Dom34p als Regulator der Protein-*O*-Mannosylierung bei *Candida albicans*

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von Sven Kluge
aus Rheinberg

Düsseldorf, Februar 2006

Aus dem Institut für Mikrobiologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

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

Referent:	Prof. Dr. J. F. Ernst
Koreferent:	Prof. Dr. H. Bünemann
Tag der mündlichen Prüfung:	28.04.2006

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung 1

1.1 Der humanpathogene Pilz *Candida albicans* 1

1.2 Virulenzfaktoren von *C. albicans* 3
1.2.1. Dimorphismus 3
1.2.2 Adhäsion 5
1.2.3 Sekretion von Proteinen 6

1.3 Klinische Relevanz von *C. albicans* und Therapie von Candidosen 6

1.4 Die Zellwand von *C. albicans* 8

1.5 Glykosylierung 11
1.5.1 *O*-Glykosylierung 12
1.5.2 Die 5 Isoformen der Protein-*O*-mannosyltransferasen 13

1.6 *DOM34* - Duplication Of Multilocus Region 34 15

1.7 Zielsetzung 17

2. Material und Methoden 18

2.1 Chemikalien und Enzyme 18

2.2 Stämme und Medien 19
2.2.1 *E. coli* -Stamm 19
2.2.2 *C. albicans* -Stämme 19
2.2.3 *S. cerevisiae* -Stämme 20
2.2.4 Medien zur Anzucht von Hefen 21
2.2.6 Hypheninduktion von *C. albicans* in Flüssigmedium 21
2.2.7 Hypheninduktion von *C. albicans* auf festem Medium 21
2.2.8 Medium zur Bildung von Chlamydosporen 22
2.2.9 Medien mit verschiedenen Substanzen 22

2.3 Oligonukleotide und Plasmide 22
2.3.1 Synthetische Oligonukleotide 22
2.3.2 Plasmide 23

2.4 Präparation, Konstruktion und Analyse von Nukleinsäuren 24
2.4.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* 25
2.4.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus Hefen 25
2.4.3 Isolierung von Gesamt-DNA aus Hefen 25
2.4.4 Restriktionsbehandlung 25
2.4.5 Entfernen von 3'-überhängenden Enden 26
2.4.6 Auffüllen von 5'-überhängenden Enden 26
2.4.7 Dephosphorylierung von DNA 26
2.4.8 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen 26
2.4.9 Molekulargewicht- und Größenstandards 26
2.4.10 Konzentrationsabschätzung von Nukleinsäuren 26
2.4.11 Nachweis spezifischer Sequenzen über Southernblot-Analyse 27
2.4.12 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) 28

2.5 Transformation 28
2.5.1 Transformation von *E. coli* 28
2.5.2 Transformation von *S. cerevisiae* 28
2.5.3 Transformation von *C. albicans* 28

2.6 Analyse von Proteinen 29
2.6.1 Antikörper 29
2.6.2 Herstellung von Hefe-Rohextrakten 29
2.6.3 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford 30
2.6.4 Nachweis der Phosphorylierung von Proteinen 30
2.6.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) 30
2.6.6 Nachweis spezifischer Proteine durch Immunoblot-Analyse 31

2.7. DNA-Mikroarrays ... 31
2.7.1. Anzucht der Zellen ... 31
2.7.2 Präparation von RNA aus *C. albicans* ... 32
2.7.3 Synthese der Komplementär-DNA ... 32
2.7.4 Hybridisierung und Waschen der DNA-Mikroarrays ... 33
2.7.5 Scannen der DNA-Mikroarrays ... 33
2.7.6 Normalisierung und statistische Auswertung ... 34
2.7.7 Clusteranalysen ... 34

2.8 Zellwandanalyse ... 34
2.8.1 Isolierung von SDS extrahierten Zellwänden ... 34
2.8.2 Bestimmung des Mannoproteingehalts ... 35
2.8.3 Bestimmung des Chitingehalts ... 35
2.8.4 Bestimmung des Glukangehalts ... 35
2.8.5 Kohlenhydrat-Bestimmung mittels der Dubois Methode ... 36

2.9 Mikroskopische Untersuchungen ... 36

3. Ergebnisse ... 37

3.1 Sequenzvergleich von Dom34p ... 37

3.2 Disruption des *DOM34*-Gens ... 39
3.2.1 Konstruktion von *dom34*Δ-Mutanten ... 39
3.2.2 Rekonstitution des *URA3*-Gens an seinem nativen Locus ... 42

3.3 Phänotypische Charakterisierung der Mutanten ... 43
3.3.1 Wachstum der *dom34*Δ-Mutanten ... 43
3.3.2 Flokkulation ... 46
3.3.3 Zelloberflächenhydrophobizität ... 46
3.3.4 Morphogenese ... 47
3.3.5 Untersuchungen zur Sensitivität der *dom34*Δ-Mutanten ... 51
3.3.6 Überexpression von Dom34p ... 55
3.3.7 Komplementation von *pmt1*Δ-Phänotypen durch Dom34p ... 56

3.4 Phänotypen von *pmt*-Mutationen im *dom34*Δ/*dom34*Δ-Stammhintergrund ... 57
3.4.1 Konstruktion der *pmt*Δ-Mutanten im *dom34*Δ/*dom34*Δ-Stammhintergrund ... 57
3.4.2 Phänotypische Analysen der *dom34*Δ/*dom34*Δ *pmt*Δ/*PMT*-Mutanten ... 58

3.5 Analyse der Zellwand der *dom34*Δ-Mutanten ... 61

3.6 Einfluss der *dom34*-Deletion auf die *O*-Glykosylierung von Substraten der Protein-*O*-mannosyltransferasen aus *C. albicans* ... 62
3.6.1 Rbt5p/ Rbt51p ... 62
3.6.2 CaPir1p ... 63
3.6.3 Als1p ... 64

3.7 Phosphorylierungsstatus von Dom34p ... 65

3.8 Genomweite Transkriptanalyse ... 69
3.8.1 Einfluss der *dom34*Δ-Mutante auf das Transkriptom von *C. albicans* ... 76
3.8.2 Einfluss der *pmt1*Δ-Mutante auf das Transkriptom von *C. albicans* ... 77
3.8.3 Einfluss der *dom34*Δ *pmt1*Δ-Mutante auf das Transkriptom von *C. albicans* ... 79

4. Diskussion ... 81

4.1 Die Deletion von *DOM34* verursacht diverse Phänotypen ... 81
4.1.1 Suppression des Wachstumsdefekts einer *pmt1*Δ-Mutante durch *dom34*Δ ... 81
4.1.2 Sensitivitäten einer *dom34*Δ-Mutante ... 82
4.1.3 Einfluss der *dom34*-Deletionen auf die Hyphenmorphogenese und Chlamydosporenbildung ... 83
4.1.4 Die Überexpression von *DOM34* verursacht elongierte Zellen und eine verstärkte Pseudohypheninduktion ... 84

4.2 Einfluss einer *dom34*Δ-Mutation auf die Zelloberfläche ... 84

4.3 Substrate von Pmt1p zeigen in der Doppeldeletionsmutante eine veränderte *O*-Glykosylierung ... 85

4.4 Dom34p ist phosphoryliert ... 86

4.5 Der Einfluss der *dom34*Δ-Mutation auf das Transkriptom von *C. albicans* 87
4.6 Wirkung von *dom34*Δ auf heterozygote *pmt*-Mutationen 88
4.7 Modell 90

5. Zusammenfassung 93

6. Literaturverzeichnis 94

7. Abkürzungsverzeichnis 107

8. Anhang 110

1. Einleitung

Pilze „begleiten“ den Menschen schon seit langer Zeit, sei es in wirtschaftlicher oder medizinischer Hinsicht. Einerseits haben die Menschen sich Pilze zu Nutzen gemacht, wie beispielsweise den Hefepilz *Saccharomyces cerevisiae* zur Produktion von Brot und Bier. Dem berühmten Roquefort- bzw. Camembertkäse verleihen die Pilze *Penicillium roqueforti* bzw. *Penicillium camemberti* ihren typischen Geschmack. Verschiedene Antibiotika werden von Pilzen produziert. Andererseits können Pilze Mykosen auslösen, welche im Extremfall tödlich verlaufen. Von den heutzutage bekannten mehr als 200.000 Pilzarten nutzen nur etwa 300 Arten den Menschen als Wirtsorganismus. Allerdings verursachen weniger als ein Dutzend mehr als 90 % aller Infektion (Edmond *et al*., 1999).

1.1 Der humanpathogene Pilz *Candida albicans*

Der humanpathogene Pilz *Candida albicans* ist das Musterbeispiel eines fakultativ pathogenen Erregers: als Kommensale besiedelt er häufig den menschlichen Körper. Erst wenn bestimmte Bedingungen, wie eine reduzierte Immunabwehr, die lokale- oder systemische Ausbreitung des Pilzes fördern, kommt es zu einer Erkrankung des Menschen. *C. albicans* wird im Boden, im Wasser und auf Früchten gefunden. Er besiedelt aber auch tierische Organismen und den Menschen. Man erkennt seine Kolonien an der weißen, glatten Oberfläche, der er auch seinen Namen zu verdanken hat (*lat*.: candidus - glänzend weiß; *lat*.: albicare - weiß sein/ werden). Im gesunden Menschen besiedelt *C. albicans* als Kommensale den Gastrointestinal- und Oraltrakt, dabei ist der Ösophagus besonders betroffen. In 30 bis 40 % aller Menschen können *Candida*-Isolate im Darm und bei über 50 % auf der Mundschleimhaut isoliert werden (McCullogh *et al.*, 1996). Die Übertragung erfolgt in der Regel bei der Geburt von der Mutter auf das Kind. Mehr als 70 % aller Frauen haben mindestens einmal in ihrem Leben eine vulvo-vaginale Pilzinfektion (Candidose), 20 % der Frauen sogar mehrfach (Fidel *et al.*, 1999). Oberflächenmykosen sind heutzutage relativ leicht therapierbar, systemische Infektionen dagegen verlaufen in mehr als 50 % der Fälle tödlich (Wey *et al.*, 1988).

Der Pilz *C. albicans* weist eine starke phylogenetische Verwandschaft zu den Ascomyceten (Schlauchpilze) auf; besonders zu der Gattung *Saccharomyces* (Peterson, 2000). Dies macht sich auf der Ebene der Nukleotidsequenzen, beispielsweise der 5S rRNA (Chen *et al.*, 1984) oder der 16S rRNA (Peterson, 2000), des GC-Gehalts des Genoms und der geringen Divergenz zwischen den Proteinen beider Spezies bemerkbar (Odds, 1988; Hendriks *et al.*, 1991). Aufgrund der relativ engen Verwandschaft ist es möglich, *C. albicans*-Gene mit Hilfe einer Komplementation von auxotrophen *S. cerevisiae*-Stämmen oder durch ein Analyse von Genbank-Bibliotheken unter Berücksichtigung der Homologie zu den sogenannten ORFs (Open Reading Frame - offener Leserahmen) von *S. cerevisiae* zu identifizieren und zu isolieren (Scherer und Magee, 1990). Doch gerade die Unterschiede zwischen pathogenen *Candida*-Spezies und dem apathogenen Pilz *S. cerevisiae* könnten für die Pathogenität von *C. albicans* wichtig sein und stellen einen interessanten Ansatz zur Aufklärung der Pathogenität dar (Gow, 1997). *C. albicans* ist polymorph und verändert seine Gestalt als Antwort auf

externe Reize. Durch beispielsweise eine Erhöhung der Temperatur, des pH-Wertes oder durch Anreicherung des Kulturmediums mit Serum kann *in vitro* aus der ellipsoiden Hefeform eine filamentöse Wachstumsform induziert werden (siehe 1.2.1). *C. albicans* besitzt ein diploides Genom, welches auf zweimal 8 Chromosomen verteilt ist. Die Chromosomen wurden von 1 bis 7, abhängig von ihrer Größe, nummeriert. Auf dem größten Chromosomenpaar sind die rRNA-Gene lokalisiert, weshalb es als R bezeichnet worden ist. Das haploide Genom von *C. albicans* ist etwa 15,5 Megabasenpaare groß (Doi *et al.*, 1992). Wie oben angedeutet, wird *C. albicans* als diploider Organismus betrachtet. Bisher konnte weder Meiose, noch Sporulation oder haploide Wachstumsformen nachgewiesen werden. Ein sexueller Fortpflanzungszyklus scheint zu fehlen (Odds, 1988; Scherer und Magee, 1990). Die komplette Genomsequenz von *C. albicans* wurde mittlerweile sequenziert und publiziert (http://www-sequence.stanford.edu/group/candida). Weiterhin existieren verschiedene annotierte Datenbanken, die weltweit Wissenschaftler nutzen und die ein sehr wichtiges Hilfsmittel für die Forschung darstellen: (http://www-sequence.stanford.edu/group/candida; http://genolist.pasteur.fr/CandidaDB oder auch http://candida.bri.nrc.ca/candida/index.cfm). Mittels Sequenzvergleichen konnten in *C. albicans* Gene identifiziert werden, die eine hohe Homologie zu dem *MAT*-Paarungstyp-Locus von *S. cerevisiae* aufweisen (Hull und Johnson, 1999). Es konnte gezeigt werden, dass sowohl *in vivo*, als auch *in vitro C. albicans*-Stämme, welche durch spezielle genetische Manipulationen homozygot für den *MTL*-Locus (*MTL***a** oder *MTL*α) waren, miteinander fusionieren konnten (Hull *et al.*, 2000; Magee und Magee, 2000; Lachke *et al.*, 2003). Diese Ergebnisse und die Tatsache, dass es auch haploide *Candida*-Arten gibt (z.B. *C. guilliermondii* oder *C. glabrata*), fördern die Diskussionen über einen kryptischen Vermehrungszyklus bei *C. albicans* (Suzuki *et al.*, 1986). Da bis heute die für eine geregelte sexuelle Vermehrung nötige Meiose nicht nachgewiesen werden konnte, wird *C. albicans* zu den Deuteromyceten (imperfekte Pilze) gezählt.

Das diploide Genom des Pilzes *C. albicans* erschwert die genetischen Analysen. Die klassischen Methoden der Rückkreuzung, der Mutations- oder der Sporenanalyse stehen daher nicht zur Verfügung. Für Mutationsanalysen ist es meist notwendig, beide Allele eines Genes zu deletieren, da die Deletion eines der beiden Allele häufig nur in einer rezessiven Mutation resultiert; es wird kein Phänotyp ausgebildet. Zur Disruption des gewünschten Gens stehen neben der klassischen „URA-Blaster"-Methode (Fonzi und Irwin, 1993) mit anschließender Selektion auf FOA (5-Fluoro-Orotic Acid) weitere Methoden zur Verfügung. Von Morschhäuser *et al.* (1997) wurde die „URA-Flipper"-Methode entwickelt, welche zur gezielten Induktion der intrachromosomalen Rekombination eine Rekombinase unter der Kontrolle eines regulierbaren Promotors verwendet. Des Weiteren existieren verschiedene Methoden, bei denen mit PCR-generierten Disruptionsfragmenten, welche verschiedene Auxotrophiemarker enthalten, gearbeitet wird (Wilson *et al.*, 1999 und 2000). Zur Selektion von Transformanten nach erfolgter Gendisruption, aber auch zur Transformation von Stämmen mit Plasmiden werden die rezessiven Marker *URA3*, *LEU2* und *ADE2* zur Komplementation entsprechender auxotropher Mutanten genutzt (Kelly *et al.*, 1987; Kelly *et al.*, 1988; Kurtz *et al.*, 1987). Zur Transformation von prototrophen Stämmen können auch dominante Marker, wie *IMH3* eingesetzt werden (Beckerman *et al.*, 2001). Ein größeres Problem stellt der veränderte, ungewöhnliche Kodon-Gebrauch bei *C. albicans* dar. Während das Kodon CUG in anderen Pilzen bei der Proteinbiosynthese in Leucin translatiert wird,

übersetzt *C. albicans* dieses Basentriplett in die Aminosäure Serin (Leuker und Ernst, 1994; Santos und Tuite, 1995). Hierdurch wird insbesondere die Expression heterologer Reportergene erschwert. Dies führt dazu, dass viele heterologe Gene erst nach einer Kodonoptimierung funktionell exprimiert werden. Dennoch stehen mittlerweile diverse Reportergene zu Verfügung, wie zum Beispiel das Luziferase-Gen *RLUC* (*Renilla reniformis*), das *GFP*-Gen (*Aequorea victoria*) oder auch das *lacZ*-Gen (*Streptococcus thermophilus*). Die Reportergene wurden ob des ungewöhnlichen Kodongebrauchs von *C. albicans* entweder daran angepasst (beispielsweise das *GFP*-Gen) oder besitzen gar kein CUG-Kodon. Neben den verschiedenen Reportergenen stehen auch regulierbare Promotoren zur Verfügung. Der *CaPCK1*-Promotor, welcher bei Anwesenheit von Glukose reprimiert und bei nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquellen stark induziert ist, eignet sich insbesondere zur Überexpression eines Gens (Leuker *et al.*, 1997). Auch der *MAL2*-Promotor von *C. albicans* wird durch die vorhandene Kohlenstoff-Quelle reguliert (Brown *et al*., 1996; Backen *et al*., 2000). Zur Untersuchung des Einflusses bereits geringer Mengen eines Genproduktes und zur Analyse essentieller Gene eignet sich besonders der Promotor des *MET3*-Gens, da er eine sehr niedrige Basalaktivität aufweist. Die Expression eines essentiellen Gens unter der Kontrolle des *MET3*-Promotors kann durch Zugabe von Methionin und Cystein soweit reduziert werden, dass die Zellen nicht mehr wachsen (Care *et al.*, 1999). Im Jahr 2000 wurde der *tet*-Promotor von Nakayama *et al.* erstmals beschrieben. Dieser ist dazu geeignet, die Expression eines Gens auch im Tiermodell zu regulieren. Es kann durch Zugabe des Antibiotikums Doxycyclin die Expression eines unter Kontrolle des *tet*-Promotors stehenden Gens im Tier inhibiert werden.

1.2 Virulenzfaktoren von *C. albicans*

Eine Candidose ist durch eine dynamische Interaktion zwischen der Wirtsabwehr und den *Candida*-Virulenzfaktoren charakterisiert. Anders als bei einigen obligat pathogenen Bakterien, für deren Virulenz oft nur ein Mechanismus verantwortlich ist, scheint die Pathogenität von *C. albicans* durch eine Vielzahl von Faktoren bedingt zu sein (Navarro-Garcia *et al.*, 2001). Im Folgenden werden die verschiedenen Virulenzfaktoren näher beschrieben.

1.2.1. Dimorphismus

Der Dimorphismus von *C. albicans* gilt als der wichtigste Virulenzfaktor. Er bezeichnet die Fähigkeit des Pilzes, einerseits als kugelige Blastokonidie und andererseits als filamentöse Hyphe zu wachsen (Odds, 1988). Die kugelige Blastokonidie vermehrt sich durch Abknospung einer Tochterzelle von der Mutterzelle. Diese trennt sich, nachdem sie auf eine gewisse Größe herangewachsen ist von der Mutterzelle und kann dann ihrerseits knospen (Abbildung 1.1). Bei den filamentösen Zellen unterscheidet man zwischen echten Hyphen und so genannten Pseudohyphen (Abb. 1.1). Echte Hyphen entstehen durch das kontinuierliche apikale Wachstum eines Keimschlauches, welcher 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). Neben der Hefeform und den beiden filamentösen Formen kommt eine weitere charakteristische Wachstumsform vor, die Chlamydosporen (Abbildung 1.1). Es wird

diskutiert, dass diese dickwandigen Zellen, welche meist terminal aus pseudohyphalen Suspensorzellen entstehen und eine Größe von bis zu 17 µm aufweisen, eine Überdauerungsform darstellen (Joshi *et al.*, 1993; Montazeri und Hedrick, 1984). Die Hyphenbildung kann durch eine Vielzahl von Wachstumsbedingungen induziert werden. Zum einen durch Hungerbedingungen auf so genanntem „Spider"- oder „Lee's"- Medium und zum anderen durch starke positive Stimuli wie *N*-Acetylglukosamin, Serum oder Prolin bei gleichzeitiger Temperaturerhöhung auf 37 °C (Ernst, 2000). Ebenfalls wird die Hyphenbildung durch einen neutralen pH-Wert (Buffo *et al.*, 1984) oder Sauerstofflimitierung, sowie die Einbettung in eine Matrix gefördert (Riggle *et al.*, 1999). Es wird angenommen, dass die hyphale Form die invasive Form darstellt, da bekannt ist, dass Hyphen besser in der Lage sind, an Epithelien zu binden und sie zu durchwachsen (Hostetter, 1994; Weide und Ernst, 1999). Da die filamentösen Formen von *C. albicans* einen höheren Anteil an hydrophoben Zellwandbestandteilen im Vergleich zur Blastokonidie aufweisen, ist die Adhäsion dieser morphologischen Form bevorteilt. Aber auch die Penetration von Geweben und Zellen erfolgt durch die Hyphenform. So ist *C. albicans* in der Lage, nach Phagocytose durch Makrophagen der Wirtsabwehr, die Zellen zu disruptieren und aus diesen herauszuwachsen (Vazquez-Torres und Balish, 1997). Der Hefeform wird dagegen eine Funktion bei der Besiedelung von Geweben und der Verbreitung im Wirt mittels des Blutsystems zugesprochen, da sie durch Knospung in der Lage ist, sich schnell zu vermehren (Odds, 1994; Cutler, 1991). Am Ort der *Candida*-Infektionen werden sowohl Blastokonidien, als auch Pseudohyphen und Hyphen gefunden (Odds, 1988). Alle drei Wachstumsformen scheinen am Infektionsgeschehen beteiligt zu sein. Allerdings scheint die Befähigung zum filamentösen oder dimorphen Wachstum keine zwingende Vorraussetzung für die Pathogenität von Pilzen zu sein. Es existieren sowohl dimorphe Pilze wie beispielsweise *S. cerevisiae*, die apathogen sind, aber auch pathogene Pilze wie *C. glabrata* und *Cryptococcus neoformans*, die im infizierten menschlichen Wirt nicht in der Hyphenform wachsen können (Odds, 1988; Gimeno *et al.*, 1992). Es konnten mittlerweile allerdings auch filamentöse Formen, wenn auch nicht im Menschen, nachgewiesen werden (Csank und Haynes, 2000; Wickes *et al.*, 1996). Für die Virulenz von *C. albicans* ist der Dimorphismus von entscheidender Bedeutung. Verdeutlicht wird diese Tatsache durch Mutanten, die nicht mehr in der Lage sind filamentös zu wachsen; sie sind im Tiermodell avirulent (Lo *et al.*,

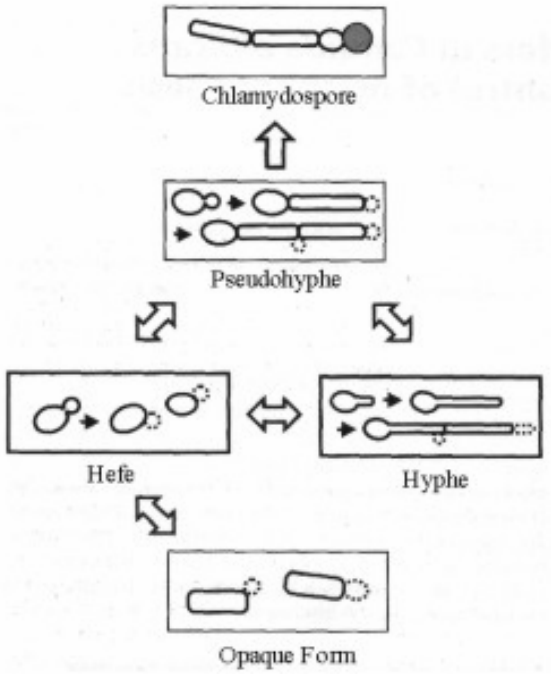


Abb. 1.1: Morphologische Formen von *C. albicans* und deren Entstehung (entnommen aus: Ernst, 2000). Tochterzellen sowie Regionen der Zellexpansion sind als gestrichelte Linien dargestellt.

1997). Wie in Abbildung 1.1 zu erkennen ist, zeigt *C. albicans* eine weitere morphologische Form. Bestimmte *C. albicans* Stämme sind in der Lage einen spontanen Phänotypwechsel („phenotypic switching") von einer als „opaque" bezeichneten stäbchenförmigen Zellform zu einer „white" Form durchzuführen. Die „opaque"-Zellen besitzen eine rauhe Koloniedoberfläche, während die „white"-Form die typische Hefeform mit glatter Oberfläche darstellt (Rikkerink *et al.*, 1988). Die mit diesem Phänomen einhergehende Antigenvariation des Pilzes behindert eine Antwort des Immunsystems und stellt somit wahrscheinlich einen weiteren Virulenzfaktor dar (Slutsky *et al.*, 1985).

1.2.2 Adhäsion

Der erste Schritt einer Candidose zeichnet sich durch die Anheftung (Adhäsion) von *C. albicans* an die Wirtsepithelien aus. Erst dann können eine erfolgreiche Kolonisation, die Infektion des Wirtes und die anschließende transepitheliale Migration erfolgen (Zink *et al.*, 1996; Weide und Ernst, 1999).

