4 pmt6*-Kolonie, durch den oberflächlichen Kontakt mit dem Agar, eine Hyperfilamentierung ausgelöst wird. Da die *pmt1*-Mutante jedoch unter eingebetteten Bedingungen nur noch bedingt in der Lage ist Hyphen zu bilden, kann diese Erklärung für sie nicht gelten. Da sowohl die *pmt4 pmt6*-Mutante, als auch die *pmt1*-Mutante in gleichem Maße aggregieren (Abb. 3.15), scheidet ein Erklärungsansatz für das invasive Wachstum der *pmt1*-Mutante aufgrund ihrer Aggregatbildung aus. Eine mögliche Erklärung wäre, dass die *pmt1*-Mutante für eine Filamentierung eine andere Kohlenstoffquelle, als die unter eingebetteten Bedingungen verwendete Saccharose, zum invasiven Wachstum benötigt.

4.3.3 Sensitivitäten

Bereits die Deletion eines *PMT2*-Allels ist ausreichend um ein Wachstum der Mutante bei 42 °C zu verhindern (Abb. 3.22). Dies verdeutlicht die enorme Bedeutung, die Pmt2p für die Zelle hat. Auch homozygote *pmt1*-Mutanten sind nicht mehr in der Lage, bei einer Temperatur von 42 °C zu wachsen. Es ist wahrscheinlich, dass die Stabilität mehrerer Proteine durch eine fehlende O-Mannosylierung derart herabgesetzt ist, dass sie ihre Funktion bei einer erhöhten Molekularbewegung nicht mehr ausüben können und auch eine gesteigerte Produktion von Stressproteinen diesen Effekt nicht mehr kompensieren kann.

Die geringe Vitalität der *pmt2/PMT2*-Mutante wird auch durch Färbung mit Phloxin B deutlich. Phloxin B wird normalerweise, da es Zellen der *opaque*-Form rot anfärbt, zur Unterscheidung von *white*-Zellen oder zur Färbung toter Zellen benutzt. Die Färbung kann vermutlich erfolgen, da die Zellwand der *pmt2/PMT2*-Mutante stark geschwächt ist. Wie aus Tab. 3.5 ersichtlich wird, ist sowohl der Chitin-, als auch der β 1,6-Glukangehalt reduziert.

Erstaunlich ist, dass keine der *pmt*-Mutanten eine erhöhte Osmosensitivität zeigt, weder bei erhöhter, noch bei erniedrigter Osmolarität. Lediglich die *pmt2/PMT2*-Mutante zeigt bei einer hohen Salzkonzentration von 2 M eine geringe Sensitivität. Für verschiedene *pmt* Doppel-, und Dreifachmutanten wurde eine Sensitivität sowohl unter hyper-, als auch hypoosmotische Bedingungen beschrieben (Gentzsch und Tanner, 1996). Dies ist jedoch nicht der Fall in den verschiedenen *pmt*-Mutanten in *C. albicans* (3.4.4.1). Ein Erklärungsansatz wäre, dass im Vergleich zu *S. cerevisiae*, in *pmt*-Mutanten von *C. albicans* der Proteinkinase C-Weg noch intakt ist. Für *S. cerevisiae* ist beschrieben worden, dass durch die Unterglykosylierung von

Mid2p, Wsc1p und Wsc2p in *pmt2 pmt4*-Mutanten der Proteinkinase C-Weg, welcher für die Integrität der Zellwand nötig ist, nicht mehr aktiviert wird und es dadurch zum Zelltod kommt (Lommel *et al.*, 2004). Möglich ist, dass der PKC-Weg in *pmt*-Mutanten von *C. albicans* nicht betroffen ist und somit osmotischer Stress durch eine Veränderung der Zellwand besser kompensiert werden kann. In diesem Zusammenhang ist es interessant, dass keine Homologen der Proteine Mid2p, Wsc1p und Wsc2p in *C. albicans* existieren.

Rhodanin-3-Acetylsäure ist ein spezifischer Inhibitor von Pmt1p (Duffy *et al.*, 2001). Dies bestätigen die in Abb. 3.23 dargestellten Tropftests mit Derivaten der Rhodanin-3-Acetylsäure. Während die *pmt1*-Mutante in keinem Fall sensitiv ist, sind alle anderen *pmt*-Mutanten in ihrem Wachstum eingeschränkt. Am deutlichsten tritt dieser Effekt bei Gabe des Derivates OGT24678 hervor. Jedoch lässt die erhöhte Sensitivität der *pmt6*-Mutante vermuten, dass dieser Inhibitor auch zu einem gewissen Grade gegen eine andere Proteinmannosyltransferase wirkt. Dies kann dadurch begründet werden, dass eine *pmt1 pmt6*-Doppelmutante das gleich Wachstum wie eine *pmt1*-Mutante zeigt, bei Gabe des Derivates OGT24678 aber wesentlich schlechter wächst. Spezifischer scheinen die Derivate OGT2185 und OGT2078 zu sein; hier ist ausschließlich eine Sensitivität in der *pmt2/PMT2*- und *pmt4*-Mutante zu sehen, von denen man im Fall von *pmt4* weiß, dass eine gleichzeitige Deletion von *PMT1* letal ist und im Fall von *pmt2/PMT2* vermuten kann. Die Sensitivität der *pmt5*-Mutante gegen den Inhibitor ist der erste *in vitro* Phänotyp, der für diese Mutante gefunden wurde.

Neben der bekannten Sensitivität der *pmt1*- und *pmt4*-Mutante (Timpel *et al.*, 1998; Prill, 2001) ist auch die *pmt2/PMT2*-Mutante stark sensitiv gegen das Aminoglykosid Hygromycin B. Gegen das Aminoglykosid G418 besteht sogar eine stärkere Sensitivität als in der *pmt1*- oder *pmt4*-Mutante (Abb. 3.24). Der Mechanismus, der zu der Sensitivität führt und auch in verschiedenen *N*-Glykosylierungsmutanten in *S. cerevisiae* beschrieben wurde ist unbekannt (Dean, 1995). Während die Aminoglykoside Hygromycin B und G418 an die kleine Untereinheit des Ribosoms binden und dort den Prozess der Translokation stören, bindet Cycloheximid an die große Untereinheit des Ribosoms (Rao und Grollman, 1967; Recht *et al.*, 1999). Dies könnte der Grund sein, weshalb Cycloheximid keine Sensitivität in den *pmt*-Mutanten verursacht. Hanna *et al.* (2003) erklären durch Translationsinhibitoren hervorgerufenen Sensitivitäten in *S. cerevisiae*-Wildtypzellen durch eine Zunahme falsch gefalteter Proteine, einhergehend mit einer Überlastung des proteasomalen Abbaus. Dabei lässt sich die Sensitivität von Hygromycin B, als auch von Cycloheximid durch Überexpression von Ubiquitin heilen. Da dies im Fall der *pmt*-Mutanten nicht gelang, muss hier von einem anderen Mechanismus ausgegangen werden.

In Abb. 4.1 ist ein Modell dargestellt, welches die Sensitivität gegen Aminoglykoside erklären soll. Dieses Modell schließt ein kleines cytoplasmatisches Protein von etwa 45 kDa, Dom34p, ein, das an der *O*-Glykosylierung von *S. cerevisiae* beteiligt ist (Wickert, 1998). Eine *dom34* Mutation verursacht in *S. cerevisiae* einen Defekt in der *O*-Glykosylierung der Chitinase, des α -Agglutinin und des hIGF-I (Wickert, 1998). Für eine *Cadom34*-Mutante konnte eine geringe Sensitivität gegen Aminoglykoside gezeigt werden (Kluge, persönliche Mitteilung). Interessanterweise besitzt Dom34p Homologie zu einem „release factor“ der Translation. Dom34p könnte neben Aufgaben in der Proteinbiosynthese auch eine Funktion in der Rekrutierung von Pmt-Proteinen an den Translokationskomplex besitzen. So könnte

gewährleistet werden, dass bestimmte in der Elongationsphase befindliche Proteine kotranslational mannosyliert werden. Fehlt Dom34p kommt es nicht zu einer Mannosylierung der Proteine (Abb. 4.1 D.).

Das Modell beruht auf der Annahme, dass in *pmt*-Mutanten der Zugang der Aminoglykoside zu ihrem Wirkungsort, der kleinen Untereinheit des Ribosoms, erleichtert ist (Abb. 4.1 B.) und die Aminoglykoside dort aufgrund ihrer Zuckerstruktur mit Komponenten des Translokons oder anderen Strukturen, sowohl der *N*- als auch *O*-Glykosylierungsmaschinerie, Wechselwirken können. Dies könnte beispielsweise der Zuckerdonor Dol-P-Man sein. Cycloheximid hingegen verursacht, aufgrund einer fehlenden Zuckerstruktur oder aufgrund seines Bindungsortes an der großen Untereinheit des Ribosoms, keine Sensitivität. Die unterschiedlich starken Sensitivitäten zwischen den einzelnen *pmt*-Mutanten könnten in diesem Modell mit unterschiedlichen Proteinmengen erklärt werden. Das Fehlen der in hohen Mengen vorkommenden Proteine Pmt1p, Pmt2p und Pmt4p ermöglicht einen häufigeren Zugang zu den Ribosomen, als das Fehlen der in niedrigen Mengen vorkommenden Proteine Pmt5p und Pmt6p. Dafür spricht, dass das *PMT6* Transkript im Vergleich zum *PMT1* Transkript deutlich geringer ist (Timpel *et al.*, 1998), während sich das *PMT5* Transkript nur mittels RTR-PCR nachweisen ließ (Klinkert, 2002).

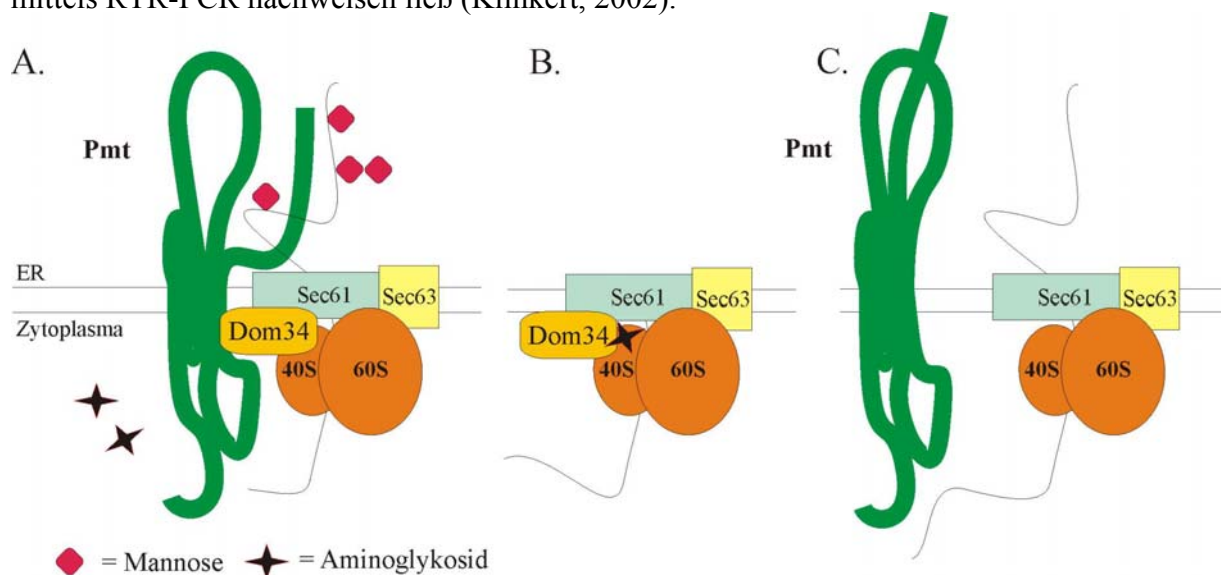


Abb. 4.1: Hypothetisches Modell zur Wirkung von Aminoglykosiden und der Funktion von Dom34p. A. Pmt-Proteine katalysieren kotranslational die Anheftung von Mannosen. Im Komplex ist der Zugang der Aminoglykoside zu den Ribosomen erschwert. B. In *pmt*-Mutanten ist, durch die Abwesenheit der Pmt-Proteine, der Zugang der Aminoglykoside zu den Ribosomen des rauen ER's erleichtert. C. Eine Disruption von *DOM34* verhindert die Aktivierung der Pmt-Proteine oder deren Rekrutierung zum Translokons und somit die *O*-Mannosylierung.

Eine andere Begründung für die Sensitivität der Mutanten ist, dass an Resistenzmechanismen beteiligte "Multi-Drug Resistance" Transporter (Sanglard *et al.*, 1997) in den *pmt*-Mutanten betroffen sind. Dagegen spricht, dass für den ABC-Transporter Cdr1p keine Veränderung des Laufverhaltens in der SDS-PAGE gefunden wurde (Timpel, 1998 und 3.5.6.1). Ein weiterer Grund, welcher dagegen spricht, ist, dass die *pmt*-Mutanten nicht gegen Polyene und nur gering gegen Azole sensitiv sind; insbesondere Azole werden verstärkt über MDR-Transporter aus der Zelle geschleust (StGeorgiev, 2000) (Abb. 3.24).

In den DNA-Mikroarrays war *CDR1* in der *pmt1*-Mutante signifikant stärker exprimiert als im Wildtyp. Eine verstärkte Expression von *CDR1* bei Wachstum in Vollmedium ist nicht zu erwarten und könnte durch einen indirekten Effekt z.B. durch einen Defekt von Signaltransduktionskomponenten bewirkt worden sein.

Die verschiedenen *pmt*-Mutanten sind unterschiedlich stark sensitiv gegen die Zellwand destabilisierende Substanzen (Abb. 3.25). Die deutlichsten Effekte zeigen dabei die *pmt1*- und die *pmt2/PMT2*-Mutante. Die *pmt1*-Mutante wächst nicht mehr auf Medium mit Congo Red und SDS, des Weiteren ist ihr Wachstum auf Calcofluor White eingeschränkt. Die Effekte dieser Substanzen auf das Wachstum der *pmt1*-Mutante lassen sich erklären, wenn man dazu die Ergebnisse der Zellwandanalyse (Tab. 3.5) vergleicht. Die Verringerung der kovalent an die Zellwand gebundenen Proteine von 21,6 % auf 1,6 % ermöglicht den Substanzen einen guten Zugang zu ihrem Wirkungsort. So kann SDS leicht in die Zelle dringen und dortige Membranstrukturen zerstören. Congo Red ist ein fluoreszierender Farbstoff, der Komplexe mit Glukan-Mikrofibrillen bildet, wodurch deren laterale Interaktion behindert wird (Kopecka' und Gabriel, 1992). Da in den *pmt1*-Mutanten der Gehalt an β 1,3-Glukan zusätzlich erhöht ist kommt es zu einer totalen Destabilisierung der Zellwand und zum Zelltod. Die Sensitivität gegenüber Calcofluor White kann mit der erhöhten Chitinkonzentration in den Zellwänden erklärt werden. Auch die Sensitivitäten der *pmt2/PMT2*-Mutante lassen sich durch die Veränderungen in der Zellwand der Mutante erklären. So besitzt sie nur noch die Hälfte der Chitinmenge des Wildtyps und einen geringeren β 1,6-Glukangehalt. Verwunderlich ist die geringe Sensitivität der *pmt4*-Mutante. Obwohl sie eine ähnliche Zusammensetzung der Zellwandkomponenten wie die *pmt1*-Mutante besitzt, ist sie lediglich gegen Congo Red in geringem Maße sensitiv. Eine Mögliche Erklärung wäre, dass auch die Menge der löslichen Zellwandproteine in der *pmt1*-Mutante erheblich herabgesetzt ist, und dass dies nicht der Fall in einer *pmt4*-Mutante ist. Schwer zu erklären ist außerdem, warum die *pmt1*-Mutante resistent gegen den β 1,3-Glukansynthase Inhibitor Caspofungin ist, nicht jedoch die *pmt4*-Mutante. Die Resistenz der *pmt1*-Mutante könnte durch den erhöhten β 1,3-Glukangehalt erklärt werden, diesen besitzt jedoch auch die *pmt4*-Mutante. Eine Erklärung könnte sein, dass in dem Transkriptionsprofil der *pmt1*-Mutante keine der verschiedenen β 1,3-Glukansynthase-Untereinheiten signifikant stärker als im Wildtyp exprimiert ist, in der *pmt4*-Mutante aber mit *FEN12* ein Gen, dessen Genprodukt an der β 1,3-Glukansynthese beteiligt ist. Besitzt Caspofungin eine stärkere Affinität zu Fen12p als zu anderen Glukansynthasen ist es für *pmt4*-Mutanten nicht möglich eine Resistenz zu entwickeln.

4.4 *pmt*-Mutanten haben eine veränderte Zusammensetzung der Zellwand

Aus der Analyse der Zellwand in den verschiedenen *pmt*-Mutanten wird deutlich, dass eine reduzierte O-Glykosylierung einen deutlichen Einfluss auf die Zusammensetzung der Zellwand besitzt. Der drastischste Effekt ist die Reduzierung des Anteil der kovalent gebundenen Proteine in der *pmt1*- und der *pmt4*-Mutante auf 7 % respektive 16 % des Wildtyps (Tab. 3.5). Dies wirft die Frage auf, welche Proteine in den Mutanten nicht mehr an die Zellwand gebunden sind. Bei der Messung des Proteingehaltes der SDS-extrahierten Zellwände werden durch Behandlung mit NaOH (β -Elimination) alle kovalent gebundenen

Proteine freigesetzt und deren Konzentration gemessen (2.8.2). Dies beinhaltet GPI-CWP und Pir-CWP. Zwar schlagen Klis *et al.* (2002) eine hypothetische, alkalisch-sensitive Bindung der Pir-CWP über O-Mannosylketten an das β 1,3-Glukan vor, jedoch fanden Ecker *et al.* (2003a) für *S. cerevisiae* heraus, dass die Pir-Proteine über eine Transglutaminasereaktion an das β 1,3-Glukan gebunden werden. Kapteyn *et al.* (2001) fanden für einen geringen Teil der GPI-CWP eine alkalisensitive Verbindung zum β 1,3-Glukan der Zellwand (siehe auch Klis *et al.*, 2002). Die drastische Reduzierung des Anteiles der kovalent gebundenen Proteine in der *pmt1*- und *pmt4*-Mutante lassen vermuten, dass es sich bei den alkalisensitiven GPI-CWP um eine größere Gruppe als vermutet handelt. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass in die Transglutaminase-Reaktion involvierte O-glykosylierte Proteine in der *pmt1*- und in der *pmt4*-Mutante einen Funktionsverlust erlitten haben. Interessant ist, dass, wie in Abb. 3.29 zu sehen ist, auch in der *pmt5*-Mutante eine Reduktion des kovalent an die Zellwand gebundenen Proteins zu sehen ist. Da die einzigen Phänotypen einer *pmt5*-Mutante bislang *in vivo* in einem Maus- und einem Hautmodell gefunden wurden (Rouabhia *et al.*, 2004) kann man vermuten, dass die hier betroffenen Proteine direkt an der Virulenz von *C. albicans* beteiligt sind.

In den Mutanten *pmt1*, *pmt2/PMT2* und *pm4* ist das Verhältnis von β 1,3- zu β 1,6-Glukan zu Gunsten des β 1,3-Glukan verschoben (Abb. 3.28). Während in den Mutanten *pmt1* und *pmt4* die Menge an β 1,3-Glukan erhöht ist, ist in der *pmt2/PMT2*-Mutante das Verhältnis zwischen beiden hauptsächlich durch eine Verminderung des β 1,6-Glukan zurückzuführen. Für mehrere Mutanten in *S. cerevisiae*, welche eine reduzierte Menge an β 1,6-Glukan besitzen, ist eine Erhöhung des β 1,3-Glukans berichtet worden (Kapteyn *et al.*, 1999), so dass die Erhöhung des β 1,3-Glukans in der *pmt2/PMT2*-Mutanten als Kompensationsmechanismus des niedrigen β 1,6-Glukangehalt angesehen werden kann. Da in den Mutanten *pmt1* und *pmt4* der β 1,6-Glukangehalt nicht herabgesetzt ist, erfolgt die Erhöhung des β 1,3-Glukan möglicherweise als Folge des niedrigen Proteingehalts der Zellwand.