Die im Vergleich zu apathogenen Pilzen hohe Hydrophobizität der Oberfläche von *C. albicans* fördert die Adhäsion an die Wirtsoberfläche (Mc Cullough, 1996). Dabei ist die Hydrophobizität abhängig von Struktur und Menge von Oligomannosen, welche an der Zelloberfläche präsentiert werden (Masuoka und Hazen, 1999). Weiterhin existiert neben dieser unspezifischen Oberflächeneigenschaft die spezifische Adhäsion. Diese wird durch spezielle Rezeptoren, den so genannten Adhäsinen, vermittelt (Calderone und Braun, 1991). Dabei handelt es sich um spezielle Proteine, welche spezifisch an Oberflächenbestandteile der Wirtsepithelien binden und in drei Kategorien eingeteilt werden können. Bei der ersten Kategorie handelt es sich beispielsweise um Integrin-ähnliche Proteine, welche mit der extrazellulären Matrix der Säugerzelle interagieren. Es konnte gezeigt werden, dass mittels dieser Adhäsine eine nicht-kovalente Anheftung beispielsweise an die Matrixproteine Fibronectin (Skerl *et al.*, 1984; Negre *et al.*, 1994), Laminin (Bouchara *et al.*, 1990; Lopez-Ribot *et al.*, 1996) oder auch Fibrinogen (Casanova *et al.*, 1992) erfolgen kann. Die Bindung erfolgt zwischen einem mannosylierten *C. albicans*-Protein und dem Proteinanteil eines Glykoproteins der Wirtszelle. Die Bindung an die Zuckerreste eines Glykoproteins der Wirtszelle wird durch die Adhäsine der zweiten Kategorie vermittelt. Dabei erfolgt die Anheftung Lektin-ähnlich an der Zelloberfläche. Die erkannten Zuckerstrukturen der Glykoproteine der Wirtszelle sind zum Beispiel Fukose, *N*-Acetylglukosamin oder die Blutgruppenantigene der Wirtsoberfläche (Brassart *et al.*, 1991; Cameron und Douglas, 1996). In der dritten Kategorie der Adhäsine, welche die größte Gruppe der bisher identifizierten Adhäsine darstellt, finden sich GPI- (Glykosylphosphatidylinositol) abhängige Zellwandproteine (Sundstrom, 2002). Diese Zellwandproteine sind am Carboxy-terminalen Ende über den Rest eines GPI-Ankers an das Glukangerüst der Zellwand (siehe 1.4) gebunden (Staab *et al.*, 1999; Fu *et al.,* 1999; Hoyer, 2001). Die Bindung an die Bestandteile der Wirtsoberfläche wird über das Amino-terminale Ende der Proteine vermittelt. In diese Kategorie gehören beispielsweise Hwp1p, die Proteine Als1p, Als5p (Fu *et al.*, 1999), Als3p (Hoyer *et al.*, 1998) und möglicherweise auch Int1p. Das Zellwandprotein Hwp1p stellt über eine wirtseigene Transglutaminase eine kovalente Bindung zum Wirtsepithel her (Staab *et al.*, 1999). Bei Int1p handelt es sich um ein zellwandassoziiertes-, dem Integrin ähnliches Protein, dessen Deletion einen nahezu vollständigen Verlust der Virulenz verursacht (Gale *et al.*,

1998). Die Als-Proteinfamilie besteht laut Sheppard *et al.* (2004) aus mindestens acht Mitgliedern. Diese Proteine zeigen typische Merkmale sekretierter Proteine. Weiterhin konnte für Als1p gezeigt werden, dass es sowohl *N*-, als auch und *O*-glykosyliert vorliegt (Kapteyn *et al.*, 2000). Es bleibt also festzuhalten, dass die Adhäsion auf eine Wechselwirkung zwischen glykosylierten Oberflächenproteinen von *C. albicans* und Oberflächenmerkmalen der Wirtzzelle zurückzuführen ist. Es konnte bereits vor einigen Jahren gezeigt werden, dass bei bestimmten Glykosylierungsmutanten, wie beispielsweise *Capmt1*Δ oder *Camnt1*Δ eine reduzierte Virulenz und verminderte Adhäsion auftritt (Timpel *et al.*, 1998; Buurman *et al.*, 1998; Ernst und Prill, 2001). Dies veranschaulicht die Bedeutung der Glykosylierung bei der Virulenz von *C. albicans*. Ein weiterer Aspekt der *C. albicans*-Adhäsion ist der der Biofilmausbildung. Dabei adhärieren *C. albicans*-Zellen, bestehend aus Hefe- und Hyphenzellen, an künstlichen, glatten Oberflächen wie beispielsweise Kunststoffen (Kumamoto, 2002). Diese Biofilme werden häufig auf implantierten Kathetern gebildet (Douglas, 2003) und stellen für die moderne Medizin ein immer wichtiger werdendes Problem dar (Ramage *et al.*, 2001).

1.2.3 Sekretion von Proteinen

Neben den Virulenzfaktoren erreicht *C. albicans* sein vollständiges pathogenes Potential erst durch die Fähigkeit sekretorische Peptide bzw. Proteine zu sekretieren (Matthews, 1994). Dazu gehören Siderophore (Sweet und Douglas, 1991; Heymann *et al.*, 2002), Phosphatasen (Csank *et al.*, 1997), Phopholipasen (Ghannoum *et al.*, 2000) und *N*-Acetylglukosaminidasen (Molloy *et al.*, 1994). Weiterhin sekretiert *C. albicans* Proteine der *SAP*-Genfamilie, deren zehn Mitglieder *SAP1-SAP10* für saure Aspartatproteasen kodieren (Hube *et al.*, 1994; Hube *et al.*, 1997). Die Proteasen sind in der Lage, das menschliche Gewebe zu schädigen, wodurch Wirtszellbarrieren während der Invasion zerstört werden und es dem Pilz erleichtert wird, tiefere Gewebeschichten zu penetrieren (Colina *et al.*, 1996; Morschhäuser *et al.*, 1997). Vermutlich spielen sie auch eine Rolle bei der Degradation von Wirtsproteinen für die Nährstoffbereitstellung und die Eliminierung von Immunglobulinen und Komplementmolekülen des menschlichen Abwehrmechanismus (Kaminishi *et al.*, 1995). Im zeitlichen Verlauf einer Gewebeinvasion werden unterschiedliche *SAP*-Gene exprimiert (Schaller *et al.*, 2000; Schaller *et al.*, 2001). Dies geschieht bei einigen *SAP*-Genen in Anpassung an die verschiedenen Umweltbedingungen durch eine pH-Wert-abhängige Regulation. Einige der *SAP*-Gene werden vermehrt bei oberflächlichen- (*SAP1-3*), andere bei systemischen Mykosen (*SAP4-6*) exprimiert (Schaller *et al.*, 2001). Es konnte gezeigt werden, dass Stämme, bei denen einzelne oder mehrere *SAP*-Gene deletiert wurden, eine reduzierte Virulenz aufwiesen (Korting *et al.*, 2003; Hube *et al.*, 1997).

1.3 Klinische Relevanz von *C. albicans* und Therapie von Candidosen

Wie einleitend erwähnt, besiedelt *C. albicans* den menschlichen Körper als Kommensale. Zu einer Candidose kommt es erst, wenn bestimmte Faktoren, wie beispielsweise eine gestörte bzw. reduzierte Immunabwehr oder eine Grunderkrankung des Patienten diese fördern. Innovative Möglichkeiten der Organtransplantation durch Immunsuppression, aber auch Stoffwechselerkrankungen wie Diabetes mellitus oder Adipositas, langfristige Therapien mit Antibiotika, Kortikosteroiden und Zytostatika und Immunmangelsyndrome, wie AIDS und

Leukämie (Bodey, 1993; Matthews, 1994; Morschhäuser *et al.*, 1997) steigern die Infektionsraten durch opportunistische Pathogene, wie *C. albicans*. Candidosen werden in superficielle- (oberflächliche) und systemische Candidosen unterschieden. Systemische Candidosen sind gekennzeichnet durch den Übertritt des Pilzes in das Blutgefäßsystem und die anschließende Besiedelung innerer Organe des Patienten. In Deutschland werden 80 % aller Mykosen durch *Candida*-Spezies ausgelöst (Pfaller, 1996). Hierbei hat sich die Anzahl an Neuerkrankungen innerhalb eines Zeitraums von 10 Jahren verdoppelt (Edmond *et al.*, 1999). Obwohl Spezies wie *C. glabrata* und *C. krusei* in den letzten Jahren an klinischer Bedeutung hinzugewonnen haben, ist *C. albicans* mit etwa 50 % der immer noch am häufigsten isolierte *Candida*-Erreger (Viscoli *et al.*, 1999; Pfaller *et al.*, 1999). Als Grund für die steigende Inzidenz der „Nicht-Albicans"-Arten wird die Selektion von weniger empfindlichen Spezies unter dem Druck von Antimykotika wie zum Beispiel Fluconazol diskutiert (Marr *et al.*, 2000).

Während oberflächliche Mykosen relativ leicht therapierbar sind, verlaufen systemische Infektionen unbehandelt zur Sepsis und zeigen eine Mortalität von 35 % (Fridkin und Jarvis, 1996). In Deutschland sind jährlich etwa 8.000-10.000 Todesfälle auf *Candida*-Infektionen zurückzuführen (Morschhäuser *et al.*, 1997). Zu den Hauptrisikofaktoren einer systemischen *Candida*-Infektion gehören Malignome, bauchchirurgische Eingriffe, Diabetes mellitus sowie HIV-Infektionen (Kao *et al.*, 1990). Es kann bei rund 90 % aller mit dem HI-Virus infizierten Patienten eine orale und im weiteren Krankheitsverlauf auch oft systemische Candidose diagnostiziert werden (Greenspan, 1996). Bei einer systemischen Candidose werden vor allem die Leber und die Niere durch die Besiedlung durch *C. albicans* stark geschädigt. Es wurde ermittelt, dass multiples Organversagen eine häufige Todesursache der Betroffenen darstellt (CDC {Centers for Disease Control and Prevention}, Department of Health and Human Services, http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/candidiasis_t.htm, November 2005). Die Manifestation einer systemischen Candidose stellt eine typische Sekundärerkrankung hospitalisierter Patienten dar (Ashman, 1998). Mittlerweile steht *C. albicans* an der vierten Stelle der nosokomialen Blutkeime (CDC, Department of Health and Human Services, November 2005). Aufgrund dieser enormen klinischen Bedeutung ist es nötig, neue Angriffspunkte für Antimykotika zu finden. Die Gemeinsamkeiten von humanen Zellen und dem Pilz *C. albicans* als eukaryotische Zelle reduziert die Anzahl möglicher Zielorte für eine antimykotische Therapie. Die Ähnlichkeit zwischen beiden Organismen ermöglichte die Entwicklung nur weniger pilzspezifischer Substanzen. Eine Wirkstoffgruppe mit breitem Wirkungsspektrum bilden die Polyene. Ihr gehören die fungiziden Substanzen Amphotericin B und Nystatin an. Durch Bindung und Oligomerisierung der pilzspezifischen Membrankomponente Ergosterol wird die Membran der Pilze permeabilisiert, was letztendlich durch den Verlust von Ionen zum Zelltod führt (Groll *et al.*, 1998). Die Applikation von Amphotericin B darf wegen starker Nebenwirkungen, wie Leber- und Nierenschädigungen und weiteren Kontraindikationen (z.B. Schwangerschaft) nur parental und in geringen Dosen erfolgen, weshalb der Einsatz der Polyene bei systemischen Mykosen deutlich eingeschränkt ist (Jehn, 1997). Die Nephrotoxizität konnte durch die Darreichung in Liposomen reduziert werden (Hartsel und Bolard, 1996). Alle Azole, welche aufgrund ihrer fungistatischen Wirkung meist nur bei lokalen Infektionen angewandt werden, inhibieren die Synthese des Ergosterols. Hierbei wird das zu den Cytochromen P450 gehörende Enzym

Erg11p, welches durch Demethylierung von Lanosterol das Ergosterol bildet, inhibiert. Dieses führt zu einer Anhäufung toxischer Sterolderivate in der Zellmembran (Tuite, 1992). Zur therapeutischen Verwendung stehen beispielsweise Imidazolderivate wie Clotrimazol, Fluconazol oder Ketoconazol zur Verfügung. Auch die Azole zeigen starke Nebenwirkungen (Coukell und Brogden, 1998). Eine relativ neue und für den Menschen sehr gut verträgliche Gruppe von Antimykotika ist die Gruppe der Candine (Echinocandine und Pneumocandine). Candine hemmen irreversibel die pilzspezifische β1,3-Glukansynthase, welche das β1,3-Glukan, den Hauptbestandteil der Zellwand, synthetisiert (DiDomenico, 1999). Das erste Echinocandin, welches Marktreife erreichte und 2002 als Medikament zugelassen wurde, ist das aus dem Pilz *Glarea lozoyensis* isolierte Caspofungin. Das Nikkomycin wirkt als Substratanalogon zu UDP-*N*-Acetylglukosamin und verhindert eine Synthese des Zellwandbestandteils Chitin durch Inaktivierung der Chitinsynthasen (DiDomenico, 1999). Einen anderen Wirkungsbereich besitzt 5-Fluorocytosin, ein Nukleosid-Analogon, das in der Pilzzelle zu 5-Fluorouracil desaminiert wird. Infolge von Interferenz mit dem Pyrimidinmetabolismus hemmt dieser Metabolit die RNA- und Proteinbiosynthese (Georgopapadakou und Walsh, 1994). Da es in Säugetierzellen kaum zur Desaminierung von 5-Fluorocytosin kommt, weist diese Substanz eine verhältnismäßige Wirksamkeit gegenüber Pilzen auf.

Der oft langfristige prophylaktische Einsatz von Antimykotika, insbesondere von 5-Fluorocytosin und Azolen in der Medizin hat zur Entwicklung von fungizidresistenten *C. albicans*-Stämmen geführt (White *et al*., 1998; van den Bossche *et al*., 1994). Eine 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.*, 1994; Sanglard *et al.*, 1997). Durch Mutationen kann die Affinität zum Antimykotikum stark inhibiert werden. Ferner kann eine Überexpression des Gens *ERG11*, das für die Lanosteroldemethylase kodiert, zur Resistenz des Keimes führen (Sanglard *et al.*, 1998). Janbon *et al*. zeigten 1998, dass die Selektion von resistenten Mutanten auf Medien, die Fluconazol enthalten zu einer veränderten Chromosomenzahl führt. Die Veränderung der Chromosomenzahl kann in der Kopienzahlerhöhung von resistenzvermittelnden Genen resultieren (Marichal *et al.*, 1997).

1.4 Die Zellwand von *C. albicans*

Die strukturelle Integrität der Hefezelle wird durch die Zellwand gewährleistet. Bei ihr handelt es sich nicht um eine starre Struktur, sondern um ein elastisches Gebilde, welches der Zelle ihre Form gibt und sie vor osmotischen- und physischen Umwelteinflüssen schützt (Shepherd 1987; Chaffin *et al.*, 1998). Ihre Biogenese wird in Abhängigkeit vom Zellzyklus und den Umweltbedingungen, wie Stresssituationen reguliert. Dieses wird mittels unterschiedlicher Signaltransduktionswege gewährleistet (Smits *et al.*, 2001). Unter pharmazeutischen Gesichtspunkten ist die Zellwand pathogener Hefen von besonderer Relevanz, da sie sich in ihrem Aufbau wesentlich von der extrazellulären Matrix von Säugetieren unterscheidet und somit ein exzellentes Ziel für die Entwicklung neuer fungizider Substanzen darstellt.

Die Zellwand der apathogenen Hefe *S. cerevisiae* und der pathogenen Hefe *C. albicans* ist sich in ihrem Aufbau sehr ähnlich. Sie bestehen aus den gleichen Makromolekülen: Glukane (β1,3- und β1,6-glykosidisch verknüpft), Chitin und Mannoproteine. Aus diesem Grund wird die *S. cerevisiae*-Zellwand oft als Modell für das Studium der Zellwand in *C. albicans* verwendet (Chaffin 1998; Klis *et al.*, 2002). In Tabelle 1.1 ist die Zusammensetzung der Zellwand von *S. cerevisiae* und *C. albicans* dargestellt. Die Zellwände der Hefen unterscheiden sich vornehmlich beim Anteil an Mannoproteinen und β1,6-Glukan (Tab. 1.1). In *S. cerevisiae* findet man einen höheren Anteil an Mannoproteinen als in der Zellwand von *C. albicans*. Der Glukan-Anteil der Zellwand ist in der pathogenen Hefe *C. albicans* im Vergleich zu *S. cerevisiae* deutlich erhöht, was auf den um 15 % höheren Anteil von β1,6-Glukan zurückzuführen ist (Tab. 1.1). Bei der Menge an β1,3-Glukan und Chitin unterscheiden sich die Hefen kaum (Tab. 1.1). Die Hefe-Zellwand besteht aus mehreren Schichten, wobei die Zahl und Dicke der Schichten, abhängig von den vorhandenen Wachstumsbedingungen, variiert: man findet eine äußere Schicht als Barriere vor fremden, die Zellwand degradierenden Enzymen und Substanzen (Klis *et al.*, 2002). Des Weiteren existieren eine innere Zellwandschicht und die Plasmamembran. Die innere Schicht vermittelt der Zellwand ihre mechanische Stärke und dient als Grundgerüst (Klis *et al.*, 2001 und 2002). Sie besteht aus β1,3-Glukan und Chitin. Die äußere Zellwandschicht weist viele glykosylierte Mannoproteine auf, die kovalent an das Glukannetzwerk gebunden sind. Viele der Mannoproteine sind durch Disulfidbrücken miteinander verbunden.

Tab. 1.1: Zusammensetzung der Zellwand von *S. cerevisiae* und *C. albicans*.

Makromoleküle	*S. cerevisiae*	*C. albicans*
Mannoproteine	50 %	35-40 %
β1,6-Glukan	5 %	20 %
β1,3-Glukan	40 %	40 %
Chitin	1-3 %	1-2 %

Die Zellwandzusammensetzung ist in % des Trockengewichts angegeben. Die Tabelle ist aus Klis *et al.*, 2001 entnommen worden. Die Werte variieren abhängig von der Zusammensetzung des Mediums und den Umweltbedingungen.

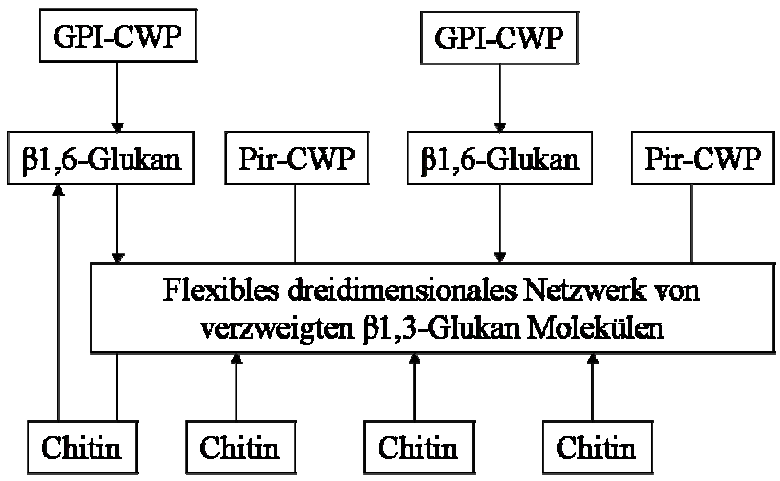


Abb. 1.2: Molekularer Aufbau der Zellwand von *C. albicans* und *S. cerevisiae*. Die Pfeilrichtung gibt die Orientierung vom reduzierenden Ende zum nicht-reduzierenden Ende an. Die Abbildung ist ursprünglich Richard *et al.* (2002) entnommen und dann von Prill (2004) modifiziert worden. Chitin, welches mit β1,6-Glukan verknüpft ist, kann gleichzeitig an β1,3-Glukan gebunden sein (Lipke und Ovalle, 1998).

Das Glukan stellt den größten Anteil am Trockengewicht der Zellwand, wobei das β1,6-Glukan im Vergleich zum β1,3-Glukan mengenmäßig überwiegt. Die aus durchschnittlich 1500 Glukosemolekülen bestehenden β1,3-Glukanpolymere bilden ein dicht gepacktes, fibrilläres Netzwerk, welches zusammen mit eingelagerten Chitinfibrillen vor allem für die mechanische Stabilität der Zellwand verantwortlich ist (Abbildung 1.2). 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 β1,3-Glukanpolymere variieren je nach Wachstumsbedingungen. In *S. cerevisiae* wird das β1,3-Glukan von zwei β1,3-Glukan-Synthase-Komplexen synthetisiert. Zwei Transmembranproteine, Fks1p und Fks2p, welche zu 88 % identisch sind, wurden als katalytische Untereinheiten der β1,3-Glukansynthase identifiziert (Ram *et al.*, 1998). Der β1,3-Glukan-Synthase-Komplex enthält, je nach Umweltbedingungen, entweder Fsk1p oder Fsk2p/ Gsc2p (Cabib *et al.*, 1998). Das in größeren Mengen vorhandene β1,6-Glukan besteht aus durchschnittlich 140 hochgradig verzweigten Glukoseeinheiten. Wie aus Abbildung 1.2 ersichtlich, ist das β1,6-Glukan mit dem β1,3-Glukan verbunden und dient als Verknüpfungsstelle für Zellwandproteine (Kapteyn *et al.*, 1996). Die Synthese dieses komplexen Polymers ist bislang im Detail nicht vollständig aufgeklärt. Den geringsten Anteil am Zellwandtrockengewicht hat das Chitin. Es handelt sich bei dem Chitin um ein Polymer, bestehend aus unverzweigtem, β1,4-verknüpftem *N*-Acetylglukosamin (GlcNAc). Chitin ist nur zu einem geringen Anteil in den lateralen Zellwänden zu finden. Dort dient es als Brücke, die sowohl an das β1,3-, sowie an das β1,6-Glukan gebunden ist (Lipke und Ovalle, 1998). Es wird vor allem während der Knospung bei der Bildung des Septums und des Knospungsrings in die Zellwand eingelagert (Shaw *et al.*, 1991; Cabib *et al.*, 2001) und ist, trotz seiner vergleichsweise geringen Menge, ein für die Integrität der Zellwand wichtiger Bestandteil. Ein bis zu dreimal höheren Chitingehalt gegenüber den Hefezellen kann in den Hyphen festgestellt werden (Braun und Calderone, 1978). Drei integrale Membranproteine, Chs1p, Chs2p und Chs3p sind zusammen mit weiteren regulatorischen Proteinen für die Chitinsynthese von *S. cerevisiae* verantwortlich. 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 β1,3- und das β1,6-Glukan, erhöhen. Wie oben erwähnt, dient die äußere Zellwandschicht als Barriere und weist viele glykosylierte Mannoproteine auf. Die Mannoproteinschicht ist, anders als die Glukane und das Chitin, nicht direkt an der Aufrechterhaltung der strukturellen Integrität beteiligt. Es konnte gezeigt werden, dass die Hefezelle ihre Form auch nach proteolytischem Verdau der äußeren Zellwandschicht aufrechterhalten kann (Koch und Rademacher, 1980). Die Mannoproteine machen einen großen Teil des Zellwandtrockengewichtes aus (Tab. 1.1). Der überwiegende Teil der Masse kommt durch zahlreiche *N*- und *O*-glykosidisch gebundene Zucker zu Stande (Orlean, 1997). Die Mannoproteine sind entweder kovalent an die Zellwand gebunden oder es handelt sich um nicht kovalent gebundene Zellwandproteine, sogenannte Scw- (soluble cell wall) Proteine (Capellaro *et al.*, 1998). Die Scw-Proteine sind am Aufbau der Zellwand aber auch an der Zellteilung beteiligt wie beispielsweise die Chitinsynthasen (Munro und Gow, 2001) oder die Endochitinasen und

Exoglukanasen (Kuranda *et al.*, 1991; Vazquez *et al.*, 1991). Bei den kovalent an die Zellwand gebundenen Proteine unterscheidet man (Abbildung 1.2) zwischen GPI-CWP (Glykosylphosphatidylinositol - Cell Wall Protein) oder Pir-CWP (Proteins with internal repeats - Cell Wall Protein). Die GPI-Zellwandproteine sind am Carboxy-terminalen Ende über den Rest eines GPI-Ankers an das β1,6-Glukan-Gerüst gebunden (Orlean, 1997; Richard *et al.*, 2002). Viele Adhäsine, wie die Als-Proteine (Hoyer, 2001) und das hyphenspezifische Hwp1-Protein (Staab *et al.*, 1999) gehören zu der Gruppe der GPI-Zellwandproteine. Pir-Zellwandproteine werden möglicherweise mittels einer Transglutaminasereaktion kovalent an das β1,3-Glukan gebunden (Ecker *et al.*, 2003a).

1.5 Glykosylierung

Die Glykosylierung von Proteinen stellt eine der wichtigsten Formen von Proteinmodifikationen dar. Die beiden Hauptformen der Glykosylierung sind die *N*- und die *O*-Glykosylierung. Weiterhin existieren seltenere Formen wie beispielsweise die *C*- oder die *P*-Glykosylierung (Spiro, 2002). In der Hefe kann nur eine Mannosylierung von Proteinen gefunden werden. Hier soll nur auf die beiden Hauptformen der Glykosylierung, mit dem Schwerpunkt auf der *O*-Glykosylierung, eingegangen werden.

Bei der *N*-Glykosylierung wird im Endoplasmatischen Retikulum (ER) über eine *N*-glykosidische Verbindung mit einem Asparagin eine Zuckergrundstruktur an das Protein geheftet. Diese Zuckergrundstruktur wird durch eine Familie von spezifischen Mannosyltransferasen (ALG-Familie; Asparagine Linked Glykosylation) an das Isoprenderivat Dolicholphosphat synthetisiert. Das Dolicholphosphat ist in der ER-Membran lokalisiert und an dessen Phosphatrest werden insgesamt 14 Zuckerreste (Glc_3-Man_9-$GlcNAc_2$) angehängt, die von aktivierten Zuckerdonoren (Derivate von UDP, GDP und Dolicholpyrophosphat) zur Verfügung gestellt werden. Diese 14 Zuckerreste werden dann an das Asparagin des Zielproteins gebunden. Die ermittelte Konsensussequenz lautet: Asn-X-Ser/ Thr. Die Anheftung der Zuckergrundstruktur wird von einem Enzymkomplex, dem Oligo-Saccharyl-Transferase- (OST) Komplex *en bloc* durchgeführt (Tanner und Lehle, 1987; Orlean, 1997) und verläuft kotranslational (Tanner und Lehle, 1987). Die weitere Prozessierung der *N*-Glykane erfolgt im Golgi-Apparat und ist, im Gegensatz zur Anheftung der Grundstruktur im ER, in Säugern und Hefen unterschiedlich (Tanner und Lehle, 1987).

Glykoproteine treten in subzellulären Organellen, wie dem endoplasmatischen Retikulum (ER), dem Golgi-Apparat, Lysosomen und Peroxisomen, sowie dem Cytoplasma auf. Auch Zellwand- und Membranproteine sind häufig glykosyliert. Über Glykosylierungsstrukturen in der Zelloberfläche findet die Interaktion von pathogenen Organismen mit Wirtsstrukturen statt. Glykosylierung ist essentiell und eine ganze Reihe von vererbbaren Glykosylierungsdefekten beim Menschen, die sogenannten „Congenital Disorders of Glykosylation-Syndromen“ (CDGS), sind mittlerweile bekannt. Bis heute konnten nur wenige *O*-mannosylierte Proteine in höheren Eukaryoten identifiziert werden. Ein wichtiges *O*-mannosyliertes Protein ist das α-Dystroglykan (Endo, 1999). Mutationen der *O*-Mannosylierungsstruktur führen zu Muskeldystrophie und dem Walker-Warburg Syndrom (Beltran-Valero de Barnabe *et al.*, 2002).

1.5.1 *O*-Glykosylierung

Bei der *O*-Glykosylierung werden Zucker *O*-glykosidisch an einen Serin- oder Threonin-Rest des Akzeptorproteins gebunden. Dabei ergeben sich bei den Hefen *C. albicans* und *S. cerevisiae* ausschließlich unverzweigte, α1,2-verknüpfte *O*-Mannosylketten (Herscovics und Orlean, 1993). In der Spalthefe *Schizosaccharomyces pombe* können zusätzlich Galaktosen in α1,3- Verknüpfung vorkommen (Gemmill und Trimbel, 1999). Es konnte gezeigt werden, dass die Mannosylketten bei *S. cerevisiae* aus bis zu fünf- und bei *C. albicans* aus bis zu sieben Mannosen bestehen können (Hayette *et al.,* 1992). Der häufigste Typ beider Organismen ist allerdings der Dimannosyl-Typ (Buurman *et al.,* 1998).