Zellen mit Schädigungen der Zellwand erhöhen häufig ihren Anteil an Chitin in den lateralen Zellwänden (Klis *et al.*, 2002). Für die *pmt1*-Mutante wurde auch bereits eine Zunahme des Chitins von 2,4 % im Wildtyp CAI4 auf 4,2 % in Stamm CAP1-312 (*pmt1/pmt1*) gemessen (Kapteyn *et al.*, 2000). Wahrscheinlich durch Unterschiede in der Durchführung der Messung ist das Ergebnis mit 1,0 % zu 1,5 % in den Stämmen CAF2-1 und SPCa2 etwas niedriger (Tab. 3.5). Im Verhältnis Mutante zu Wildtyp ist das Ergebnis jedoch tendenziell gleich. Somit kann bei einem Anteil von 1,1 % auch von einer moderaten Erhöhung des Chitingehaltes in der *pmt4*- und *pmt5*-Mutante ausgegangen werden. Erstaunlich ist allerdings die Reduzierung des Chitingehalts in der *pmt2/PMT2*-Mutante auf gut die Hälfte des Wildtyps. In *C. albicans* existieren vier für Chitinsynthasen kodierende Gene *CHS1*, *CHS2*, *CHS3* und *CHS8* wovon sich einzig die Disruption von *CHS1* als essentiell erwies. Auf der anderen Seite waren *Chs2p* und *Chs8p* zusammen für 95 % der Synthaseaktivität *in vitro* verantwortlich (Selvaggini *et al.*, 2004; Munro *et al.*, 2003). In *S. cerevisiae* gibt es drei Chitinsynthase Gene *CHS1*, *CHS2* und *CHS3*, von denen nur die simultane Disruption von *CHS2* und *CHS3* letal ist (Cabib *et al.*, 2001). Interessanterweise ist in der *pmt2/PMT2*-Mutante die Expression von *CHS21* signifikant niedriger als im Wildtyp (Tab. 8.2). *CHS21* kodiert laut Datenbankanalysen für eine Chitinsynthase und entspricht *CHS8* (Munro *et al.*,

2003). Wenn auch der Grund für die niedrige Expression von *CHS21* in *pmt2/PMT2*-Mutanten unbekannt ist, könnte dies der Grund für die Letalität einer *PMT2* Disruption sein. Eine Analyse der DNA-Mikroarrays ergab, dass kein Gen des Proteinkinase C-Weges, welcher die Zellwandbiosynthese reguliert, eine statistisch signifikante Veränderung der Expression aufwies. Eine Überprüfung der Regulationswerte zeigte nur geringe Veränderung in der Expression. Es ist zu vermuten, dass diese geringen Änderungen der Expression ausreichend für eine Kompensation der Zellwandschäden in den *pmt*-Mutanten sind.

4.5 Einfluss von Mutationen in *PMT*-Genen auf verschiedene Proteine

Wie in Abb. 3.30 zu sehen ist, erkennt das Pir2-Antiserum im Wildtyp eine Bande mit einer Größe von etwa 240 kDa. Dies stimmt mit der von Kapteyn *et al.* (2000) detektierten Größe von 235 kDa in etwa überein. Nach PNGase F-Behandlung reduziert sich die Größe auf etwa 150 kDa, was der von Kapteyn *et al.* detektierten Größe nach milder Alkalibehandlung entspricht. Während Kapteyn *et al.* (2000) β 1,3-Glukanase behandelte Zellwandextrakte benutzten, wurden hier ganze Zellextrakte verwendet. Aus diesem Grund konnten mit dem Antiserum weitere Banden einer geringeren molekularen Masse von etwa 80 kDa und 70 kDa detektiert werden, welche nach Behandlung mit PNGase F eine geringere molekulare Masse aufwiesen. Bei den Banden geringerer molekularer Masse handelt es sich entweder um unreife Vorstufen von Pir2p oder um eine Kreuzreaktion mit einem anderen Pir-Protein. So berichtet Kapteyn *et al.*, (2000), dass das Serum in *S. cerevisiae* in geringem Maße mit Pir1p reagiert. Auch Kandasamy *et al.*, (2000) konnten in *C. albicans* zwei Banden mit dem Pir2p/HSP150 Antiserum detektieren, welche eine Größe von 150 kDa und 66 kDa hatten.

Pir2p ist in der *pmt1*-Mutante nicht zu detektieren, und die Banden geringerer Größe lassen sich nur als ein Schmier erkennen, welcher auf geringerer Größe als im Wildtyp läuft. In der *pmt4*-Mutante lassen sich mehrere Banden geringerer molekularer Masse erkennen, bei denen es sich wahrscheinlich um Abbauprodukte des Proteins der kleineren Formen handelt. Die Ergebnisse zeigen, dass Pir2p ein Substrat der O-Mannosylierung von Pmt1p ist und wahrscheinlich ein weiteres Pir-Protein Substrat von sowohl Pmt1p, als auch Pmt4p ist.

Für das Protein Axl2 aus *S. cerevisiae* wurde eine Mannosylierung durch Pmt4p beschrieben. In *Scpmt4*-Mutanten konnte nur noch ein Abbauprodukt von Axl2p detektiert werden, nicht jedoch das Protein ursprünglicher Größe (Sanders *et al.*, 1999). Wie in Abb. 3.31 zu sehen ist, verändert sich das Laufverhalten des Proteins mit einer Größe von etwa 140 kDa in *C. albicans* in keiner der *pmt*-Mutanten. In den Bahnen, in denen Extrakte aus Stämmen mit *pmt4* Mutationen aufgetragen wurden, kann jedoch ein spezifisches Abbauprodukt von ca. 70 kDa detektiert werden. Wie eine PNGase F Behandlung zeigt, ist Axl2p N-glykosyliert, dies gilt jedoch nicht für das Abbauprodukt in den *pmt4*-Mutanten. Der Einfluss der Pmt4p vermittelten O-Glykosylierung in *C. albicans* auf die Stabilität von Axl2p ist im Vergleich zu *S. cerevisiae* geringer. Dennoch kann Axl2p als Substrat der O-Glykosylierung von Pmt4p angesehen werden. Da ein instabiles Axl2p in *S. cerevisiae* das axiale Knospungsmuster in haploiden Zellen verändert (Sanders *et al.*, 1999), wurde auch das Knospungsverhalten in *pmt*-Mutanten von *C. albicans* untersucht. Wie aus Abschnitt 3.4.5 zu entnehmen ist, verändert sich das Knospungsmuster in den *pmt*-Mutanten nicht. Dies liegt daran, dass auch in den *pmt4*-Mutanten genügend intaktes Axl2p vorliegt.

Für Als1p wurde bereits eine Pmt1p vermittelte O-Glykosylierung detektiert (Kapteyn *et al.*, 2000; Timpel *et al.*, 1998). Hier wurde getestet, ob Als1p auch in anderen *pmt*-Mutanten modifiziert wird. Wie in Abb. 3. 32 zu sehen ist, erkennt das von L.L Hoyer zur Verfügung gestellte Antiserum mehrere Banden verschiedener Größe. Die oberste Bande entspricht hier in etwa der von Kapteyn *et al.* (2000) berichteten Größe von mehr als 250 kDa für Als1p. Das Laufverhalten dieser Als1p Bande ist lediglich in der *pmt1*-Mutante um ca. 60 kDa verändert. Bei der auf einer Höhe von etwa 155 kDa laufenden Bande ist das Laufverhalten in der *pmt1*-Mutante nur um wenige kDa reduziert. Wahrscheinlich handelt es sich bei dieser von dem Als-Antiserum erkannten Form um ein anderes Protein der aus wenigstens acht Mitgliedern bestehenden Als-Proteinfamilie (Hoyer, 2001; Sheppard *et al.*, 2004).

Mutationen in *PMT*-Genen hatten bei den hier beschriebenen Substraten der O-Glykosylierung keinen Einfluss auf die N-Glykosylierung. Somit ist es wahrscheinlich, dass die von Ecker *et al.* (2003 b) beschriebene Kontrolle der N-Glykosylierung von Ccw5p durch die O-Mannosylierung eine Ausnahme ist.

Sec20p kann in einer nicht glykosylierten instabilen 38 kDa Form und in einer stabilen glykosylierten Form von 50 kDa detektiert werden (Weber, 2001 und Abb. 3.33). In *pmt1*- und *pmt4*-Mutanten konnte keine glykosylierte Form von 50 kDa detektiert werden, was einen Abbau der instabilen, nicht glykosylierten Form vermuten lässt. Dieser Abbau konnte durch einen Inhibitor des Proteasoms verzögert werden (Abb. 3.33). Auch entstand im Verlauf des „Chase“ eine Bande von größerer molekularer Masse. Da Sec20p auch ein Substrat von Pmt4p ist (Weber *et al.*, 2004), kann angenommen werden, dass eine Akkumulation von Sec20 und damit eine Verlängerung der Verweildauer im ER-Lumen, eine verstärkte Glykosylierung durch Pmt4p bewirkt. Es ist auch möglich, dass Pmt2p oder Pmt6p bei einer erhöhten Exposition von Sec20p zu einer Glykosylierung von Sec0p beitragen. Dies ist ähnlich für eine mutierte Version des prä-pro- α -Faktors. In *S. cerevisiae* wurde beschrieben, dass eine verlängerte Verweildauer des prä-pro- α -Faktors *in vitro* eine Pmt2p-vermittelte O-Mannosylierung bewirkt (Harty *et al.*, 2001).

Da eine Ubiquitinierung die Voraussetzung für den proteasomalen Abbau ist (Sommer und Wolf, 1997) und eine Ubiquitinierung von Sec20p nicht detektiert wurde, ist es wahrscheinlich, dass Sec20p überwiegend über einen alternativen Degradationsweg abgebaut wird. In Säugern wurde ein Proteasom unabhängiger Abbauweg beschrieben an dem Tyrosinphosphatasen beteiligt sind (Cabral *et al.* 2000) und, es wurde ein weiterer alternativer Degradationsweg beschrieben, der sowohl unabhängig vom Proteasom, als auch vom Lysosom ist und eine spezifische Erkennung von Mannosylresten erfordert (Mancini *et al.*, 2003). Die molekularen Mechanismen mit denen eine Pmt1/4p-vermittelte O-Mannosylierung einen Abbau von Sec20p verhindert sind unbekannt. Es ist möglich, dass Sec20p im Lumen des ER durch die Mannosylierung eine Konformation einnimmt, die es vor einer Erkennung am Abbau beteiligter Chaperone schützt. Durch die Mannosylierung könnte auch eine Bindung an lectinähnlichen Proteinen vermittelt werden, welche das Protein vor einem Abbau schützen. Ein Mannosen erkennendes Lectin, welches eine Funktion im Abbau von Glykoproteinen hat, ist in Säugern EDEM bzw. in Hefen Htm1p/Mnl1p (Jakob *et al.*, 2001). Eine Funktion im Abbau von Sec20p ist allerdings rein spekulativ.

Da das essentielle Sec20p in *pmt1*- und *pmt4*-Mutanten instabil ist, kann vermutet werden, dass dies einer der Hauptgründe ist, warum eine Deletion von *PMT1* und *PMT4* für *C.*

albicans letal ist (Prill, 2001). In den Einzelmutanten könnte die Mannosylierung eines *Pmt*-Proteins ausreichend für die Funktion von Sec20p zum Überleben der Zelle sein. Dagegen verursacht eine Deletion beider *PMT*-Gene den kompletten Funktionsverlust von Sec20p und somit den Tod der Zelle. Interessant in diesem Zusammenhang ist, dass eine Verringerung des *SEC20* Transkriptes, Sensitivitäten ähnlich denen der *pmt*-Mutanten, verursacht (Weber, 2001).

4.6 Der Einfluss von *pmt*-Mutationen auf das Transkriptom von *C. albicans*

Die Resultate der vergleichenden Transkriptomanalyse der *pmt*-Mutanten zeigen unterschiedliche Expressionsprofile für die einzelnen *pmt*-Mutanten und machen deutlich, dass die Zelle auf bestimmte *pmt*-Mutationen spezifisch reagiert. Betrachtet man die Clusteranalyse aller Gene, sowie der Gene die in mindestens einem Experiment statistisch signifikant um das 1,5fache reguliert wurden, wird deutlich, dass es mehr Gegensätze als Gemeinsamkeiten in der Expression der verschiedenen *pmt*-Mutanten gibt. Einer der ersten Punkte, die bei einer Analyse der DNA-Mikroarrays auffällt, ist, dass generell die Expression von mehr Genen erniedrigt ist (Tab. 3.6). Bei der Mutation einer Proteinmannosyltransferase entsteht für die Zelle eine Stresssituation. Eine fehlende O-Mannosylierung erzeugt eine Vielzahl an falsch gefalteten, instabilen und in ihrer Funktion eingeschränkten Proteinen. Es ist wahrscheinlich, dass sich unter diesen Proteinen viele Sensoren bzw. Signaltransduktoren befinden, die der Zelle aufgrund einer Hypoglykosylierung keine oder falsche, konstitutive Signale vermitteln. Aufgrund dieser Stresssituation ist eine allgemeine Reduzierung der Proteinbiosynthese und damit der Expression in den Mutanten zu erwarten gewesen. Diese wirkt sich jedoch nicht auf ein Wachstum der *pmt*-Mutanten aus (3.3.1). Unerwartet ist, dass in der *pmt5*-Mutante die meisten Gene statistisch signifikant reguliert waren. Da Mutationen in den Genen *PMT1* und *PMT4* ungleich größere Veränderungen in der Zelle verursachen, wäre für diese Mutanten erwartet worden die meisten Gene mit veränderter Expression zu isolieren. Als Begründung können Unterschiede in der Qualität der Hybridisierungen herangezogen werden. Eine Erhöhung der Anzahl der Replikate eines einzelnen Experiments könnte die statistische Signifikanz vieler Gene erhöhen und zu einer größeren Zahl regulierter Gene führen. Auch würde es eine höhere Anzahl der Replikate erlauben, die Daten einer schwächeren Hybridisierung zu ersetzen.

Auffällig ist des Weiteren, dass die am zweitstärksten vertretene Kategorie, neben der am stärksten vertretenen Kategorie der unbekannten Gene, die des Metabolismus ist (Abb. 3.38). Viele dieser Gene konnten in mehr als einer *pmt*-Mutante als reguliert identifiziert werden. Darunter befinden sich beispielsweise viele Gene der Glykolyse (*PFK1*, *PFK2*) und des Glycerinstoffwechsels (*GPD1*, *GPD2*), die schwächer exprimiert sind. Ausnahmen hierbei sind in der *pmt1*-Mutante *PFK1* und in der *pmt4*-Mutante *GPD2*, welche stärker exprimiert sind (Abb. 3.37). Die verminderte Expression der Gene des Glycerinstoffwechsels könnte ein Zeichen dafür sein, dass die *pmt*-Mutanten einem zu hohen osmotischem Druck ausgesetzt sind. Die Zelle ist aufgrund der geschwächten Zellwand nicht mehr in der Lage, dem Wassereinfluß aus dem Medium, verursacht durch eine niedrigere Osmolarität des Mediums, zu begegnen. Eine Verringerung der Glycerinkonzentration setzt die cytoplasmatische

Osmolarität auf einen Wert, welcher für das Überleben der Zelle und die Aufrechterhaltung des Turgors benötigt wird.

Das einzige Gen, welches in allen fünf Mutanten statistisch signifikant reguliert war, ist *PLB1*. Dabei ist es bemerkenswert, dass *PLB1* nur in der *pmt4*-Mutante erhöht exprimiert war, während es in allen anderen Mutanten niedriger exprimiert war (Abb. 3.37). Disruption der Phospholipase B in *C. albicans* erzeugt keine offensichtlichen Phänotypen, jedoch war die Fähigkeit der *plb1*-Mutante an humane Zelllinien zu adhären bzw. diese zu penetrieren drastisch eingeschränkt (Leidich *et al.*, 1998). Disruption des homologen Gens aus *S. pombe* zeigte, dass *PLB1* für die Lebensfähigkeit auf hochosmolaren Medien benötigt wird und vermutlich stromaufwärts eines cAMP abhängigen Signalweges liegt (Yang *et al.*, 2003). Man kann nun spekulieren, dass Plb1p von Pmt4p mannosyliert wird und es in einer *pmt4*-Mutante zu einer erhöhten Expression kommt um diesen Defekt zu kompensieren. Weiter kann spekuliert werden, dass die reduzierte Virulenz der übrigen Mutanten teilweise auf eine reduzierte Expression von *PLB1* zurückzuführen ist. Abb. 3.41 C zeigt ausgesuchte Gene, die in Zusammenhang mit der Virulenz von *C. albicans* stehen (Calderone und Fonzi, 2001). Auffällig ist hier eine erhöhte Expression der Gene *PLB3* und *HWP1* in der *pmt6*-Mutante, während die Expression dieser beiden Gene in der *pmt4*-Mutante vermindert ist. Dieses gegensätzliche Expressionsverhalten verdeutlicht, dass, obwohl die *pmt*-Mutanten ähnliche Phänotypen zeigen, diese Phänotypen oftmals aus dem Verlust spezifischer Proteine bzw. einer erniedrigten oder erhöhten Expression spezifischer Gene resultieren. Obwohl, das für die Adhäsionsfähigkeit von *C. albicans* bedeutende *FLO1* (*IPF5185*), in den Mutanten *pmt1*, *pmt4* und *pmt6* nur eine moderat niedrigere Expression bzw. keine Veränderung der Expression gegenüber dem Wildtyp detektiert wurde, konnte in den entsprechenden Mutanten mittels einer Luziferasemessung eine deutlich Reduzierung der *FLO1* Expression gemessen werden. Ein möglicher Grund für diesen Unterschied könnte sein, dass die Zellen für die RNA Präparation der DNA-Mikroarrays in YPD angezogen wurden, während die Zellen für die Messung der Luziferaseaktivität in SD-Medium angezogen wurden. Es ist bekannt, dass die Expression von vielen Genen von den Wachstumsbedingungen abhängt und hierbei insbesondere von der Wahl des Mediums. In einer vergleichenden Transkriptomanalyse von *S. cerevisiae* in SD- bzw. YPD-Medium wurden mehr als 10% aller Gene differentiell exprimiert (Wodicka *et al.*, 1997).

Im Zusammenhang mit der veränderten Zellwandstruktur der *pmt*-Mutanten wurde in Abb. 3.41 C. und D. die Expression von Genen dargestellt, welche an der Chitinsynthese beteiligt sind bzw. zu den Chitinasen gehören und an der Synthese des β 1,3-Glukan beteiligt sind. Die Expression der meisten Gene ist moderat induziert, was in Einklang mit den die Zellwand betreffenden Daten steht. Auffällig sind eine reduzierte Expression von *CHT21* in der *pmt2/PMT2*-Mutante und eine erhöhte Expression von *FEN12* in der *pmt4*-Mutante, die bereits unter 4.5 diskutiert wurden.

Insbesondere in der *pmt4*-Mutante wurden relativ viele Gene reguliert, deren Genprodukte in die Proteinbiosynthese involviert sind bzw. Komponenten des Ribosoms sind (Abb. 3.38). Dies ist in dem unter 4.4.3. beschriebenen Zusammenhang, dass die Mutation von *DOM34* in *S. cerevisiae* einen Defekt in der O-Mannosylierung verschiedener Proteine erzeugt, interessant (Wickert, 1998). Für ScDom34p wurde beschrieben, dass es mit ScPmt1p interagiert (Wickert, 1998). Die erhöhte Expression von ribosomalen Komponenten in einer

pmt4-Mutante lässt vermuten, dass Dom34 in *C. albicans* mit Pmt4p interagiert und die erhöhte Expression der ribosomalen Komponenten den daraus resultierenden Defekt kompensieren soll. Das Phänomen, dass für Proteine, denen bereits bestimmte Funktionen zugeschrieben sind, auch Funktionen in anderen Bereichen zugeordnet werden können, ist bereits für mehrere Proteine beschrieben worden. Proteine die so Funktionen in verschiedenen Bereichen ausüben werden als „Moonlighting proteins“ bezeichnet (Jefferey, 2003).

Für die Entwicklung neuer wirksamer Antimykotika ist es notwendig, die molekularen Abläufe einer *Candida*-Infektion genau zu kennen. Genauso ist es wichtig, die Mechanismen zu verstehen, die zu Resistenzen führen. Für beide Punkte ist ein Studium der O-Glykosylierung und hierbei im Besonderen der Familie der Proteinmannosyltransferasen als Initiatoren hilfreich. Einerseits determinieren O-mannosylierte Proteine der Zelloberfläche die Adhäsionseigenschaften des Pilzes und stellen eine Reihe von Antigenen (1.2.1.), andererseits zeigen *pmt*-Mutanten selbst gegen eine Reihe antibiotischer Substanzen Sensitivitäten. Die Aufklärung der Mechanismen dieser Sensitivitäten ist für das molekulare Verständnis der Wirkung der Antibiotika und damit auch für die Entstehung von Resistenzen ein wichtiger Schritt.

Bis vor kurzem wurde davon ausgegangen, dass es in Säugern keine O-Mannosylierung, vergleichbar mit der in Hefen, gibt. Jedoch zeigen die Ergebnisse der Arbeiten von Manya *et al.* (2004), dass im Menschen funktionelle Homologe der Proteinmannosyltransferasen existieren. Eines der wenigen Substrate der humanen Proteinmannosyltransferasen *POMT1* und *POMT2* ist das wichtige α -Dystroglykan, dessen unvollständige Glykosylierung das Walker-Warburg Syndrom (Muskeldystrophie) verursacht. Eine Entwicklung von Antimykotika, die direkt gegen die Pmt-Proteine von *C. albicans* gerichtet sind, ist somit zumindest erschwert. Ein spezifischer Inhibitor des CaPmt1-Proteins wurde beschrieben (Duffy *et al.*, 2001), allerdings ist unklar, ob er auch gegen POMT-Proteine wirkt. In den bislang sequenzierten Genomen von Säugern kommen generell nur Homologe von Pmt1p und Pmt2p vor (Willer *et al.*, 2003), was insbesondere Pmt4p, welches eine eigene Subklasse unter den Pmt-Proteinen bildet, als Ziel für die Entwicklung von Antimykotika interessant macht. Auch beträgt die Sequenzidentität zwischen CaPmt1p und HsPOMT1 nur 28 % und zwischen CaPmt2p und hPOMT2 nur 35 %. Dies lässt die Entwicklung eines pilzspezifischen Inhibitors der Proteinmannosyltransferasen gegen humane Mykosen möglich erscheinen.

Von großer Bedeutung ist außerdem die Tatsache, dass in den bisher sequenzierten Genomen von Pflanzen keine Homologe der Pmt-Proteine entdeckt wurde. Dies macht die Pmt-Proteine zu einem exzellenten Ziel für die Entwicklung von Antimykotika, welche in der Landwirtschaft gegen pflanzenpathogene Pilze wie bspw. *F. graminea*, *M. grisea*, *U. maydis* eingesetzt werden könnten.

5. Zusammenfassung

Die Initialreaktion der Protein-O-Mannosylierung wird in dem humanpathogenen Pilz *Candida albicans* durch fünf Isoformen der Protein-O-mannosyltransferase (Pmt) katalysiert. Pmt-Proteine sind für die Pathogenität von *C. albicans* essentiell und sie sind daher potentielle Zielkomponenten für zukünftige antimykotische Substanzen.

In dieser Arbeit wurde mit *PMT2* das fünfte und letzte Mitglied der *PMT*-Genfamilie in *C. albicans* charakterisiert und eine vergleichende Charakterisierung der *C. albicans* *PMT1*-, *PMT2*-, *PMT4*-, *PMT5*- und *PMT6*-Gene durchgeführt. Eine Disruption beider *PMT2*-Allele war nicht möglich, wie durch die Konstruktion einer konditionalen Mutante bewiesen wurde. Eine Mutante mit dem Genotypen *pmt2Δ::hisG/tetO-SchOP1p-PMT2*, in der das verbliebene *PMT2*-Allel unter der Kontrolle eines Tetracyclin-reprimierten Promotors steht, war nicht mehr in der Lage, unter Promotor-reprimierenden Bedingungen zu wachsen. Eine konditionale Mutante, in der das verbliebene *PMT2*-Allel unter Kontrolle des *MET3*-Promotors stand, war in ihrem Wachstum unter reprimierenden Bedingungen ebenfalls eingeschränkt.

In einer vergleichenden Charakterisierung wurde deutlich, dass Mutationen in verschiedenen *PMT*-Genen unterschiedlich starke Defekte hervorrufen. *pmt1*-Mutanten und heterozygote *pmt2/PMT2*-Mutanten sind temperatursensitiv und besonders sensitiv gegen Aminoglykoside, Azole und verschiedene Zellwand-destabilisierende Substanzen. Diese Sensitivitäten sind in *pmt4*- und *pmt6*-Mutanten schwächer ausgeprägt, während *pmt5*-Mutanten sich wie der Wildtyp verhalten. Überraschend waren alle *pmt*-Mutanten unter hoch- und niedrigsmolaren Bedingungen lebensfähig.

Bis auf die *pmt5*-Mutante zeigten alle *pmt*-Mutanten eine defekte Hyphenbildung auf festen Mangelmedien, in Flüssigmedien bildeten jedoch nur *pmt1*-Mutanten, z. B. nach Induktion durch Serum, weniger Hyphen als der Wildtyp. Unter eingebetteten und hypoxischen Bedingungen waren *pmt1*-Mutanten in der Hyphenbildung eingeschränkt, während *pmt4*-Mutanten unerwartet eine stärkere Hyphenbildung als der Wildtyp zeigten.

Eine Analyse der Zellwandzusammensetzung der *pmt*-Mutanten ergab für die *pmt1*- und die *pmt4*-Mutante eine drastische und für die *pmt5*-Mutante eine moderate Reduzierung ihrer kovalent gebundenen Zellwandproteine. Außerdem war in der *pmt1*-, der *pmt2/PMT2*- und der *pmt4*-Mutante das β 1,3-Glukan erhöht und in *pmt2/PMT2*-Mutanten zusätzlich das β 1,6-Glukan erniedrigt. Während in *pmt1*-Mutanten der Chitinanteil erhöht war, war er in *pmt2/PMT2*-Mutanten um die Hälfte reduziert, was eine Begründung für die Letalität einer homozygoten *pmt2*-Mutante sein könnte. Pir2p, Als1p, Kre9p und Sec20p wurden als Substrate einer Pmt1p-vermittelten O-Glykosylierung identifiziert, während Axl2p und Sec20p durch Pmt4p O-glykosyliert werden.

Eine vergleichende Transkriptomanalyse ergab, dass als Reaktion auf die Deletion von *PMT*-Genen überwiegend unterschiedliche Gene reguliert werden. Eine Einteilung der regulierten Gene in funktionelle Kategorien ergab, dass die meisten statistisch signifikant regulierten Gene unbekannt sind. Viele in den *pmt*-Mutanten verstärkt exprimierten Gene sind in die Stressantwort involviert (z. B. *KAR2*, *CDR1*, *DDR48*), während Gene für viele Proteine der Zellwand schwächer exprimiert werden (z. B. *ALS4*, *ALS12*). Das *PLB1*-Gen für die Phospholipase B war in *pmt1*, *pmt2/PMT2*-, *pmt5*-, und *pmt6*-Mutanten schwächer exprimiert, während es in einer *pmt4*-Mutante stärker exprimiert war; Plb1p könnte somit eine wichtige Komponente sein, welche die Virulenz von *pmt*-Mutanten beeinflusst. Überraschend war der Befund, dass die *pmt5*-Mutation einen deutlichen Einfluss auf das Transkriptom hatte, obwohl sie zu keinerlei *in vitro* Phänotypen führte.

6. Literaturverzeichnis

Abeijon, C. und Hirschberg, C.B. (1987)

Subcellular site of synthesis of the *N*-acetylgalactosamin (β 1-0) serine (or threonine) linkage in rat liver.
J. Biol. Chem. **262**: 4153-4159

Abeijon, C., Orlean, P., Robbins, P.W. und Hirschberg, C.B. (1989)

Topography of glycosylation in yeast: characterization of GDPmannose transport and luminal guanosine diphosphatase activities in golgi-like vesicles.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **86**: 6935-6939

Abeijon, C., Yanagisawa, K., Mandon, E.C., Häusler, A., Moremen, K., Hirschberg, C.B. und Robbins, P.W. (1993)

Guanosine diphosphatase is required for protein and sphingolipid glycosylation in the golgi lumen of *Saccharomyces cerevisiae*.
J. Cell Biol. **122**: 307-323

Arroyo-Florres, B.L., Calvo-Méndez, C., Flores-Carreón, A. und López-Romero E. (2004)

Partial purification of a mannosyl transferase involved in *O*-linked mannosylation of glycoproteins in *Candida albicans*.
Anton. Leeuw. Int. J. **85**: 199-207

Backen, A.C. (2000)

Evaluation of the *CaMAL2* promoter for regulated expression of genes in *Candida albicans*.
Yeast **16**: 1121-1129

Baladron, V., Ufano, S., Duenas, E., Martin-Cuadrado, A.B., del Rey, F. und Vazquez de Aldana, C.R. (2002)

Eng1p, an endo-1,3-beta-glucanase localized at the daughter side of the septum, is involved in cell separation in *Saccharomyces cerevisiae*.
Eukaryot. Cell **1**: 774-786

Banuett, F. (1998)

Signalling in yeasts: An informational cascade with links to the filamentous fungi.
Microbiol. Mol. Biol. R. **62**: 249-274

Bause, E. und Lehle, L. (1979)

Enzymatic *N*-glycosylation and *O*-glycosylation of synthetic peptide acceptors by dolichol-linked sugar derivatives in yeast.
Eur. J. Biochem. **101**: 185-190

Beltran-Valero de Barnabe, D., Currier, S., Steinbrecher, A., Celli, J., Van Beusekom, E., Van der Zwaag, B., Kayserilli, H., Merlini, L., Chitayat, D. und Dobyns, W.B. (2002)

Mutations in the *O*-mannosyltransferase gene *POMT1* give rise to severe neuronal migration disorder walker-warburg syndrome.
Am. J. Hum. Genet. **71**: 1033-1043

Bodey, G.P. (1993)

What's new in fungal infection in leukemic patients.
Leukemia Lymphoma **11**: 127-35

Bradford, M.M. (1976)

A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.
Anal. Biochem. **72**: 248-54

Braun, P.C., und Calderone, R.A. (1978).

Chitin synthesis in *Candida albicans*: comparison of yeast and hyphal forms.
J. Bacteriol. **133**: 1472-1477

Brodersen, D.E., Clemons, W.M., Carter, A.P., Morgan-Warren, R.J., Wimberly, B.T. und Ramakrishnan, V. (2000)

The structural basis for the action of the antibiotics tetracycline, pactamycin, and hygromycin B on the 30S ribosomal subunit.

Cell **22**: 1143-1154

Buffo, J., Herman, M.A. und Soll, D.R. (1984)

A characterization of pH-regulated dimorphism in *Candida albicans*.

Mycopathologia **85**: 21-30

Buurman, E.T., Westwater, C., Hube, B., Brown, A.J.P., Odds, F.C. und Gow, N.A.R. (1998)

Molecular analysis of CaMnt1p, a mannosyl transferase important for adhesion and virulence of *Candida albicans*.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA **95**: 7670-7675

Cabib E., Drgonova J. und Drgon T. (1998)

Role of small G proteins in yeast cell polarization and wall biogenesis.

Annu. Rev. Biochem. **67**: 307-333

Cabib E., Roh D.H., Schmidt M., Crottei L.B. und Varma A. (2001)

The yeast cell wall and septum as paradigms of cell growth and morphogenesis.

J. Biol. Chem. **276**: 19679-19682

Cabral, C.M., Choudhury, P., Liu, Y., and Sifers, R.N. (2000)

Processing by endoplasmic reticulum mannosidases partitions a secretion-impaired glycoprotein into distinct disposal pathways.

J. Biol. Chem. **275**: 25015–25022

Care, R.S., Trevethick, J., Binley, K.M. und Sudbery, P.E. (1999)

The *MET3* promotor: a novel tool for *Candida albicans* molecular genetics.

Mol. Microbiol. **34**: 792-798

Casanova, M., Lopez-Ribot, J.L., Monteagudo, C., Llombart-Basch, A., Sentandreu, R. und Martinez, J.P. (1992)

Identification of a 58-kilodalton cell surface fibrinogen-binding mannoprotein from *Candida albicans*.

Infect. Immun. **69**: 4221-29

Cannon, R. D., Jenkinson, H. F. und Shepherd, M. G. (1992)

Cloning and expression of *Candida albicans* *ADE2* and proteinase genes on a replicative plasmid in *C. albicans* and in *Saccharomyces cerevisiae*.

Mol. Gen. Genet. **235**: 453-457

Capellaro, C., Mrsa, V. und Tanner, W. (1998)

New potential cell wall glucanases of *Saccharomyces cerevisiae* and their involvement in mating.

J. Bacteriol. **180**: 4081-4088

Calderone, R.A. und Braun, P.C. (1991)

Adherence and receptor relationships of *Candida albicans*.

Microbiol. Rev. **55**: 1-20

Calderone, R.A. und Fonzi, W.A. (2001)

Virulence factors of *Candida albicans*.

Trends Microbiol. **9**: 237-335

Chaffin, W.L., Lopez-Ribot, J.L., Casanova, M., Gozalbo, D. und Martinez, J.P. (1998)

Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: identification, function, and expression.

Microbiol. Molec. Biol. Rev. **62**: 130-180

Chen, J., Zhou, S., Wang, Q., Chen, X., Pan, T. und Liu, H. (2000)

Crk1, a novel Cdc2-related protein kinase, is required for hyphal development and virulence in *Candida albicans*.

Mol. Cell Biol. **20**: 8696-8708

Cheng, S., Nguyen, M.H., Zhang, Z., Jia, H., Handfield, M. und Clancy, C.J. (2003)

Evaluation of the role of four *Candida albicans* genes in virulence by using gene disruption strains that express *URA3* from the native locus.

Infect. Immun. **71**: 6101-6103

Costigan, C., Gehrung, S. und Snyder, M. (1992)

A synthetic lethal screen identifies *SLK1*, a novel protein kinase homolog implicated in yeast cell morphogenesis and cell growth.

Mol. Cell Biol. **12**:1162-78

Crump, J.A. und Collignon, P.J. (2000)

Intravascular catheter-associated infections.

Eur. J. Clin. Microbiol. **19**: 1-8

Csank, C., Makris, C., Meloche, S., Schröppel, K., Röllinghoff, M., Dignard, D., Thomas, D.Y. und Whiteway, M. (1997)

Derepressed hyphal growth and reduced virulence in a *VH1* family-related protein phosphatase mutant of the human pathogen *Candida albicans*.

Mol. Biol. Cell **8**: 2539-2551

Csank, C., Schröppel, S., Leberer, E., Harcus, D., Mohamed, O., Meloche, S., Thomas, D.Y. und 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

Csank, C. und Haynes, K. (2000)

Candida glabrata displays pseudohyphal growth.

FEMS Microbiol. Lett. **189**: 115-120

Cullen, P. J., Schultz, J., Horecka, J., Stevenson, B. J., Jigami, Y. und Sprague, G.F. (2000)

Defects in protein glycosylation cause *SHO1*-dependent activation of a *STE12* signaling pathway in yeast.

Genetics **155**: 1005-1018

Cutler, J. E. (1991)

Putative virulence factors of *Candida albicans*.

Annu. Rev. Microbiol. **45**: 187-218

Cutler, J. E. (2001)

N-Glycosylation of yeast, with emphasis on *Candida albicans*

Med. Mycol. **39**: 75-86

Dean, N. (1995)

Yeast glycosylation mutants are sensitive to aminoglycosides.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA **92**: 1287-1291

Delbrück, S. und Ernst, J.F. (1993)

Morphogenesis-independent regulation of actin transcript levels in the pathogen yeast *Candida albicans*.

Mol. Microbiol. **10**: 859-866

DiDomenico, B. (1999)

Novel antifungal drugs.

Curr. Op. Microbiol. **2**: 509-519

Dijkgraaf, G.J.P., Brown, J.L. und Bussey, H. (1996)

The *KNH1* Gene of *Saccharomyces cerevisiae* is a functional homolog of *KRE9*

Yeast **12**: 683-692

Doedt, T. (2003)

Transkriptionelle Steuerung von Morphogenese und Metabolismus des humanpathogenen Pilzes *Candida albicans* durch die APSES-Proteine Efg1p und Efh1p.

Dissertation, Heinrich Heine Universität Düsseldorf

Doi, M., Homma, M., Chindamporn, A. und Tanaka, K. (1992)

Estimation of chromosome number and size by pulse-field gel electrophoresis (PFGE) in medically important *Candida* species.

J. Gen. Microbiol. **138**: 2243-2251

Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebes, P.A. und Smith, F. (1956)

Colorimetric method for determination of sugars and related substances.

Anal. Chem. **28**: 350-356

Duffy, K., Glithero, A., Haydon, D., Hircock, M., Stubberfield, C., Townsend, D., Young, K. und Page, M. (2001)

Inhibition of protein mannosyltransferase 1 (*PMT1*) activity in the pathogenic yeast *Candida albicans*. International Conference: Molecular mechanisms of fungal cell wall biogenesis.

Ascona, Schweiz Aug. 2001: P38

Ecker, M., Hagen, I., Sestak, S., Strahl, S., Deutzmann, R., Mrsa, V. und Tanner, W. (2003a)

News from the covalently linked cell wall proteins Ccw5p/ Pir4p.

II International conference on molecular mechanisms of fungal cell wall biogenesis.

Salamanca (Spanien) Aug. 27- Sep. 01. 2003

Ecker, M., Mrsa, V., Hagen, I., Deutzmann, R., Strahl, S. und Tanner, W. (2003b)

O-Mannosylation precedes and potentially controls the N-glycosylation of a yeast cell wall protein.

EMBO Rep. **6**: 628-632

Eisen, M.B., Spellman, P.T., Brown, P.O. und Botstein, D. (1998)

Cluster analysis and display of genomw-wide expression patterns.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA **95**: 14863-14868

Endo, T. (1999)

O-Mannosyl glycans in mammals.

Biochim. Biophys. Acta **1437**: 273-246

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

Stress-induced gene expression in *Candida albicans*: absence of a general stress response.

Mol. Biol. Cell **14**: 1460-1467

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

A single-transformation gene function test in diploid *Candida albicans*.

J. Bacteriol. **182**: 5730-5736

Ernst. J.F. (2000)

Transcription factors in *Candida albicans*-environmental control of morphogenesis.

Microbiology **146**: 1763-1774

Ernst. J.F. und Prill, S.K.-H. (2001)

O-Glycosylation.

Med. Mycol. **39**: 67-74

Fidel, P., Vazquez, J.A. und Sobel, J.D. (1999)

Candida glabrata : a review of epidemiology, pathogenesis and clinical disease.

Clin. Microbiol. Rev. **12**: 80-96

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

Isogenic strain construction and gene mapping in *Candida albicans*.

Genetics **134**: 717-728

Fridkin, S.K., Jarvis, W.R. (1996)

Epidemiology of nosokomial fungal infections.

Clin. Microbiol. Rev. **9**: 499-511

Fu, Y., Ibrahim, A.S., Fonzi, W., Ramos, C.F. und Ghannoum, M.A. (1998)

Expression of the *Candida albicans* gene *ALS1* in *Saccharomyces cerevisiae* induces adherence to endothelial

and epithelial cells.

Infect. Immun. **66**: 1783-1786

Gale, C.A., Bendel, C.M., McClellan, M., Hauser, M., Becker, J.M., Berman, J. und Hostetter, M.K. (1998)

Linkage of adhesion, filamentous growth, and virulence in *Candida albicans* to a single gene, *INT1*.

Science **279**: 1355-1358

Gemmell, T.R. und Trimble, R.B. (1999)

Overview of *N*- and *O*-linked oligosaccharide structures found in various yeast species.

Biochim. Biophys. Acta **1426**: 227-237

Gentsch, M. und Tanner, W. (1996)

The *PMT* gene family: protein *O*-glycosylation in *Saccharomyces cerevisiae* is vital.

EMBO J. **15**: 5752-5759

Georgopapadakou, N.H. und Walsh, T.J. (1994)

Human mycoses: drugs and targets for emerging pathogens.

Science **264**: 371-374

Ghannoum, M.A. (2000)

Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis.

Clin. Microbiol. Rev. **13**: 122-143

Girrbach, V., Zeller, T., Priesmeier, M. und Strahl-Bolsinger, S. (2000)

Structure function analysis of the dolichyl phosphate-mannose:protein *O*-mannosyltransferase ScPmt1p.

J. Biol. Chem. **275**: 19288-19296

Girrbach, V. und Strahl, S. (2003)

Members of the evolutionary conserved *PMT* family of protein *O*-mannosyltransferases form distinct protein complexes among themselves.

J. Biol. Chem. **276**: 12554-12562

Gimeno, C.J., Ljungdahl, P.O., Styles, C.A. und Fink, G.R. (1992)

Unipolar cell divisions in the yeast *S. cerevisiae* lead to filamentous growth: regulation of starvation and *RAS*.

Cell **68**: 1077-1090

Glee, P.M., Sundstrom, P. und Hazen, K.C. (1995)

Expression of surface hydrophobic proteins by *Candida albicans* *in vivo*.

Infect. Immun. **63**: 1373-1379

Gow, N.A.R., Robbins, P.W., Brown, A.J., Fonzi, W.A., Chapman, T. und Kinsma, O.S. (1994)

A hyphal-specific chitin synthase gene (*CHS2*) is not essential for growth on, dimorphism, or virulence of *Candida albicans*.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA **91**: 6216-6220

Gow, N.A.R. (1997)

Germ tube growth of *Candida albicans*.

Curr. Top. Med. Mycol. **8**: 43-55

Groll, A.H., De Lucca, A.J. und Walsh, T.J. (1998)

Emerging targets for the development of novel antifungal therapeutics.

Trends Microbiol. **6**: 117-124

Hanahan, D. (1983)

Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids.

J. Mol. Biol. **166**: 557-580

Hanna J., Leggett, D.S. und Finley, D. (2003)

Ubiquitin depletion as a key mediator of toxicity by translational inhibitors.