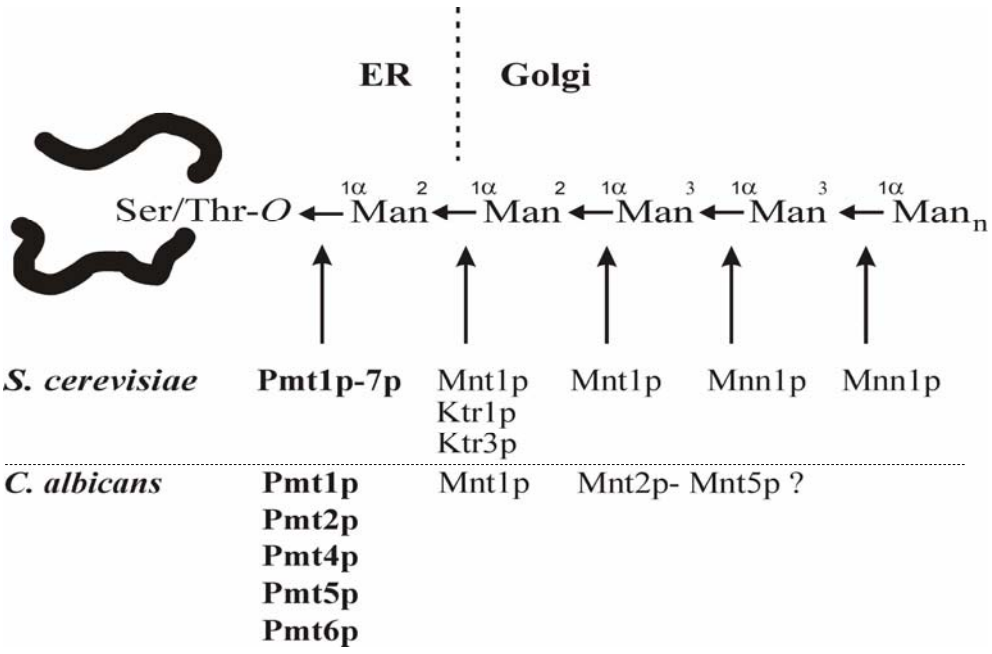


Abb. 1.3: Protein-*O*-glykosylierung in *S. cerevisiae* und *C. albicans*. Die Initialreaktion wird im ER durch Protein-*O*-mannosyltransferasen katalysiert. Die Kettenelongation findet im Golgi-Apparat statt. Die Mannosylketten können eine Länge von bis zu 5 Mannosen in *S. cerevisiae* und bis zu 7 in *C. albicans* haben. Bei dem am häufigsten zu findenden Typ handelt es sich um den Dimannosyl-Typ.

Der erste Reaktionsschritt der *O*-Glykosylierung findet im ER statt. Diese initiale Reaktion der *O*-Glykosylierung wird durch Isoformen von Protein-*O*-mannosyltransferasen (Pmt) katalysiert (Abbildung 1.3). Bei den Pmt-Proteinen handelt es sich um Membranproteine, die den Transfer einer Mannose unter Inversion der Konfiguration des aktivierten Zuckers Dolichol-*P*-Mannose auf die Hydroxylseitengruppe eines spezifischen Serins oder Threonins des Akzeptorproteins katalysieren (Bause und Lehle, 1979). 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-Mannose auf Dolichol-*P* synthetisiert (Orlean *et al.*, 1988; Orlean, 1990). Nach der Initialreaktion der *O*-Glykosylierung erfolgt die Kettenelongation im Golgi-Apparat (Abbildung 1.3). Der Zuckerdonor für die Kettenelongation ist GDP-Mannose (Abeijon *et al.*, 1993). Zur Verfügung gestellt wird dieser durch die GDP-Mannose Pyrophosphorylase Srb1p (Warit *et al.*, 2000). Nach dem Transfer der Mannose wird GDP von der GDPase Gda1p zu GMP

hydrolysiert (Herrero *et al.*, 2002). Anschließend wird GMP über einen Antiporter im Austausch gegen ein neues Molekül GDP-Mannose ins Cytoplasma transportiert (Abeijon *et al.*, 1989). Die Addition weiterer Mannosen an das Akzeptorprotein findet im Lumen des Golgiapparates statt und ist abhängig von Mangan (Mn^{2+}). Die Elongationsreaktionen werden durch die Ktr- und die Mnn-Proteinfamilien katalysiert (Abbildung 1.3). Die Ktr-Familie besteht aus neun Proteinen, während bei der Mnn-Proteinfamilie nur sechs Proteine bekannt sind (Lussier *et al.*, 1999).

Die *O*-Glykosylierung verläuft in Hefen und Säugetieren grundsätzlich unterschiedlich. Sowohl bei der *O*-Glykosylierung, als auch der *N*-Glykosylierung verläuft die initiale Reaktion der Glykosylierung in Hefen bei der Sekretion von Proteinen durch die Sekretionspore in der ER-Membran wahrscheinlich kotranslational (Haselbeck und Tanner, 1983; Tanner und Lehle, 1987). In höheren Eukaryoten erfolgt die Masse der *O*-Glykosylierung typischerweise posttranslational im Golgi-Apparat (Abeijon und Hirschberg, 1987). In höheren Eukaryoten bestehen die Glykosylketten häufig aus Sialinsäure und Galaktose (Hanisch, 2001), aber auch aus Zuckern wie Xylose und Fucose (Nishimura *et al.*, 1992). Bei dem zuerst angehefteten Zucker der Glykosylketten höherer Eukaryoten handelt es sich um *N*-Acetylgalaktosamin (GalNAc). Neben dieser typischen *O*-Glykosylierung sind einige Proteine, z.B. α-Dystroglykan, auch *O*-mannosyliert (Manya *et al.* 2004). Die Pmt-Orthologe *POMT1* und *POMT2* des Menschen sind funktionelle Proteinmannosyltransferasen, da sie, sofern sie koexprimiert werden, das α-Dystroglykan glykosylieren. Von Ecker *et al*. wurde erstmals berichtet, dass die *N*-Glykosylierung und *O*-Glykosylierung in Konkurrenz stehen können (Ecker *et al.*, 2003a). Es wurde beschrieben, dass das Pir-Protein ScCcw5p ausschließlich *N*-glykosyliert wird, wenn die *O*-Glykosylierung aufgrund einer Mutation im Gen der Proteinmannosyltransferase Pmt4p nicht erfolgt (Ecker *et al.*, 2003b).

1.5.2 Die 5 Isoformen der Protein-*O*-mannosyltransferasen

Der erste Reaktionsschritt der *O*-Glykosylierung findet in Hefen im ER statt, wobei die initiale Reaktion der *O*-Glykosylierung durch Protein-*O*-mannosyltransferasen katalysiert wird. Bei den Mitgliedern der Pmt-Proteinfamilie handelt es sich um ER-membranständige Proteine, deren Aminoterminus ins Cytoplasma und das Carboxy-terminale Ende ins ER-Lumen ragt (Strahl-Bolsinger *et al.*, 1999). Mittels Datenbankanalysen wurde gezeigt, dass *PMT*-Orthologe in vielen Organismen vorhanden sind. Homologe von *PMT*-Genen wurden beispielsweise in den Pilzen *S. cerevisiae* (Strahl-Bolsinger *et al.*, 1999), in *C. albicans* (Ernst und Prill, 2001), in *Aspergillus nidulans* (Shaw und Momany, 2002) und in *S. pombe* (Willer *et al.*, 2003) identifiziert und teilweise schon charakterisiert. Weiterhin konnten Orthologe der *S. cerevisiae* Pmt-Familie in der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* (Martin-Blanco *et al.*, 1996; Willer *et al.*, 2002), der Maus *Mus musculus* (Willer *et al.*, 2002) oder auch dem Menschen *Homo sapiens* (Jurado *et al.*, 1999; Manya *et al.*, 2004) identifiziert werden. In anderen vollständig sequenzierten Genomen von anderen Organismen, wie des Fadenwurms *Caenorhabditis elegans* oder der Pflanze *Arabidopsis thaliana*, konnten bis heute keine Sequenzübereinstimmungen mit Mitgliedern der Pmt-Familie gefunden werden. Die Pmt-Proteinfamilie kann aufgrund ihrer Aminosäuresequenz in eine Pmt1-, Pmt2- und eine Pmt4-Subfamilie eingeteilt werden (Ernst und Prill, 2001), wobei in höheren Organismen nur

Mitglieder der Pmt2- und Pmt4-Subfamilien vorkommen (Willer *et al.*, 2003). Identifiziert wurden die Pmt-Proteine ursprünglich in der Hefe *S. cerevisiae*. Es existieren in *S. cerevisiae* sieben Pmt-Proteine (Strahl-Bolsinger *et al.,* 1993; Lussier *et al.*, 1995; Immervoll *et al.*, 1995; Gentzsch und Tanner, 1996), während *C. albicans* 5 Isoformen synthetisiert (Ernst und Prill, 2001).

Es konnte gezeigt werden, dass Pmt-Proteine Dimere innerhalb der Proteinfamilie ausbilden (Girrbach und Strahl, 2003). Mitglieder der ScPmt1-Subfamilie bilden bevorzugt Heterodimere mit Proteinen der ScPmt2-Subfamilie. ScPmt4p bildet hingegen ausschließlich Homodimere (Girrbach und Strahl, 2003). Es konnte gezeigt werden, dass bei *C. albicans* Homodimere von Pmt4p, aber auch von Pmt5p gebildet werden; weiterhin konnten Protein-Protein-Interaktionen von Pmt1p mit Pmt4p, Pmt2p mit Pmt4p und Pmt6p mit Pmt5p gefunden werden (I. Schmidt, persönliche Mitteilung). In humanen Zelllinien ist die Koexpression der beiden Protein-mannosyltransferasen POMT1 und POMT2 notwendig zur Detektion einer Enzymaktivität (Manya *et al.*, 2004). POMT1 gehört zu der Pmt4-Subfamilie, während POMT2 in die Pmt2-Subfamilie eingeordnet wird. Sowohl im Menschen, als auch in *C. albicans*, nicht aber in *S. cerevisiae*, findet offenbar eine Dimerbildung von Pmt2p- und Pmt4p-Isoformen statt.

Bis heute konnte keine Konsensussequenz am Akzeptorprotein für die *O*-Glykosylierung etabliert werden. Es existieren allerdings Präferenzen. So begünstigt ein Prolin in der Position -1 und +3 von Serin/ Threonin die *O*-Glykosylierung (Wilson *et al.*, 1991). Bei *C. albicans* wird Threonin als Substrat gegenüber Serin bevorzugt (Weston *et al.*, 1993). Es wird davon ausgegangen, dass es mehrere Konsensussequenzen für die *O*-Glykosylierung gibt, da *pmt*-Mutanten Glykosylierungsdefekte unterschiedlicher Proteine aufweisen. Beispielsweise konnte bei *S. cerevisiae* nachgewiesen werden, dass das Protein Pir2p vornehmlich in *pmt1*Δ- und *pmt2*Δ-Mutanten hypoglykosyliert vorliegt (Gentzsch und Tanner, 1997). Bei *C. albicans* wurde von Prill (2004) beschrieben, dass ein Glykosylierungsdefekt des Proteins in der *pmt1*Δ- und *pmt4*Δ-Mutante zu beobachten ist.

Mutationen in den *PMT*-Genen verursachen verschiedene Phänotypen. Dabei werden die Phänotypen entweder durch den Funktionsverlust einzelner Proteine oder durch eine defekte *O*-Glykosylierung von Zellwandproteinen verursacht. Die *Capmt1*Δ-Deletionsmutante ist sensitiv gegen verschiedene Zellwand-destabilisierende Substanzen und zeigt Defekte in der Morphogenese, wie einen Wachstumsdefekt oder eine Tendenz zur Aggregation (Timpel *et al.*, 1998). Andere Deletionsmutanten zeigen nur wenige Defekte. Für die *Capmt5*Δ-Mutante konnten *in vitro* keine Phänotypen festgestellt werden. Prill *et al*. zeigten aber 2005, dass im Mausmodell sowohl für *Capmt5*Δ, als auch für alle anderen *pmt*Δ-Mutanten eine abgeschwächte Virulenz existiert. Auch war es in *C. albicans* nicht möglich, eine *pmt1*Δ *pmt4*Δ-Doppelmutante herzustellen (Prill, 2000). *PMT2* ist für *C. albicans* essentiell; es konnte keine homozygote *pmt2*Δ-Deletionsmutante hergestellt werden, da die Deletion für die Zellen letal war (Prill, 2004). Dies konnte auch für die Spalthefe *S. pombe* gezeigt werden (Willer *et al.*, 2005). Die heterozygote *Capmt2*Δ-Mutante zeigte bereits phänotypische Effekte (Prill, 2004). Von Timpel *et al.* (2000) wurde gezeigt, dass in *C. albicans* die Proteine Pmt1p und Pmt6p, obwohl die Defekte der beiden Mutanten in der Morphogenese

sich ähneln, unterschiedliche, spezielle Funktionen besitzen. Beide Mutationen verursachen einen Defekt der Hyphenbildung bei Hungerbedingungen, der in der *pmt6*Δ-Mutante, nicht aber in der *pmt1*Δ-Mutante mittels Überexpression von Komponenten verschiedener Signaltransduktionswege (Cek1p, Cph1p, Tpk2p und Efg1p) komplementiert werden konnte. Die Autoren schlossen daraus, dass möglicherweise eine glykosylierte Sensorkomponente in der *pmt6*Δ-Mutante einen Funktionsverlust durch fehlerhafte oder fehlende *O*-Glykosylierung des Sensorproteins erlitten hatte. Da der Defekt der Hyphenbildung einer *pmt6*Δ-Mutante durch die Expression von *PMT1* teilweise komplementiert werden konnte, es aber umgekehrt in einer *pmt1*Δ-Mutante durch Expression von *PMT6* nicht möglich war, den Defekt zu komplementieren, gehen die Autoren davon aus, dass Pmt1p und Pmt6p ähnliche Funktionen besitzen könnten, die Substratspezifität der beiden Proteine aber unterschiedlich stark reguliert ist.

Einige *S. cerevisiae* Doppeldeletionsmutanten, wie die *pmt1*Δ *pmt2*Δ-Mutante, können nur wachsen, sofern sie osmotisch mit Sorbitol stabilisiert werden (Gentzsch und Tanner, 1996). Einige *Scpmt*Δ-Dreifachmutanten sind trotz osmotischer Stabilisierung nicht wachstumsfähig. Daraus schlossen Gentzsch und Tanner (1996), dass ein Minimum an *O*-Glykosylierung für die Hefe essentiell ist; dies trifft auch auf die pathogene Hefe *C. albicans* zu.

1.6 *DOM34* - Duplication Of Multilocus Region 34

Den Namen *DOM34* (Duplication Of Multilocus Region 34) erhielt das Gen, da es ursprünglich mittels einer genomischen Sonde für das Gen *RPC34* auf Chromosom XIV des Organismus *S. cerevisiae* kloniert wurde. Es fiel auf, dass die erhaltene Sequenz des *DOM34*-ORF auch auf dem Chromosom III von *S. cerevisiae* identifiziert werden konnte. Hierbei handelt es sich um ein Pseudogen namens *DOM34/ 2*, das sich in der Größe unterscheidet und mindestens drei Leserastersprünge aufweist (Lalo *et al.*, 1993 und 1994). Lalo *et al.* (1993) zeigten, dass (bei Nichtbeachtung der Leserastersprünge) die 303 Aminosäuren des Pseudogens *DOM34/ 2* für ein Protein kodieren würde, das 57 % Identität zur kodierenden Region von *DOM34* besitzt. Sowohl das *DOM34*-Gen, als auch das Pseudogen *DOM34/ 2*, sind nahe dem jeweiligen Centromer lokalisiert. Der Pseudogenstatus von *DOM34 /2* wurde von Wickert (1998) durch Klonierung und Sequenzierung, sowie durch Northern-Analyse bestätigt.

Das *ScDOM34*-Gen kodiert mit seinen 1158 Basenpaaren für ein Protein bestehend aus 386 Aminosäuren. Die theoretisch ermittelte Masse beträgt etwa 44 kDa und es konnten keine Signalsequenzen oder Transmembran-Domänen identifiziert werden. Es handelt sich um ein in viele zelluläre Prozesse involviertes Protein. Dom34p zeigt 48 % Homologie zum omnipotenten Suppressor Sup1p (Lalo *et al.*, 1993), wobei die kodierenden Regionen von *ScDOM34* und *ScSUP1* keine Homologie zeigen. *DOM34*-Orthologe konnten in vielen Organismen identifiziert werden. Ursprünglich identifiziert wurde *DOM34* in der Fruchtfliege *D. melanogaster* (Castrillon *et al*., 1993); es wurde als *Pelota* bezeichnet. Der Verlust des Gens resultiert in schweren Störungen, wie die Unfähigkeit der Männchen, Meiose und Spermatogenese korrekt zu koordinieren. Es erfolgt eine Arretierung in der Prophase I, was zur Unfruchtbarkeit führt (Castrillon *et al*., 1993). Weiterhin sind die Oogenese und die Augenentwicklung gestört. Auch in der Zellproliferation scheint das *Pelota* Gen-Produkt eine

Rolle zu spielen. In der Maus *M. musculus* wird das *DOM34*-Gen als *Pelo* bezeichnet. Adham *et al.* (2002) zeigten, dass die Deletion des *DOM34*-Orthologs zu Defekten beim Fortschreiten des Zell-Zyklus und zur Letalität junger Embryonen führt. Auch im Menschen konnte das *DOM34*-Ortholog identifiziert werden, es trägt den Namen *PELO* und wird während der Embryonalentwicklung exprimiert (Shamsadin *et al.*, 2000). Ein weiteres Ortholog des *DOM34*-Gens konnte in der Pflanze *A. thaliana* gefunden werden. Selbst in dem Archaebakterium *Sulfolobus solfataricus* wurde ein Ortholog namens *pelA* identifiziert (Ragan *et al*., 1996). Bis heute konnte allerdings kein *DOM34*-Ortholog bei den Eubakterien identifiziert werden. Davis und Engbrecht (1998) zeigten, dass die heterologe Expression von *Pelota* aus *D. melanogaster* das verzögerte Wachstum in *Scdom34*Δ-Deletionsmutanten komplementieren konnte. Sie sind daher davon überzeugt, dass die Funktion von Dom34p-Orthologen zwischen den eukaryotischen Mitgliedern der Genfamilie stark konserviert ist.

Den Proteinen der oben aufgeführten Organismen ist gemeinsam, dass sie eine Größe zwischen 347 und 395 Aminosäuren aufweisen, ein Kern-Transport-Signal besitzen und im Carboxy-terminalen Bereich eine eEF1α-Domäne tragen. Diese Domäne wird in einer Proteinfamilie gefunden, die an dem Terminationsschritt der Translation beteiligt ist (Frolova *et al.*, 1994). Zu ihr gehören beispielsweise der Translation-Elongationsfaktor eEF1A (eukaryotic Elongation Factor) und der Translations-Terminationsfaktor eRF1 (eukaryotic Release Factor). Der Elongationsfaktor eEF1A transportiert während der Translations-elongation Aminoacyl-tRNAs zum Ribosom. Der Terminationsfaktor eRF1 ist in dem Terminationsschritt der Translationselongation involviert.

Die Deletion von *DOM34* in der Hefe *S. cerevisiae* führt zu einer Vielzahl von Phänotypen, allerdings nur in einem speziellen genetischen Hintergrund (Davis und Engbrecht, 1998). Alle der nachfolgend beschriebenen Phänotypen einer *S. cerevisiae dom34*Δ-Mutation konnten in einem anderen Hintergrund nicht reproduziert werden (Carr-Schmid *et al.* 2002). Die Mutanten, die von Davis und Engbrecht untersucht wurden, zeigten einen Wachstumsdefekt. Bei einer Wachstumstemperatur von 30 °C wuchsen die Mutanten langsamer als der Wildtyp. Dieser Effekt wurde bei einer erniedrigten Temperatur von 15 °C noch verstärkt. Die Mutanten verweilten länger in der Lag-Phase und traten früher und bei einer geringeren Zelldichte als der Wildtyp in die stationäre Phase ein. Weiterhin zeigten die Deletions-mutanten ein verzögertes Fortschreiten der G1-Phase des Zellzyklus und wiesen einen Defekt bei der Agarinvasion auf. *dom34*Δ-Mutanten wiesen weiterhin eine verringerte Fähigkeit auf, Pseudohyphen zu formen und zu sporulieren. Auch zeigten die *dom34*Δ-Mutanten eine erhöhte Anzahl an nicht knospenden Zellen im Vergleich zum Wildtyp. Die Autoren konnten zeigen, dass die Dom34p-Aktivität die Effizienz der Translationsmaschinerie erhöht. Bei *dom34*Δ-Mutanten wurde eine reduzierte Anzahl an Polyribosomen und ein erhöhter Spiegel an freien 40 S- und 60 S-Untereinheiten beobachtet. Ferner konnten Davis und Engbrecht (1998) durch Überexpression des ribosomalen S30-Proteins verschiedene Defekte der Deletionsmutanten komplementieren. Auch das Polyribosomenprofil der Mutanten zeigte das Wildtyp-Polyribosomenprofil nach Expression des Proteins. Daraus folgerten die Autoren, dass Dom34p in die Translation involviert ist und das Fortschreiten aus der G1-Phase und die Differenzierung fördert. Carr-Schmid *et al.* (2002) konnten zeigen, dass der von Davis und Engbrecht (1998) beschriebene Wachstumsdefekt einer *dom34*Δ-Mutante offensichtlich

stammabhängig ist. Mittels Zwei-Hybrid-Analysen konnte von Carr-Schmid *et al.* (2002) ein Protein identifiziert werden, welches mit Dom34p interagiert. Bei dem Protein handelt es sich um das GTP-Bindeprotein (G-Protein) Hbs1p. G-Proteine sind an vielen zellulären Prozessen, wie Signaltransduktion oder Proteinbiosynthese beteiligt. Hbs1p ist ein bisher uncharakterisiertes G-Protein mit Motivhomologie zu eEF1A und eRF3 (Wallrapp *et al*., 1998). Carr-Schmid *et al.* (2002) zeigten genetische Interaktionen zwischen *DOM34* und *HBS1*. Offenbar wurde Dom34p für ein effizientes Wachstum und die Proteinsynthese bei limitierter Translationsinitiation benötigt. Sie postulieren, dass Dom34p und Hbs1p einen Komplex bilden und so die Regulation der Translation einer Teilmenge von mRNAs beeinflussen. Sie glauben, dass RNA-Bindeproteine, einschließlich Dom34p, durch die Bindung von 3'-Bereichen bestimmter mRNAs deren Aktivität regulieren (Jacobson, 2004).

Bei der Charakterisierung der Sekretion von hIGF-1 (human Insulin like Growth Factor-1) in der Hefe *S. cerevisiae* wurde der Stamm YE465 einer EMS-Mutagenese (Ethyl Methan Sulfonat) unterzogen (Finck *et al.*, 1996). In einer der erhaltenen Mutanten (M577) konnte eine reduzierte *O*-Glykosylierung von hIGF-1 festgestellt werden. Um das unbekannte, durch die Mutagenese betroffene Gen der Mutante identifizieren und klonieren zu können, wurde mit dem Ziel eines synthetischen Phänotyps eine *pmt1*Δ-Deletion in diese Mutante eingeführt (Wickert, 1998). Es wurde anschließend ein Sensitivitätstest gegenüber dem Killertoxin K1 des Hefestamms RC130 durchgeführt. Das Killertoxin bindet an β1,6-Glukan der Zellwand und führt letztendlich über einen Verlust an Ionen zum Zelltod. Während sowohl die Ausgangsmutante, als auch deren *pmt1*Δ-Derivat sensitiv gegen das Killertoxin waren, zeigte die Mutante mit der eingeführten *pmt1*Δ-Deletion eine Resistenz gegenüber dem Killertoxin. Dieser Phänotyp wurde von S. Wickert genutzt, um das mutagenisierte Gen der Mutante mittels einer genomischen Bank zu klonieren. Hierbei konnten zwei vollständige ORFs identifiziert werden. Bei einem handelte es sich um das *DOM34*-Gen. Der Killertest wurde mit einer gezielt konstruierten *dom34*Δ *pmt1*Δ-Doppeldeletionsmutante wiederholt und die Resistenz bestätigt. Der synthetische Phänotyp der Einzeldeletionen in einer Doppeldeletionsmutante konnte in weiteren Analysen bestätigt werden. So konnte Wickert (1998) zeigen, dass die geringe Sensitivität gegen das Aminoglykosid Hygromycin B beider Einzeldeletionsmutanten in der Doppelmutante verstärkt wurde. Weiterhin wiesen Zellen der Doppeldeletionsmutante in flüssigem Minimalmedium eine starke Vergrößerung der Zellen auf. Dieser Effekt konnte nicht durch osmotische Stabilisierung mit Sorbitol aufgehoben werden.

1.7 Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den möglichen Einfluss des *DOM34*-Genprodukts des humanpathogenen Pilzes *C. albicans* auf die *O*-Glykosylierung und die Wachstumseigenschaften zu charakterisieren. In diesem Zusammenhang sollte das *DOM34*-Gen in verschiedenen Stammhintergründen disruptiert und die daraus resultierenden Auswirkungen studiert werden. Ferner war es von Interesse, zu überprüfen, ob in der pathogenen Hefe *C. albicans*, ähnlich wie in der apathogenen Hefe *S. cerevisiae*, genetische Interaktionen zwischen *DOM34*- und *PMT*-Genen auftreten. Des Weiteren sollte eine Transkriptomanalyse der *Cadom34*Δ-Mutanten durchgeführt werden, um ein besseres Verständnis der vermuteten Interaktion der *DOM34*- und *PMT1*-Genprodukte zu erlangen.