Mol. Cell Biol. **23**:9251-61

Hanisch, F.-G. (2001)

O-Glycosylation of the mucin type.
Biol. Chem. **382**: 143-149

Harty, H., Strahl, S. und Römisch, K. (2001)

O-Mannosylation protects mutant alpha-factor precursor from endoplasmic reticulum-associated degradation.
Mol. Biol. Cell **12**: 1093-1101

Haselbeck, A. und Tanner, W. (1983)

O-Glycosylation in *Saccharomyces cerevisiae* is initiated at the endoplasmic reticulum.
FEBS Lett. **158**: 335-338

Hayette, M.P., Strecker, G., Faille, C., Dive, D., Camus, D., Mackenzie, D.W.R. und Poulain, D. (1992)

Presence of human antibodies reacting with *Candida albicans* O-linked oligomannosides revealed by using an enzyme-linked immunosorbent assay and neoglycolipids.
J. Clin. Microbiol. **30**: 411-417

Hazen, K.C., Wu, J.G. und Masuoka, J. (2001)

Comparison of the hydrophobic properties of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*.
Infect. Immun. **69**: 779-786

Helenius, A. und Aebi, M. (2001)

Intracellular functions of N-linked glycans.
Science **291**: 2364-2369

Helenius, J., Ng, D.T., Marolda, C.L., Walter, P., Valvano, M.A. und Aebi, M. (2002)

Translocation of lipid-linked oligosaccharides across the ER membrane requires Rft1 protein.
Nature **415**: 447-450

Hendriks, L., Goris, A., Van de Peer, Y., Neefs, J.-M., Vancanneyt, M., Kersters, K., Hennebert, G.L. und de Wachter, R. (1991)

Phylogenetic analysis of five medically important *Candida* species as deduced on the basis of small ribosomal subunit RNA sequences.
J. Gen. Microbiol. **137**: 1223-30

Herscovics, A. und Orlean, P. (1993)

Glycoprotein biosynthesis in yeast.
FASEB J. **7**: 540-550

Heymann, P., Gerads, M., Schaller, M., Dromer, F., Winkelmann, G. und Ernst, J.F. (2002)

The siderophore iron transporter of *Candida albicans* (Sit1p/Arn1p) mediates uptake of ferrichrome-type siderophores and is required for epithelial invasion.
Infect. Immun. **70**: 5246-5255

Hostetter, M.K. (1994)

Adhesins and ligands involved in the interaction of *Candida* spp. with epithelial and endothelial surfaces.
Clin. Microbiol. Rev. **7**: 29-42

Hounsell, E.F., Davies, M.J. und Renouf, D.V. (1996)

O-linked protein glycosylation structure and function.
Glycoconj. J. **13**: 19-26

Hoyer, L.L. (2001)

The ALS gene family of *Candida albicans*.
Trends Microbiol. **9**: 176-180

Hube, B., Monod, M., Schofield, D.A., Brown, A.J.P. und Gow, N.A.R. (1994)

Expression of seven members of the gene family encoding secretory aspartyl proteinases in *Candida albicans*.
Mol. Microbiol. **14**: 87-99

Hube, B., Sanglard, D., Odds, F.C., Hess, D., Monod, M., Schäfer, W., Brown, A.J.P. und Gow, N.A.R. (1997)

Disruption of each of the secreted aspartyl proteinase genes, *SAP1*, *SAP2*, and *SAP3* of *C. albicans albicans* attenuates virulence.

Infect. Immun. **65**: 3529-3528

Hull, C. M. und Johnson, A. D. (1999)

Identification of a mating type-like locus in the asexual pathogenic yeast *Candida albicans*.

Science **285**: 1271-1275

Hull, C. M., Raisner, R. M. und Johnson, A. D. (2000)

Evidence for mating of the 'asexual' yeast *Candida albicans* in a mammalian host.

Science **189**: 307-310

Immervoll, T., Gentzsch, M. und Tanner, W. (1995)

PMT3 and *PMT4*, two new members of the protein-O-mannosyltransferase gene family of *Saccharomyces cerevisiae*.

Yeast **11**: 1345-1351

Müller-Jung, J (2000)

Gefährden Azol-Fungizide die Wirksamkeit von Antimykotika in der Medizin?

Industrieverband Agrar, Expertengespräch Frankfurt am Main 21. Nov. 2000

Iyer, V.R., Horak, C.E., Scafe, C.S., Botstein, D., Snyder, M. und Brown, P.O. (2001)

Genomic binding sites of the yeast cell-cycle transcription factors SBF and MBF.

Nature **409**: 533-538

Jakob, C.A., Bodmer, D., Spirig, U., Battig, P., Marcil, A., Dignard, D., Bergeron, J.J., Thomas, D.Y. und Aebi, M. (2001)

Htm1p, a mannosidase-like protein, is involved in glycoprotein degradation in yeast.

EMBO Rep. **2**: 423-430

Jarvis, W.R. (1995)

Epidemiology of nosokomial fungal infections, with emphasis on *Candida*-species.

Clin. Infect. Dis. **20**: 1526-1530

Jeffery, C.J. (2003)

Moonlighting proteins: old proteins learning new tricks.

Trends Genet. **19**: 415-417

Jehn, U. (1997)

System-Mykosen bei abwehrgeschwächten Patienten, speziell in der Hämatologie und Onkologie.

In Jehn, U. (Hrsg): Klinische Mykologie, Landsberg

Jigami, Y. und Odani, T. (1999)

Mannosylphosphate transfer to yeast manna.

Biochim. Biophys. Acta **1426**: 335-345

Jurado, L.A., Coloma, A. und Cruces, J. (2000)

Identification of a human homolog of the *Drosophila* rotated abdomen gene (*POMT1*) encoding a putativ ptoein O-mannosyl-transderase, and assignment to human chromosome 9q34.1.

Genomics **58**: 171-180

Kandasamy, R., VEDIYAPPAN, G. und Chaffin, W.L. (2000)

Evidence fort he presence of Pir-like proteins in *Candida albicans*.

FEMS Microbiol. Lett. **15**: 239-243

Kao, A.S. Brandt, M.E., Pruitt, W.R., Conn, L.A., Perkins, B.A., Stephens, D.S., Baughmann, W.S., Reingold, A.L., Rothrock, G.A., Pfaller, M.A., Pinner, R.W., und Hajjeh, R.A. (1999)

The epidemiology of candidemia in two United States cities: results of a population based active surveillance.

Clin. Infec. Dis. **29**: 1164-1170

Kapteyn, J.C., Montijn, R.C., Vink, E., de la Cruz, J., Llobell, A., Douwes, J.E., Shimoi, H., Lipke, P.N. und Klis, F.M. (1996)

Retention of *Saccharomyces cerevisiae* cell wall proteins through a phosphodiester-linked beta-1,3-/beta-1,6-glucan heteropolymer.
Glycobiol. **6**: 337-345

Kapteyn, J.C., Van Egmond, P., Sievi, E., Van Den Ende, H., Makarow, M. und Klis, F.M. (1999)

The contribution of the O-glycosylated protein Pir2p/Hsp150 to the construction of the yeast cell wall in wild-type cells and β 1,6-glucan-deficient mutants.
Mol. Microbiol. **31**: 1835-1844

Kapteyn, J.C., Hoyer, L.L., Hecht, J.E., Müller, W.H., Andel, A., Verkleij, A.J., Makarow, M., Van Den Ende, H. und Klis, F.M. (2000)

The cell wall architecture of *Candida albicans* wild-type cells and cell wall-defective mutants.
Mol. Microbiol. **35**: 601-611

Kasper, L.H. und Buzoni-Gatel, D. (1998)

Some opportunistic parasitic infections in AIDS: candidiasis, pneumocystosis, cryptosporidiosis, toxoplasmosis.
Parasitol. Today **14**: 150-156

Klinkert, B. (2001)

Charakterisierung der Pmt5p Proteinmannosyltransferase-Isoform des humanpathogenen Pilzes *Candida albicans*.
Diplomarbeit, Heinrich Heine Universität, Düsseldorf

Klis, F.M., De Groot, P., und Hellingwerf, K. (2001)

Molecular organization of the cell wall of *Candida albicans*.
Med. Mycol. **39**: 1-8

Klis F.M., Mol P., Hellingwerf K. und Brul, S. (2002)

Dynamics of cell wall structure *Saccharomyces cerevisiae*.
FEMS Microbiol. Rev. **26**: 239-256

Koch, C und Nasmyth, K. (1994)

Cell cycle regulated transcription in yeast.
Curr. Opin. Cell Biol. **6**: 451-459

Kopecka, M und Gabriel, M. (1992)

The influence of Congo red on the cell wall and (1-3)- β -D-glucan microfibril biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*
Arch. Mikrobiol. **158**: 115-126

Laemmli, U.K. (1970)

Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4.
Nature **227**: 680-685

Lay, J., Henry, L.K., Clifford, J., Koltin, Y., Bulawa, C.E. und Becker, J.M. (1998)

Altered expression of selectable marker *URA3* in gene-disrupted *Candida albicans* strains complicates interpretation of virulence studies.
Infect. Imm. **66**: 5301-5306

Leggett, D.S., Hanna, J., Borodovsky, A., Crosas, B., Schmidt, M., Baker, R.T., Walz, T., Ploegh, H. und Finley, D. (2002)

Multiple associated proteins regulate proteasome structure and function.
Mol. Cell **10**: 495-507

Leidich, S.D., Ibrahim, A.S., Fu, Y., Koul, A., Jessup, C., Vitullo, J., Fonzi, W., Mirbod, F., Nakashima, S., Nozawa, Y. und Ghannoum, M.A. (1998)

Cloning and disruption of *caPLB1*, a phospholipase B gene involved in the pathogenicity of *Candida albicans*.
J. Biol. Chem. **273**: 26078-26086

Leuker, C.E., Hahn, A.M. und Ernst, J.F. (1992)

β -Galactosidase of *Kluyveromyces lactis* (Lac4p) as a reporter of gene expression in *Candida albicans* and *C. tropicalis*.

Mol. Gen. Genet. **245**: 212-217

Leuker, C.E., Sonneborn, A., Delbrück, S. und Ernst, J.F. (1997)

Sequence and promoter regulation of the *PCK1* gene encoding phosphoenolcarboxykinase of the fungal pathogen *Candida albicans*.

Gene **192**: 235-240

Lipke, P.N. und Ovalle, R. (1998)

Cell wall architecture in yeast: new structure and new challenges.

J. Bacteriol. **180**: 3735-40

Liu, H., Köhler, J. und Fink, G.R. (1994)

Suppression of hyphal formation in *Candida albicans* by mutation of a *STE12* homolog.

Science **266**: 1723-1726

Lo, H.-S., Köhler, J.R., DiDomenico, B., Loebenberg, D., Cacciapuoti, A. und Fink, G.R. (1997)

Nonfilamentous *C. albicans* mutants are avirulent.

Cell **90**: 939-949

Lommel, M., Bagnat, M. und Strahl, S. (2004)

Abberant 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

Lopez-Ribot, J.L., Monteagudo, C., Sepulveda, P., Casanova, M., Martinez, J.P. und Chaffin, W.L. (1996)

Expression of the fibrinogen binding mannoprotein and the laminin receptor of *Candida albicans* *in vitro* and in infected tissues.

FEMS Microbiol. Lett. **142**:117-22

Losberger, C. und Ernst, J.F. (1998)

Sequence and transcript analysis of the *C. albicans* *URA3* gene encoding orotidine-5'-phosphate decarboxylase.

Curr. Genet. **16**:153-158

Luft, J.H. (1961)

Improvements in epoxy resin embedding methods.

J. Biophys. Biochem. Cytol. **9**: 409-14

Lussier, M., Gentzsch, M., Sdicu, A.-M., Bussey, H. und Tanner, W. (1995)

Protein O-glycosylation in Yeast: The *PMT2* gene specifies a second protein O-mannosyltransferase that functions in addition to the *PMT1*-encoded activity.

J. Biol. Chem. **270**: 2770-2775

Lussier, M., Sdicu, A.-M., Bussereau, F., Jacquet, M. und Bussey, H. (1997)

The Ktr1p, Ktr3p, and Kre2p/Mnt1p mannosyltransferases participate in the elaboration of yeast O- and N-linked carbohydrate chains.

J. Biol. Chem. **272**: 15527-15531

Lussier, M., Sdicu, A.-M., Shahinian S. und Bussey, H. (1998)

The *Candida albicans* *KRE9* gene is required for cell wall β -1,6-glucan synthesis and is essential for growth on glucose.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA **95**: 9825-9830

Lussier, M., Sdicu, A.-M. und Bussey, H. (1999)

The *KTR* and *MNN1* mannosyltransferase families of *Saccharomyces cerevisiae*

Biochem.Biophys.Acta **1426**:323-334

Magee, B. B. und Magee, P. T. (2000)

Induction of mating in *Candida albicans* by the constructon of *MTLa* and *MTLq* strains.

Science **289**: 310-313

Mager, W.H. und Siderius, M. (2002)

Novel insights into the osmotic stress response of yeast.
FEMS Yeast Res. **2**: 251-257

Mancini, R., Aebi, M. und Helenius, A. (2003)

Multiple endoplasmic reticulum-associated pathways degrade mutant yeast carboxypeptidase Y in mammalian cells.
J. Biol. Chem. **278**: 46895-46905

Manya, H., Chiba, A., Yoshida, A., Wang, X., Chiba, Y., Jigami, Y., Margolis R.U. und Endo, T. (2004)

Demonstration of mammalian protein O-mannosyltransferase activity: coexpression of *POMT1* and *POMT2* required for enzyme activity.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **101**: 500-505

Marichal, P., Wanden Bosshe, H., Odds, F.C., Nobels, G., Warncock, D.W., Timmerman, V., Van Broeckhoven, C., Fay, S. und Mose-Larsen, P. (1997)

Molecular biological characterization of an azole-resistant *Candida glabrata* isolate.
Antimicrob. Agents Ch. **41**: 2229-37

Masuoka J., und Hazen K.C. (1999)

Differences in the acid-labile component of *Candida albicans* mannan from hydrophobic and hydrophilic yeast cells.
Glycobiology **9**: 1281-1286

Martin-Blanco, E. und Bellido-García, A. (1996)

Mutations in the *rotated abdomen* locus affect muscle development and reveal an intrinsic asymmetry in *Drosophila*.
P. Natl. Acad. Sci. USA **93**: 6048-6052

Martin-Cuadrado, A.B., Duenas, A.B., Sipiczki, M., Vazquez de Aldana, C.R. und del Rey, F. (2003)

The endo-beta-1,3-glucanase eng1p is required for dissolution of the primary septum during cell separation in *Schizosaccharomyces pombe*.
J. Cell Sci. **116**: 1689-1698

Matthews, R.C. (1994)

Pathogenicity determinants of *Candida albicans*: potential targets for immunotherapy ?
Microbiology **140**: 1505-1511

McCreath, K.J., Specht, C.A. und Robbins, P.W. (1995)

Molecular cloning and characterization of chitinase genes from *Candida albicans*.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA **92**: 2544-2548

McCullough, M.J., Ross, B.C. und Reade, P.C. (1996)

Candida albicans: a review of its history, taxonomy, epidemiology, virulence attributes, and methods of strain differentiation.
Int. J. Oral. Maxillofac. Surg. **25**: 136-144

McIntosh, E.M. (1994)

MCB elements and the regulation of DNA replication genes in yeast.
Curr. Genet. **24**: 185-192

McIntosh, E.M. Looser, J., Haynes, R.H. und Pearlman, R. E. (1994)

MluI site-dependent transcriptional regulation of the *Candida albicans* dUTPase gene.
Curr. Genet. **26**: 415-421

Mewes, H.W., Albermann, K., Heumann, K., Liebl, S. und Pfeiffer, F. (1997)

MIPS: a database for protein sequences, homology data and yeast genome information.
Nucleic Acids Res. **25**: 28-30

Molano, J., Bowers, und Cabib, E. (1980)

Distribution of chitin in the yeast cell wall. An ultrastructural and chemical study.
J. Cell Biol. **85**: 199-212

Molloy, C., Cannon, R.D., Sullivan, P.A. und Shepherd, M.G. (1994)

Purification and characterization of two forms of *N*-Acetylglucosaminidase from *Candida albicans* showing widely different outerchain glycosylation.

Microbiology **140**: 1543-1553

Moreno, I., Pedreno, Y., Maicas, S., Sentandreu, R., Herrero, E. und Valentin, E. (2003)

Characterization of a *Candida albicans* gene encoding a putative transcripational factor required for cell wall integrity.

FEMS Microbiol. Letters **226**: 159-167

Morschhäuser, J., Blum-Oehler, G. und Hacker, J. (1997)

Virulenz- und Resistenzmechanismen pathogener *Candida*-Spezies.

Med. Welt **48**: 352-357

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

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

Mol. Microbiol. **32**: 547-556

Mühlschlegel, F.A. und Fonzi, W.A. (1997)

PHR2 of *Candida albicans* encodes a functional homolog of the pH-regulated Gene *PHR1* with an inverted pattern of pH-dependent expression.

Mol. Cell Biol. **17**: 5960-5967

Müller, H., Ziegler, B. und Schweizer, B. (1993)

UV/VIS-Spektroskopie in der Nukleinsäureanalytik.

Biotechnol. Tech. **4**: 25-29

Munro, C.A. und Gow, N.A.R. (2001)

Chitin synthesis in human pathogenic fungi.

Med. Mycol. **39**: 41-53

Munro, C.A., Whitton, R.K., Hughes, H.B., Rella, M., Selvaggini, S. und Gow, N.A. (2003)

CHS8-a fourth chitin synthase gene of *Candida albicans* contributes to in vitro chitin synthase activity, but is dispensable for growth.

Fungal Genet. Biol. **40**:146-58

Naglik, J.R., Challacombe, S.J. und Hube, B. (2003)

Candida albicans secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis.

Microbiol. Mol. Biol. Rev. **67**: 400-428

Nantel, A., Dignard, D., Bachewich, C., Harcus, D., Marcil, A., Bouin, A., Sensen, C., Hogues, H., Hoog, M., Gordon, P., Rigby, T., Benoit, F., Tessier, D., Thomas, D. und Whiteway, M. (2002)

Transcript profiling of *Candida albicans* cells undergoing the yeast-to-hyphal-transition.

Mol. Biol. Cell **13**: 3452-3465

Nakayama, H., Mio, T., Nagahashi, S., Kokado, M., Arisawa, M. und Aoki, Y. (2000)

Tetracycline regulatable system to tightly control gene expression in the pathogenic fungus *Candida albicans*.

Infect. Immun. **68**: 6712-6719

Nakayama, K., Feng, Y., Tanaka, A. und Jigami, Y. (1998)

The involvement of *mnn4* and *mnn6* mutations in mannosyl phosphorylation of *O*-linked oligosaccharide in yeast *Saccharomyces cerevisiae*.

Biochim. Biophys. Acta **1425**: 255-262

Navarro-García, F., Eismann, B. Román, E., Nombela, C., und Pla, J. (2001)

Signal transduction pathways and cell-wall construction in *Candida albicans*.

Med. Mycol. **39**: 87-100

Negre, E., Vogel, T., Levanon, A., Guy, R., Walsch, T.J. und Roberts, D.D. (1994)

The collagen binding domain of fibronectin contains a high affinity binding site for *Candida albicans*.

J. Cell Biol. **269**: 22039-45

Nishimura, H., Takao, T., Hase, S., Shimonishi, Y. und Iwanaga, S. (1992)

Human factor IX has a tetrasaccharide O-glycosidically linked to serine 61 through the fucose residue.
J. Biol. Chem. **267**: 17520-17525

Odds, F.C. (1988)

Candida and candidosis.
2nd ed., London: Bailliere Tindall

Odds, F.C. (1994)

Pathogenesis of *Candida* infections.
J. Am. Acad. Dermatol. **31**: 2-5

Orlean, P., Albright, C. und Robbins, P. W. (1988)

Cloning and sequencing of the yeast gene for dolichol phosphate mannose synthase, an essential protein.
J. Biol. Chem. **263**: 17499-17507

Orlean, P. (1990)

Dolichol phosphate mannose synthase is required in vivo for glycosyl phosphatidylinositol membrane anchoring, O-mannosylation, and N-Glycosylation of protein in *Saccharomyces cerevisiae*.
Mol. Cell. Biol. **10**: 5796-5805

Orlean, P. (1997)

Biogenesis of yeast wall and surface components.
In: Pringle, J.R., Broach, J.R. und Jones, E.W., (Eds.). The molecular and cellular biology of the yeast *Saccharomyces*, Vol. 3: Cell cycle and cell biology. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY; S. 229-362

Pendrak, M.L. und Klotz, S.A. (1995)

Adherence of *Candida albicans* to host cells.
FEMS Microbiol. Lett. **129**: 103-114

Petersen, R.F., Marinoni, G., Nielsen, M.L. und Piskur, J. (2000)

Molecular approaches for analyzing diversity and phylogeny among yeast species.
in: Contributions to Microbiology. Dimorphism in Human Pathogenic and Apathogenic Yeasts. Vol. 5, 15-35.
Hrsg. J.F. Ernst und A. Schmidt, Basel: Karger

Petrescu, A.J., Milac, A.L., Petrescu, S.M., Dwek, R.A. und Wormald, M.R. (2004)

Statistical analysis of the protein environment of N-glycosylation sites: implications for occupancy, structure, and folding
Glycobiology **14**: 103-114

Pfaller, M.A. (1994)

Epidemiology and control of fungal infections.
Clin. Infect. Dis. **19**: 8-13

Pfaller, M.A. (1996)

Nosocomial candidiasis: emerging species, reservoirs, and modes of transmission.
Clin. Infect. Dis. **22**: S89-94

Pfaller, M.A., Jones, R., Doern, G., Fluit, A. Verhoef, J., Sader, H., Messer, S., Houston, A. Coffmann, S. und Hollis, R. (1999)

International surveillance of blood stream infections due to *Candida* species in the european SENTRY-Programm: species distribution and antifungal susceptibility including the investigational triazol and echinocandin agents.
Diagn Microbiol. Infect. Dis. **35**: 19-25

Pla, J., Gil, C., Monteoliva, L., Navarro-García, F., Sánchez, M. und Nombela, C. (1996)

Understanding *Candida albicans* at the molecular level.
Yeast **12**: 1677-1702

Plaine, A. (2002)

Characterization of the *OLE1* gene, encoding a fatty acid desaturase in the human fungal pathogen *Candida albicans*

Diplomarbeit, Heinrich Heine Universität, Düsseldorf

Prill, S.K.-H. (2000)

Bedeutung des Pmt4-Proteins für die Proteinglykosylierung des humanpathogenen Pilzes *Candida albicans*.

Diplomarbeit, Heinrich Heine Universität, Düsseldorf

Ram, A.F.J., Wolters, A., Ten Hoopen, R. und Klis, F.M. (1994)

A new approach for isolating cell wall mutants in *Saccharomyces cerevisiae* by screening for hypersensitivity to calcofluor white.

Yeast **10**: 1019-1030

Rao, S.S. und Grollman, A.P. (1967)

Cycloheximide resistance in yeast: a property of the 60S ribosomal subunit.

Biochim. Biophys. Res. Commun. **29**: 696-704

Recht, M.I., Douthwaite, S. und Puglisi, J.D. (1999)

Basis for prokaryotic specificity of action of aminoglycoside antibiotics.

EMBO J. **18**:3133-8

Reissig, I.L., Strominger, J.L. und Leloir, L.F. (1955)

A modified colorimetric method for estimation of N-acetylamino sugars.

J. Biol. Chem. **217**: 959-966

Reynolds, T.B. und Fink, G.R. (2001)

Bakers' yeast, a model for fungal biofilm formation.

Science **291**: 878-881

Richard, M., de Groot, P., Courtin, O., Poulain, D., Klis, F.M. und Gaillardin, C. (2002)

GP17 affects cell-wall protein anchorage in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans*.

Microbiology **148**: 2125-2133

Riggle, P.J., Andrutis, K.A., Chen, X., Tzipori, S.R. und Kumamoto, C. (1999)

Invasive lesions containing filamentous forms produced by a *Candida albicans* mutant that is defective in filamentous growth in culture.

Infect. Immun. **67**: 3649-3652

Rikkerink, E.H.A., Magee, B.B. und Magee, P.T. (1988)

Opaque-white phenotype transition: A programmed morphological transition in *Candida albicans*.

J. Bacteriol. **170**: 895-899

Roberts, R.L. und Fink, G.R. (1994)

Elements of a single MAP kinase cascade in *Saccharomyces cerevisiae* mediate two developmental programs in the same cell type: mating and invasive growth.

Genes Dev. **8**: 2974-2985

Robertson, L.S. und Fink, G.R. (1998)

The three yeast A kinases have specific signaling functions in pseudohyphal growth.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA **95**: 13783-13787

Rouabhia, M., Schaller, M., Vecchiarelli, A., Prill, S.K.-H., Giasson, L. und Ernst, J.F. (2004)

Epithelial damage and virulence of the fungal pathogen *Candida albicans* requires the five isoforms of protein mannosyltransferases (Pmt proteins).

eingereicht bei Infect. Immun.

Russo, P., Kalkinen, N., Sareneva, H., Paakkola, J. und Makarow, M. (1992)

A heat shock gene from *Saccharomyces cerevisiae* encoding a secretory glycoprotein.

Mol. Gen. Genet. **239**: 273-280

Sambrook, J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T. (1989)

Molecular cloning: A laboratory manual. 2nd edition.
Cold Spring Harbor Laboratory Press NY.

Sanders, S.L., Gentsch, M., Tanner, W. und Herskowitz, I. (1999)

O-Glycosylation of Axl2/Bud10p by Pmt4p is required for its stability, localization, and function in daughter cells.
J. Cell Biol. **145**: 1177-1188

Sanglard, D., Kuchler, K., Ischer, F., Pagani, J.L., Monod, M. und Bille, J. (1995)

Mechanisms of resistance to azole antifungal agents in *Candida albicans* isolates from AIDS patients involve specific multidrug transporters.
Antimicrob. Agents Ch. **39**: 2378-2386

Sanglard, D., Ischer, F., Monod, M. und Bille, J. (1997)

Cloning of *Candida albicans* genes conferring resistance to azole antifungal agents: characterization of *CDR2*, a new multidrug ABC transporter gene.
Microbiology **143**: 405-416

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

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

Schaller, M., Schackert, C., Korting, H.C., Januschke, E. und Hube, B. (2000)

Invasion of *Candida albicans* correlates with expression of secreted aspartic proteinases during experimental infection of human epidermis.
J. Invest. Dermatol. **114**: 712-717

Schaller, M., Januschke, E., Schackert, C., Woerle, B. und Korting, H.C. (2001)

Different isoforms of secreted aspartyl proteinases (Sap) are expressed by *Candida albicans* during oral and cutaneous candidosis *in vivo*.
J. Med. Microbiol. **50**: 743-7

Schleip, I., E. Heiß & Lehle, L. (2001)

The yeast *SEC20* gene is required for N- and O-glycosylation in the Golgi.
J. Biol. Chem. **276**: 28751-28758

Sharma, C.B., D'Souza, C. und Elbein, A.D. (1991)

Partial purification of a mannosyltransferase involved in O-mannosylation of glycoproteins in *Saccharomyces cerevisiae*.
Glycobiology **1**: 367-373

Shaw, B.D. und Momany, M. (2002)

Aspergillus nidulans polarity mutant *swoA* is complemented by protein O-mannosyltransferase *pmtA*.
Fungal Genet. Biol. **37**: 263-270

Shepherd, M.G. (1987)

Cell envelope of *Candida albicans*.
Crit. Rev. Microbiol. **15**: 7-25

Shepherd, M.G. (1988)

Morphogenetic transformation of fungi.
Curr. Top. Med. Mycol. **2**: 278-304

Sheppard, D.C., Yeaman, M.R., Welch, W.H., Phan, Q.T., Fu, Y., Ibrahim, A.S., Filler, S.G., Zhang, M., Waring, A.J. und Edwards, J.E. Jr. (2004)

Functional and structural diversity in the Als protein family of *Candida albicans*.
J Biol. Chem. im Druck

Scherer, S. und Magee, P.T. (1990)

Genetics of *Candida albicans*.
Microbiol. Rev. **54**: 226-41

Selvaggini, S., Munro, C.A., Paschoud, S., Sanglard, D. und Gow, N.A.R. (2004)

Independent regulation of chitin synthase and chitinase activity in *Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae*.

Microbiology **150**: 921-98

Sherman, F., Fink, G.R. und Hicks, J.B. (1986)

Laboratory course manual for methods in yeast genetics.

Cold Spring Harbor Laboratory press, Cold Spring Harbor, NY.

Singleton, D.R. und Hazen, K.C. (2004)

Differential surface localization and temprature-dependent expression of the *Candida albicans* Csh1 protein.

Microbiology **150**: 285-292

Slutsky, B., Buffo, J. und Soll, D.R. (1985)

High-frequency switching of colony morphology in *Candida albicans*.

Science **230**: 666-669

Smits, G.J., van den Ende, H. und KLi, F.M. (2001)

Differential regulation of cell wall biogenesis during growth and development in yeast.

Microbiology **147**: 781-794

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

EFG1 is a major regulator of cell wall dynamics in *Candida albicans* as revealed by DNA microarrays.

Mol. Microbiol. **47**: 89-102

Sommer, T. und Wolf, D.H. (1997)

Endoplasmic reticulum degradation: reverse protein flow of no return.

FASEB J. **11**:1227–1233

Sonneborn, A. (1999)

Die Bedeutung des Transkriptionsfaktors Efg1p und der Protenkinase A (CaTpk2p) für die Morphogenese des humanpathogenen Pilzes *Candida albicans*.

Dissertation, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf

Sonneborn, A., Bockmühl, D.P., Gerads, M., Kurpanek, K., Sanglard, D. und Ernst, J.F. (2000)

Protein kinase A encoded by *TPK2* regulates dimorphism of *Candida albicans*.

Mol. Microbiol. **35**: 386-396

Southern, E.M. (1975)

Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis.

J. Mol. Biol. **98**: 503-517

Specht, C.A., Lui, Y., Robbins, P.W., Bulawa, C.E., Iartchouk, N., Winter, K.R., Riggle, P.J., Rhodes, J.C., Dodge, C.L., Culp, D.W. und Borgia, P.T. (1996)

The *chsD* and *chsE* genes of *Aspergillus nidulans* and their roles in chitin synthesis.

Fungal Genet. Biol. **2**: 153-167

Spiro, R.G. (2002)

Protein glycosylation: nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptide bonds.

Glycobiology **12**: 43R-56R

Srikantha, T., Morrow, B., Schröppel, K. und Soll, D.R. (1995)

The frequency of integrative transformation at phase specific genes of *Candida albicans* correlates with their transkriptional state.

Mol. Gen. Genet. **246**: 342-352

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

Adhesive and mammalian transglutaminase substrate properties of *Candida albicans* Hwp1.

Science **283**: 1535-1538

StGeorgiev, V. (2000)

Membrane transporters and antifungal drug resistance.

Curr. Drug Targets **1**: 261-84

Stoldt, V.R., Sonneborn, A., Leuker, C.E. und Ernst, J.F. (1997)

Efg1p, an essential regulator of morphogenesis of the human pathogen *Candida albicans*, is a member of a conserved class of bHLH proteins regulating morphogenetic processes in fungi.

EMBO J. **16**: 1982-1991

Strahl-Bolsinger, S., Immervoll, T., Deutzmann, R. und Tanner, W. (1993)

PMT1, the gene for a key enzyme of protein O-glycosylation in *Saccharomyces cerevisiae*.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA **90**: 8164-8168

Strahl-Bolsinger, S. und Scheinost, A. (1999)

Transmembrane topology of PMT1p, a member of an evolutionarily conserved family of protein-O-mannosyltransferases.

J. Biol. Chem. **274**: 9068-9075

Strahl-Bolsinger, S., Gentzsch, M. und Tanner, W. (1999)

Protein O-mannosylation

Biochim. Biophys. Acta **1426**: 279-307

Suzuki, T., Rogers, A.L. und Magee, P.T. (1986)

Inter- and intra-species crosses between *Candida albicans* and *Candida guilliermondii*.

Yeast **2**: 53-8

Sweet, D.J. und Pelham, H.R.B. (1992)

The *Saccharomyces cerevisiae* SEC20 gene encodes a membrane glycoprotein which is sorted by the HDEL retrieval system.

EMBO J. **11**: 423-432s

Sweet, S.P. und Douglas, L.J. (1991)

Effect of iron deprivation on surface composition and virulence determinants of *Candida albicans*.

J. Gen. Microbiol. **137**: 859-865

Swoboda, R. K., Bertram, G., Delbrück, S., Ernst, J. F., Gow, N. A., Gooday, G. W., und Brown, A. J. (1994)

Fluctuations in glycolytic mRNA levels during morphogenesis in *Candida albicans* reflect underlying changes in growth and are not a response to cellular dimorphism.

Mol. Microbiol. **13**: 663-672.

Tanner, W. und Lehle, L. (1987)

Protein glycosylation in yeast.

Biochim. Biophys. Acta **906**: 81-99

Thomson, I.M., Bates, S., Yamazaki, S., Arisawa, M., Aoki, Y. und Gow, N.A.R. (2000)

Functional characterisation of the *Candida albicans* MNT1 mannosyltransferase expressed heterologously in *Pichia Pastoris*.

J. Biol. Chem. **275**: 18933-18938

Timpel, C., Strahl-Bolsinger, S., Ziegelbauer, K. und Ernst, J. F. (1998)

Multiple functions of Pmt1p-mediated protein O-mannosylation in the fungal pathogen *Candida albicans*.

J. Biol. Chem. **273**: 20837-20846

Timpel, C. (1998)

Identifizierung und Charakterisierung von Genen für Protein-Mannosyltransferasen (*CaPMT1*, *CaPMT6*) des humanpathogenen Pilzes *Candida albicans*.

Dissertation, Heinrich Heine Universität Düsseldorf

Timpel, C., Zink, S., Strahl-Bolsinger S., Schröppel, K. und Ernst, J. (2000)

Morphogenesis, adhesive properties, and antifungal resistance depend on the Pmt6 protein mannosyltransferase in the fungal pathogen *Candida albicans*.

J. Bacteriol. **182**: 3063-3071

Tokunaga M., Kusamichi M. und Koike, H. (1986)

Ultrastructure of outermost layer of cell wall in *Candida albicans* observed by rapid-freezing technique.
J. Electron Microsc. **35**: 237-246

Tuite, M.F. (1992)

Antifungal drug development: the identification of new targets.
Tibtech **10**: 235-239

Tusher, V.G., Tibshirani, R. und Chu, G. (2001)

Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **98**: 5116-5121

Tzung, K. W. et al. (2001)

Genomic evidence for a complete sexual cycle in *Candida albicans*.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **13**: 3249-3253

Umeyama, T., Nagai, Y., Niimi, M. und Uehara, Y. (2002)

Construction of FLAG tagging vectors for *Candida albicans*
Yeast **19**: 611-618

Vai, M., Orlandi, I., Cavadini, P., Alberghina, L. und Popolo, L. (1996)

Candida albicans homologue of *GDP1/ GAS1* gene is functional in *Saccharomyces cerevisiae* and contains the determinants for glycosylphosphatidylinositol attachment.
Yeast **12**: 135-141

van den Bossche, H., Marichal, P. und Odds, F.C. (1994)

Molecular mechanisms of drug resistance in fungi.
Trends Microbiol. **2**: 393-400

Vazquez-Torres, A. und Balish, E. (1997)

Macrophages in resistance to candidiasis.
Microbiol. Mol. Biol. Rev. **61**: 170-192

Warit, S., Zhang, N., Short, A., Walmsley, R.M., Oliver, S.G. und Stateva, L.I. (2000)

Glycosylation deficiency phenotypes resulting from depletion of GDP-mannose pyrophosphorylase in two yeast species
Mol. Microbiol. **36**: 1156-1166

Watari, J., Takata, Y., Ohawa, M., Sahara, H., Koshino, S., Onnela, M.L., Airaksinen, U., Jaatinen, R., Penttilä, M. und Keranen, S. (1994)

Molecular cloning and analysis of the yeast flocculation gene *FLO1*.
Yeast **10**: 211-225

Weber, Y. (2001)

Funktionen des Sec20-Proteins im Sekretionsweg des humanpathogenen Pilzes *Candida albicans*
Dissertation, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf

Weide, M.R. und Ernst, J.F. (1999)

Caco-2 monolayer as a model for transepithelial migration of the fungal pathogen *Candida albicans*.
Mycoses **42**: 61-67

Weston, A., Nassau, P.M., Henly, C. und Marriot, M.S. (1993)

Protein O-mannosylation in *Candida albicans*. Determination of the amino acid sequences of peptide acceptors for protein O-mannosyltransferase.
Eur. J. Biochem. **215**: 845-849

Wickert, S. (1998)

DOM34- und *AGS1*-Genprodukte als Komponenten der Proteinglykosylierung von *Saccharomyces cerevisiae*.
Dissertation, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf

Wickes, B.L., Mayorga, M.E., Edman, U. und Edman, J.C. (1996)

Dimorphism and haploid fruiting in *Cryptococcus neoformans*: association with the α -mating type.

P. Natl. Acad. Sci. USA **93**: 7327-7331

Willer, T., Valero, C.M., Tanner, W., Cruces, J. und Strahl, S. (2003)
O-mannosyl glycans: from yeast to novel associations with human disease.
Curr. Opin. Struc. Biol. **13**: 621-630

Willer, T., Amselgruber, W., Deutzmann, R. und Strahl, S. (2002)
Characterization of POMT2, a novel member of the PMT protein O-mannosyltransferase family specifically localized to the acrosome of mammalian spermatids.
Glycobiology **11**: 771-783

Wilson, I.B.H., Gavel, Y. und Heijne, G. (1991)
Amino acid distribution around O-linked glycosylation sites.
Biochem. J. **275**: 529-534

Wilson, R.B., Davis, D., und Mitchell, A.P. (1999)
Rapid hypothesis testing with *Candida albicans* through gene disruption with short homology regions.
J. Bacteriol. **181**: 1868-1874

Wilson, B.R., Davis, D., Enloe, B.M. und Mitchell, A.P. (2000)
A recyclable *Candida albicans* URA3 cassette for PCR product-directed gene disruption.
Yeast **16**: 65-70

White, T.C., Andrews, L.E., Malthy, C. und Agabian, N. (1995)
The "universal" leucine codon CTG in the secreted aspartyl proteinase 1 (*SAP1*) gene of *Candida albicans* encodes a serine *in vivo*.
J. Bacteriol. **177**: 2953-2955

White, T.C., Marr, K.A. und Bowden, R.A. (1998)
Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance.
Clin. Microbiol. Rev. **11**: 382-402

Wodicka, L., Dong, H., Mittmann, M., Ho, M.H. und Lockhart, D.J. (1997)
Genome-wide expression monitoring in *Saccharomyces cerevisiae*.
Nat. Biotechnol. **15**: 1359-1367

Wolfe, K. H. und Shields, D.C. (1997)
Molecular evidence for an ancient duplication of the entire yeast genome.
Nature **387**, 708-713.

Woodcock, D.M., Crowther, P.J., Dogerty, J., Jefferson, S., DeCruz, E., Noyer-Weidner, M., Sunith, S.S., Micheal, M.Z. und Graha, M.W. (1989)
Quantitative evaluation of *Escherichia coli* host strains for tolerance cytosine methylation in plasmid and phage recombinants.
Nucl. Acids Res. **17**: 3469-3478

Yang, P., Hoffma, C.S. und Marcus, S. (2003)
The phospholipase B homolog Plb1 is a mediator of osmotic stress response and of nutrient dependent repression of sexual differentiation in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*.
Mol. Genet. Genomics **269**: 116-125

Yanish-Perron, C., Vieira, J. und Messing, J. (1985)
Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of M13mp18 and pUC19 vectors.
Gene **33**: 103-119

Zakrzewska, A., Migdalski, A., Saloheimo, M., Penttila, M.E., Palamarczyk, G. und Kruszewska, J.S. (2003)
cDNA encoding protein O-mannosyltransferase from the filamentous fungus *Trichoderma reesei*; functional equivalence to *Saccharomyces cerevisiae* PMT2.
Curr. Genet. **43**: 11-16

Zimmermann, F.K. (1975)

Procedures used in the induction of mitotic recombination and mutation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*.
Mut. Res. **31**: 71-86

7. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxidsulfat
ARS	autonomous replication site
ATP	Adenosintriphosphat
BMFZ	Biologisch medizinisches Forschungszentrum (Düsseldorf)
bp	Basenpaare
BSA	Bovine Serum Albumin
Cys	Cystein
CWP	cell wall proteins
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
Dol-P-Man	Dolichol-Phospho-Mannose
EDDHA	Ethylendiamino-di(<i>o</i> -hydroxyphenylacetyl)-säure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FOA	5-Fluoro-Orotic Acid
GalNac	N-Acetylgalaktosamin
GDP	Guanosindiphosphat
G418	Geneticin 418
GPI	glycosyl-phosphahtidylinositol anchor
GlcNac	N-Acetylglukosamin
h	Stunde
HEPES	2-[4-(2Hydroxyethyl)-1piperaziny]-ethansulfonsäure
HMW	High molekular weightmarker
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LB-Medium	Lura Bertami-Medium
M	Molar
mA	Milliampere
Man	Mannose
MAP	mitogen activated protein
Met	Methionin
MEK	MAP-Kinase-Kinase
MEKK	MAP-Kinase-Kinase-Kinase
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MUF	4-Methylumbelliferon
NBT	4-Nitrotetrazolium Chloridblau
nm	Nanometer
dNTP	desoxy-Nukleosidtriphosphate
OD _{600 nm}	optische Dichte bei 600 nm
ORF	open reading frame (offenes Leseraster)

p. a.	per analysis
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H^+ -Ionenkonzentration
Pir	proteins with internal repeats
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Upm	Umdrehungen pro Minute
RNA	Ribonucleinsäure
RNase A	Ribonuclease A
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkription-PCR
SDS	Natriumdodecylsulfat
TEMED	N,N,N,N-Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)aminoethansulfonsäure
UTR	"untranslated region" (untranslatierte Region)
UV	ultraviolettes Licht
YNB	yeast nitrogen base

8. Anhang

Tab. 8.1: Regulierte Gene in der *pmt1* Mutante CAP1-312 im Vergleich zum Wildtyp-Stamm CAF2-1 (100 Gene bei einer FDR¹ von 5,6%). Die Zellen wurden auf eine OD_{600 nm} = 0,5 in YPD-Medium bei 30 °C angezogen. Die Einteilung in funktionelle Kategorien erfolgte nach MIPS (<http://mips.gsf.de/proj/yeast/CYGD/db/index.html>).