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)
Heringssperma-DNA (Clontech)
YNB w/ o amino acids, Casamino acids, Hefeextrakt, Pepton (Difco Labarotories)
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, Glyzerin, 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, Sorbitol, (Sigma)

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

2.2 Stämme und Medien

2.2.1 *E. coli* -Stamm

Tab. 2.1: Im Rahmen dieser Arbeit benutzter E. *coli*-Stamm:

Stamm	Genotyp	Quelle/ Referenz
DH5αF'	F' [Φ80 Δ(*lac*Z)M15] Δ(*lacZYA-arg*F)*U169 recA1 endA1 hsdR17* r_K- m_K+ *supE44 thi*-1 *gyrA*	Hanahan, 1983; Woodcock *et al.,* 1989

2.2.2 *C. albicans* -Stämme

Tab. 2.2: Im Rahmen dieser Arbeit benutzte *C. albicans*-Stämme:

Stamm	Genotyp	Quelle/ Referenz
SC5314	prototroph	Fonzi & Irwin, 1993
CAI4	*ura3*Δ::*imm434*/*ura3*Δ::*imm434*	Fonzi & Irwin, 1993
CAF2-1	*ura3*Δ::*imm434*/*URA3*	Fonzi & Irwin, 1993
CAI8	*ade2*Δ::*hisG*/*ade2*Δ::*hisG* *ura3*Δ::*imm434*/*ura3*Δ::*imm434*	Fonzi & Irwin, 1993
C8D-3478	wie CAI8, aber *dom34*Δ::*FRT*/*dom34*Δ::*FRT*	van den Boom, Laborsammlung
SK65	wie C8D-3478, aber *ura3*Δ::*imm434*/*URA3*	diese Arbeit
IIHH6-4a, N1HH18-1.3	wie CAI4, aber *tpk1*Δ::*hisG*/*tpk1*Δ::*hisG*	Bockmühl *et al.*, 2001
AS1	wie CAI4, aber *tpk2*Δ::*hisG*/*tpk2*Δ::*hisG*	Sonneborn *et al.*, 2000
CAP1-3	wie CAI4, aber *pmt1*Δ::*hisG-URA3-hisG*/*PMT1*	Timpel *et al.*, 1998
CAP1-312	wie CAI4, aber *pmt1*Δ::*hisG-URA3-hisG*/*pmt1*Δ::*hisG*	Timpel *et al.*, 1998
CAP1-3121	wie CAI4, aber *pmt1*Δ::*hisg*/*pmt1*Δ::*hisG*	Timpel *et al.*, 1998
SPCa2	wie CAP1-3121, aber *ura3*Δ::*imm434*/*URA3*	Prill, 2004
CAP4-2	wie CAI4, aber *pmt4*Δ::*hisG-URA3-hisG*/*PMT4*	Prill, 2000
CAP4-2164	wie CAI4, aber *pmt4*Δ::*hisG*/*pmt4*Δ::*hisG*	Prill, 2000
SPCa6	wie CAP4-2164, aber *ura3*Δ::*imm434*/*URA3*	Prill, 2004
P5-1	wie CAI4, aber *pmt5*Δ::*hisG-URA3-hisG*/*PMT5*	Klinkert, 2001
P5-5744	wie CAI4, aber *pmt5*Δ::*hisG*/*pmt5*Δ::*hisG*	Klinkert, 2001
SPCa10	wie P5-5744, aber *ura3*Δ::*imm434*/*URA3*	Prill, 2004
CAP2-3	wie CAI4, aber *pmt6*Δ::*hisG-URA3-hisG*/*PMT6*	Timpel *et al.*, 2000
CAP2-2391	wie CAI4, aber *pmt6*Δ::*hisG*/*pmt6*Δ::*hisG*	Timpel *et al.*, 2000
SPCa8	wie CAP2-2391, aber *ura3*Δ::*imm434*/*URA3*	Prill, 2004
SK5 (Klon 1)	wie CAI4, aber *dom34*Δ::*FRT-URA3-FRT*/*DOM34*	diese Arbeit
SK7 (Klon 1)	wie CAI4, aber *dom34*Δ::*FRT*/*DOM34*	diese Arbeit
SK25 (Klon 1)	wie CAI4, aber *dom34*Δ::*FRT*/*dom34*Δ::*FRT-URA3-*	diese Arbeit

	FRT	
SK47 (Klon 1)	wie CAI4, aber *dom34*Δ::*FRT*/*dom34*Δ::*FRT*	diese Arbeit
SK51 (Klon 1)	wie CAI4, aber *dom34*Δ::*FRT*/*dom34*Δ::*FRT ura3*Δ::*imm434*/*URA3*	diese Arbeit
SK20 (Klon 2)	wie CAI4, aber *dom34*Δ::*FRT-URA3-FRT*/*DOM34*	diese Arbeit
SK9 (Klon 2)	wie CAI4, aber *dom34*Δ::*FRT*/*DOM34*	diese Arbeit
SK59 (Klon 2)	wie CAI4, aber *dom34*Δ::*FRT*/*dom34*Δ::*FRT-URA3-FRT*	diese Arbeit
SK48 (Klon 2)	wie CAI4, aber *dom34*Δ::*FRT*/*dom34*Δ::*FRT*	diese Arbeit
SK62 (Klon 2)	wie CAI4, aber *dom34*Δ::*FRT*/*dom34*Δ::*FRT ura3*Δ::*imm434*/*URA3*	diese Arbeit
SK6 (Klon 8)	wie CAP1-3121, aber *dom34*Δ::*FRT-URA3-FRT*/*DOM34*	diese Arbeit
SK8 (Klon 8)	wie CAP1-3121, aber *dom34*Δ::*FRT*/*DOM34*	diese Arbeit
SK52 (Klon 8)	wie CAP1-3121, aber *dom34*Δ::*FRT*/*dom34*Δ::*FRT-URA3-FRT*	diese Arbeit
SK58 (Klon 8)	wie CAP1-3121, aber *dom34*Δ::*FRT*/*dom34*Δ::*FRT*	diese Arbeit
SK61 (Klon 8)	wie CAP1-3121, aber *dom34*Δ::*FRT*/*dom34*Δ::*FRT ura3*Δ::*imm434*/*URA3*	diese Arbeit
SK19 (Klon 7)	wie CAP1-3121, aber *dom34*Δ::*FRT-URA3-FRT*/*DOM34*	diese Arbeit
SK10 (Klon 7)	wie CAP1-3121, aber *dom34*Δ::*FRT*/*DOM34*	diese Arbeit
SK18 (Klon 7)	wie CAP1-3121, aber *dom34*Δ::*FRT*/*dom34*Δ::*FRT-URA3-FRT*	diese Arbeit
SK24 (Klon 7)	wie CAP1-3121, aber *dom34*Δ::*FRT*/*dom34*Δ::*FRT*	diese Arbeit
SK53 (Klon 7)	wie CAP1-3121, aber *dom34*Δ::*FRT*/*dom34*Δ::*FRT ura3*Δ::*imm434*/*URA3*	diese Arbeit
SK72	wie SK47, aber *pmt1*Δ::*hisG-URA3-hisG*/*PMT1*	diese Arbeit
SK73	wie SK47, aber *pmt4*Δ::*hisG-URA3-hisG*/*PMT4*	diese Arbeit
SK74	wie SK47, aber *pmt6*Δ::*hisG-URA3-hisG*/*PMT6*	diese Arbeit
SK75	wie SK47, aber *pmt5*Δ::*hisG-URA3-hisG*/*PMT5*	diese Arbeit

2.2.3 *S. cerevisiae* -Stämme

Tab. 2.3: Im Rahmen dieser Arbeit benutzte *S. cerevisiae*-Stämme:

Stamm	Genotyp	Quelle/ Referenz
YE449	*MATα leu2 ura3-52 prb1-112 pep4-3 cir°*	Gellerfors *et al*., 1989
M577	*MATα leu2 ura3-52 prb1-112 pep4-3 cir°*	Finck *et al*., 1996
CENPK141	*MATa*/ α *leu2-3, 112*/*LEU2 ura3-52*/*URA3 trp1-289*/*TRP1 his3-*Δ*1*/*HIS3 MAL2-8^C MAL2-8^C SUC2*/*SUC2*	Wickert, 1998
W21	wie YE449, aber *pmt1*Δ::*URA3 dom34*Δ::*kanMX4*	Wickert, 1998

W4	wie CENPK141, aber *MATα leu2-3, 112 URA3 trp1-289 his3-Δ1 MAL2-8^C MAL2-8^C SUC2/SUC2 dom34Δ::kanMX4*	Wickert, 1998
YE449 *pmt1Δ*	wie YE449, aber *pmt1Δ::kanMX4*	Wickert, 1998
M577 *pmt1Δ*	wie M577, aber *pmt1Δ::kanMX4*	Wickert, 1998
RC130	*MATa/ α his1/his1* [KIL-k1] K^+R^+	M. Leibowitz

2.2.4 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
CASA : wie SD mit zusätzlich 4 % Casamino acids
Spider : 1 % Nutrient Broth (Oxoid); 1 % Mannitol; 0,2 % K_2HPO_4; 100 mM NaCl
Lee's : Lee *et al.*, 1975
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 2 % Agar hergestellt. Das Wachstum der Hefen erfolgte, wenn nicht anders vermerkt, bei 30 °C.

2.2.5 Medium zur Anzucht von *E. coli*

Vollmedium (LB) : 1 % Trypton (Pepton 140); 0,5 % Hefeextrakt; 0,5 % NaCl
Die Selektion von *E. coli* erfolgte durch Zugabe von Ampicillin auf eine Konzentration von 100 µg/ ml. Festes Medium wurde durch Zugabe von 2 % Agar hergestellt. Das Wachstum erfolgte bei 37 °C.

2.2.6 Hypheninduktion von *C. albicans* in Flüssigmedium

Die Hypheninduktion erfolgte mit 2,5 mM N-Acetylglukosamin, 5 % Pferdeserum oder mit „Spider"-Medium. Die Zellen einer Übernachtkultur 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 warmem SB-Medium, pH 6,5 mit GlcNAc, Wasser mit 5 % Pferdeserum oder „Spider"-Medium auf eine $OD_{600\ nm}$ von 0,1-0,5 verdünnt. Die Hypheninduktion bei 37 °C wurde über zwei bis drei Stunden unter dem Mikroskop verfolgt.

2.2.7 Hypheninduktion von *C. albicans* auf festem Medium

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

Alternativ 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.

2.2.8 Medium zur Bildung von Chlamydosporen

Für die Induktion von Chlamydosporen bei *C. albicans* wurden „Corn Meal"-Agarplatten (CMA, Maismehl Agarplatten von Difco) verwendet, die mit 0,5 % Tween 80 versetzt wurden (Casal und Linares, 1981; Joshi *et al*., 1993). Die zu untersuchenden Stämme wurden sehr dünn ausgestrichen und zur Erzeugung mikroaerophiler Bedingungen Deckgläschen auf die Ausstriche gelegt. Die Platten wurden 7-9 Tage bei Raumtemperatur in Dunkelheit inkubiert. Anschließend wurde die Bildung der Chlamydosporen mikroskopisch überprüft.

2.2.9 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. 2.4) zugesetzt wurden. Der Agar wurde vor Zugabe der zu testenden Substanzen auf mindestens 50 °C abgekühlt.

Tab. 2.4: Testsubstanzen und ihre Konzentrationen:

Testsubstanz	Firma	Stammlösung	Lösungsmittel	Konzentration
Amphotericin B	Sigma	25 mg/ ml	DMSO	1 µg/ ml
Calcofluor White	Sigma	25 mg/ ml	dH_2O	10 µg/ ml
Congo Red	Sigma	20 mg/ ml	dH_2O	400 µg/ ml
Clotrimazol	Sigma	50 mg/ ml	dH_2O	2-5 µg/ ml
Ketoconazol	Sigma	25 mg/ ml	DMSO	2 µg/ ml
Fluconazol	Sigma	5 mg/ ml	Aceton	5 µg/ ml
G418	Calbiochem	50 mg/ ml	dH_2O	1,2 mg/ ml
Hygromycin B	Calbiochem	398 mg/ ml	dH_2O	50-200 µg/ ml
Nourseothricin	Werner BioAgents	200 mg/ ml	dH_2O	10-100 µg/ ml
SDS	Serva	10 %	dH_2O	0,06 %

2.3 Oligonukleotide und Plasmide

2.3.1 Synthetische Oligonukleotide

Tab. 2.5: Im Rahmen dieser Arbeit benutzte synthetischen Oligonukleotide:

Name	Sequenz
p1-verDOM34	5'-GTAACATTCCAAGCCATGCA-3'
p2-verDOM34	5'-CTTGAAGCGTTAGTGACAAC-3'
p3-verDOM34	5'-CTTGCATTATGTGGTGATGC-3'
p1-DOM-FLAG	5'-TTACTGCAGATGCAAGTTAAAAACAAAGC-3'

p2-DOM-FLAG	5'-TTAGCATGCCAAGTCTTCTTCATCACTG-3'
p1-DOM34-NUB	5'-ATGGCCGCTCCAGCACCTGCCTTGGCTGCTCCAGCCA CCACCATGCAAGTTAAAAACAAAGCCA-3'
p2-DOM34-NUB	5'-AGCTGCGGTTGGAACAGCCAATGGGGCAGCTGGAGC AGGCAAGTCTTCTTCATCACTGTCATC-3'
p2-PMT1su	5'-GCTGCGGTTGGAACAGCCAATGGGGCAGCTGGAGCA GGGAAATATTTAGAACGAGAAGTC-3'
pcURA3	5'-GGTAAAGGAAGAGATCCAG- 3'
pcP4-6	5'-CAAGTCTCTTCTAGGG-3'
p-URA3-v	5'-GGT CTT AGT GTT GAC TGT C-3'
v-PMT5-1	5'-CTG GTA TAG GAG TTA CAC C-3'
P2-PMT1su	5'-GCTGCGGTTGGAACAGCCAATGGGGCAGCTGGAGCA GGGAAATATTTAGAACGAGAAGTC-3'
P2verFOA	5'-GTTGCTGGTGAACCAATCAT-3'
phisG-1	5'-CCGGTCTGTATCGCGCG-3'
p2-PMT6su	5'-GCTGCGGTTGGAACAGCCAATGGGGCAGCTGGAGCA GGCTGAAATTTATTGTTATGATATGA-3'
P1-DOM34-Labeling	5'-ATCGACATACCAAGAGAAATC-3'
P2-DOM34-Labeling	5'-TGCAGGAAGTTCCTATACTTTC-3'
i-p2-URA3ver	5'-TTACAATCAAAGGTGGTCC-3'
p3-URA3ver	5'-GGTACAGTTGTTCCTCACA-3'

2.3.2 Plasmide

Tab. 2.6: Im Rahmen dieser Arbeit benutzte *E.coli*-, *S. cerevisiae*- und *C. albicans*-Plasmide:

Name	Selektionsmarker/ Replikationsmodul	Beschreibung	Quelle
pUC18	Amp^R	*E. coli* Klonierungsvektor	Yanisch-Perron *et al*., 1985
pMOS-BLUE	Amp^R	*E. coli* Klonierungsvektor	Fa. Amersham
pBI-1	Amp^R, *CaURA3, CaARS*	*CaPCK1p* in pRC2312	Rademacher, 1998
pJB28	C*aURA3*	Flipper-Disruptionskassette mit *CaDOM34*-Homologien (3' und 5'); *Sc*Flippase unter der Kontrolle von *CaSAP2p*	van den Boom, Laborsammlung
pJB33	Amp^R	*E. coli* Klonierungsvektor mit *CaDOM34*	van den Boom, Laborsammlung
pJB34	Amp^R, C*aURA3, CaLEU2 CaARS*	*CaDOM34* unter der Kontrolle von *CaPCK1p*	van den Boom, Laborsammlung
pSP38	Amp^R, *CaURA3, CaARS*	*CaMET3p* mit FLAG-Epitop	Prill, 2004
pSK2	Amp^R, *CaURA3, CaARS*	*CaDOM34* in pSP38 (C-terminal mit FLAG-Epitop)	diese Arbeit
pADHNubG-kanMX	Amp^R, *ScTRP1*, *ScARS*	N-terminaler Bereich des *Sc*Ubiquitins unter der Kontrolle von *ScADH1p*	Boles, Laborsammlung
pADHkanMX-NubG	Amp^R, *ScTRP1*, *ScARS*	N-terminaler Bereich des *Sc*Ubiquitins unter der Kontrolle von *ScADH1p*	Boles, Laborsammlung

pSK5	Amp^R, *ScTRP1*, *ScARS*	N-terminaler Bereich des *Sc*Ubiquitins (C-terminal an *CaDOM34*) unter der Kontrolle von *ScADH1p*	diese Arbeit
pSK6	Amp^R, *ScTRP1*, *ScARS*	N-terminaler Bereich des *Sc*Ubiquitins (N-terminal an *CaDOM34*) unter der Kontrolle von *ScADH1p*	diese Arbeit
YCpFGY1-CubPLV	Amp^R, *ScLEU2*, *ScARS*	C-terminaler Bereich des *Sc*Ubiquitins unter der Kontrolle von *ScFGY1p*	Boles, Laborsammlung
PMT1-CubPLV	Amp^R, *ScLEU2*, *ScARS*	C-terminaler Bereich des *Sc*Ubiquitins (C-terminal an *CaPMT1*) unter der Kontrolle von *ScFGY1p*	Prill, 2004
YEp13	Amp^R, Tet^R, *ScLEU2*	High copy-Ausgangsvektor für Genbank	Broach *et al*., 1979
pSW577/ 20	Amp^R, Tet^R, *ScLEU2*	Genbankvektor auf Basis von YEp13 mit genomischem Fragment; hier *ScDOM34*	Wickert, 1998
pSW20	Amp^R, *ScLEU2*, *ScARS*	*ScPMT1* in YCplac111	Wickert, 1998
pSP18	Amp^R, *CaURA3*	*URA3*-Blaster-Disruptionskassette mit *CaPMT2*-Homologien (3' und 5')	Prill, 2004
pSW25	Amp^R, *ScLEU2*, *ScARS*	*ScDOM34* in YCplac111 (N-terminal mit HA-Epitop)	Wickert, 1998
pCT23	Amp^R, *CaURA3*	*URA3*-Blaster-Disruptionskassette mit *CaPMT1*-Homologien (3' und 5')	Timpel *et al.*, 1998
pCT54	Amp^R, *CaURA3*	*URA3*-Blaster-Disruptionskassette mit *CaPMT4*-Homologien (3' und 5')	Prill, 2000
pBK-5	Amp^R, *CaURA3*	*URA3*-Blaster-Disruptionskassette mit *CaPMT5*-Homologien (3' und 5')	Klinkert, 2001
pCT25	Amp^R, *CaURA3*	*URA3*-Blaster-Disruptionskassette mit *CaPMT6*-Homologien (3' und 5')	Timpel *et al.*, 1998
HB5	*CaURA3*	*URA3*-ORF zur Rekonstitution	Losberger & Ernst, 1989

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 des Herstellers (Qiagen, Hilden) gefolgt.

2.4.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus Hefen

Hefezellen aus einer 10 ml Übernachtkultur wurden geerntet, mit destilliertem Wasser gewaschen und das Pellet wurde anschließend in 1 ml P1 (50 mM Tris/ HCl, pH 8,0; 10 mM EDTA) mit RNAse resuspendiert und nach Zugabe von 1 ml P2 (0,2 M NaOH; 1 % SDS) gemischt. Der Zellaufschluss erfolgte durch die Zugabe von ⅔ Volumen Glasperlen unter Schütteln bei 4 °C mittels eines Vibrax (VX 2E, Janke und Kunkel). Der Überstand wurde mit 0,5 ml P3 (3 M KOAc, pH 5,5) versetzt, 15 min auf Eis inkubiert und für 15 min bei 10000 Upm zentrifugiert. Aus dem Überstand wurde die Plasmid-DNA mit Isopropanol gefällt und anschließend mit 70 % Ethanol gewaschen. Das getrocknete Pellet wurde in 20 µl destilliertem Wasser aufgenommen und die DNA wurde im Anschluss für die Transformation in *E. coli* eingesetzt.

2.4.3 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 Übernachtkultur 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 bis 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 bis 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 bis 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 µl TE-Puffer aufgenommen.

2.4.4 Restriktionsbehandlung

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

2.4.5 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 2.4.8).

2.4.6 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.

2.4.7 Dephosphorylierung von DNA

Die Dephosporylierung von 5'-Enden linearer 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 hitzeinaktiviert. Daran schloss sich eine Phenol/ Chloroform-Extraktion, gefolgt von einer Ethanol-Fällung der geschnittenen und dephosporylierten DNA an.

2.4.8 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 des Herstellers Qiagen verwendet.

2.4.9 Molekulargewicht- und Größenstandards

DNA-Standard : λ-DNA (MBI Fermentas), welche mit *Eco*RI/ *Hind*III oder mit *Hind*III geschnitten wurde.

Protein-Standard : SeeBlue® Plus2 (pre-stained, von Invitrogen). Die Proteine besitzen molekulare Massen von 4, 6, 16, 22, 36, 50, 64, 98, 148 und 250 kDa.

2.4.10 Konzentrationsabschätzung von Nukleinsäuren

2.4.10.1 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: $A_{260} \cdot \varepsilon = c$ [ng/ µl]

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

2.4.10.2 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.

2.4.11 Nachweis spezifischer Sequenzen über Southernblot-Analyse

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

2.4.11.1 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.

2.4.11.2 Transfer auf eine Nylonmembran durch Vakuum-Blot

1,0 bis 1,5 µg der zu untersuchenden DNA wurde in einem Gesamtvolumen von 100 µl 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 etwa 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.

2.4.11.3 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 unmittelbar vorher für 10 min bei 95 °C denaturierten Sonde pro ml Prähybridisierungslösung eingesetzt wurden. Der Hybridisierung bei 68 °C über Nacht folgten zwei Waschschritte 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 60 min in 1 % Blockierungslösung bei Raumtemperatur erfolgte eine Inkubation für 45 min bei Raumtemperatur mit einem Antikörperkonjugat (polyklonale Schaf-Anti-Digoxygenin-Fab-Fragmente konjugiert mit alkalischer Phosphatase). Darauf folgten mindestens zwei Waschschritte in Maleinsäurepuffer für mindestens je 15 min. Nach einer Äquilibrierung der Membran in Puffer 3 (0,1 M Tris/ HCl, pH 9,5; 0,1 M NaCl; 0,05 M $MgCl_2$) 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-Phospat (0,175 mg/ ml) zu einem blauen Farbstoff.

2.4.12 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) (Mullis und Faloona, 1987) diente zur Amplifikation von DNA und zur Verifikation 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 Verifikation von Transformanten wurde die PCR auf ganzen Zellen einzelner Kolonien durchgeführt. Dazu wurde ein Teil der Kolonie in 40 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, sowie je 20 pM des 3’- und des 5’-Oligonukleotids enthalten. Als Puffer wurde einfach konzentrierter Puffer von Roche mit $MgCl_2$ verwendet. Nach einer Denaturierung des PCR-Ansatzes für 10 Minuten bei 95 °C wurde die DNA über 20 Zyklen für Klonierungen und 35 Zyklen für Verifikationen amplifiziert. Danach folgte ein zehnminütiger Schritt (72 °C) zur Amplifikation nicht vollendeter DNA-Ketten. Die PCR zur Amplifikation von DNA wurden auf chromosomaler DNA des Wildtypstammes SC5314 durchgeführt. Die Konzentrationen an dNTP, Puffer und Oligonukleotide entsprachen denen 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 (Ito *et al*., 1983). Es wurden 50 ml einer Kultur mit einer $OD_{600\ nm}$ von 0,6 bis 1 abzentrifugiert, die Zellen einmal in dH_2O gewaschen und in 400 µl 0,1 M LiOAc resuspendiert und in 50 µl Aliquots aufgeteilt. Diese wurden abzentrifugiert und zu dem Pellet wurde folgender Mix hinzugegeben: 240 µl 50 % PEG3350, 36 µl 1 M LiOAc, 10 µl Heringssperma-DNA (10 mg/ ml), 10 µl Plasmid-DNA und 64 µl dH_2O. Der Ansatz wurde anschließend für 30 min bei 30 °C inkubiert. Nun folgte ein Hitzeschock über 30 min bei 42 °C. Die Zellen wurden schließlich abzentrifugiert, in 1 ml YPD aufgenommen und für 2 Stunden bei 30 °C regeneriert. Nach einer erneuten Zentrifugation wurden die Zellen in 200 µl YPD aufgenommen und auf Selektionsmedium ausplattiert. Danach erfolgte die Inkubation bei 30 °C.

2.5.3 Transformation von *C. albicans*

Die Transformation in *C. albicans* erfolgte nach der Sphäroblastenmethode 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 bis 0,8 durch fünfminutiges abzentrifugieren bei 3000 Upm geerntet. Die Zellen wurden in 20 ml dH_2O 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 erneutem Waschen 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 sphäroblastiert. 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 $CaCl_2$; 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 Sphäroblasten mit 10 µg Herinssperma-DNA (10 mg/ ml) und 1,5 bis 2,5 µg DNA zusammengegeben und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 1 ml PEG-Lösung (20 % PEG400; 10 mM $CaCl_2$; 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 $CaCl_2$) 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 mit Plasmiden eine LiOAc-Methode verwendet. Hierbei wurden 200 µl einer über Nacht Kultur abzentrifugiert und in 100 µl 10 x OSB-Mix (0,2 ml 1 M LiOAc; 0,8 ml 50 % PEG8000; 15 mg DTT; 250 µg Einzelstrang-DNA) aufgenommen. Nach Zugabe der zu transformierenden DNA wurden die Zellen gemischt und 30 min bei 43,5 °C inkubiert. Anschließend wurden sie auf Selektionsplatten ausplattiert und bei 30 °C für drei Tage inkubiert.

2.6 Analyse von Proteinen

2.6.1 Antikörper

Primärantikörper:	Anti-Flag, monoklonal, Maus, 1:1000 (Stratagene)
	Anti-Pir1-Serum, polyklonal, Kaninchen, 1:1000 (M. Makarow)
	Anti-Als1p, polyklonal, Kaninchen, 1:10000 (L.L. Hoyer)
	Anti-Rbt5p/ Rbt51p, polyklonal, Kaninchen, 1:5000 (D. Kornitzer)
	Anti-Flag, monoklonal, Zellkultur, konjugiert mit Peroxidase, 1:1000 (Sigma)
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-Medium auf eine $OD_{600\ nm}$ von 0,15 angeimpft und über Nacht bis zu einer $OD_{600\ nm}$ von 4 bis 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 zweimal für 10 min mit zehnminütiger Pause bei 4 °C 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 von dem klaren Überstand durch Zentrifugation (3 min, 3500 Upm) abgetrennt. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration (siehe 2.6.3) wurden die Extrakte eingefroren.

2.6.3 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Die Proteingehaltsbestimmung nach Bradford (1976) beruht darauf, dass der Farbstoff Coomassie Brillant 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 dH_2O 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 Nachweis der Phosphorylierung von Proteinen

Zum Nachweis von Phosphorylierungen wurde der Proteinextrakt mit 2 U alkalischer Phosphatase (Roche) für eine bestimmte Zeit zwischen 5 min und 6 h (siehe Angabe in den Abbildungen) bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Proteine mit Laemmli-Puffer versetzt, denaturiert und das Laufverhalten mittels einer Western-Blot-Analyse überprüft.

2.6.5 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. Alternativ wurde die XCell SureLock™ Mini-Cell-Gelapparatur der Firma Invitrogen verwendet.

Die aufzutrennenden Proteine wurden sofort nach der Präparation im Verhältnis 2:1 mit 3x Laemmli-Puffer (30 % Glyzerin, 6 % SDS, 188 mM Tris/ HCl, pH 6,8, 15 % β-Mercaptoethanol, 0,006 % Bromphenolblau) 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 dH_2O, filtrieren; 180 ml 50 % (w/ v) TCA} angefärbt und anschließend wurde das Gel bis zur gewünschten Blaufärbung wieder entfärbt {15 % (w/ v) Methanol; 7,6 % (w/ v) Essigsäure}. Als Größenstandard für Proteine wurde der SeeBlue® Plus2 Proteinstandard der Firma Invitrogen benutzt (siehe 2.4.9).