Gen-Name	Gen-Nummer	Beschreibung (nach CandidaDB: http://genolist.pasteur.fr/CandidaDB/)	q-Wert ²	-fache Regulation
----------	------------	--	---------------------	----------------------

Stärker exprimierte Gene: *pmt1/pmt1*–Wildtyp (58 Gene):

Unbekannte/ nicht klassifizierte (17 Gene)

<i>IPF11059</i>	CA0993	unknown function	0,47	2,27
<i>IPF7109</i>	CA5650	unknown function	0,65	2,16
<i>IPF5217</i>	CA5382	unknown function	0,47	1,98
<i>IPF525</i>	CA5613	unknown function	0,93	1,97
<i>AOX2</i>	CA2189	alternative oxidase (by homology)	0,47	1,92
<i>IPF14348.3</i>	CA3231	unknown function, 3-prime end	4,91	1,88
<i>IPF2690.5F</i>	CA5811	unknown function, 5-prime end	3,26	1,83
<i>IPF13577</i>	CA0434	unknown function	0,47	1,79
<i>IPF26</i>	CA6083	unknown function	3,98	1,79
<i>IPF1911</i>	CA5282	unknown function	3,98	1,71
<i>IPF4129</i>	CA3647	unknown function	5,66	1,69
<i>IPF2233</i>	CA4580	unknown function	0,47	1,68
<i>IPF946</i>	CA5968	unknown function	0,47	1,65
<i>IFF8</i>	CA2713	unknown function	0,47	1,65
<i>IFA24.3</i>	CA0075	unknown function	0,47	1,56
<i>IPF1980</i>	CA5564	unknown function	4,14	1,54
<i>IPF10662</i>	CA3827	unknown function	0,47	1,53
<i>IPF20054</i>	CA0262	unknown function	0,47	1,53
<i>IPF9211.3F</i>	CA3141	unknown function	3,98	1,51
<i>IPF8617</i>	CA0941	unknown function	3,2	1,51

Transport /Transporterleichterung/ Routen (8 Gene)

<i>RTA2</i>	CA3607	fatty acid transport/flippase	0,47	2,03
<i>IPF9384</i>	CA4769	similar to <i>S. cerevisiae</i> Mss2p serine/threonine protein kinase (by homology)	0,65	1,91
<i>IPF8951</i>	CA2360	putative phosphatidylinositol transfer protein	0,47	1,84
<i>IPF9240</i>	CA3414	probable permease (hexosetransporter)	3,98	1,7
<i>IPF6108</i>	CA3073	putative tricarboxylate carrier (by homology)	1,5	1,67
<i>IPF8610</i>	CA0480	probable permease (hexosetransporter)	1,95	1,62
<i>YPT32</i>	CA0470	small GTP-binding protein essential for Golgi function (by homology)	0,47	1,53

¹FDR: „false discovery rate“: Prozentsatz nicht-signifikant regulierter Gene

²q-Wert: Niedrigste FDR, bei der das Gen als „signifikant reguliert“ bezeichnet wird. Dieser Wert reflektiert die Variation unter den sechs Messwerten (ein niedriger Wert zeigt eine geringe Variation an).

IPF4258	CA4002	unknown function, involved in fatty acid metabolism	4,63	1,51
---------	--------	---	------	------

Metabolismus (8 Gene)

LPD1	CA2998	dihydrolipoamide dehydrogenase (by homology)	0,47	1,9
RMT2	CA0119	N-delta-arginine methyltransferase (by homology)	0,47	1,78
IPF19977	CA3211	ERG1 (by homology)	3,98	1,69
KGD2	CA2997	2-oxoglutarate dehydrogenase complex E2 component (by homology)	0,47	1,66
ARD8	CA3288	D-arabinitol dehydrogenase	1,5	1,58
IPF4293	CA4249	similar to <i>S. cerevisiae</i> Gpi2p N-acetylglucosaminyl-phosphatidylinositol biosynthetic protein (by homology)	0,47	1,55
IPF5673	CA1103	similar to <i>S. cerevisiae</i> Rex3p RNA exonuclease (by homology)	5,66	1,53
IPF15525	CA2907	putative gluconokinase (by homology);	0,47	1,5

Transkription (5 Gene)

CTA24.3	CA5387	transcriptional activator, 3-prime end	0,47	1,70
IPF10197	CA1892	Similarity to transcription factors	0,47	1,63
CTA27	CA0078	transcriptional activation;	0,79	1,57
CTA21	CA3851	transcriptional activation	3,98	1,55
IPF15604	CA0457	transcription factor (by homology)	4,63	1,54

Zelluläre Abwehrmechanismen (4 Gene)

DDR48	CA4336	stress protein (by homology)	0,47	1,80
CDR1	CA6066	multidrug resistance protein (by homology)	0,47	1,64
GTT1.3	CA4712	glutathione S-transferase, 3-prime end	0,47	1,63
IPF11888	CA4416	unknown function; isoform thioredoxin peroxidase	4,91	1,56

Zelluläre Bestimmung (4 Gene)

KAR2	CA0915	dnaK-type molecular chaperone (by homology)	0,47	1,89
IPF20142	CA3679	unknown function	0,47	1,87
SPR3	CA0363	sporulation-specific septin (by homology)	5,66	1,51
SSR1	CA5213	Secretory Stress Response protein 1 (by homology)	0,47	1,7

Proteinschicksal (Faltung, Modifizierung, Bestimmung) (3 Gene)

TFP3	CA4937	H ⁺ -ATPase by homology	0,65	1,60
MAP2	CA1534	methionine aminopeptidase (by homology)	0,79	1,56
IPF20016	CA4514	similar to <i>S. cerevisiae</i> Sec63p ER protein-translocation complex subunit (by homology)	0,47	1,52

Zellzyklus und DNA Prozessierung (3 Gene)

IPF1341	CA5112	Similarity to mucin proteins (by homology)	0,47	1,75
---------	--------	--	------	------

¹FDR: „false discovery rate“: Prozentsatz nicht-signifikant regulierter Gene

²q-Wert: Niedrigste FDR, bei der das Gen als „signifikant reguliert“ bezeichnet wird. Dieser Wert reflektiert die Variation unter den sechs Messwerten (ein niedriger Wert zeigt eine geringe Variation an).

<i>IPF2334</i>	CA5199	unknown function	5,66	1,53
<i>CHT1</i>	CA5859	endochitinase 1 precursor	4,14	1,52

Umweltinteraktion (2 Gene)

<i>CFL1</i>	CA3460	ferric reductase	0,47	1,75
<i>ALS1.3EOC</i>	CA0316	agglutinin-like protein, 3-prime end	0,47	1,71

Proteinbiosynthese (1 Gen)

<i>MRPL8</i>	CA2999	mitochondrial 60s ribosomal subunit (by homology)	0,93	1,56
--------------	--------	---	------	------

Schwächer regulierte Gene: *pmt1/pmt1*–Wildtyp (43 Gene):

Unbekannte/ nicht klassifizierte (14 Gene)

<i>IPF14109</i>	CA0380	unknown function	0,47	0,47
<i>IPF6518</i>	CA2302	unknown function	4,63	0,48
<i>IPF6238</i>	CA2752	GAG protein of retrotransposon pCal	0,47	0,49
<i>IPF6235</i>	CA2216	<i>C. albicans</i> Tca2 retrotransposon	0,47	0,51
<i>IPF19568</i>	CA4870	unknown function	4,63	0,57
<i>IPF5358</i>	CA3120	unknown function	3,98	0,58
<i>IPF3986</i>	CA4099	unknown function	0,79	0,59
<i>IPF17119</i>	CA3934	unknown function	0,65	0,61
<i>IPF14802</i>	CA1184	unknown function	2,68	0,61
<i>IPF4459</i>	CA0523	unknown function	0,47	0,64
<i>IPF11854</i>	CA1412	unknown function	4,14	0,64
<i>POL0</i>	CA2217	pol polyprotein, reverse transcripase	0,47	0,64
<i>IPF11363</i>	CA2802	unknown function	3,26	0,65
<i>IPF16143</i>	CA3581	unknown function	0,47	0,66

Proteinschicksal (Faltung, Modifizierung, Bestimmung) (11 Gene)

<i>PMT1</i>	CA4424	Mannosyltransferase	0,47	0,19
<i>PRC1</i>	CA0430	Carboxypeptidase Y precursor	0,65	0,48
<i>RPN5.3F</i>	CA4798	subunit of the regulatory particle of the proteasome, 3-prime end (by homology)	1,5	0,53
<i>IPF1183</i>	CA4816	putative aspartyl protease (by homology)	1,95	0,58
<i>TOM37</i>	CA0230	Mitochondrial outer membrane import receptor subunit (by homology)	3,26	0,59
<i>CPS2.5F</i>	CA5172	Carboxypeptidase YSCS precursor, 5-prime end	0,79	0,63
<i>SMP2</i>	CA4540	Involved in plasmid maintenance, respiration and cell proliferation (by homology)	4,14	0,64
<i>TOM6</i>	CA1043	mitochondrial outer membrane import receptor subunit (by homology)	4,14	0,65
<i>ANP1</i>	CA0528	Golgi mannosyltransferase (by homology)	4,91	0,65
<i>VPS27</i>	CA1585	Vacuolar protein sorting (by homology)	1,95	0,65

¹FDR: „false discovery rate“: Prozentsatz nicht-signifikant regulierter Gene

²q-Wert: Niedrigste FDR, bei der das Gen als „signifikant reguliert“ bezeichnet wird. Dieser Wert reflektiert die Variation unter den sechs Messwerten (ein niedriger Wert zeigt eine geringe Variation an).

<i>IPF17055.3EOC</i>	CA1692	unknown function; involved in sorting at endosome	4,63	0,66
----------------------	--------	---	------	------

Transkription (5 Gene)

<i>IPF19614</i>	CA1859	putative transcription factor similar to positive activator of the proline utilisation pathway (by homology)	1,95	0,54
<i>IPF10231.EXON2</i>	CA4052	similar to <i>S. cerevisiae</i> Rif1p Rap1p-interacting factor 1, exon 2 (by homology)	0,79	0,58
<i>SRB2.3</i>	CA1292	DNA-directed RNA polymerase II holoenzyme and Kornberg s mediator (SRB) subcomplex subunit, 3-prime end	0,79	0,63
<i>SBP1.5EOC</i>	CA0252	RNA binding protein-like, 5-prime end (by homology)	0,65	0,63
<i>SBP1</i>	CA2951	RNA binding protein-like (by homology)	0,47	0,64
<i>IPF8362</i>	CA3384	similar to <i>S. cerevisiae</i> Cft2p involved in cleavage and polyadenylation specificity factor, part of CF II (by homology)	5,66	0,65

Metabolismus (4 Gene)

<i>PLB1</i>	CA1975	phospholipase B	0,93	0,54
<i>IFE1</i>	CA1958	Unknown function; oxidoreductase	3,98	0,58
<i>ERG16</i>	CA1387	cytochrome P450 lanosterol 14a-demethylase	0,47	0,6
<i>GPD1</i>	CA2263	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase (by homology)	0,47	0,63

Proteinbiosynthese (3 Gene)

<i>MRPL37</i>	CA1928	Mitochondrial ribosomal protein YmL37 (by homology)	0,65	0,57
<i>MRP51</i>	CA1445	Mitochondrial ribosomal protein of the small subunit (by homology)	4,14	0,62
<i>MRP10</i>	CA1724	Mitochondrial ribosomal protein (by homology)	4,63	0,65

Zelluläre Abwehrmechanismen (2 Gene)

<i>IPF9188</i>	CA2539	unknown function	2,68	0,57
<i>HSP12</i>	CA0627	Heat shock protein (by homology)	0,47	0,64

Umweltinteraktion (1 Gen)

<i>ALS11.3F</i>	CA1426	agglutinin-like protein, 3-prime end	5,66	0,62
-----------------	--------	--------------------------------------	------	------

Zellzyklus und DNA Prozessierung (1 Gen)

<i>SPC19</i>	CA2420	spindle pole body protein (by homology)	0,65	0,58
--------------	--------	---	------	------

Transport /Transporterleichterung/ Routen (1 Gen)

<i>NIC96</i>	CA3940	nuclear pore protein (by homology)	2,68	0,62
--------------	--------	------------------------------------	------	------

¹FDR: „false discovery rate“: Prozentsatz nicht-signifikant regulierter Gene

²q-Wert: Niedrigste FDR, bei der das Gen als „signifikant reguliert“ bezeichnet wird. Dieser Wert reflektiert die Variation unter den sechs Messwerten (ein niedriger Wert zeigt eine geringe Variation an).

Tab. 8.2: Regulierte Gene in der *pmt2/PMT2*-Mutanten P2-2 im Vergleich zum Wildtyp-Stamm CAF2-1 (57 Gene bei einer FDR¹ von 2,3 %). Die Zellen wurden auf eine OD_{600 nm} = 0,5 in YPD-Medium bei 30 °C angezogen. Die Einteilung in funktionelle Kategorien erfolgte nach MIPS (<http://mips.gsf.de/proj/yeast/CYGD/db/index.html>).

Gen-Name	Gen-Nummer	Beschreibung (nach CandidaDB: http://genolist.pasteur.fr/CandidaDB/)	q-Wert ²	-fache Regulation
----------	------------	--	---------------------	----------------------

Stärker exprimierte Gene: *pmt2/PMT2*–Wildtyp (10 Gene):

Unbekannte/ nicht klassifizierte (5 Gene)

<i>IPF1617</i>	CA4894	unknown function	1,07	1,99
<i>IPF538</i>	CA5609	unknown function	1,07	1,68
<i>IPF5330</i>	CA1339	unknown function	1,07	1,59
<i>IPF11888</i>	CA4416	unknown function	1,78	1,52
<i>DBP9</i>	CA0715	dead box helicase	2,36	1,52

Metabolismus (3 Gene)

<i>GDH2</i>	CA1775	NAD-specific glutamate dehydrogenase (by homology)	1,78	1,69
<i>PYC2.EXON2</i>	CA1464	Pyruvate carboxylase 2 (by homology)	1,07	1,51
<i>IPF15013</i>	CA2761	pyruvate decarboxylase regulatory protein (by homology)	1,78	1,69

Proteinschicksal (Faltung, Modifizierung, Bestimmung) (1 Gen)

<i>ALG2.5</i>	CA1530	mannosyltransferase, 5-prime end (by homology)	2,36	1,72
---------------	--------	--	------	------

Biosynthese zellulärer Komponenten (1 Gen)

<i>CIT1.EXON2</i>	CA3909	Citrate synthase, exon 2	1,78	1,52
-------------------	--------	--------------------------	------	------

Schwächer exprimierte Gene: *pmt2/PMT2* – Wildtyp (47 Gene):

Unbekannte/ nicht klassifizierte (16 Gene)

<i>IPF9000</i>	CA0732	unknown function	1,07	0,17
<i>IPF4976</i>	CA1739	unknown function	2,1	0,18
<i>IPF9347</i>	CA1643	unknown function	1,07	0,34
<i>IPF11273</i>	CA1108	unknown function	1,07	0,35
<i>IPF447</i>	CA5644	unknown function	1,07	0,44
<i>IPF11926</i>	CA1192	unknown function	1,07	0,54
<i>IPF8663</i>	CA4717	Unknown function	1,07	0,55
<i>IPF7477</i>	CA1919	unknown function	2,1	0,574
<i>IPF1674</i>	CA4874	putative transcription initiation factor (by homology)	1,07	0,59
<i>IPF20054</i>	CA0262	unknown function	1,07	0,63
<i>IPF1097</i>	CA5766	serine/threonine protein kinase (by homology)	1,07	0,63
<i>IPF2690.5F</i>	CA5811	unknown function, 5-prime end	1,07	0,64

¹FDR: „false discovery rate“: Prozentsatz nicht-signifikant regulierter Gene

²q-Wert: Niedrigste FDR, bei der das Gen als „signifikant reguliert“ bezeichnet wird. Dieser Wert reflektiert die Variation unter den sechs Messwerten (ein niedriger Wert zeigt eine geringe Variation an).

IPF4065	CA0386	unknown function	1,07	0,64
IPF6518	CA2302	unknown function	1,07	0,65
IPF6235	CA2216	<i>C. albicans</i> Tca2 retrotransposon	1,07	0,65
IPF10493.5EOC	CA0831	unknown function	1,07	0,66

Metabolismus (13 Gene)

SOU2	CA3770	Sorbitol utilization protein Sou2p [<i>C. albicans</i>]	1,071	0,257
DLD1	CA4905	D-lactate ferricytochrome C oxidoreductase (by homology)	2,36	0,35
PFK1	CA1834	6-phosphofructokinase, alpha subunit	1,07	0,44
ADH5	CA2391	probable alcohol dehydrogenase (by homology)	1,07	0,48
GSY1	CA5467	UDP glucose--starch glucosyltransferase, glycogen synthase (by homology)	1,07	0,53
PLB1	CA1975	phospholipase B	1,07	0,54
IPF3094	CA4657	4-nitrophenyl phosphatase (by homology)	1,07	0,62
PFK2	CA3112	6-phosphofructokinase, beta subunit	1,07	0,62
IFE2	CA2075	Unknown function	1,79	0,65
IPF2471	CA5728	maltose acetyltransferase	1,07	0,65
IPF4959	CA6057	D-xylulose reductase (by homology)	1,07	0,65
ERG1	CA1353	squalene epoxidase	1,07	0,66
FBA1	CA5180	fructose-bisphosphate aldolase (by homology)	1,07	0,66

Zelluläre Abwehrmechanismen (4 Gene)

RHR2	CA5788	DL-glycerol phosphatase	1,071	0,43
IPF9550	CA4570	similar to <i>S. cerevisiae</i> Osm1p osmotic growth protein	1,071	0,47
TPS3.3	CA5505	alpha,alpha-trehalose-phosphate synthase, regulatory subunit	1,071	0,55
GPD2	CA0824	Glycerol 3-phosphate dehydrogenase (by homology)	1,071	0,59

Umweltinteraktion (4 Gene)

CHS21	CA5750	Chitin synthase (by homology)	1,071	0,08
ALS12.3F	CA0413	agglutinin-like protein	1,071	0,34
ALS4.3F	CA1528	agglutinin-like protein	1,071	0,44
ALS1.3EOC	CA0316	agglutinin-like protein	1,071	0,57

Proteinschicksal (Faltung, Modifizierung, Bestimmung) (3 Gene)

KRE1	CA2589	secretory pathway protein	1,07	0,20
STF2	CA2738	ATP synthase regulatory factor (by homology)	1,07	0,53
SNC2.EXON2	CA5257	Strong similarity to synaptobrevin, exon 2 (by homology)	1,07	0,65

Transport /Transporterleichterung/ Routen (3 Gene)

DAL52	CA2478	allantoate permease (by homology)	1,07	0,25
CAN2	CA1191	amino acid permease (by homology)	1,07	0,37

¹FDR: „false discovery rate“: Prozentsatz nicht-signifikant regulierter Gene

²q-Wert: Niedrigste FDR, bei der das Gen als „signifikant reguliert“ bezeichnet wird. Dieser Wert reflektiert die Variation unter den sechs Messwerten (ein niedriger Wert zeigt eine geringe Variation an).

<i>GLK1</i>	CA0263	aldohexose specific glucokinase (by homology)	1,07	0,57
-------------	--------	---	------	------

Transkription (2 Gene)

<i>HOS1</i>	CA1453	Putative histon deacetylase (by homology)	1,07	0,39
-------------	--------	---	------	------

<i>CAF16</i>	CA3880	ABC ATPase (by homology)	2,1	0,59
--------------	--------	--------------------------	-----	------

Zellzyklus und DNA Prozessierung (1 Gen)

<i>RNR22</i>	CA4492	ribonucleoside-diphosphate reductase (by homology)	1,07	0,29
--------------	--------	--	------	------

¹FDR: „false discovery rate“: Prozentsatz nicht-signifikant regulierter Gene

²q-Wert: Niedrigste FDR, bei der das Gen als „signifikant reguliert“ bezeichnet wird. Dieser Wert reflektiert die Variation unter den sechs Messwerten (ein niedriger Wert zeigt eine geringe Variation an).

Tab. 8.3: Regulierte Gene in der *pmt4*-Mutante CAP4-216 im Vergleich zum Wildtyp-Stamm CAF2-1 (131 Gene bei einer FDR¹ von 4,79 %). Die Zellen wurden auf eine OD_{600 nm} = 0,5 in YPD-Medium bei 30 °C angezogen. Die Einteilung in funktionelle Kategorien erfolgte nach MIPS (<http://mips.gsf.de/proj/yeast/CYGD/db/index.html>).