2.6.6 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. Der Transfer 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, pH 7,5 (50 mM Tris; 150 mM NaCl), 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/ v) Tween-20 in TBS} und zweimal mit 0,5 % „Blocking“-Lösung bei RT jeweils 10 min gewaschen. Es folgte eine Inkubation (45 min) mit dem entsprechenden Zweitantikörper in 1 % „Blocking“-Lösung (Roche).

Zur Entfernung unspezifischer Bindungen wurde die Membran dreimal mit TBST-Puffer für 15 min gewaschen. Nach kurzem Waschen in PBS, pH 7,4 (140 mM NaCl; 3 mM KCl; 8 mM Na_2HPO_4; 1,8 mM KH_2PO_4) erfolgte die Detektion durch die Verwendung des Chemilumineszenz-Substrats „SuperSignal ULTRA“ (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 Glasobjektträger ist die DNA der zu untersuchenden offenen Leseraster (ORFs) fixiert. Durch Scannen der DNA-Chips mit zwei verschiedenen Wellenlängen (532 nm 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 Übernachtkultur, in 50 ml frisches YPD-Medium auf eine $OD_{600\ nm}$ von 0,05 angeimpft. Die Zellen wurden dann bis zu einer $OD_{600\ nm}$ von 0,5 wachsen gelassen und durch Zentrifugation geerntet (5 min, 3500 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 $OD_{600\ nm}$ von 0,5 durch Zentrifugation (5 min, 3500 Upm) pelletiert. Nach Entfernung des Überstandes wurde das Zellpellet im verbleibenden Überstand resuspendiert. Die Zellsuspension wurde langsam in flüssigen Stickstoff getropft, so dass gefrorene Zellkugeln entstanden. Die gefrorenen Zellkugeln wurden bei -80 °C gelagert. Zum Zellaufschluss wurden die gefrorenen Zellkugeln zusammen mit einer Metallkugel (∅ 7 mm) in ein gekühltes Teflongefäß gegeben und in einem Micro-Dismembrator (B. Braun Biotech International GmbH, Melsungen) für 2 min bei 2600 Upm gerüttelt. Der so erhaltene 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 minütiger 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 Lufttrocknung 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 dem Auftauen der Probe wurde die RNA durch Zentrifugation (30 min, 13000 Upm) pelletiert und anschließend zweimal 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. 2.7) 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 Qia-quick PCR Purification Kits (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 dH_2O. Nach Vereinigung der zwei Eluate wurden diese mit Hilfe von Microcon-YM30 Säulen (Millipore) auf ein Volumen von etwa 10 µl aufkonzentriert.

Tab. 2.7: Reaktionsansatz zur Herstellung von markierter cDNA aus Gesamt-RNA.

Komponente	Volumen [µl]
5x Erststrang Puffer	24
C. albicans specific Oligonukleotid-Mix (0,1 pmol/ µl)	3
AncT mRNA Oligonukleotide (1,5 µg/ µl)	3
Oligo dT18-21 (0,5 µg/ µl)	6
10 mM dNTP (ohne 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 DEPC - H_2O	120 µl

2.7.4 Hybridisierung und Waschen der DNA-Mikroarrays

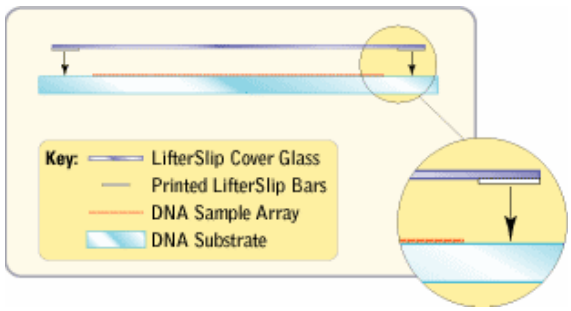


Abb. 2.1: Schematische Darstellung der zur Hybridisierung genutzten Deckgläser.

Es wurden Mikroarrays (Eurogentec, Belgien) benutzt, 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 Hybridiesierungskammer (Corning) gelegt und am Rand mit zweimal 10 µl destilliertem Wasser versehen. Die Hybridisierung erfolgte im Wasserbad für 24 h bei 42 °C. Die Objektträger wurden anschließend aus den Hybridisierungskammern entnommen und mit moderater 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 im BMFZ 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 7.2 (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 benutzen 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 wurden 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 eingesetzt. 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 % entsprach.

2.7.7 Clusteranalysen

Für Clusteranalysen wurden die Daten aller Replikate eines Experimentes gemittelt und dann in das Programm GeneSpring 7.2 importiert. Die Clusteranalysen mit den jeweils angegeben Genen wurden mit GeneSpring 7.2 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 (18-20 h) in SD-Medium wachsen gelassen. Diese 500 ml sollten in etwa 1 g 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 1 mM 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 1 min gevortext. Nach jeweils einer Minute wurden die Zellen für eine Minute auf Eis gestellt. Der Zellaufschluss wurde mikroskopisch überprüft. Die Extrakte wurden nur bei nahezu völligem Aufschluss zur Analyse verwendet. Die Extrakte mit den Glasperlen wurden nun vier- bis fünfmal mit 50 ml eiskaltem Wasser und 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 10 min 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 dH_2O entfernt. Von den erhaltenen SDS extrahierten Zellwänden wurden Aliquots von 2x 100 mg und einmal 50 mg Nassgewicht abgewogen.

2.8.2 Bestimmung des Mannoproteingehalts

100 mg Nassgewicht der SDS-extrahierten Zellwände 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 zehnminütigen 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 einer 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 Na_2CO_3 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 inkubiert. Nach Zugabe von 0,1 ml Lösung B (1,6 g p-Dimethylaminobenzaldehyd in 30 ml konzentrierter HCl und 30 ml EtOH) wurde die Absorption bei 520 nm gemessen. Eine Standardkurve wurde mit Glukosamin (0-200 mg) hergestellt, wobei die Proben der Standardkurve genauso wie die anderen Proben, einschließlich des HCl Schritts, behandelt wurden.

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 1 ml 10 mM Tris/ HCl, pH 7,5 mit 1 mM PMSF wurde 1 mg/ ml Zymolyase 20T pro Gramm Nassgewicht zugegeben. Der Reaktionsansatz wurde über Nacht bei 37 °C inkubiert. Unlösliches Material wurde durch Zentrifugation bei 13000 Upm für 15 min entfernt. 400 µl des Überstandes (beinhaltet β1,6-Glukan und geschnittenes 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 ergibt.

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 %) und danach sofort 5 ml Schwefelsäure (98 %) hinzugefügt. Nachdem die Probe gut gemischt wurde, folgte eine dreißigminütige Inkubation. Anschließend wurde die Absorbtion bei 490 nm gemessen. Die Ergebnisse wurden anhand einer Standardkurve mit Glukose (0-100 µg) quantifiziert. Die Ergebnisse wurden in µg/ 100 mg Nassgewicht, in Trockengewicht der Zellwände (das Trockengewicht ist etwa 1/ 10 des Nassgewichts) oder in relativem Verhältnis zum Wildtyp (Wert =1) angeben.

2.9 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 11.0“ nachbearbeitet.

3. Ergebnisse

3.1 Sequenzvergleich von Dom34p

Das Dom34-Protein ist in vielen Organismen konserviert. Man findet es in Hefen (*S. cerevisiae*, *S. pombe* und *Zygosaccharomyces rouxii*), Säugetieren (*M. musculus* und *H. sapiens*), Insekten (*Anopheles gambiae*, *D. melanogaster*) und Pflanzen (*A. thaliana*). Ein Ortholog wurde auch bei zwei Archaebakterien (*Methanococcus jannaschii* und *S. solfataricus*) identifiziert. Bis heute konnte kein Ortholog von *DOM34* in den sequenzierten Genomen von Eubakterien gefunden werden. Die vollständige Sequenzierung und Annotierung des Genoms von *C. albicans* (http://www-sequence.stanford.edu/group/candida) erlaubte die Identifizierung des *DOM34*-Gens in diesem Organismus. In der Abbildung 3.1 lässt sich die Sequenzidentität und Sequenzähnlichkeit des Dom34-Proteins aus *C. albicans* mit Dom34p-Homologen anderer Organismen erkennen.

	Candida albicans	
	Sequenzidentität	**Sequenzähnlichkeit**
Saccharomyces cerevisiae	36 %	56 %
Schizosaccharomyces pombe	39 %	62 %
Zygosaccharomyces rouxii	40 %	62 %
Homo sapiens	38 %	59 %
Mus musculus	36 %	59 %
Drosophila melanogaster	37 %	60 %
Anopheles gambiae	36 %	60 %

Abb. 3.1: Homologie von Dom34p aus *C. albicans* zu Dom34-Proteinen anderer Organismen. Homologien wurden durch BLAST-Vergleiche der Volllängenproteine ermittelt (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST).

Die Dom34-Proteine von *C. albicans* und den aufgeführten Hefen *S. cerevisiae*, *S. pombe* und *Z. rouxii* zeigen eine ähnlich hohe Sequenzidentität von 36 % bis 40 %. Die Sequenzähnlichkeit der Proteine bewegt sich zwischen 56 % und 62 %. Auffällig ist, dass auch die Verwandschaft zum Dom34p des Menschen oder der Maus etwa genau so hoch ist wie zu Dom34p der Hefen.

In Abbildung 3.2 ist die Aminosäurensequenz von Dom34p der Organismen *S. pombe* (SpErf1), *D. melanogaster* (DmPelota), *C. albicans* (CaDom34) und *S. cerevisiae* (ScDom34p) dargestellt. Farblich hervorgehoben wurden drei Domänen von *S. cerevisiae*,

welche von Davis und Engbrecht (1998) vorgeschlagen wurden. Es handelt sich um einen NLS-Bereich, eine ERF1-Domäne und einen Leucin-Zipper-Bereich. Bei dem Kern-Transport-Signal (NLS – Nuclear Localization Sequence) handelt es sich um eine Arginin- und Lysin-reiche Sequenz. Viele der für den Kern bestimmten Proteine haben das Sequenzmotiv: zwei kurze Folgen von basischen Aminosäuren, getrennt durch zehn beliebige

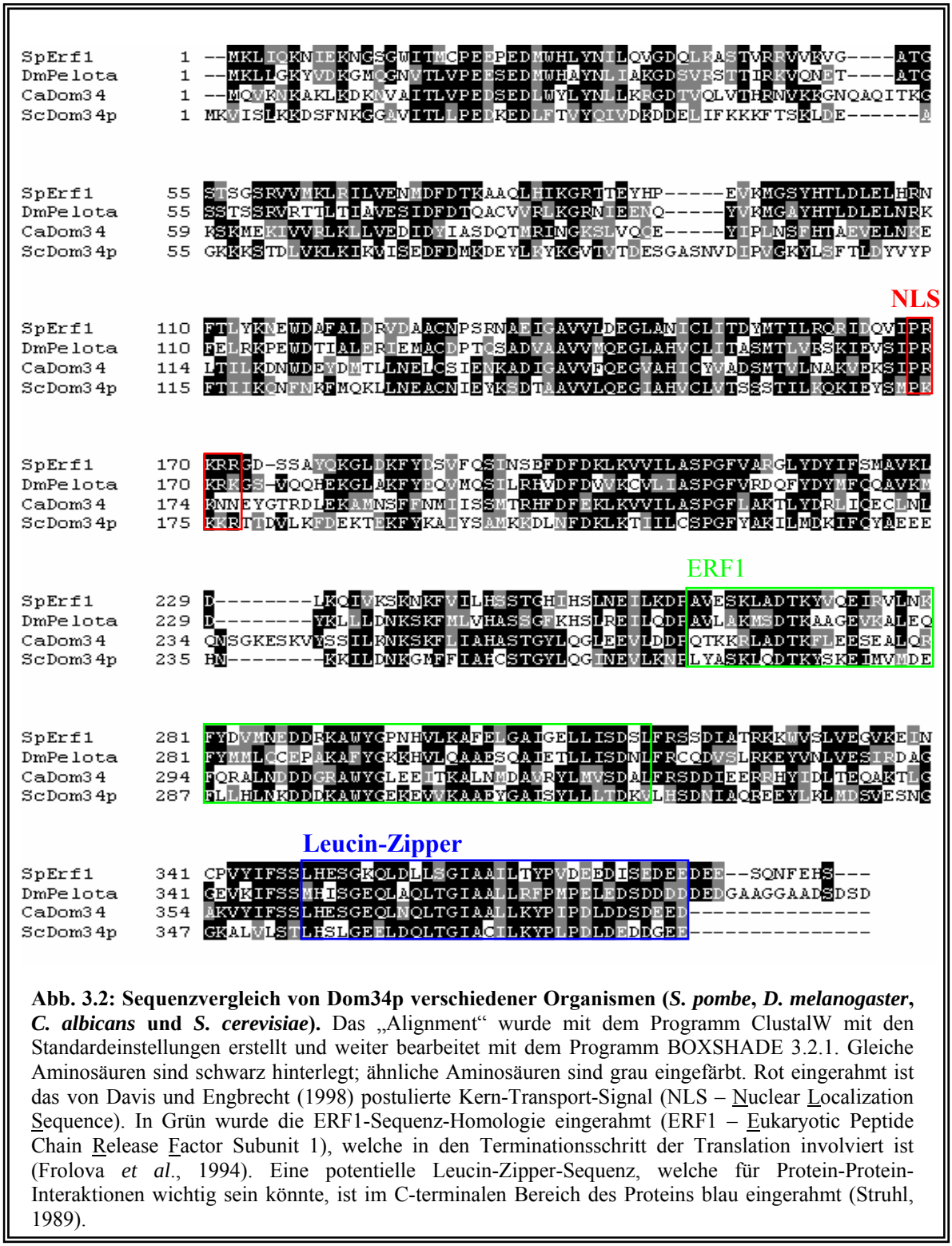


Abb. 3.2: Sequenzvergleich von Dom34p verschiedener Organismen (*S. pombe*, *D. melanogaster*, *C. albicans* und *S. cerevisiae*). Das „Alignment“ wurde mit dem Programm ClustalW mit den Standardeinstellungen erstellt und weiter bearbeitet mit dem Programm BOXSHADE 3.2.1. Gleiche Aminosäuren sind schwarz hinterlegt; ähnliche Aminosäuren sind grau eingefärbt. Rot eingerahmt ist das von Davis und Engbrecht (1998) postulierte Kern-Transport-Signal (NLS – Nuclear Localization Sequence). In Grün wurde die ERF1-Sequenz-Homologie eingerahmt (ERF1 – Eukaryotic Peptide Chain Release Factor Subunit 1), welche in den Terminationsschritt der Translation involviert ist (Frolova *et al.*, 1994). Eine potentielle Leucin-Zipper-Sequenz, welche für Protein-Protein-Interaktionen wichtig sein könnte, ist im C-terminalen Bereich des Proteins blau eingerahmt (Struhl, 1989).

Aminosäuren. Oftmals findet sich aber auch eine nicht zweigeteilte, kurze Folge von 4-5 basischen Aminosäuren (Struhl, 1989). Dennoch bleibt unklar, ob *C. albicans* eine NLS besitzt, da dieser Bereich nicht eindeutig einer NLS-Domäne gleicht (Abb. 3.2). Bei der ERF1-Domäne (ERF1 – Eukaryotic Peptide Chain Release Factor Subunit 1) handelt es ich um eine typische Domäne einer Proteinfamilie, die in den Terminationsschritt der Translation involviert ist (Frolova *et al.*, 1994). Dabei vermittelt der Terminationsfaktor die Termination durch Erkennung eines oder mehrerer Stop-Kodons und die Peptidkette wird von der Peptidyl-tRNA abgetrennt. Im Carboxy-terminalen Bereich des Dom34-Proteins findet sich ein Leucin-Zipper; Leucin-Zipper-Bereiche sind bekannte Motive für Protein-Protein-Interaktionen (Struhl, 1989).

3.2 Disruption des *DOM34*-Gens

Es wurde beschrieben, dass in einem bestimmten Stammhintergrund die Disruption des *DOM34*-Gens von *S. cerevisiae* unter anderem einen Einfluss auf den Zellzyklus, die Translation, aber auch auf morphogenetische Prozesse, wie zum Beispiel die Pseudohyphenausbildung, ausübt (Davis und Engbrecht, 1998). In unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass die Disruption von *DOM34* von *S. cerevisiae* Defekte der *O*-Glykosylierung von homologen und heterologen Proteinen, wie a-Agglutinin, Chitinase oder hIGF-1 (human Insulin-like Growth Factor 1) hervorruft (Finck *et al*., 1996). Um die Folgen einer Abwesenheit des *DOM34*-Genprodukts in *C. albicans* näher untersuchen zu können und um mehr über die Eigenschaften des Genprodukts erfahren zu können, wurden in *C. albicans* beide Allele des *DOM34*-Gens in zwei Stammhintergründen disruptiert. Diese Stämme waren zum einen CAI4 (Wildtyp) und zum anderen CAP1-3121 (*pmt1*Δ::*hisG*/*pmt1*Δ::*hisG*), da in *S. cerevisiae* ein synthetischer Phänotyp der *pmt1*Δ- und *dom34*Δ-Deletionen zu beobachten war.

3.2.1 Konstruktion von *dom34*Δ-Mutanten

Zur Disruption des *DOM34*-Gens wurde die „Flipper-Methode“ benutzt (Morschhäuser *et al*., 1999). Das verwendete Plasmid pJB28 (zur Verfügung gestellt von J. van den Boom) beeinhaltet die Flipper-Disruptionskassette, welche *C. albicans-DOM34*-Homologien (3’- und 5’-Bereich) und eine *S. cerevisiae*-Flippase unter der Kontrolle des *C. albicans-SAP2*-Promotors trägt. Dieser ist induziert unter Stickstoff-Mangel-Bedingungen, wobei 0,4 % Rinderserumalbumin als Stickstoffquelle dient. Weiterhin besteht die Disruptionskassette aus dem *URA3*-Selektionsmarker und den FRT-Bereichen (Flippase Recognition Target Sites), zwischen denen die homologe, sequenzspezifische Rekombination erfolgt. Das Plasmid wurde mit den Restriktionsendonukleasen *Apa*I und *Sac*II geschnitten. Das so erhaltene etwa 5,9 kb große Fragment wurde nach erfolgter Aufreinigung zur Disruption eingesetzt. Die Stämme CAI4 (Wildtyp) und CAP1-3121 (*pmt1*Δ::*hisG*/*pmt1*Δ::*hisG*) wurden mit der Disruptionskassette transformiert. Die Selektion erfolgte auf SD-Medium ohne Uridin. Die so erhaltenen Transformanten wurden mittels Kolonie-PCR auf eine korrekte Integration der Disruptionskassette vorgetestet. Dazu wurden die Oligonukleotide p3URA3ver und p1-verDOM34 eingesetzt und ein Produkt von 1430 bp erzielt (Daten nicht gezeigt). Anschließend wurden die positiven Transformanten in einer Southernblot-Analyse bestätigt.

Die so erhaltenen heterozygoten Stämme wurden als SK5, SK20 (CAI4), SK6 und SK19 (CAP1-3121) benannt (Tab. 2.2, Anhang - Abb. 8.1, Anhang - Abb. 8.2). Zur Wiederherstellung der *ura3*-Auxotrophie wurden die Stämme in Induktionsmedium für den *SAP2*-Promotor über Nacht angezogen (1,17 % YCB, 0,4 % BSA und 100 µg/ml Uridin) und dann auf Minimal-Agar-Platten, die 100 µg/ml Uridin enthielten, ausplattiert. Es wurden Kolonien mit großem und kleinem Durchmesser erhalten. Die Kolonien mit dem kleinen Durchmesser wurden weiter untersucht, da sie, im Gegensatz zu den großen Kolonien den *URA3*-Marker wegen der Induktion des *SAP2*-Promotors und der damit verbundenen homologen Rekombination verloren hatten. Die kleinen Kolonien waren daher auf das im Medium vorhandene, aber sehr gering dosierte Uridin angewiesen und wuchsen daher langsamer unter diesen Bedingungen. Die so erhaltenen Transformanten wurden mittels Kolonie-PCR auf einen Verlust der Disruptionskassette getestet; es wurden die Oligonukleotide p1-verDOM34 und p2-verDOM34 eingesetzt und ein Produkt von 1715 bp erzielt (Daten nicht gezeigt). Nachfolgend wurden die positiven Transformanten in einer Southernblot-Analyse bestätigt (Abbildung 3.5). Es wurden die Stämme SK7, SK9 (CAI4), SK8 und SK10 (CAP1-3121) erhalten (Tab. 2.2, Anhang - Abb. 8.1, Anhang - Abb. 8.2).

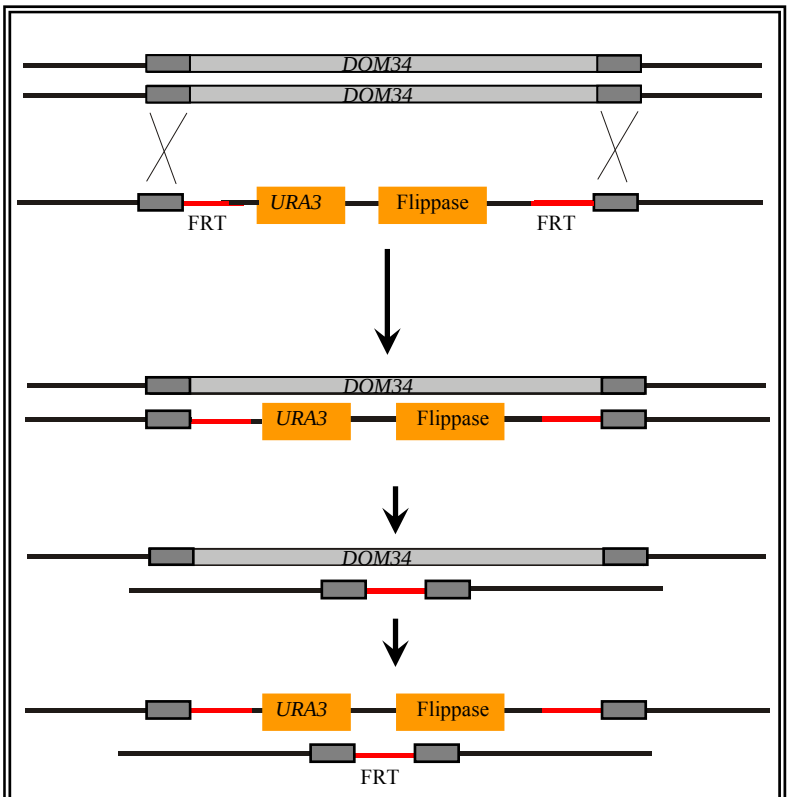


Abb. 3.3: Schematische Darstellung der Disruption von *DOM34*. *DOM34*-Gen-Bereiche sind hellgrau markiert; homologe Bereiche im 3'- und 5'-Bereich des Gens sind dunkelgrau dargestellt (645 bp im 3'-Bereich und 1014 bp im 5'-Bereich). Die Lage der FRT- Bereiche (Flippase Recognition Target Sites), welche eine Länge von 31 bp besitzen, sind rot markiert. Die Exzision der Disruptionskassette der zweiten Disruptionsrunde ist nicht dargestellt.

Anschließend wurde das zweite Allel von *DOM34* zu disruptiert. Die weitere Vorgehensweise glich der Disruption des ersten Allels. Daraus resultierten die Stämme SK25, SK59 (CAI4), SK52 und SK18 (CAP1-3121) (Tab. 2.2, Anhang - Abb. 8.1, Anhang - Abb. 8.2). Nach erfolgter Wiederherstellung der *ura3*-Auxotrophie wurden die Stämme SK47, SK48 (CAI4), SK58 und SK24 (CAP1-3121) (Tab. 2.2, Anhang - Abb. 8.1, Anhang - Abb. 8.2) erhalten. Die oben beschriebene Vorgehensweise ist schematisch in Abbildung 3.3 zu erkennen. Alle Schritte der vollständigen Disruption von *DOM34* wurden durch eine Southernblot-Analyse verifiziert (Abbildung 3.5). Die genomische DNA der zu untersuchenden Stämme wurde mit den Restriktionsendonukleasen *Cla*I und *Sal*I geschnitten. Je nach Disruptionssituation ergab

sich damit ein unterschiedliches Bandenmuster bei der Southernblot-Analyse. Zur Verdeutlichung sind die drei unterschiedlichen Disruptionssituationen in Abbildung 3.4 schematisch wiedergegeben. In der Abbildung 3.4 **A**. ist die Wildtypsituation abgebildet. In der Abbildung 3.4 **B**. erkennt man die im *DOM34*-Locus integrierte Disruptionskassette. In der Abbildung 3.4 **C**. wird die Situation des Allels nach dem Verlust der Disruptionskassette gezeigt. Weiterhin dargestellt ist der Bindebereich der Sonde im Promotorbereich des *DOM34*-Gens. Die Sonde mit einer Gesamtlänge von 1048 bp wurde mittels PCR und anschließender Markierung hergestellt (2.4.11.1). Für die PCR wurden das Plasmid pJB28 und die Oligonukleotide P1-DOM34-Labeling und P2-DOM34-Labeling eingesetzt.

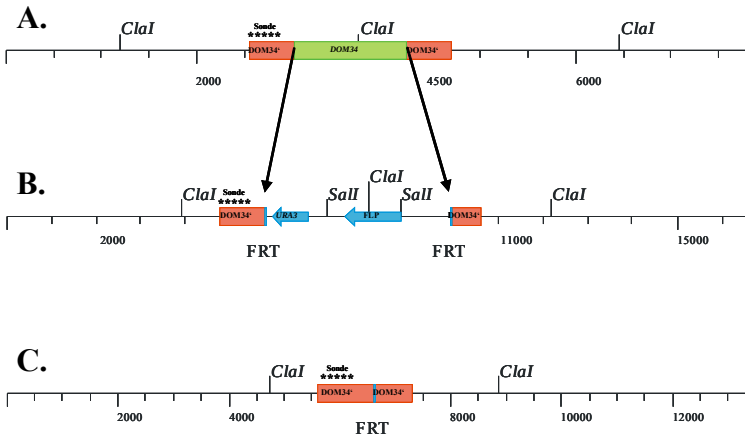


Abb. 3.4: Schematische Darstellung der unterschiedlichen *DOM34*-Allele. A. Wildtypsituation. **B.** Disruptionskassette im *DOM34*-Locus eines Allels. **C.** Situation nach Exzision der Kassette. Die Bindestelle der benutzen Sonde (1048 bp) ist mit Sternen gekennzeichnet und befindet sich im Promotorbereich des *DOM34*-Gens. Der kodierende Bereich ist grün eingefärbt, während Homologien im Disruptionsfragment rot dargestellt sind.