Gen-Name	Gen-Nummer	Beschreibung (nach CandidaDB: http://genolist.pasteur.fr/CandidaDB/)	q-Wert ²	-fache Regulation
----------	------------	--	---------------------	----------------------

Stärker exprimierte Gene: *pmt4*/*pmt4*–Wildtyp (69 Gene):

Transkription (13 Gene)

<i>SMD3</i>	CA3087	core snRNP protein (by homology)	4,79	6,50
<i>IMP1</i>	CA5084	protease, mitochondrial (by homology)	4,79	4,54
<i>IPF3912</i>	CA4960	unknown function	1,52	3,01
<i>IPF1292</i>	CA5678	unknown function Hypothetical zinc-finger protein	3,98	1,87
<i>BDF1</i>	CA5425	sporulation protein (by homology)	1,52	1,87
<i>ARC1</i>	CA3042	G4 nucleic acid binding protein (by homology)	3,98	1,83
<i>TRM1</i>	CA5457	N2,N2-dimethylguanine tRNA methyltransferase (by homology)	1,52	1,81
<i>NOP1</i>	CA3570	Fibrillarin	1,52	1,70
<i>IPF6893</i>	CA3324	unknown function	3,98	1,69
<i>IPF3618</i>	CA4339	Unknown function	1,52	1,66
<i>RPB5</i>	CA3494	DNA-directed RNA polymerase I, II, III (by homology)	1,52	1,59
<i>IPF4776</i>	CA1443	unknown Function	3,22	1,57
<i>SOL1</i>	CA0259	multicopy suppressor of los1-1	3,98	1,53

Unbekannte/ nicht klassifizierte (11 Gene)

<i>IPF20137</i>	CA3583	unknown function	1,52	7,77
<i>IPF6328</i>	CA1807	unknown function	4,79	2,05
<i>IPF8275</i>	CA3993	unknown function	3,98	1,88
<i>IPF18109</i>	CA5391	unknown function	3,98	1,85
<i>IPF19617</i>	CA0249	unknown function	3,98	1,84
<i>IPF14797</i>	CA1082	unknown function	3,98	1,80
<i>IPF12086</i>	CA3103	unknown function	3,98	1,71
<i>IPF14013</i>	CA3012	unknown function	1,52	1,66
<i>IPF15664</i>	CA2160	unknown function	3,73	1,64
<i>IPF6754</i>	CA3389	unknown function	3,98	1,59
<i>IPF9130</i>	CA1923	unknown function	1,52	1,51

Proteinbiosynthese (11 Gene)

<i>TIF5</i>	CA0667	Translation initiation factor eIF5 (by homology)	1,52	1,54
<i>MRPL36</i>	CA2481	ribosomal protein YmL36 precursor, mitochondrial (by homology)	3,73	2,35
<i>IPF5446</i>	CA2613	putative ribosomal protein (by homology)	1,52	2,24

¹FDR: „false discovery rate“: Prozentsatz nicht-signifikant regulierter Gene

²q-Wert: Niedrigste FDR, bei der das Gen als „signifikant reguliert“ bezeichnet wird. Dieser Wert reflektiert die Variation unter den sechs Messwerten (ein niedriger Wert zeigt eine geringe Variation an).

<i>VAS1</i>	CA0223	valyl-tRNA synthetase (by homology)	1,52	2,16
<i>IPF3361</i>	CA4785	putative mitochondrial ribosomal protein S7 (by homology)	1,52	1,91
<i>IPF10027</i>	CA3016	unknown function	1,52	1,85
<i>MRPL16</i>	CA0910	ribosomal protein	1,52	1,74
<i>MAK21</i>	CA6134	Ribosome biogenesis protein (by homology)	1,52	1,60
<i>IMG1</i>	CA2945	Ribosomal protein, mitochondrial (by homology)	3,73	1,53
<i>IPF10301</i>	CA1876	putative 60S ribosomal protein L7/L12 homolog, mitochondrial precursor	3,98	1,52
<i>LPA4</i>	CA5198	Similar to ribosomal protein S16, mitochondrial (by homology)	3,98	1,50

Proteinschicksal (Faltung, Modifizierung, Bestimmung) (9 Gene)

<i>IPF14019</i>	CA1950	unknown function	1,52	2,28
<i>SLA2</i>	CA5327	Cytoskeleton assembly control protein	1,52	2,16
<i>YTA7</i>	CA1092	26S proteasome subunit (by homology)	1,52	1,78
<i>VAN1</i>	CA5956	Vanadate resistance protein	2,54	1,76
<i>CBF5</i>	CA2373	centromere/ microtubule binding protein	1,52	1,74
<i>UBP12</i>	CA1124	ubiquitin C-terminal hydrolase (by homology)	3,22	1,63
<i>FAA4</i>	CA5992	long-chain fatty acid--CoA ligase and synthetase 4 (by homology)	1,52	1,62
<i>TOM72</i>	CA1397	mitochondrial import receptor (by homology)	3,98	1,53
<i>IPF2973</i>	CA3064	unknown function (ubiquitin catabolism)	3,98	1,53

Transport /Transporterleichterung/ Routen (6 Gene)

<i>IPF9224</i>	CA3806	similar to <i>S. cerevisiae</i> Nup170p nuclear pore protein (by homology)	1,52	2,24
<i>IPF2988</i>	CA5030	unknown function (vacuolar aminoacid transport)	3,22	2,12
<i>PSE1</i>	CA3892	karyopherin-beta protein (by homology)	1,52	1,95
<i>IPF7706</i>	CA4115	putative plasma membrane phosphatase (by homology)	1,52	1,75
<i>IPF15660</i>	CA1226	putative mitochondrial carrier (by homology)	3,22	1,63
<i>IPF11224</i>	CA3781	similar to <i>S. cerevisiae</i> Pdr16p protein involved in lipid biosynthesis and multidrug resistance (by homology)	1,52	1,6

Zelluläre Abwehrmechanismen (3 Gene)

<i>SNZ1</i>	CA4184	stationary phase protein by homology	1,52	3,87
<i>SSE1</i>	CA1911	heat shock protein of HSP70 family (by homology)	3,98	1,63
<i>MCM1</i>	CA5209	Transcription factor of the MADS box (by homology)	1,52	1,56

Zelldifferenzierung (2 Gene)

<i>IPF7423.3EOC</i>	CA0400	similar to <i>S. cerevisiae</i> Spo22 involved in sporulation, 3-prime end	1,52	1,97
<i>IPF13717</i>	CA0712	unknown function	1,52	1,66

¹FDR: „false discovery rate“: Prozentsatz nicht-signifikant regulierter Gene

²q-Wert: Niedrigste FDR, bei der das Gen als „signifikant reguliert“ bezeichnet wird. Dieser Wert reflektiert die Variation unter den sechs Messwerten (ein niedriger Wert zeigt eine geringe Variation an).

Zellzyklus und DNA Prozessierung (2 Gene)

<i>PEL1</i>	CA5625	CDP-diacylglycerol-serine-O-phosphatidyltransferase (by homology)	1,52	2,20
<i>CDC42</i>	CA3879	Cell Division Control	1,52	1,69

Schwächer exprimierte Gene: *pmt4/pmt4*–Wildtyp (62 Gene):**Unbekannte/ nicht klassifizierte (34 Gene)**

<i>IPF4696</i>	CA4970	unknown Function	3,73	0,28
<i>IPF4824</i>	CA1020	unknown function	2,54	0,31
<i>IPF4859</i>	CA3700	unknown function	3,73	0,34
<i>IPF13080</i>	CA0589	unknown function	3,98	0,35
<i>IPF3857</i>	CA3608	unknown function	3,98	0,37
<i>IPF20134</i>	CA3522	unknown function	3,73	0,38
<i>IPF10424</i>	CA5230	unknown function	4,79	0,38
<i>IFR1</i>	CA2258	unknown function	1,52	0,38
<i>IPF1119</i>	CA5778	unknown function	4,79	0,42
<i>IPF1631</i>	CA4888	unknown function	4,79	0,42
<i>IPF13868</i>	CA4436	unknown function	3,73	0,42
<i>IPF20056</i>	CA0495	unknown function	1,52	0,44
<i>IPF2106</i>	CA4318	unknown function	3,73	0,49
<i>PRA1</i>	CA4399	pH-regulated antigen	2,54	0,49
<i>IFA24.3</i>	CA0075	unknown function, 3-prime end	1,52	0,49
<i>IPF16267</i>	CA0634	unknown function	3,22	0,50
<i>IPF14219</i>	CA2042	probable membrane protein (by homology)	3,73	0,55
<i>IPF1912</i>	CA5283	putative catechol o-methyltransferase	3,98	0,55
<i>IPF8114</i>	CA2200	unknown function	3,73	0,55
<i>IPF7353</i>	CA2716	unknown function	2,54	0,56
<i>IPF19936</i>	CA1935	unknown function	3,98	0,56
<i>IPF8990</i>	CA3135	unknown function	3,98	0,57
<i>IPF9162</i>	CA4486	unknown function	2,54	0,57
<i>IPF3866</i>	CA1248	unknown function	3,73	0,58
<i>IPF11281</i>	CA3354	similar to <i>S. cerevisiae</i> Gpr1p G-protein coupled receptor (by homology)	4,79	0,59
<i>IPF14825</i>	CA0799	unknown function	3,73	0,61
<i>IPF11858</i>	CA1411	unknown function	4,79	0,61
<i>IPF11299</i>	CA4378	unknown function	4,79	0,62
<i>IPF3964</i>	CA4111	unknown function	3,98	0,63
<i>IPF3262.3</i>	CA0740	unknown function, 3-prime end	3,73	0,63
<i>IPF4949</i>	CA6053	unknown function	4,79	0,63
<i>IPF7403</i>	CA2710	unknown function	4,79	0,64
<i>IPF1022</i>	CA5142	similar to <i>S. cerevisiae</i> Erv29p ER-Golgi transport	3,73	0,65

¹FDR: „false discovery rate“: Prozentsatz nicht-signifikant regulierter Gene

²q-Wert: Niedrigste FDR, bei der das Gen als „signifikant reguliert“ bezeichnet wird. Dieser Wert reflektiert die Variation unter den sechs Messwerten (ein niedriger Wert zeigt eine geringe Variation an).

		vesicle protein (by homology)		
<i>CIRT2</i>	CA4850	Transposase	3,98	0,65

Metabolismus (11 Gene)

<i>AMYG2</i>	CA3518	Glucoamylase	4,79	0,39
<i>PCK1</i>	CA5857	phosphoenolpyruvate carboxykinase	3,73	0,42
<i>IPF11995</i>	CA0427	unknown function	4,79	0,43
<i>BNA1</i>	CA0804	3-hydroxyanthranilic acid dioxygenase (by homology)	1,52	0,46
<i>HDA1</i>	CA1899	Histone deacetylase (by homology)	1,52	0,52
<i>IFE2</i>	CA2075	Unknown function	1,52	0,55
<i>PFK2</i>	CA3112	6-phosphofructokinase, beta subunit	3,73	0,59
<i>PFK1</i>	CA1834	6-phosphofructokinase, alpha subunit	4,79	0,61
<i>IPF12210</i>	CA1742	quinolinate phosphoribosyltransferase (by homology)	4,79	0,62
<i>IPF4942</i>	CA6052	similar to <i>S. cerevisiae</i> Mal32p alpha-glucosidase)	4,79	0,64
<i>GPH1</i>	CA5206	Glycogen phosphorylase (by homology)	3,73	0,65

Zelluläre Abwehrmechanismen (5 Gene)

<i>YHB1</i>	CA0943	flavohemoglobin (by homology)	1,52	0,46
<i>TPS2</i>	CA5066	Trehalose-6-phosphate phosphatase (by homology)	2,54	0,55
<i>IPF9550</i>	CA4570	similar to <i>S. cerevisiae</i> Osm1p osmotic growth protein	3,73	0,61
<i>IPF9483</i>	CA2435	probable permease (by homology)	3,73	0,64
<i>MUM2</i>	CA2490	ubiquitin C-terminal hydrolase (by homology)	4,79	0,66

Transport /Transporterleichterung/ Routen (3 Gene)

<i>SFT1</i>	CA5433	SNARE-like protein (by homology)	2,54	0,27
<i>IPF8951</i>	CA2360	unknown function	3,73	0,37
<i>SEC10</i>	CA2012	Required for exocytosis (by homology)	3,73	0,4
<i>HXT62</i>	CA1067	sugar transporter	3,98	0,63
<i>IPF6108</i>	CA3073	putative tricarboxylate carrier (by homology)	4,79	0,64

Proteinschicksal (Faltung, Modifizierung, Bestimmung) (3 Gene)

<i>STF2</i>	CA2738	ATP synthase regulatory factor (by homology)	1,52	0,43
<i>IPF13621</i>	CA3398	unknown function	2,54	0,46
<i>SDS24</i>	CA3920	Similar to <i>S. cerevisiae</i> YBR214w which presents strong similarity to hypothetical protein YGL056c	3,22	0,59

Transkription (3 Gene)

<i>IPF10032.3F</i>	CA2237	unknown function, 3-prime end	2,54	0,48
<i>IPF12537</i>	CA5577	unknown function	3,73	0,58
<i>IPF7646</i>	CA1865	putative transcription factor (by homology)	4,79	0,65

zelluläre Kommunikation/ Signaltransduktion (1 Gen)

<i>SMK1</i>	CA5334	MAP kinase	2,54	0,43
-------------	--------	------------	------	------

¹FDR: „false discovery rate“: Prozentsatz nicht-signifikant regulierter Gene

²q-Wert: Niedrigste FDR, bei der das Gen als „signifikant reguliert“ bezeichnet wird. Dieser Wert reflektiert die Variation unter den sechs Messwerten (ein niedriger Wert zeigt eine geringe Variation an).

Tab. 8.4: Regulierte Gene in der *pmt1* Mutante P5-577 im Vergleich zum Wildtyp-Stamm CAF2-1 (174 Gene bei einer FDR¹ von 5,4 %). Die Zellen wurden auf eine OD_{600 nm} = 0,5 in YPD-Medium bei 30 °C angezogen. Die Einteilung in funktionelle Kategorien erfolgte nach MIPS (<http://mips.gsf.de/proj/yeast/CYGD/db/index.html>).

Gen-Name	Gen-Nummer	Beschreibung (nach CandidaDB: http://genolist.pasteur.fr/CandidaDB/)	q-Wert ²	-fache Regulation
----------	------------	--	---------------------	----------------------

Stärker exprimierte Gene: *pmt5/pmt5*–Wildtyp (30 Gene):

Unbekannte/ nicht klassifizierte (7 Gene)

<i>IPF10138.5F</i>	CA1356	unknown function	3,42	1,61
<i>IPF16479</i>	CA0098	unknown function	5,49	1,57
<i>IPF10662</i>	CA3827	unknown function	2,18	1,55
<i>IFA24.3</i>	CA0075	unknown function	3,29	1,55
<i>IPF17283</i>	CA2021	unknown function	2,18	1,53
<i>IPF18447</i>	CA2592	putative zinc-finger protein (by homology)	3,42	1,52
<i>IPF10785.EXON1</i>	CA2847	unknown function, exon 1	2,96	1,50

Proteinschicksal (Faltung, Modifizierung, Bestimmung) (5 Gene)

<i>KAR2</i>	CA0915	dnaK-type molecular chaperone (by homology)	2,96	2,14
<i>MNT1</i>	CA3469	Mannosyltransferase involved in n-linked and o-linked glycosylation	2,96	1,66
<i>NPI46</i>	CA1629	proline cis-trans isomerase (by homology)	2,96	1,56
<i>SQT1</i>	CA4794	suppresses dominant-negative mutants of the ribosomal protein QSR1 (by homology)	2,18	1,52
<i>MNT2</i>	CA3467	Alpha-1,2-mannosyltransferase (by homology)	3,29	1,51

Proteinbiosynthese (4 Gene)

<i>EFT3</i>	CA3081	translation elongation factor 3	3,29	1,73
<i>IPF3709</i>	CA5051	unknown function	2,18	1,58
<i>RPS21</i>	CA1715	ribosomal protein (by homology)	3,42	1,56
<i>GCD11</i>	CA1322	Translation initiation factor eIF2 (by homology)	3,29	1,52

Metabolismus (4 Gene)

<i>IPF6105</i>	CA3075	similar to <i>S. cerevisiae</i> Gualp GMP synthase (glutamine-hydrolyzing) (by homology)	2,18	1,57
<i>CIT1.EXON2</i>	CA3909	Citrate synthase, exon 2	3,42	1,55
<i>IPF19977</i>	CA3211	unknown function	2,18	1,54
<i>URA7</i>	CA1635	CTP synthase 1 (by homology)	2,18	1,63

Transkription (3 Gene)

<i>ARC1</i>	CA3042	G4 nucleic acid binding protein (by homology)	3,42	7,82
-------------	--------	---	------	------

¹FDR: „false discovery rate“: Prozentsatz nicht-signifikant regulierter Gene

²q-Wert: Niedrigste FDR, bei der das Gen als „signifikant reguliert“ bezeichnet wird. Dieser Wert reflektiert die Variation unter den sechs Messwerten (ein niedriger Wert zeigt eine geringe Variation an).

<i>TYE7</i>	CA3707	Basic helix-loop-helix transcription factor by homology	3,74	1,65
<i>IPF16752</i>	CA1291	unknown function	4,68	1,62

Umweltinteraktion (3 Gene)

<i>CCC2</i>	CA1655	putative copper-transporting ATPase (by homology)	2,18	2,13
<i>FET34.3EOC</i>	CA1431	iron transport multicopper oxidase, 3-prime end (by homology)	2,18	1,56
<i>FET5</i>	CA2920	multicopy oxidase (by homology)	2,18	1,51

Zellzyklus und DNA Prozessierung (2 Gene)

<i>CBF5</i>	CA2373	centromere/ microtubule binding protein	3,29	9,78
<i>SUN42</i>	CA5232	Putative cell wall beta-glucosidase (by homology)	3,74	1,55

Kontrolle der zellulären Organisation (1 Gen)

<i>PHR1</i>	CA4857	GPI-anchored pH responsive glycosyl transferase	3,74	1,53
-------------	--------	---	------	------

Zelluläre Abwehrmechanismen (1 Gen)

<i>NSR1</i>	CA3862	nuclear localization sequence binding protein (by homology)	3,29	1,52
-------------	--------	---	------	------

Schwächer exprimierte Gene: *pmt5/pmt5*–Wildtyp (143 Gene):

Unbekannte/ nicht klassifizierte (52 Gene)

<i>IPF9398</i>	CA5393	unknown function	3,42	0,35
<i>ZORRO1A</i>	CA0930	Putative reverse transcriptase	0,45	0,43
<i>IPF6156</i>	CA1625	similar to <i>C.elegans</i> LIM homeobox protein	0,45	0,44
<i>IPF11363</i>	CA2802	unknown function	0,45	0,45
<i>IFP3</i>	CA1840	Unknown Function	0,45	0,47
<i>IPF6518</i>	CA2302	unknown function	0,45	0,5
<i>IPF1382</i>	CA5097	unknown function	0,45	0,51
<i>IPF11480</i>	CA4755	unknown function	0,45	0,51
<i>IPF15822</i>	CA1869	unknown function	0,45	0,51
<i>IPF8024</i>	CA2118	unknown function	0,45	0,53
<i>IPF17494.3EOC</i>	CA2669	unknown function	0,45	0,53
<i>IPF4065</i>	CA0386	unknown function	0,45	0,53
<i>IPF4905</i>	CA0899	unknown function	0,45	0,53
<i>IPF19377</i>	CA0036	unknown function	0,45	0,54
<i>IPF373</i>	CA5861	unknown function	0,45	0,54
<i>IPF3105</i>	CA4652	unknown function	2,18	0,54
<i>IPF2234</i>	CA4579	unknown function	0,45	0,55
<i>IPF900.3</i>	CA5332	unknown function	3,29	0,56

¹FDR: „false discovery rate“: Prozentsatz nicht-signifikant regulierter Gene

²q-Wert: Niedrigste FDR, bei der das Gen als „signifikant reguliert“ bezeichnet wird. Dieser Wert reflektiert die Variation unter den sechs Messwerten (ein niedriger Wert zeigt eine geringe Variation an).

IPF20134	CA3522	unknown function	0,45	0,56
IPF4500	CA4738	putative GTP-binding protein (by homology)	0,45	0,57
ARP6	CA0593	actin-related protein (by homology)	0,45	0,57
IPF8856	CA0595	unknown function	0,45	0,57
IPF7647	CA1866	unknown function	0,45	0,57
IPF6238	CA2752	GAG protein of retrotransposon pCal	0,45	0,57
IPF13839	CA0477	unknown function	0,45	0,58
IPF1306	CA5123	unknown function	0,45	0,58
IPF12900	CA3592	unknown function	0,45	0,59
IPF18234.3	CA4254	unknown Function	0,45	0,59
IPF1097	CA5766	serine/threonine protein kinase (by homology)	0,45	0,6
IPF6235	CA2216	<i>C. albicans</i> Tca2 retrotransposon	0,45	0,61
IPF10493.5EOC	CA0831	unknown function, 5-prime end	0,45	0,62
IPF4859	CA3700	unknown function	1,59	0,62
IPF16024	CA0226	unknown function	0,45	0,62
IPF8953	CA2358	unknown function	1,59	0,62
IPF2125	CA4310	unknown function	0,45	0,62
IPF2106	CA4318	unknown function	0,45	0,62
IPF7385	CA3748	unknown function	1,59	0,63
IPF18207	CA4516	unknown function	0,45	0,63
IPF19154	CA0172	unknown function	0,45	0,63
IPF15297	CA5078	unknown function	0,45	0,63
IPF4405	CA0905	unknown function	0,45	0,64
IPF14219	CA2042	probable membrane protein (by homology)	1,59	0,64
IPF11093	CA5182	weak similarity to pig tubulin-tyrosine ligase	2,18	0,64
CRD2	CA2240	Cu-binding metallothionein	0,45	0,64
IPF13316	CA1880	unknown function	0,45	0,65
IPF1437	CA4910	unknown function	1,59	0,65
IPF19568	CA4870	unknown function	1,59	0,65
IPF20163	CA4135	unknown function	2,18	0,65
IPF7999	CA1940	unknown function	2,18	0,65
IPF14706	CA1777	unknown function	2,18	0,66
IPF3857	CA3608	unknown function	2,70	0,66

Metabolismus (34 Gene)

IFE2	CA2075	Unknown function	0,45	0,31
GPD1	CA2263	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase (by homology)	0,45	0,41
IPF4959	CA6057	D-xylulose reductase (by homology)	0,45	0,42
IPF3094	CA4657	4-nitrophenyl phosphatase (by homology)	0,45	0,42
GPD2	CA0824	Glycerol 3-phosphate dehydrogenase (by homology)	0,45	0,43
GSY1	CA5467	UDP glucose--starch glucosyltransferase, glycogen synthase (by homology)	0,45	0,46
PLB1	CA1975	phospholipase B	0,45	0,46

¹FDR: „false discovery rate“: Prozentsatz nicht-signifikant regulierter Gene

²q-Wert: Niedrigste FDR, bei der das Gen als „signifikant reguliert“ bezeichnet wird. Dieser Wert reflektiert die Variation unter den sechs Messwerten (ein niedriger Wert zeigt eine geringe Variation an).

COQ4	CA3118	ubiquinone biosynthesis	0,45	0,54
CDC21	CA2665	thymidylate synthase (by homology)	0,45	0,54
IPF9972.3EOC	CA1511	unknown function, 3-prime end	0,45	0,54
IPF9069	CA3617	unknown function	2,70	0,55
PFK1	CA1834	6-phosphofructokinase, alpha subunit	0,45	0,55
IPF4942	CA6052	similar to <i>S. cerevisiae</i> Mal32p alpha-glucosidase (by homology)	0,45	0,55
ADH5	CA2391	probable alcohol dehydrogenase (by homology)	0,45	0,57
IPF11995	CA0427	unknown function	0,45	0,57
IPF8856	CA0595	unknown function	0,45	0,57
PDC11	CA2474	Pyruvate decarboxylase (by homology)	0,45	0,57
ERG1	CA1353	squalene epoxidase	0,45	0,57
TRP3	CA5004	Anthranilate synthase / indole glycerol phosphate synthase (by homology)	0,45	0,58
RIB3	CA1111	3,4-dihydroxy-2-butanone 4-phosphate synthase (by homology)	0,45	0,58
IPF8321	CA2938	similar to <i>S. cerevisiae</i> Glg2p self-glucosylating initiator of glycogen synthesis (by homology)	0,45	0,58
TPS3.3	CA5505	alpha,alpha-trehalose-phosphate synthase, regulatory subunit, 3-prime end (by homology)	0,45	0,56
CNA1	CA4137	cyclic nucleotide phosphodiesterase	1,59	0,61
MET7	CA2911	folylpolyglutamate synthetase [<i>C. albicans</i>]	0,45	0,62
SDH41	CA2423	succinate dehydrogenase membrane anchor subunit for sdh2p (by homology)	0,45	0,62
SUR2	CA2225	Hydroxylation of C-4 of the sphingoid moiety of ceramide by homology	0,45	0,62
LYS12	CA1737	homo-isocitrate dehydrogenase (by homology)	0,45	0,62
AMYG1	CA0855	Glucoamylase	1,59	0,63
IDI1.3EOC	CA1538	Isopentenyl-diphosphate delta-isomerase, 3-prime end	1,59	0,63
PDX3	CA4261	pyridoxamine-phosphate oxidase (by homology)	0,45	0,63
FBA1	CA5180	fructose-bisphosphate aldolase (by homology)	1,59	0,64
GPM2	CA2855	phosphoglycerate mutase (by homology)	0,45	0,65
HEM14	CA1951	Mitochondrial protoporphyrinogen oxidase (by homology)	0,45	0,65
CSL4	CA0142	Involved in kinetochore-related function (by homology)	2,18	0,66

Proteinschicksal (Faltung, Modifizierung, Bestimmung) (13 Gene)

STF2	CA2738	ATP synthase regulatory factor (by homology)	0,45	0,29
ESA1	CA5772	Histone acetyltransferase (by homology)	0,45	0,54
MAK3	CA5179	N-acetyltransferase (by homology)	0,45	0,54
VPS27	CA1585	Vacuolar protein sorting (by homology)	0,45	0,54
IPF7862	CA4548	unknown function	0,45	0,56
SFT1	CA5433	SNARE-like protein (by homology)	0,45	0,57

¹FDR: „false discovery rate“: Prozentsatz nicht-signifikant regulierter Gene

²q-Wert: Niedrigste FDR, bei der das Gen als „signifikant reguliert“ bezeichnet wird. Dieser Wert reflektiert die Variation unter den sechs Messwerten (ein niedriger Wert zeigt eine geringe Variation an).

<i>IPF5279</i>	CA4370	unknown function	0,45	0,59
<i>IPF630</i>	CA6016	unknown function	1,59	0,62
<i>IPF16024</i>	CA0226	unknown function	0,45	0,62
<i>IPF8810</i>	CA3312	unknown function	0,45	0,62
<i>SNC2.EXON2</i>	CA5257	Strong similarity to synaptobrevin, exon 2 (by homology)	0,45	0,63
<i>STE23</i>	CA1653	protease involved in a-factor processing by homology	0,45	0,64
<i>IPF2878</i>	CA5735	unknown function	0,45	0,66

Zelluläre Abwehrmechanismen (12 Gene)

<i>DAK2.3EOC</i>	CA0311	dihydroxyacetone kinase, 3-prime end (by homology)	0,45	0,34
<i>RHR2</i>	CA5788	DL-glycerol phosphatase	0,45	0,37
<i>HSP12</i>	CA0627	Heat shock protein (by homology)	0,45	0,44
<i>IPF9550</i>	CA4570	similar to <i>S. cerevisiae</i> Osm1p osmotic growth protein	0,45	0,46
<i>SSA1</i>	CA2857	Heat shock protein of HSP70 family	0,45	0,48
<i>IPF8878</i>	CA3614	unknown function	0,45	0,50
<i>HK1</i>	CA4676	Histidine kinase	0,45	0,55
<i>IPF10424</i>	CA5230	unknown function	0,45	0,55
<i>KAR3.53</i>	CA4321	Kinesin-related protein, internal fragment	0,45	0,56
<i>SNZ1</i>	CA4184	stationary phase protein by homology	0,45	0,58
<i>SKI3</i>	CA4737	antiviral protein	0,45	0,59
<i>IPF10795</i>	CA0424	putative transcription factor (by homology)	0,45	0,62

Transkription (9 Gene)

<i>HSH49</i>	CA3579	spliceosome-associated essential protein [<i>C. albicans</i>]	0,45	0,36
<i>SWI1</i>	CA4366	Transcription regulation by homology	0,45	0,42
<i>POP7</i>	CA3718	Nuclear RNase P subunit (by homology)	0,45	0,42
<i>CAF16</i>	CA3880	ABC ATPase (by homology)	0,45	0,53
<i>IPF6203</i>	CA3716	unknown function	0,45	0,58
<i>IPF20023</i>	CA5031	similar to <i>S. cerevisiae</i> Tea1p activator of Ty1 enhance(by homology)	0,45	0,59
<i>GTS1</i>	CA5132	Transcription factor by homology	0,45	0,61
<i>IPF8044</i>	CA4556	similar to <i>S. cerevisiae</i> Snp1p U1 small nuclear ribonucleoprotein (by homology)	1,59	0,63
<i>IPF1598</i>	CA5424	unknown function	2,70	0,65

Transport /Transporterleichterung/ Routen (8 Gene)

<i>IPF3790</i>	CA2883	unknown function	0,45	0,53
<i>APL6</i>	CA2826	AP-3 complex subunit, beta3-adaptin (by homology)	0,45	0,56
<i>CRD1</i>	CA2832	Cu-transporting P1-type ATPase	0,45	0,6
<i>SAC6.5F</i>	CA0408	actin filament bundling protein, fimbrin, 5-prime end (by homology)	0,45	0,6
<i>PXA2</i>	CA4993	ABC transporter, peroxisomal (by homology)	0,45	0,61
<i>SEC2</i>	CA3598	GDP/GTP exchange factor (by homology)	0,45	0,64

¹FDR: „false discovery rate“: Prozentsatz nicht-signifikant regulierter Gene

²q-Wert: Niedrigste FDR, bei der das Gen als „signifikant reguliert“ bezeichnet wird. Dieser Wert reflektiert die Variation unter den sechs Messwerten (ein niedriger Wert zeigt eine geringe Variation an).

<i>GLK1</i>	CA0263	aldohexose specific glucokinase (by homology)	0,45	0,64
<i>IPF4632</i>	CA3859	similar to <i>S. cerevisiae</i> Vps53p subunit of VP52-54 complex, required for protein sorting at the yeast late Golgi (by homology)	2,18	0,65

Biosynthese zellulärer Komponenten (5 Gene)

<i>IPF13621</i>	CA3398	unknown function	0,45	0,63
<i>DNM1</i>	CA5033	Dynamin-related protein (by homology)	0,45	0,64
<i>IPF4497</i>	CA4740	unknown function	2,18	0,64
<i>UTR2</i>	CA0605	1,3-1,4-beta-glucanase (by homology)	2,70	0,66
<i>SCW11.3EOC</i>	CA1053	glucanase gene family member, 3-prime end (by homology)	1,59	0,63

Zellzyklus und DNA Prozessierung (4 Gene)

<i>IPF1820</i>	CA5254	unknown function	0,45	0,52
<i>OGG1</i>	CA5318	8-oxoguanine DNA glycosylase (by homology)	2,96	0,56
<i>IPF13972</i>	CA0513	unknown function	0,45	0,58
<i>BMH2</i>	CA5050	similar to <i>S. cerevisiae</i> Bmh2p suppressor of clathrin deficiency (by homology)	0,45	0,58

Umweltinteraktion (4 Gene)

<i>ALS4.3F</i>	CA1528	agglutinin-like protein, 3-prime end	0,45	0,39
<i>ALS12.3F</i>	CA0413	agglutinin-like protein, 3-prime end	0,45	0,4
<i>IPF11161.3</i>	CA0760	unknown function, 3-prime end	0,45	0,57
<i>IPF3887</i>	CA1957	similar to <i>S. cerevisiae</i> Syg1p plasma membrane protein of the major facilitator superfamily (by homology)	0,45	0,65

Proteinbiosynthese (1 Gen)

<i>MSM1</i>	CA1093	mitochondrial methionyl-tRNA synthetase	1,59	0,12
-------------	--------	---	------	------

zelluläre Kommunikation/ Signaltransduktion (1 Gen)

<i>SMK1</i>	CA5334	MAP kinase (by homology)	0,45	0,54
-------------	--------	--------------------------	------	------

Zelluläre Bestimmung (1 Gen)

<i>IFU5</i>	CA2679	Unknown function	0,45	0,06
-------------	--------	------------------	------	------

¹FDR: „false discovery rate“: Prozentsatz nicht-signifikant regulierter Gene

²q-Wert: Niedrigste FDR, bei der das Gen als „signifikant reguliert“ bezeichnet wird. Dieser Wert reflektiert die Variation unter den sechs Messwerten (ein niedriger Wert zeigt eine geringe Variation an).

Tab. 8.5: Regulierte Gene in der *pmt6*-Mutante CAP2-239 im Vergleich zum Wildtyp-Stamm CAF2-1 (100 Gene bei einer FDR¹ von 5,5%). Die Zellen wurden auf eine OD_{600 nm} = 0,5 in YPD-Medium bei 30 °C angezogen. Die Einteilung in funktionelle Kategorien erfolgte nach MIPS (<http://mips.gsf.de/proj/yeast/CYGD/db/index.html>).

Gen-Name	Gen-Nummer	Beschreibung (nach CandidaDB: http://genolist.pasteur.fr/CandidaDB/)	q-Wert ²	-fache Regulation
----------	------------	--	---------------------	----------------------

Stärker exprimierte Gene: *pmt6/pmt6*–Wildtyp (2 Gene):

Zelluläre Abwehrmechanismen (1 Gen)

<i>SNZ1</i>	CA4184	stationary phase protein by homology	5,55	1,8
-------------	--------	--------------------------------------	------	-----

Metabolismus (1 Gen)

<i>HIS7</i>	CA2447	Histidine biosynthesis	0,92	1,69
-------------	--------	------------------------	------	------

Schwächer exprimierte Gene *pmt6/pmt6*–Wildtyp (46 Gene):

Metabolismus (21 Gene)

<i>RHR2</i>	CA5788	DL-glycerol phosphatase	0,92	0,43
<i>TPS3.3</i>	CA5505	alpha,alpha-trehalose-phosphate synthase, regulatory subunit, 3-prime end (by homology)	0,92	0,44
<i>PFK1</i>	CA1834	6-phosphofructokinase, alpha subunit	0,92	0,45
<i>IPF4959</i>	CA6057	D-xylulose reductase (by homology)	0,92	0,45
<i>TPI1</i>	CA5950	Triose phosphate isomerase	0,92	0,46
<i>GPM1</i>	CA4671	phosphoglycerate mutase (by homology)	0,92	0,46
<i>PFK2</i>	CA3112	6-phosphofructokinase, beta subunit	0,92	0,47
<i>PGK1</i>	CA1691	Phosphoglycerate kinase	0,92	0,47
<i>FBA1</i>	CA5180	fructose-bisphosphate aldolase (by homology)	0,92	0,48
<i>ERG16</i>	CA1387	cytochrome P450 lanosterol 14a-demethylase	0,92	0,49
<i>COX8</i>	CA2134	CYTOCHROME C OXIDASE (by homology)	0,92	0,49
<i>PDC11</i>	CA2474	Pyruvate decarboxylase (by homology)	0,92	0,50
<i>ADH1</i>	CA4765	alcohol dehydrogenase (by homology)	0,92	0,53
<i>URA1</i>	CA4745	dihydroorotate dehydrogenase	0,92	0,55
<i>PLB1</i>	CA1975	phospholipase B	0,92	0,56
<i>HXK2.3F</i>	CA0127	hexokinase II, 3-prime end (by homology)	0,92	0,58
<i>PGI1</i>	CA3559	Glucose-6-phosphate isomerase	0,92	0,58
<i>GAP1</i>	CA5892	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	0,92	0,61
<i>GPD1</i>	CA2263	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase (by homology)	0,92	0,62
<i>ADH2</i>	CA3923	alcohol dehydrogenase I (by homology)	0,92	0,63
<i>CAR2</i>	CA2561	ornithine aminotransferase (by homology)	0,92	0,65
<i>SUR2</i>	CA2225	Hydroxylation of C-4 of the sphingoid moiety of ceramide by homology	0,92	0,67

¹FDR: „false discovery rate“: Prozentsatz nicht-signifikant regulierter Gene

²q-Wert: Niedrigste FDR, bei der das Gen als „signifikant reguliert“ bezeichnet wird. Dieser Wert reflektiert die Variation unter den sechs Messwerten (ein niedriger Wert zeigt eine geringe Variation an).

Zelluläre Abwehrmechanismen (7 Gene)

IPF9550	CA4570	similar to <i>S. cerevisiae</i> Osm1p osmotic growth protein	0,921	0,435
HSP12	CA0627	Heat shock protein (by homology)	0,921	0,44
GPD2	CA0824	Glycerol 3-phosphate dehydrogenase (by homology)	0,921	0,55
SSA4	CA1230	cahsp70 mRNA for heat shock	0,921	0,59
IPF284	CA5463	unknown function	0,921	0,6
DAK2.3EOC	CA0311	dihydroxyacetone kinase, 3-prime end (by homology)	0,921	0,62
IPF6629	CA4127	unknown function	0,921	0,65

Unbekannte/ nicht klassifizierte (4 Gene)

IPF6235	CA2216	<i>C. albicans</i> Tca2 retrotransposon	0,921	0,48
IPF1980	CA5564	unknown function	0,921	0,64
IPF15540	CA0486	unknown function	5,55	0,65
IPF6238	CA2752	GAG protein of retrotransposon pCal	1,90	0,66

Proteinschicksal (Faltung, Modifizierung, Bestimmung) (4 Gene)

STF2	CA2738	ATP synthase regulatory factor (by homology)	0,92	0,58
CDC48	CA3333	Microsomal ATPase (by homology)	0,92	0,65
SNC2.EXON2	CA5257	Strong similarity to synaptobrevin, exon 2 (by homology)	3,49	0,66
PRD1	CA4059	Proteinase (by homology)	0,92	0,66

Transkription (3 Gene)

CAF16	CA3880	ABC ATPase (by homology)	0,92	0,66
IPF7289	CA3878	similar to <i>S. cerevisiae</i> Upc2p RNA polymerase II transcription factor	0,92	0,63
IPF7033	CA1212	unknown function	3,49	0,66

Proteinbiosynthese (2 Gene)

MRPS5	CA3526	Probable ribosomal protein S5, mitochondrial (by homology)	5,55	0,03
IPF4276	CA4260	similar to <i>S. cerevisiae</i> Mrpl32p putative mitochondrial ribosomal protein (by homology)	5,55	0,66

Umweltinteraktion (1 Gen)

ALS4.3F	CA1528	agglutinin-like protein, 3-prime end	0,92	0,32
---------	--------	--------------------------------------	------	------

Transport /Transporterleichterung/ Routen (1 Gen)

GLK1	CA0263	aldohexose specific glucokinase (by homology)	0,92	0,57
------	--------	---	------	------

Zelldifferenzierung (1 Gen)

¹FDR: „false discovery rate“: Prozentsatz nicht-signifikant regulierter Gene

²q-Wert: Niedrigste FDR, bei der das Gen als „signifikant reguliert“ bezeichnet wird. Dieser Wert reflektiert die Variation unter den sechs Messwerten (ein niedriger Wert zeigt eine geringe Variation an).

<i>IPF1217</i>	CA4834	unknown function	1,9	0,56
----------------	--------	------------------	-----	------

Zellzyklus und DNA Prozessierung (1 Gen)

<i>RNR22</i>	CA4492	ribonucleoside-diphosphate reductase (by homology)	3,49	0,49
--------------	--------	--	------	------

¹FDR: „false discovery rate“: Prozentsatz nicht-signifikant regulierter Gene

²q-Wert: Niedrigste FDR, bei der das Gen als „signifikant reguliert“ bezeichnet wird. Dieser Wert reflektiert die Variation unter den sechs Messwerten (ein niedriger Wert zeigt eine geringe Variation an).

Danksagung:

Ich danke Herrn Prof. Dr. J. F. Ernst für die Überlassung des interessanten Themas, die Betreuung, sowie für die vielen Anregungen und Ideen und insbesondere für seine Geduld während der gesamten Zeit dieser Arbeit.

Bei Herrn Prof. Dr. H. Bünemann möchte ich mich herzlich für die Übernahme des Korefferrats bedanken.

Ich danke allen jetzigen und ehemaligen Mitarbeitern des Instituts, insbesondere der AG Ernst und den „Mensagängern“ für die ausgesprochen gute Arbeitsatmosphäre, Hilfsbereitschaft und für die lustigen Unternehmungen.

Bernd Tebarth danke ich für die Zusammenarbeit beim Scannen der Microarrays.

Einen herzlichen Dank an Klaus Lengeler, Sven Kluge und Thomas Doedt für die Durchsicht des Manuskripts.

Ich danke meiner ganzen Familie und insbesondere meiner Mutter, für die finanzielle Unterstützung während meines Studiums.

Vielen herzlichen Dank an meine Frau Anke, die mir immer den Rücken freigehalten hat und meine schwankenden Stimmungen ertragen hat und einen extra Dank an meine Kinder Simon und Yannik, die mir immer wieder die wahren Prioritäten des Lebens vor Augen gehalten haben.

Erklärung:

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln und Quellen angefertigt habe. Sie wurde weder in dieser noch in einer ähnlichen Form bei einer anderen Institution vorgelegt.

Düsseldorf, Juni 2004

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht oder sind zur Veröffentlichung eingereicht:

Ernst, J.F. und Prill, S.K.-H. (2001)

O-Glycosylation

Med. Mycol. **39**: 67-74

Rouabhia, M., Schaller, M., Vecchiarelli, A., Prill, S.K.-H., Giasson, L. und Ernst, J.F. (2004)

Epithelial damage and virulence of the fungal pathogen *Candida albicans* requires the five isoforms of protein mannosyltransferases (Pmt proteins).

eingereicht bei Infect. Immun.

Weber, Y., Prill, S.K.-H. Prill und Ernst, J.F. (2004)

Stabilization of an essential secretory component in *Candida albicans* (Sec20p) by Pmt1/4p-mediated O-glycosylation.

eingereicht bei Eukar. Cell

Prill, S.K.-H., Klinkert, B., Timpel, C. and Ernst, J.F. (2004)

PMT gene family of the fungal pathogen *Candida albicans*: essential and non-essential functions of five protein mannosyltransferase-isoforms for growth, morphogenesis and antifungal resistance.

eingereicht bei J. Biol. Chem.