In Abbildung 3.5 ist exemplarisch das Bandenmuster einer Southernblot-Analyse der Disruption von *DOM34* in Stamm CAI4 gezeigt. Zu sehen sind die Stämme CAI4, SK5, SK7, SK25 und SK47. Das Wildtypallel zeigt eine Bande von etwa 2,5 kb, während bei Integration der Disruptionskassette sich eine Bande von ca. 3,3 kb ergibt. Nach erfolgter Wiederherstellung der *ura3*-Auxotrophie durch den Verlust der Disruptionskassette kann eine Bande von etwa 4,1 kb detektiert werden. Es wurden jeweils zwei voneinander unabhängige Transformantenlinien der Stammhintergründe CAI4 (Wildtyp) und CAP1-3121 (*pmt1*Δ::*hisG*/*pmt1*Δ::*hisG*) generiert (Anhang - Abb. 8.1, Anhang - Abb. 8.2) und mittels Southernblot-Analyse bestätigt (Abbildung 3.5). Bei einigen Experimenten wurde auch eine *dom34*Δ/*dom34*Δ-Mutante des Stammhintergrundes CAI8 untersucht, welche von J. van den Boom zur Verfügung gestellt wurde (C8D-3478). Die korrekte Disruption von *DOM34* in diesem Stamm wurde mittels Southernblot-Analyse bestätigt (Daten nicht gezeigt).

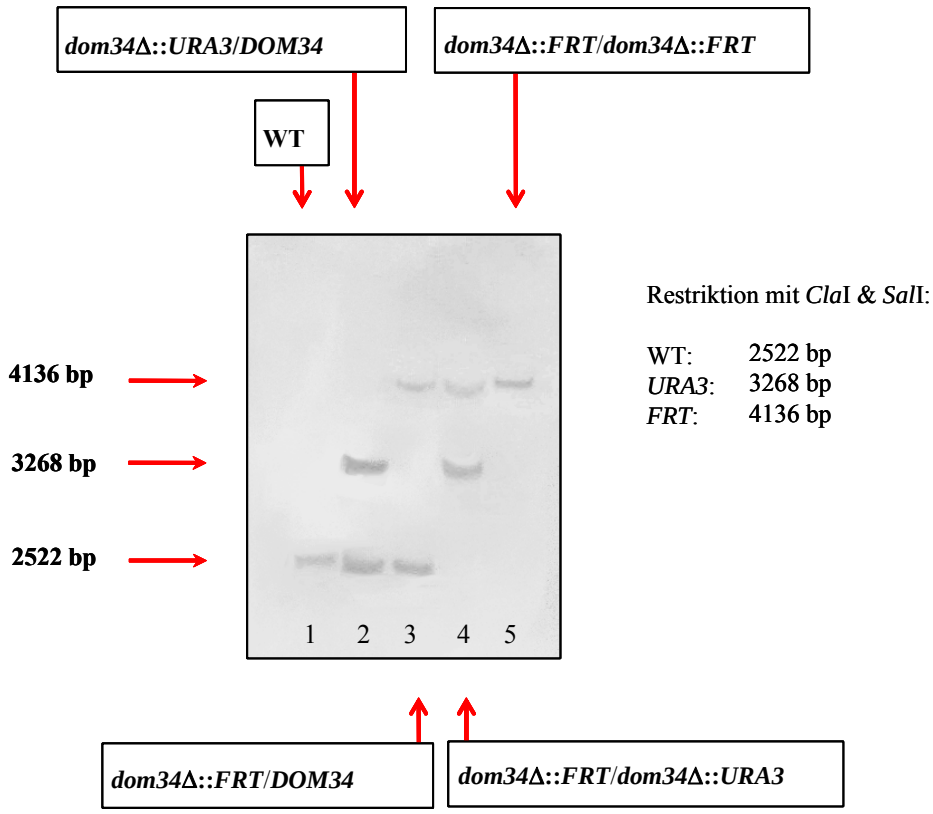


Abb. 3.5: Southernblot-Analyse verschiedener Disruptionssituationen von *DOM34* im Stammhintergrund CAI4. In der ersten Spur sieht man das Wildtyp-Fragment (2522 bp); Spur 2 zeigt ein Wildtyp-Fragment (2522 bp) und ein Allel-Fragment mit korrekter Integration der Disruptionskassette (3268 bp); in der Spur 3 sieht man ein Wildtyp-Fragment (2522 bp) und ein Allel-Fragment nach erfolgter Exzision der Disruptionskassette (4136 bp); Spur 4 zeigt ein Allel-Fragment mit korrekter Integration der Disruptionskassette (3268 bp) und ein Allel-Fragment nach erfolgtem Verlust der Disruptionskassette (4136 bp); in der letzten Spur (5) sieht man nur noch eine Bande bei 4136 bp, da bei beiden Allelen der Verlust der Disruptionskassette erfolgt ist.

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

Seit längerem ist bereits bekannt, dass die *URA3*-Expression vom Integrationsort abhängig ist und Phänotypeffekte aufgrund der Genomlokalisation entstehen können (Cheng *et al.*, 2003; Lay *et al.*, 1998). Um diese Positionseffekte zu vermeiden, wurde das *URA3*-Gen aller *dom34*Δ-Stämme nach der von Prill (2004) beschriebenen Methode am authentischen Genort rekonstituiert. Wenn es nicht anders im Text vermerkt ist, wurden ausschließlich die rekonstituierten Stämme für die Experimente eingesetzt. Nach erfolgter Behandlung des Plasmides HB5 (Losberger und Ernst, 1989) mit den Restriktionsendonukleasen *Pst*I und *Xho*I, erhielt man ein etwa 4,3 kb großes Fragment, welches den genomischen *URA3*-Locus trägt.

Die zu rekonstituierenden, *ura3*-auxotrophen Stämme wurden mit dem Fragment transformiert und es erfolgte eine Selektion auf SD-Medium ohne Uracil. Dies erfolgte auch mit der von J. van den Boom zur Verfügung gestellten *dom34*Δ/*dom34*Δ-Mutante des Stammhintergrunds CAI8 (SK65). Mittels Kolonie-PCR wurde die korrekte Integration des *URA3*-Gens am nativen Locus verifiziert. Dazu wurden die Oligonukleotide i-p2-URA3-ver und p3URA3ver eingesetzt und ein Produkt von etwa 800 bp erhalten (Daten nicht gezeigt).

3.3 Phänotypische Charakterisierung der Mutanten

Nach der Disruption des *DOM34*-Gens sollten die Auswirkungen des Genverlustes auf die Phänotypen der betroffenen Stämme untersucht werden. Dabei wurde unter anderem der Einfluss auf die Morphologie, aber auch beispielsweise die Auswirkungen auf die Sensitivität gegenüber Zellwand-destabilisierender Substanzen, Aluminiumchlorid, Antibiotika oder Aminoglykosiden getestet. Zur Bestätigung der Ergebnisse wurden teilweise unabhängige Transformantenlinien getestet.

3.3.1 Wachstum der *dom34*Δ-Mutanten

Es konnte gezeigt werden, dass sich in *S. cerevisiae* synthetische Phänotypen der *pmt1*Δ- und *dom34*Δ-Deletionen ergeben (Wickert, 1998). Daher war es von besonderem Interesse, zu überprüfen, ob dieser synthetische Phänotyp auch in *C. albicans* aufzufinden ist. Zunächst wurde eine Wachstumsanalyse der hergestellten *C. albicans*-Deletionsmutanten durchgeführt (Abb. 3.6).

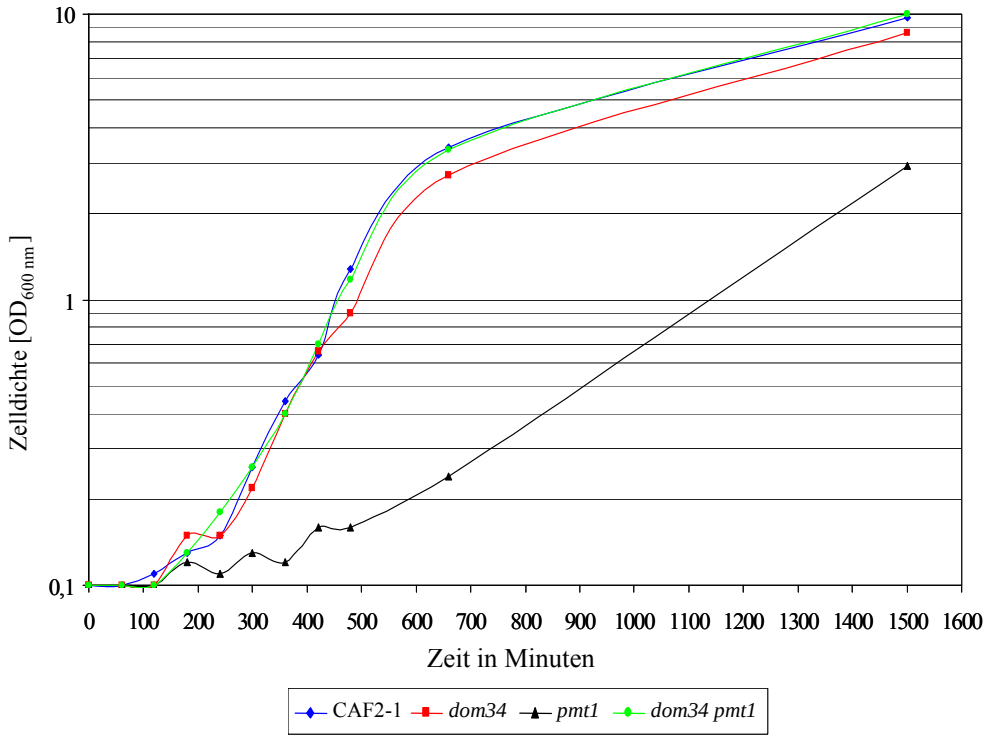


Abb. 3.6: Wachstumskurve verschiedener *C. albicans*-Mutanten in SD-Medium @ 30 °C. Die Zelldichte wurde photometrisch über einen Zeitraum von 1500 min ermittelt und halblogarithmisch aufgetragen. Es wurden folgende Generationszeiten in SD-Medium ermittelt: Wildtyp (CAF2-1): 131 min; *dom34*Δ/*dom34*Δ (SK51): 151 min; *pmt1*Δ/*pmt1*Δ (SPCa2): 308 min und *dom34*Δ/*dom34*Δ *pmt1*Δ/*pmt1*Δ (SK53): 135 min.

In der Abbildung 3.6 ist eine Wachstumskurve der Mutanten in SD-Medium abgebildet. Es wurde eine Generationszeit in SD-Medium der *pmt1*Δ/*pmt1*Δ-Mutante von 308 min im Vergleich zum Wildtyp, welcher eine Generationszeit von 131 min aufwies, festgestellt (Abbildung 3.6). Dies bestätigt frühere Ergebnisse von Timpel *et al.* (1998). Die *dom34*Δ/*dom34*Δ-Mutante zeigte eine Generationszeit von 151 min, was einer nur leichten

Wachstumsverzögerung entspricht, während die Doppeldeletionsmutante *dom34*Δ/*dom34*Δ *pmt1*Δ/*pmt1*Δ überraschenderweise mit 135 min annähernd die gleiche Generationszeit wie der Wildtyp aufwies. Somit hebt die *dom34*Δ-Mutation den durch die *pmt1*Δ-Mutation verursachten Wachstumsdefekt auf.

Bei erhöhter Temperatur (42 °C) konnten Wachstumsdefekte auf Minimalmedium- (SD), jedoch nicht auf Vollmedium-Platten (YPD) beobachtet werden (Abb. 3.7). Die *dom34*Δ/*dom34*Δ-Mutante zeigt einen geringen Wachstumsdefekt, welcher durch das Plasmid pSK2 (CaDom34p^{FLAG}) komplementiert werden kann. Die *pmt1*Δ/*pmt1*Δ-Mutante ist hypersensitiv gegen die erhöhte Temperatur von 42 °C und es ist kein Wachstum detektierbar, während die Doppeldeletionsmutante *dom34*Δ/*dom34*Δ *pmt1*Δ/*pmt1*Δ keinen Temperaturphänotyp zeigt. Somit wurden die Hitzesensitivitäten beider Mutanten in der Doppeldeletionsmutante wieder aufgehoben. Bei diesem Test wurde zur Bestätigung der erhaltenen Ergebnisse die jeweils zweite unabhängige *dom34*Δ/*dom34*Δ *pmt1*Δ/*pmt1*Δ- und *dom34*Δ/*dom34*Δ-Transformantenlinie (SK 61 und SK62) überprüft. Diese Stämme zeigen die oben beschriebenen Phänotypen der Stämme SK53 und SK51 (Abbildung 3.7). Es wurde auch der Einfluss erhöhter Wachstumstemperatur auf den Stamm SK65 (CAI8 *dom34*Δ/*dom34*Δ) im Vergleich zu CAI8 getestet. SK65 zeigt einen geringen Wachstumsdefekt (Daten nicht gezeigt). Dieser Wachstumsdefekt der *dom34*Δ-Muatation ist allerdings nicht so stark ausgeprägt wie im Stammhintergrund CAI4 (Abb. 3.7). Eine Kältesensitivität der *dom34*Δ-Mutanten bei einer Temperatur von 16 °C, wie sie in einem speziellen Stammhintergrund bei *S. cerevisiae* gezeigt werden konnte (Davis und Engbrecht, 1998), wurde bei *C. albicans* nicht bestätigt (Daten nicht gezeigt).

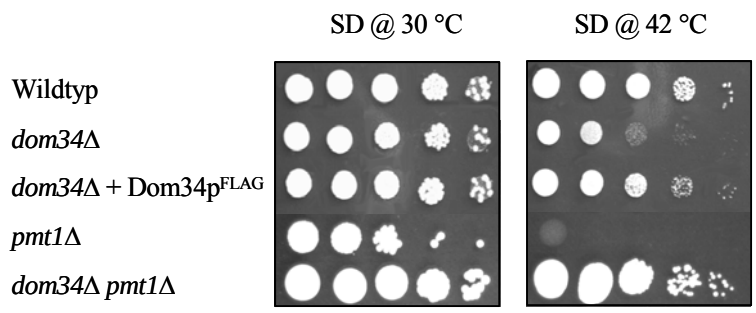
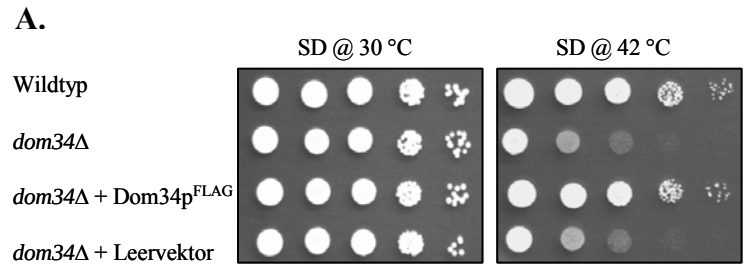


Abb. 3.7: Temperatursensitivität der Mutanten bei 42 °C. Es wurden Zellen einer Übernacht-Kultur des Wildtyps (CAF2-1) und der Stämme *dom34*Δ/*dom34*Δ (SK51), *pmt1*Δ/*pmt1*Δ (SPCa2), *dom34*Δ/*dom34*Δ *pmt1*Δ/*pmt1*Δ (SK53) und *dom34*Δ/*dom34*Δ (SK47) mit dem Plasmid pSK2 (Dom34p^{FLAG}) auf 10^5 bis 10^1 Zellen verdünnt und in einem Volumen von jeweils 5 µl auf SD-Platten getropft. Die Inkubation erfolgte bei 30 °C bzw. 42 °C für 2-3 Tage.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Plasmid pSK2 konstruiert (Abb. 3.8). Dieses kodiert für CaDom34p mit Carboxy-terminalem FLAG-Epitop; das Fusionsgen wird durch den *CaMET3*-Promotor transkribiert. Dieser Promotor wird durch Methionin und Cystein reprimiert, ist in SD-Medium aber aktiv.



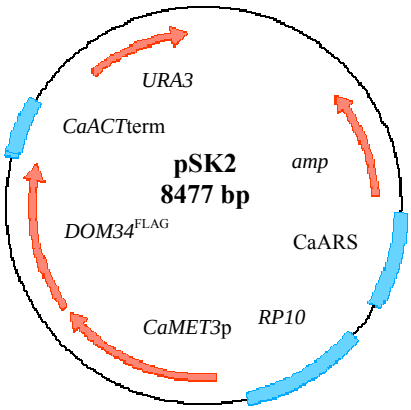


Abb. 3.8: Sensitivitätstest zur Klärung der Funktionalität von pSK2 im *dom34*Δ-Stamm (SK47) und Darstellung des Plasmids pSK2. A. Zellen einer Übernacht-Kultur der Stämme CAF2-1, SK51, SK47 + pSK2 und SK47 + pSP38 (Leervektor) wurden auf 10^5 bis 10^1 Zellen verdünnt und in einem Volumen von jeweils 5 µl auf SD-Platten getropft. Die Inkubation erfolgte bei 30 °C bzw. 42 °C für 2-3 Tage. In **B.** abgebildet ist das konstruierte Plasmid pSK2 mit CaDom34p und C-terminalem FLAG-Epitop unter der Kontrolle des *CaMET3*-Promotors.

Es wird ersichtlich, dass der Temperatursensitivitäts-Phänotyp der *dom34*Δ-Mutante durch das Plasmid pSK2, aber nicht durch den Leervektor (pSP38) vollständig aufgehoben werden kann (Abbildung 3.8); das Dom34^{FLAG}-Fusionsprotein ist also funktionell. Da überraschenderweise die Temperatursensitivität der *pmt1*Δ/*pmt1*Δ-Mutante durch die Einführung einer Deletion von *DOM34* supprimiert werden konnte (Abb. 3.9), wurde in einem weiteren Experiment untersucht, ob in der *dom34*Δ/*dom34*Δ *pmt1*Δ/*pmt1*Δ-Doppeldeletionsmutante durch die Dom34p-Rekonstitution mittels pSK2 (CaDom34p^{FLAG}) der *pmt1*Δ/*pmt1*Δ-Phänotyp wiederhergestellt werden kann. Wie in Abb. 3.9 zu erkennen ist, wird die Temperatursensitivität einer *pmt1*Δ/*pmt1*Δ-Mutante in dem Stamm *dom34*Δ/*dom34*Δ *pmt1*Δ/*pmt1*Δ mit dem Plasmid pSK2 (SK37), aber nicht in der Kontrolle (*dom34*Δ/*dom34*Δ *pmt1*Δ/*pmt1*Δ mit dem Leervektor pSP38) wieder hergestellt. Aufgrund dieser Ergebnisse kann davon ausgegangen werden, dass die erzielten Phänotypen der *dom34*Δ-Mutanten tatsächlich durch die Deletion von *DOM34* in den unterschiedlichen Stammhintergründen hervorgerufen werden.

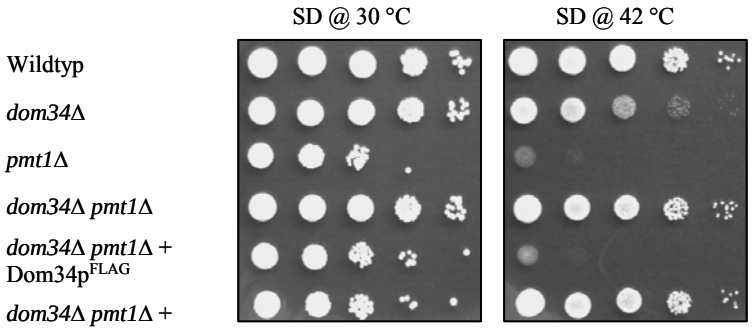


Abb. 3.9: Temperatursensitivität der Mutanten bei 42 °C. Es wurden Zellen einer Übernacht-Kultur der Stämme CAF2-1, SK51, SPCa2, SK53 und *dom34*Δ/*dom34*Δ *pmt1*Δ/*pmt1*Δ mit dem Plasmid pSK2 (SK37), sowie von *dom34*Δ/*dom34*Δ *pmt1*Δ/*pmt1*Δ mit dem Plasmid pSP38 (Leervektor) auf 10^5 bis 10^1 Zellen verdünnt und in einem Volumen von jeweils 5 µl auf SD-Platten getropft. Die Inkubation erfolgte bei 30 °C bzw. 42 °C für 2-3 Tage.

3.3.2 Flokkulation

Stämme mit Mutationen in Genen für Proteinmannosyltransferasen zeigen verschieden stark ausgeprägte Tendenzen zur Aggregation (Timpel *et al.*, 1998; Prill, 2000; Klinkert, 2002). Zellaggregate werden beispielsweise durch eine veränderte Zelloberfläche verursacht. Die *pmt1*Δ/*pmt1*Δ-Mutante aggregiert sehr stark. Es sollten daher *dom34*Δ-Mutanten hinsichtlich ihrer Tendenz zur Aggregation näher untersucht werden.

Wie in Abbildung 3.10 zu erkennen ist, können bei der *dom34*Δ-Mutante nach 6 Stunden kaum Aggregate beobachtet werden, welche zu Boden gesunken sind. Nach einer Inkubationszeit von 6 h wird bei der *pmt1*Δ-Mutante die Tendenz zur Aggregation gut ersichtlich (rot eingekreist). Wie in obigen Phänotypen erfolgt in der Doppeldeletionsmutante *dom34*Δ/*dom34*Δ *pmt1*Δ/*pmt1*Δ eine Suppression des Flokkulationsphänotyps der *pmt1*Δ-Mutante.

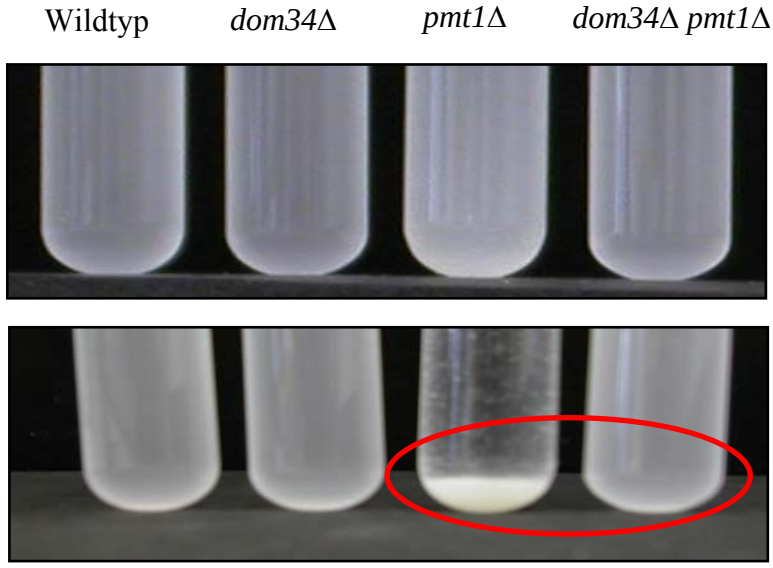


Abb. 3.10: Flokkulationsversuch zur Ermittlung des Aggregationsverhaltens der Mutanten. Übernachtkulturen der zu testenden Stämme CAF2-1, SK51, SPCa2 und SK53 wurden auf eine $OD_{600\ nm}$ von 1 verdünnt, stark gemischt (Vortex) und bei Raumtemperatur stehen gelassen. Es wird das Aggregationsverhalten der Mutanten zu Beginn (0 h) und nach einer Dauer von 6 h dokumentiert.

3.3.3 Zelloberflächenhydrophobizität

Der erste Schritt einer Candidose ist die Adhäsion des pathogenen Erregers an der Wirtsoberfläche. Es ist bekannt, dass die Zelloberflächenhydrophobizität einen Einfluss auf die Adhäsionsfähigkeit von *C. albicans* ausübt (Glee *et al.*, 1995). Timpel *et al.* (1998) zeigten, dass *pmt1*Δ/*pmt1*Δ-Mutanten in Relation zum Wildtyp weniger effizient an Endothel- und Epithelzellen adhärieren, was mit einer veränderten Zelloberflächenhydrophobizität einhergeht (Prill *et al.*, 2005).

Es wurden die *dom34*Δ-Mutanten verschiedener Stammhintergründe auf ihre Verteilung in einem Wasser/ Oktan-System hin getestet (Tabelle 3.1). Dazu wurden die zu testenden Mutanten mit Wasser auf eine $OD_{600\ nm}$ von 1 verdünnt und mit Oktan überschichtet. Anschließend wurde stark gemischt (Vortex) und die Zelldichte der wässrigen Phase erneut bestimmt. Diese wurde dann in Relation zur Anfangszelldichte gesetzt. Die *dom34*Δ-Mutanten der Stammhintergründe CAI4 und CAI8 zeigen jeweils eine stärkere Hydrophobizität als der Wildtyp. 10,8 % bzw. 4,8 % der *dom34*Δ-Zellen befinden sich in der wässrigen Phase, während 15,7 % bzw. 10,5 % der Zellen des Wildtyps in dieser Phase zu finden sind. Anders verhält sich die *pmt1*Δ-Mutante, die stark hydrophil ist. Hier sind es 56,3 % der Zellen in der wässrigen Phase im Vergleich zu 15,7 % des Wildtyps. Beim Betrachten des Wertes der *dom34*Δ/*dom34*Δ *pmt1*Δ/*pmt1*Δ Doppeldeletionsmutante wird deutlich, dass eine in die *pmt1*Δ/*pmt1*Δ-Mutante zusätzlich eingeführte *DOM34*-Deletion die stark hydrophilen Eigenschaften der *pmt1*Δ-Mutante um mehr als 20 % auf 31,6 % abschwächt. Die stark hydrophilen Eigenschaften der *pmt1*Δ-Mutante werden allerdings nicht vollständig supprimiert.

Tab. 3.1: Anteil an *C. albicans*-Zellen verschiedener Stammhintergründe in der wässrigen Phase.

Genotyp	Zellen in der wässrigen Phase
CAI8	10,5 % (± 6,0 %)
CAI8 *dom34*Δ	4,8 % (± 2,5 %)
CAF2-1	15,7 % (± 3,1 %)
CAI4 *dom34*Δ	10,8 % (± 1,4 %)
*pmt1*Δ	56,3 % (± 12,3 %)
*dom34*Δ *pmt1*Δ	31,6 % (± 5,1 %)

Zellen einer Übernacht-Kultur der Stämme CAI8, CAI8 *dom34*Δ/*dom34*Δ (SK65), CAF2-1, SK51, SPCa2 und SK53 wurden in Wasser auf eine $OD_{600\ nm}$ von 1 verdünnt und mit Oktan überschichtet. Nach dreiminütigem Mischen (Vortex) wurde die $OD_{600\ nm}$ der wässrigen Phase ins Verhältnis zur Anfangs-$OD_{600\ nm}$ gesetzt (Reynolds und Fink, 2001). Angegeben ist der Mittelwert von drei unabhängigen Experimenten.

3.3.4 Morphogenese

C. albicans ist in der Lage, in verschiedenen morphologischen Wachstumsformen aufzutreten. Neben der Hefe-Form sind weitere Ausprägungen wie beispielsweise Pseudohyphen, echte Hyphen oder die Opaque-Form möglich (Ernst, 2000). Weiterhin ist *C. albicans* fähig, so genannte Chlamydosporen, welche als Überdauerungsstadium diskutiert werden, auszubilden (Joshi *et al.*, 1993). Die Bildung von Hyphen wird bei *C. albicans* durch verschiedene Stimuli ausgelöst. Positive Stimuli sind zum Beispiel *N*-Acetylglukosamin (GlcNAc) oder Serum (Odds, 1988). Es konnte gezeigt werden, dass *pmt1*Δ-Mutanten, abhängig vom Stimulus, nur noch eingeschränkt bis gar nicht mehr in der Lage sind, Hyphen auszubilden (Timpel *et al.*, 1998). Es wurden die verschiedenen *dom34*Δ/*dom34*Δ-Mutanten hinsichtlich ihrer veränderten Morphologie näher untersucht. Auch hier war von Interesse, aufzuklären, ob ein synthetischer Phänotyp der *dom34*Δ- und der *pmt1*Δ-Deletion in *C. albicans* vorhanden ist.

3.3.4.1 Hypheninduktion auf festem Medium

Die Hyphenbildung auf festem Medium wurde mittels drei verschiedener Induktionsmedien untersucht. Die verschiedenen *dom34*Δ/*dom34*Δ-Mutanten wurden auf Pferdeserum-, Spider- und Lee's-Platten ausgestrichen und für etwa 3 Tage bei einer Temperatur von 37 °C

inkubiert. Anschließend wurde mikroskopisch der Einfluss einer Deletion von *DOM34* auf die Hyphenbildung überprüft.

In Abbildung 3.11 sind die Ergebnisse des Versuches dargestellt. Die Ergebnisse von Timpel *et al.*, (1998) zeigten, dass *pmt1*Δ-Mutanten nur noch eingeschränkt in der Lage sind, Hyphen auszubilden. Dieses konnte bestätigt werden (Abb. 3.11). Bei allen getesteten Bedingungen (Serum-, Spider- und Lee's-Medium) war die *pmt1*Δ-Mutante nicht in der Lage, Hyphen auszubilden. Die *dom34*Δ-Mutante zeigte keine morphologischen Unterschiede im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 3.11). Die Doppeldeletionsmutante *dom34*Δ/*dom34*Δ *pmt1*Δ/*pmt1*Δ zeigte dagegen das Wildtypverhalten auf allen getesteten Medien. Somit hebt eine *dom34*Δ-Mutation den Phänotypen der *pmt1*Δ-Mutante auf.

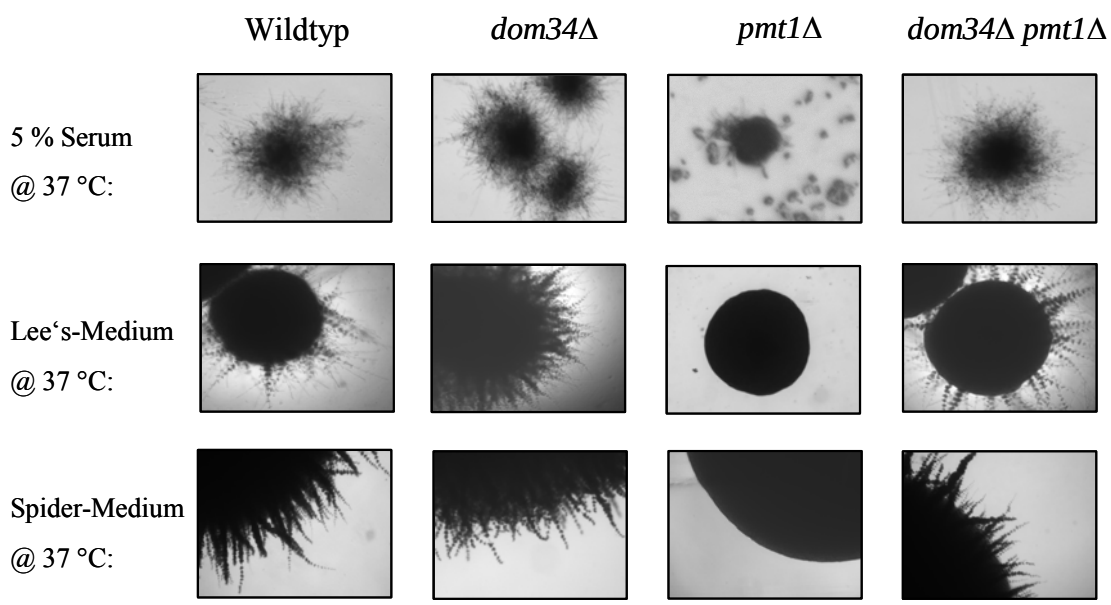


Abb. 3.11: Hyphenbildung verschiedener *C. albicans*-Stämme auf Serum-, Spider- und Lee's-Platten. Die Stämme CAF2-1, SK51, SPCa2 und SK53 wurden auf dem jeweiligen Medium ausgestrichen und nach etwa dreitägiger Inkubation bei 37 °C fotografiert. Gezeigt sind Ränder von Einzelkolonien.

3.3.4.2 Hypheninduktion in Flüssigmedium

Die Hypheninduktion in Flüssigmedium wurde mittels der drei verschiedenen Induktionsmedien (Serum-, Spider- und Lee's-Medium) untersucht. Die verschiedenen *dom34*Δ/*dom34*Δ-Mutanten wurden nach einer Hungerperiode von 1-3 Stunden in Wasser auf eine $OD_{600\ nm}$ von 0,1-0,5 im jeweiligen auf 37 °C vorgewärmten Medium verdünnt. Die Hypheninduktion bei 37 °C wurde über 2 bis 3 Stunden mikroskopisch verfolgt. Die erhaltenen Ergebnisse sind aus den Abbildungen 3.12, 3.13 und 3.14 ersichtlich.

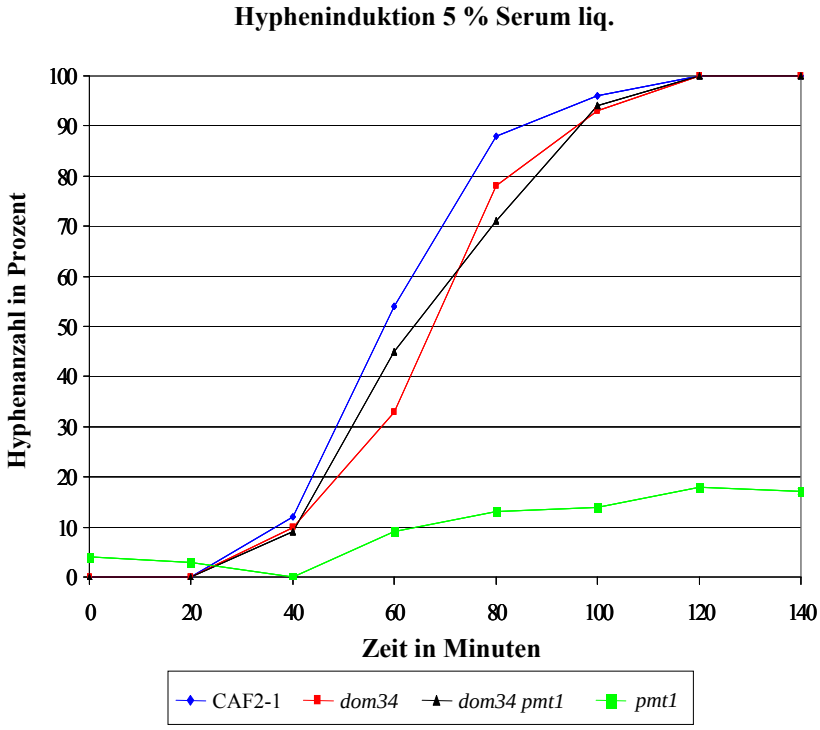


Abb. 3.12: Hyphenbildung verschiedener *C. albicans*-Stämme in 5 % Pferdeserum-Medium. Die zu untersuchenden Stämme CAF2-1, SK51, SPCa2 und SK53 wurden nach einer Hungerperiode von 1-3 Stunden in Wasser auf eine $OD_{600\ nm}$ von 0,1-0,5 in auf 37 °C vorgewärmtem 5 % Pferdeserum-Medium verdünnt. Die Hyphen-induktion wurde über 140 Minuten mikroskopisch verfolgt.

Die *pmt1*Δ-Mutante zeigte lediglich in Serum- und Spider-Medium eine Hyphenbildung. Aber auch nach mehr als zwei Stunden wies lediglich ein Fünftel der Zellen eine Hyphenbildung auf (Abb. 3.12, Abb. 3.14). In Lee's-Medium konnte auch nach mehr als zwei Stunden keine Hyphenbildung beobachtet werden (Abb. 3.13). Die *dom34*Δ-Mutante zeigte keinen Defekt und auch die Doppeldeletionsmutante *dom34*Δ/*dom34*Δ *pmt1*Δ/*pmt1*Δ verhielt sich unauffällig (Abb. 3.12, Abb. 3.13, Abb. 3.14). Nach 100-120 Minuten zeigten alle Zellen zu 100 % Hyphenbildung.

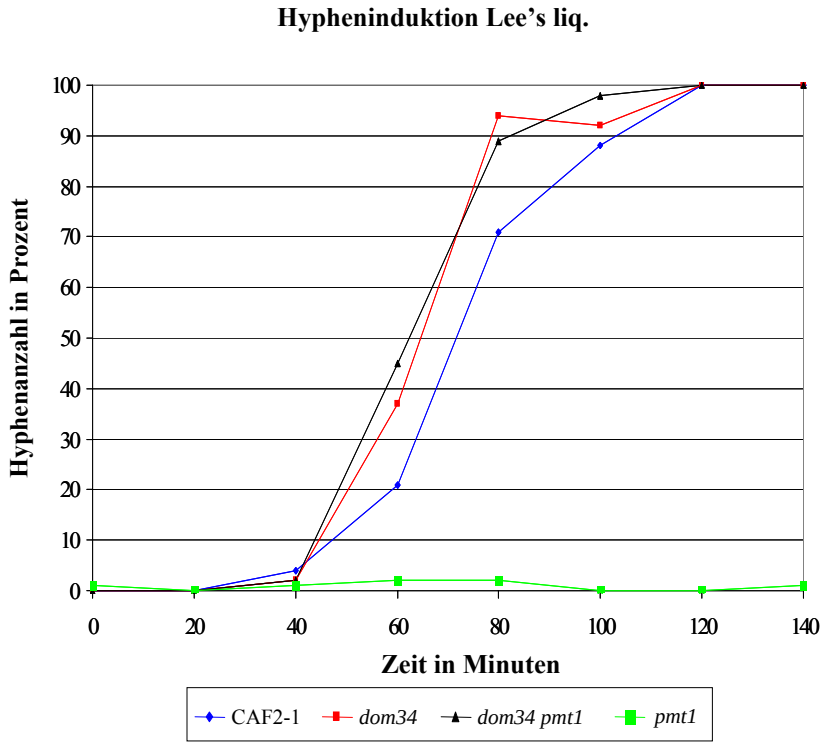


Abb. 3.13: Hyphenbildung verschiedener *C. albicans*-Stämme in Lee's-Medium. Die zu untersuchenden Stämme CAF2-1, SK51, SPCa2 und SK53 wurden nach einer Hungerperiode von 1-3 Stunden in Wasser auf eine $OD_{600\ nm}$ von 0,1-0,5 in auf 37 °C vorgewärmtem Lee's-Medium verdünnt. Die Hypheninduktion wurde über 140 Minuten mikroskopisch verfolgt.

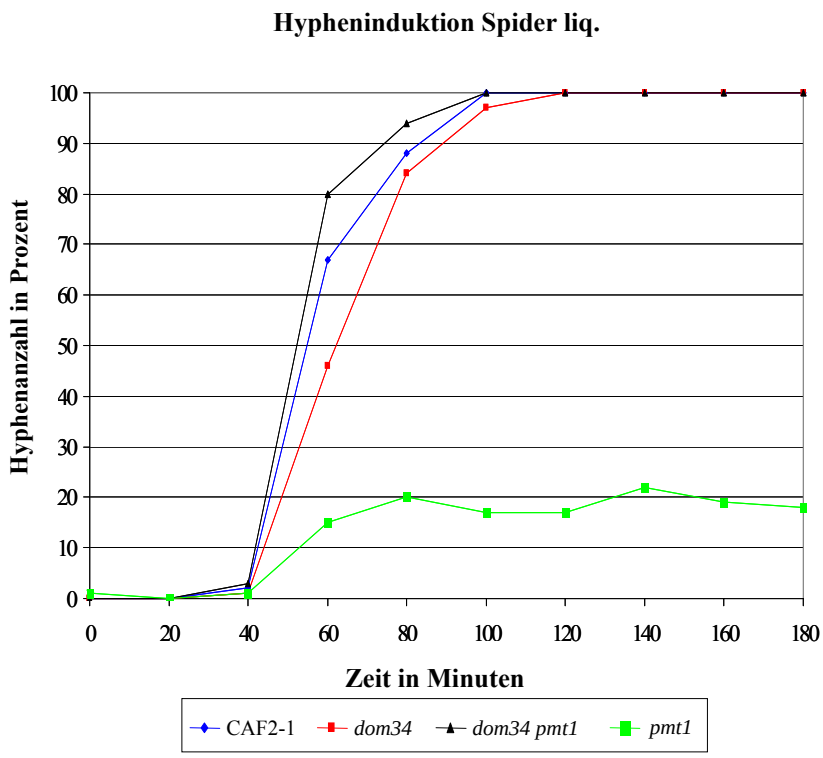


Abb. 3.14: Hyphenbildung verschiedener *C. albicans*-Stämme in Spider-Medium. Die zu untersuchenden Stämme CAF2-1, SK51, SPCa2 und SK53 wurden nach einer Hungerperiode von 1-3 Stunden in Wasser auf eine $OD_{600\ nm}$ von 0,1-0,5 in auf 37 °C vorgewärmtem Spider-Medium verdünnt. Die Hypheninduktion wurde über 180 Minuten mikroskopisch verfolgt.

3.3.4.3 Chlamydosporenbildung

Wie oben bereits erwähnt, ist *C. albicans* in der Lage, Chlamydosporen auszubilden (Joshi *et al.*, 1993). Es handelt sich dabei um dickwandige Zellen, welche Überdauerungsstadien darstellen könnten, aber wahrscheinlich nicht an der Pathogenität des Pilzes beteiligt sind. Die Bildung von Chlamydosporen geht mit einer Veränderung der Zellwand einher. Die Zusammensetzung der Zellwand, und damit viele *O*-glykosylierte Zellwandproteine sind sehr wahrscheinlich davon betroffen.

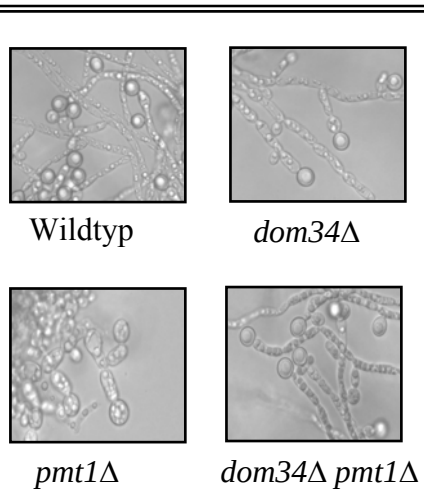


Abb. 3.15: Chlamydosporenbildung. Die zu testenden *C. albicans*–Stämme CAF2-1, SK51, SPCa2 und SK53 wurden sehr dünn auf Maismehl-Agarplatten ausgestrichen. Anschließend wurden zur Erzeugung mikroaerophiler Bedingungen Deckgläschen auf die Ausstriche gelegt. Die Platten wurden 7-9 Tage in Dunkelheit bei Raumtemperatur inkubiert. Die Bildung der Chlamydosporen wurde mikroskopisch überprüft.

Die Chlamydosporenbildung von *C. albicans* macht man sich als diagnostisches Mittel zur Unterscheidung von *Candida*-Spezies zu Nutze. Es wurden die *dom34*Δ-Mutanten des CAI4- und des *pmt1*Δ-Stammhintergrundes analysiert. Die Chlamydosporen, die von der *pmt1*Δ-Mutante gebildet werden, sehen im Vergleich zu denen des Wildtyps leicht verändert aus (Abbildung 3.15). Diese erscheinen kürzer und gedrungener als die des Wildtyps. Die Doppeldeletionsmutante und die *dom34*Δ-Mutante zeigten dagegen keine Veränderung der Chlamydosporen (Abbildung 3.15). Nach den Untersuchungen zur Morphogenese von Hyphen (auf festem

Medium und in Flüssigmedium) und Chlamydosporen ist festzustellen, dass in allen Fällen eine Suppression des *pmt1*Δ-Phänotyps durch die Deletion des *DOM34*-Gens in der Doppeldeletionsmutante *dom34*Δ/*dom34*Δ *pmt1*Δ/*pmt1*Δ erfolgte.

3.3.5 Untersuchungen zur Sensitivität der *dom34*Δ-Mutanten

Mittels Untersuchungen zur Sensitivität der Mutanten gegenüber verschiedenen Substanzen lassen sich weitere Aussagen zur Funktion von *DOM34* machen. Die *pmt1*Δ-Mutante zeigte beispielsweise erhöhte Sensitivitäten gegenüberüber verschiedenen Aminoglykosiden und Zellwand-destabilisierenden Agenzien (Timpel *et al.*, 1998). Hier wurden die Sensitivitäten verschiedener *dom34*Δ-Mutanten näher untersucht. Es sollte überprüft werden, ob genetische Interaktionen zwischen *PMT1*- und *DOM34*-Genen nachzuweisen sind.

3.3.5.1 Sensitivitäten gegen verschiedene Substanzen

Von *S. cerevisiae* ist seit längerem bekannt, dass viele Glykosylierungsmutanten aus bisher unbekannten Gründen eine erhöhte Sensitivität gegenüber Aminoglykosiden zeigen (Dean, 1995).

Die Aminoglykoside wirken im Inneren der Zelle, wo sie an den Ribosomen die Proteinbiosynthese störend beeinflussen. Das Aminoglykosid Hygromycin B induziert beispielsweise Fehllesungen und produziert abgewandelte Proteine, indem es spezifisch an die kleine Untereinheit des Ribosoms bindet (Brodersen *et al.*, 2000). Auch die *C. albicans pmt1*Δ-Deletionsmutante zeigt eine erhöhte Sensitivität gegenüber verschiedenen Aminoglykosid-Antibiotika, wie Hygromycin B (Abbildung 3.16; Timpel *et al.*, 1998). Die *dom34*Δ-Mutante und auch die Doppeldeletionsmutante *dom34*Δ/*dom34*Δ *pmt1*Δ/*pmt1*Δ verhalten sich wie der Wildtyp (Abbildung 3.16).

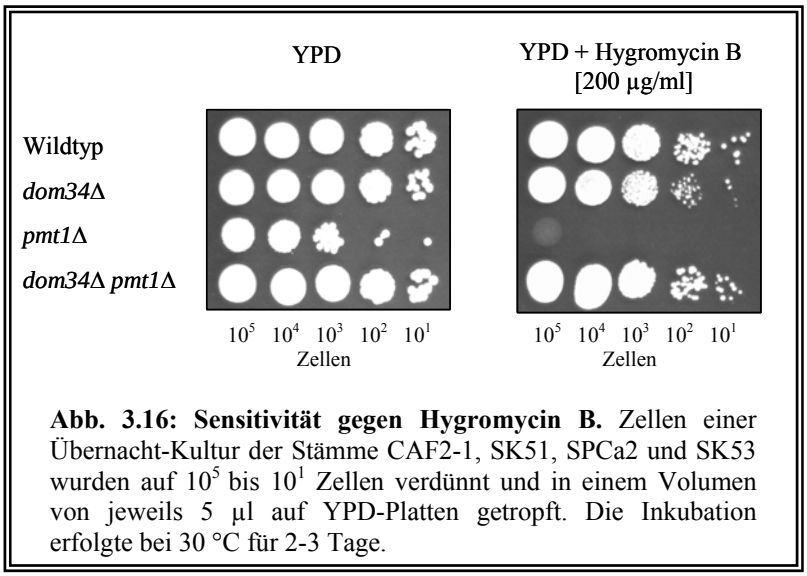


Abb. 3.16: Sensitivität gegen Hygromycin B. Zellen einer Übernacht-Kultur der Stämme CAF2-1, SK51, SPCa2 und SK53 wurden auf 10^5 bis 10^1 Zellen verdünnt und in einem Volumen von jeweils 5 µl auf YPD-Platten getropft. Die Inkubation erfolgte bei 30 °C für 2-3 Tage.

In der Abbildung 3.17 ist ein Sensitivitätstest der Mutanten gegenüber Nourseothricin abgebildet. Nourseothricin, ein Komplex von Streptothricin D und F, produziert vom Actinomyceten *Streptomyces noursei*, inhibiert die ribosomale Proteinsynthese und induziert Fehllesungen. Bei einer Konzentration von 50 µg/ml zeigt die *pmt1*Δ-Mutante eine starke Sensitivität gegenüber Nourseothricin (Abb. 3.17). Die *dom34*Δ-Mutante und die Doppeldeletionsmutante *dom34*Δ/*dom34*Δ *pmt1*Δ/*pmt1*Δ verhalten sich wie der Wildtyp und zeigen keinerlei Sensitivität (Abbildung 3.17).

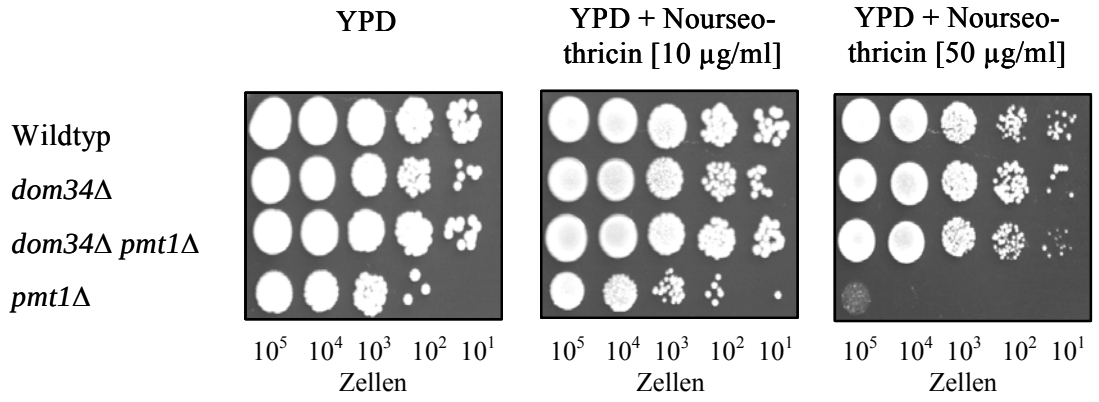


Abb. 3.17: Sensitivität gegen Nourseothricin. Zellen einer Übernacht-Kultur der Stämme CAF2-1, SK51, SPCa2 und SK53 wurden auf 10^5 bis 10^1 Zellen verdünnt und in einem Volumen von jeweils 5 µl auf YPD-Platten getropft. Die Inkubation erfolgte bei 30 °C für 2-3 Tage.

Die Azole Fluconazol, Ketoconazol, Itraconazol und Clotrimazol sind die am häufigsten verwendeten Antimykotika. Azole inhibieren durch eine Interaktion mit dem Cytochrom P-450 die Demethylierung am C-14 von Lanosterol zu Ergosterol. Dies führt zu einer Anhäufung von toxischen Sterolen in der Zellmembran (1.3 – Klinische Relevanz von *C. albicans* und Therapie von Candidosen). Es konnte bereits gezeigt werden, dass die *pmt1*Δ-Mutante supersensitiv gegen das Azol Clotrimazol ist (Timpel *et al.*, 1998). Diese Sensitivität konnte sowohl bei 30 °C (Daten nicht gezeigt), als auch bei 37 °C bestätigt werden (Abb. 3.18). Ebenfalls sensitiv ist die Mutante bei der menschlichen Körpertemperatur von 37 °C gegen Ketoconazol und Fluconazol (Abb. 3.18). Interessanterweise zeigt die *dom34*Δ-Mutante eine erhöhte Sensitivität gegen Fluconazol, Ketoconazol und Clotrimazol bei einer

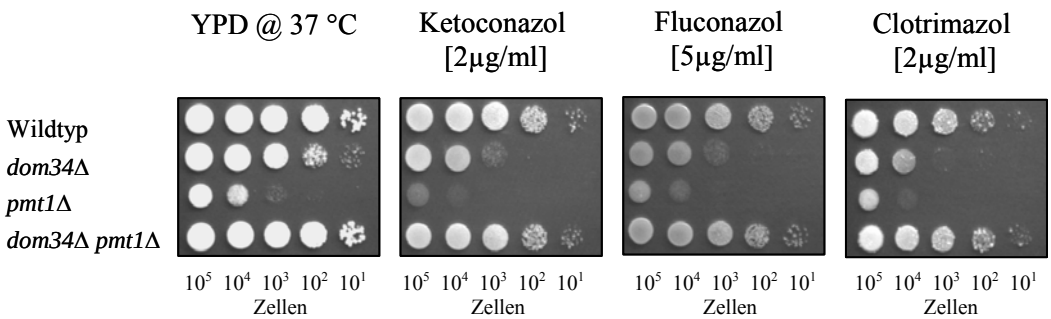


Abb. 3.18: Sensitivität gegen verschiedene Azole @ 37 °C. Zellen einer Übernacht-Kultur der Stämme CAF2-1, SK51, SPCa2 und SK53 wurden auf 10^5 bis 10^1 Zellen verdünnt und in einem Volumen von jeweils 5 µl auf YPD-Platten getropft. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C für 2-3 Tage.

Temperatur von 37 °C, nicht aber bei einer Wachstumstemperatur von 30 °C (Abb. 3.18, Daten nicht gezeigt). Die Doppeldeletionsmutante *dom34*Δ/*dom34*Δ *pmt1*Δ/*pmt1*Δ verhält sich wie der Wildtyp und zeigte keine Sensitivität; die Phänotypen der Einzeldeletionsmutanten werden in der Doppeldeletionsmutante supprimiert (Abb. 3.18).

3.3.5.2 Sensitivitäten gegen verschiedene Zellwand-destabilisierende Substanzen

Congo Red ist ein fluoreszierender Farbstoff, der Komplexe mit Glukan-Mikrofibrillen bildet und dadurch deren laterale Interaktion behindert. Dieses führt zu einer Destabilisierung der Zellwand (Kopecka und Gabriel, 1992). Eine zentrale Komponente des Signaltransduktionsweges, welcher die Expression von Zellwandkomponenten kontrolliert, ist die Proteinkinase C (PKC) (Banuett, 1998). Von *S. cerevisiae* ist bekannt, dass viele Mutanten des PKC-Weges sensitiv gegenüber niedrigen Konzentrationen von SDS sind.

In der Abbildung 3.19 ist das Sensitivitätsverhalten der Mutanten gegenüber SDS und Congo Red abgebildet. Die *pmt1*Δ-Mutante zeigt eine moderate Sensitivität gegen Congo Red und eine Hypersensitivität gegenüber YPD-Platten mit 0,06 % SDS (Abbildung 3.19). Die *dom34*Δ-Mutante ist nicht sensitiv gegen Congo Red, zeigt aber ebenfalls, wie die *pmt1*Δ-Mutante, eine Hypersensitivität gegen SDS (Abb. 3.19). Die Doppeldeletionsmutante *dom34*Δ/*dom34*Δ *pmt1*Δ/*pmt1*Δ verhält sich wie der Wildtyp. Die Phänotypen der Einzeldeletionsmutanten werden in der Doppeldeletionsmutante aufgehoben (Abb. 3.19). Bei diesem Test wurde zur Bestätigung der Ergebnisse der Sensitivität gegenüber SDS die jeweils zweite unabhängige *dom34*Δ/*dom34*Δ *pmt1*Δ/*pmt1*Δ- und *dom34*Δ/*dom34*Δ-Transformantenlinie (SK 61 und SK62) überprüft. Diese Stämme zeigen die oben beschriebenen Phänotypen der Stämme SK53 und SK51 (Abbildung 3.19). Es wurde auch die Sensitivität gegenüber SDS des Stamms SK65 (CAI8 *dom34*Δ/*dom34*Δ) im Vergleich zu CAI8 getestet. SK65 zeigt eine geringe Sensitivität gegenüber SDS (Daten nicht gezeigt). Diese Sensitivität der *dom34*Δ-Muatation ist allerdings nicht so stark ausgeprägt wie im Stammhintergrund CAI4 (Abb. 3.19).

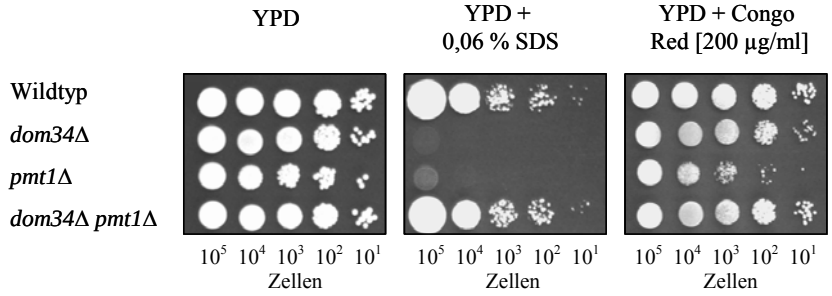


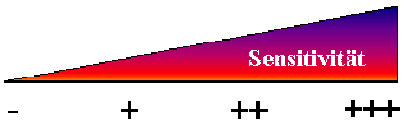
Abb. 3.19: Sensitivität gegen Congo Red und SDS. Zellen einer Übernacht-Kultur der Stämme CAF2-1, SK51, SPCa2 und SK53 wurden auf 10^5 bis 10^1 Zellen verdünnt und in einem Volumen von jeweils 5 µl auf YPD-Platten getropft. Die Inkubation erfolgte bei 30 °C für 2-3 Tage.

In der Tabelle 3.2 sind die Sensitivitätstest noch einmal zusammengefasst. Zusätzlich sind dort weitere Sensitivitätstestergebnisse der Mutanten gegen die Wirkstoffe G418 und Calcofluor White dokumentiert, deren Sensitivitätstests hier nicht gezeigt wurden. Calcofluor White ist ein fluoreszierender Farbstoff, der an naszierende Chitin-Mikrofibrillen bindet und deren Zusammenbau negativ beeinflusst, sowie einen negativen Effekt auf die Glukan-

synthese ausübt. Bei Geneticin 418 (G418) handelt es sich um ein Aminoglykosid; es unterbricht den Elongationszyklus, indem es mit der kleinen Untereinheit des Ribosoms interagiert. Die *dom34*Δ-Mutante ist leicht sensitiv gegen G418 und zeigt keine Sensitivität gegen Calcofluor White. Gegen beide Substanzen ist die *pmt1*Δ-Deletionsmutante sensitiv und auf den Sensitivitätsplatten konnte nur noch sehr geringes Wachstum der Mutante festgestellt werden (Daten nicht gezeigt, Tab. 3.2). Die Doppeldeletionsmutante *dom34*Δ/*dom34*Δ *pmt1*Δ/*pmt1*Δ verhält sich wie der Wildtyp. Die Sensitivitätsphänotypen der Einzeldeletionsmutanten werden in der Doppeldeletionsmutante supprimiert (Tab. 3.2).

Tab. 3.2: Sensitivitätsverhalten der Mutanten.

@ 30 °C	Hygromycin B [200 µg/ml]	G418 [1,2 mg/ml]	Calcofluor White [10 µg/ml]	Nourseo-thricin [50 µg/ml]	SDS [0,06 %]	Fluconazol [5 µg/ml]	Congo Red [200 µg/ml]	42 °C
Wildtyp	-	-	-	-	-	-	-	-
*dom34*Δ	-	+	-	-	+++	+	+	++
*pmt1*Δ	+++	++	++	+++	+++	++	++	+++
*dom34*Δ *pmt1*Δ	-	-	-	-	-	-	-	-



@ 37 °C	Hygromycin B [200 µg/ml]	SDS [0,06 %]	Congo Red [200 µg/ml]	Ketoconazol [2 µg/ml]	Clotrimazol [2 µg/ml]	Fluconazol [5 µg/ml]
Wildtyp	-	-	-	-	-	-
*dom34*Δ	+++	+++	+++	++	++	++
*pmt1*Δ	+++	+++	+++	+++	+++	+++
*dom34*Δ *pmt1*Δ	-	-	-	-	-	-

Zellen einer Übernacht-Kultur der Stämme CAF2-1, SK51, SPCa2 und SK53 wurden auf 10^5 bis 10^1 Zellen verdünnt und in einem Volumen von jeweils 5 µl auf YPD- oder SD-Platten getropft. Die Inkubation erfolgte bei 30 °C bzw. 37 °C für 2 bis 3 Tage. Ein (-) bedeutet, dass keine Sensitivität festgestellt worden ist und die Mutante sich wie der Wildtyp verhält. Ein (+) symbolisiert eine Sensitivität gegen den jeweiligen Wirkstoff oder die Temperatur oder beides. Der Grad der Sensitivität wird durch die Anzahl an (+)-Symbolen dargestellt. Die maximale Sensitivität, das bedeutet kein/ kaum Wachstum der getesteten Mutante, wird durch drei (+)-Symbole verdeutlicht.

3.3.5.3 Sensitivität gegenüber Aluminiumchlorid

Von *S. cerevisiae* ist bekannt, dass Mutanten des PKC-Signaltransduktionsweges eine erhöhte Sensitivität gegenüber Aluminium zeigen (Schott und Gardner, 1997). Um den möglichen Einfluss von Aluminiumchlorid ($AlCl_3$) auf das Wachstum der Glykosylierungsmutanten zu analysieren, wurden verschiedene $AlCl_3$-Konzentrationen (1 mM, 5 mM und 10 mM) getestet.

Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.20 dargestellt. Beim Wildtyp und allen getesteten Mutanten ist zu erkennen, dass mit erhöhter $AlCl_3$-Konzentration das Wachstum stärker gehemmt wird. Bereits bei geringen Konzentrationen von $AlCl_3$ wird ein starker Effekt auf das Wachstum der *pmt1*Δ-Mutante erzielt. Bei einer $AlCl_3$-Konzentration von 10 mM ist auch nach einer Inkubationsdauer von 49,5 Stunden kaum Wachstum detektierbar (Abb. 3.20).

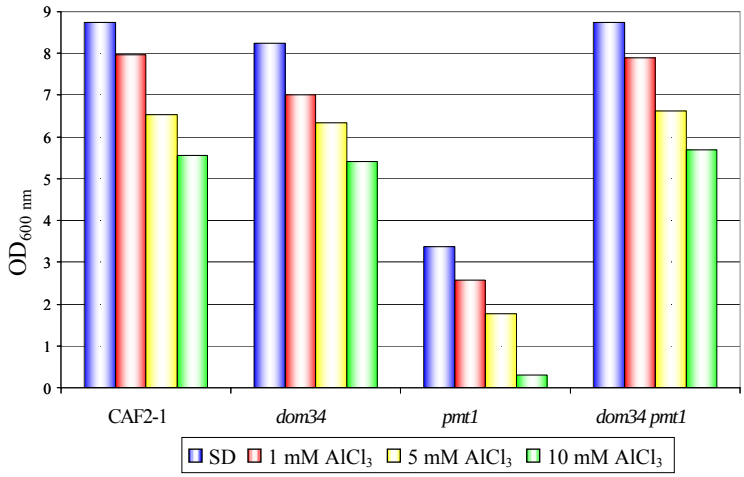


Abb. 3.20: Sensitivität der Mutanten gegenüber $AlCl_3$. Übernacht-Kulturen der Stämme CAF2-1, SK51, SPCa2 und SK53 wurden auf eine $OD_{600\ nm}$ von 0,1 verdünnt und bei 30 °C für bis zu 49,5 Stunden in SD-Medium (pH = 3,5) inkubiert. Zusätzlich wurde $AlCl_3$ (1 mM, 5 mM oder 10 mM) hinzugegeben.

3.3.6 Überexpression von Dom34p

Wie oben beschrieben, hatte die Deletion des *DOM34*-Gens im *C. albicans* Wildtypstamm CAI4 keinen Einfluss auf die Morphogenese der Hyphenbildung in verschiedenen flüssigen Induktionsmedien oder auf festen Medien (3.3.4). Auch die Chlamydosporenbildung der *dom34*Δ-Mutante war nicht betroffen. Davis und Engbrecht (1998) zeigten, dass *dom34*Δ-Mutanten eines speziellen *S. cerevisiae*-Stamms nur noch eingeschränkt in der Lage sind, Pseudohyphen auszubilden. Pseudohyphen entstehen durch unipolare Knospung und eine

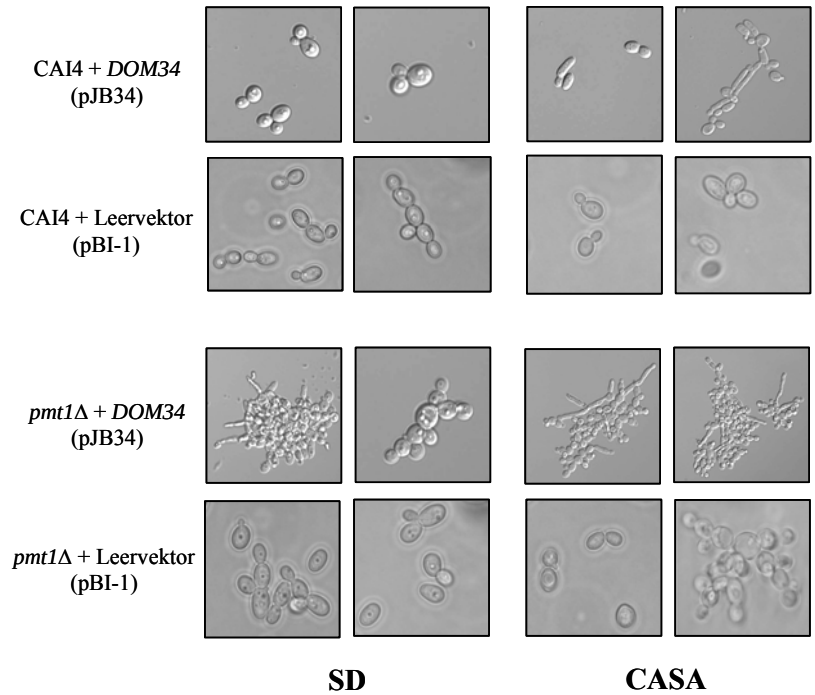


Abb. 3.21: Überexpression von Dom34p im CAI4- und *pmt1*Δ/*pmt1*Δ-Stamm-hintergrund. Untersucht wurde der mögliche Einfluss der Überexpression von *DOM34* unter der Kontrolle des *PCK1*-Promotors, welcher in CASA-Medium induziert ist und unter SD-Bedingungen nur eine Basalaktivität zeigt. Die Zellen der Stämme CAI4 + pJB34, CAI4 + pBI-1, CAP1-3121 (*pmt1*Δ/*pmt1*Δ) + pJB34 und CAP1-3121 + pBI-1 wurden einige Tage bei 30 °C in SD- oder CASA-Medium inkubiert und anschließend mikroskopisch überprüft.

fehlende Trennung von Mutter- und Tochterzelle. Hierdurch und durch Elongation der einzelnen Zellen entstehen oftmals lange Zellketten. Dass Dom34p auch bei *C. albicans* einen Einfluss auf die Bildung von Pseudohyphen hat, konnte mit Hilfe von Überexpressionsstudien gezeigt werden (Abb. 3.21). Dazu wurde *DOM34* unter der Kontrolle des *PCK1*-Promotors überexprimiert. Der *PCK1*-Promotor ist in CASA-Medium induziert, während in SD-Medium seine Aktivität durch Glukose-Repression stark verringert ist. Der Einfluss von überexprimiertem Dom34p wurde in den Stammhintergründen CAI4 und *pmt1*Δ/*pmt1*Δ in CASA-Medium und SD-Medium getestet. Als Kontrolle wurde eine Transformante mit dem Leervektor pBI-1 verwendet. Die *pmt1*Δ/*pmt1*Δ-Mutante neigt dazu, unabhängig von Medium und Plasmid, Pseudohyphen auszubilden und zu aggregieren (siehe auch 3.3.2). In CASA-Medium wird dieser Effekt durch die Überexpression von *DOM34* moderat verstärkt. Im CAI4-Stammhintergrund erkennt man unter nicht-induzierenden Bedingungen (SD-Medium) fast ausschließlich kugelige Blastosporen und keine Pseudohyphen, während man in CASA-Medium, unter induzierenden Bedingungen, stark elongierte Zellen und zum Teil auch Pseudohyphen erkennen kann (Abb. 3.21). Daher scheint auch bei *C. albicans* das *DOM34*-Genprodukt bei Überexpression die Pseudohyphenentwicklung zu beeinflussen.

3.3.7 Komplementation von *pmt1*Δ-Phänotypen durch Dom34p

S. Wickert (1998) konnte zeigen, dass bei *S. cerevisiae dom34*Δ- und *pmt1*Δ-Mutationen einen synthetischen Phänotypen hervorrufen. So konnte unter anderem eine verstärkte Sensitivität gegenüber Hygromycin B in der Doppeldeletionsmutante im Vergleich zu den Einzeldeletionsmutanten festgestellt werden. Wie oben beschrieben, konnte bei *C. albicans* kein additiver Effekt der beiden Einzeldeletionen gefunden werden. Dennoch sollte getestet werden, ob es möglich ist, einen *pmt1*Δ-Phänotyp mittels Dom34p-Überexpression zu beeinflussen. Es wurden Wachstumstests mit SDS, Congo Red und bei 42 °C durchgeführt. Die zusätzliche Biosynthese von Dom34p erfolgte mit dem Plasmid pSK2; das *DOM34* ist unter der Kontrolle des *MET3*-Promotors exprimiert, der durch Methionin bzw. Cystein (2,5 µM) im Medium reprimiert wird. Die *pmt1*Δ-Sensitivität gegenüber SDS und Congo Red wurden komplett vom Dom34p (pSK2), aber nicht vom Leervektor (pSP38) komplementiert (Abb. 3.22, Daten nicht gezeigt). Da YPD-Medium Methionin bzw. Cystein enthält, ist dieses

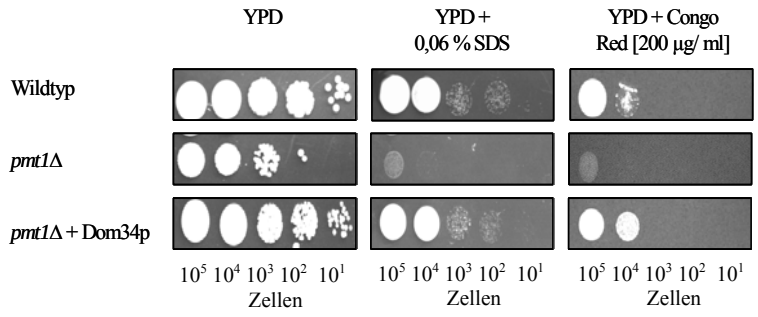


Abb. 3.22: Komplementation der Sensitivität gegen SDS und Congo Red der *pmt1*Δ-Mutante. Zellen einer Übernacht-Kultur der Stämme CAF2-1, SPCa2 und CAP1-3121 + pSK2 (SK70) wurden auf 10^5 bis 10^1 Zellen verdünnt und in einem Volumen von jeweils 5 µl auf YPD-Platten getropft. Die Inkubation erfolgte bei 30 °C für 2-3 Tage.

Ergebnis überraschend. Somit reicht die basale Aktivität des *MET3*-Promotors in YPD-Medium aus, um genügend DOM34p für die Suppression des *pmt1*Δ-Phänotyps zu synthetisieren.

Die Temperatursensitivität einer *pmt1*Δ-Mutante wurde zu einem Großteil wieder aufgehoben; dennoch wurde der Wildtypstatus nicht gänzlich erreicht (Abb. 3.23). Somit reicht die zusätzliche Expression eines *DOM34*-Allels in einem *DOM34*/*DOM34*-Stamm aus, den Phänotypen einer *pmt1*Δ-Mutation aufzuheben.

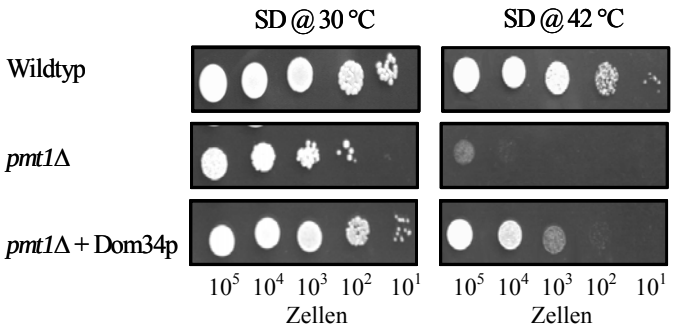


Abb. 3.23: Komplementation der Temperatursensitivität der *pmt1*Δ-Mutante. Zellen einer Übernacht-Kultur der Stämme CAF2-1, SPCa2 und SK70 wurden auf 10^5 bis 10^1 Zellen verdünnt und in einem Volumen von jeweils 5 µl auf SD-Platten getropft. Die Inkubation erfolgte bei 30 °C bzw. 42 °C für 2-3 Tage.

3.4 Phänotypen von *pmt*-Mutationen im *dom34*Δ/*dom34*Δ-Stamm-hintergrund

In den vorangegangenen Kapiteln konnten genetische Interaktionen zwischen *dom34*Δ- und *pmt1*Δ-Mutationen nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu *S. cerevisiae*, wo ein synthetischer Phänotyp aus beiden Einzeldeletionen *pmt1*Δ und *dom34*Δ resultierte, konnte bei *C. albicans* eine Suppression des *pmt1*Δ-Phänotyps durch die Einführung einer Deletion des *DOM34*-Gens erzielt werden.

Aufgrund dieser Ergebnisse ist es möglich, dass dem CaDom34p eine Regulationsfunktion der Protein-*O*-mannosyltransferasen zukommt. Um diese Hypothese zu überprüfen, sollten *pmt*-Mutationen im *dom34*Δ/*dom34*Δ-Stammhintergrund generiert werden; in einem ersten Versuchsansatz wurden heterozygote *pmt*Δ-Mutanten hergestellt. Anschließend sollten erste phänotypische Analysen der konstruierten Mutanten erfolgen.

3.4.1 Konstruktion der *pmt*Δ-Mutanten im *dom34*Δ/*dom34*Δ-Stammhintergrund

Die Deletion eines Allels der *PMT*-Gene erfolgte im Stammhintergrund von SK47 (CAI4 *dom34*Δ/*dom34*Δ). Der Stamm wurde mit den jeweiligen Disruptionsfragmenten transformiert und auf Selektionsmedium ausplattiert (Tab. 3.3). Mittels Kolonie-PCR und den angegebenen Oligonukleotiden (Tab. 3.3) wurde die korrekte Integration des Disruptions-fragments im jeweiligen *PMT*-Gen verifiziert (Daten nicht gezeigt). Es gelang nicht,

*pmt2*Δ/*PMT2*-Transformanten im Stammhintergrund SK47 zu generieren. Prill (2004) konnte zeigen, dass bereits die Deletion eines der beiden *PMT2*-Allele im CAI4-Stammhintergrund zu zum Teil schweren Defekten der Mutanten führt. Auch war es Prill (2004) nicht möglich, homozygote *pmt2*Δ-Mutanten zu generieren, da die Deletion des *PMT2*-Gens beider Allele letal für die Zelle ist.

Tab. 3.3: Disruption der *PMT*-Gene im *dom34*Δ/*dom34*Δ-Stammhintergrund (SK47).

Ausgangs-plasmid	Ausgangs-größe	Enzym(e)	Disruptions-fragment-größe	Oligo-nukleotide	PCR-Produkt-größe	Stamm
pCT23 (*PMT1*)	9,5 kb	*Asp718*, *Spe*I	6,7 kb	phisG-1, p2-PMT1su	2,4 kb	SK 72
pSP18 (*PMT2*)	8,4 kb	*Pvu*II	6,0 kb	pcURA3, p2verFOA	1,7 kb	nicht erhalten
pCT54 (*PMT4*)	8,6 kb	*Pvu*II, *Xmn*I	5,1 kb	pcURA3, pcP4-6	2,4 kb	SK 73
pBK-5 (*PMT5*)	8,0 kb	*Sal*I, *Sac*I	4,7 kb	p3-URA3-v, v-PMT5-1	2,3 kb	SK 75
pCT25 (*PMT6*)	10,8 kb	*Xho*I	5,7 kb	phisG-1, p2-PMT6su	2,6 kb	SK 74

Die Plasmide wurden mit Restriktionsendonukleasen behandelt und mit den so erhaltenen Disruptionsfragmenten erfolgte eine Transformation von SK47 (CAI4 *dom34*Δ/*dom34*Δ). Die erhaltenen Transformanten wurden mittels Kolonie-PCR und den angegebenen Oligonukleotiden auf die korrekte Integration des Disruptionfragments im jeweiligen *PMT*-Gen überprüft. Es konnten keine *pmt2*Δ/*PMT2*-Transformanten im Stammhintergrund SK47 generiert werden.

3.4.2 Phänotypische Analysen der *dom34*Δ/*dom34*Δ *pmt*Δ/*PMT*-Mutanten

Nachdem die heterozygoten *pmt*Δ-Mutanten im *dom34*Δ/*dom34*Δ-Stammhintergrund generiert und mittels Kolonie-PCR die korrekte Integration des Disruptionsfragments im jeweiligen *PMT*-Gen verifiziert worden waren, wurden erste phänotypische Analysen dieser Mutanten durchgeführt. Zum einen wurde die Sensitivität der Mutanten gegenüber Hygromycin B und erhöhter Wachstumstemperatur getestet (Abb. 3.24, Abb. 3.25); zum anderen wurde die Koloniemorphologie untersucht (Abb. 3.26). Sowohl die *dom34*Δ/*dom34*Δ *pmt1*Δ/*PMT1*-Mutante, aber besonders die *dom34*Δ/*dom34*Δ *pmt5*Δ/*PMT5*-Mutante ist sensitiver gegen Hygromycin B oder eine erhöhte Wachstumstemperatur von 42 °C, als die jeweiligen *pmt*-Mutanten des CAI4-Stammhintergrunds; bei der *pmt1*Δ/*PMT1*-Mutante ist die Auswirkung bei erhöhter Wachstumstemperatur von 42 °C allerdings nur gering. Dieses Ergebnis ist bemerkenswert, da weder die *pmt5*Δ/*PMT5*-Mutante, noch die *pmt5*Δ/*pmt5*Δ-Mutante eine Sensitivität gegen Hygromycin B oder eine erhöhte Wachstumstemperatur von 42 °C aufweisen (Abbildung 3.24). Die Deletion von *DOM34* verstärkt also die Sensitivität

einer heterozygoten *pmt5*Δ-Mutante deutlich. Bei der heterozygoten *pmt1*Δ-Mutante, aber auch bei der heterozygoten *pmt4*Δ-Mutante ist der synthetische Phänotyp schwächer ausgeprägt.

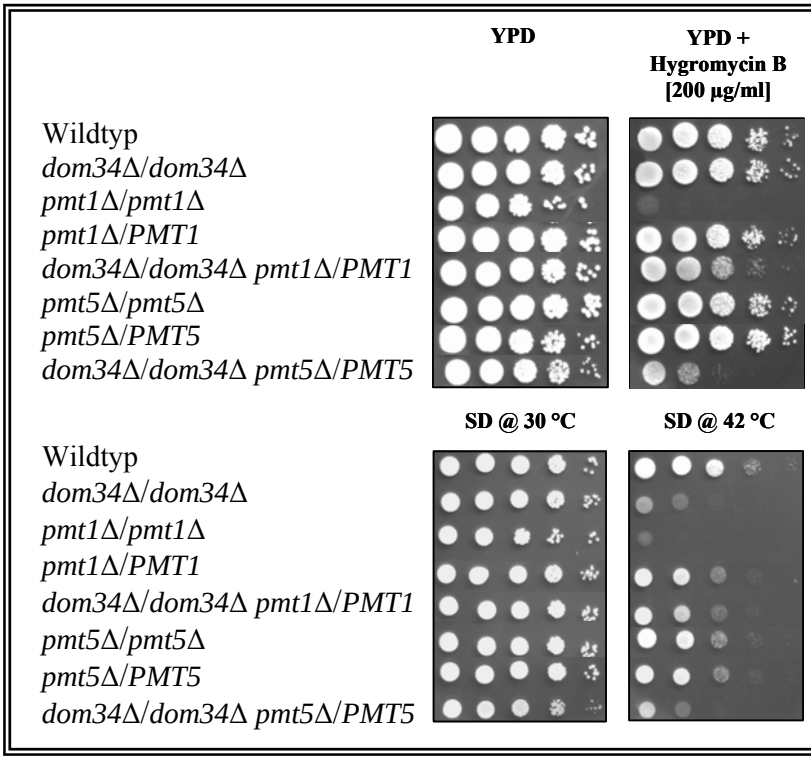


Abb. 3.24: Sensitivität gegen Hygromycin B oder eine erhöhte Wachstumstemperatur auf YPD- oder Minimalmedium-Platten verschiedener *C. albicans*-Stämme. Zellen einer Übernacht-Kultur der Stämme CAF2-1, SK51, SPCa2, *pmt1*Δ/*PMT1* (CAP1-3), *dom34*Δ/*dom34*Δ *pmt1*Δ/*PMT1* (SK72), *pmt5*Δ/*pmt5*Δ (SPCa10), *pmt5*Δ/*PMT5* (P5-1) und *dom34*Δ/*dom34*Δ *pmt5*Δ/*PMT5* (SK75) wurden auf 10^5 bis 10^1 Zellen verdünnt und in einem Volumen von jeweils 5 µl auf YPD- oder SD-Platten getropft. Die Inkubation erfolgte bei 30 °C bzw. 42 °C für 2-3 Tage.

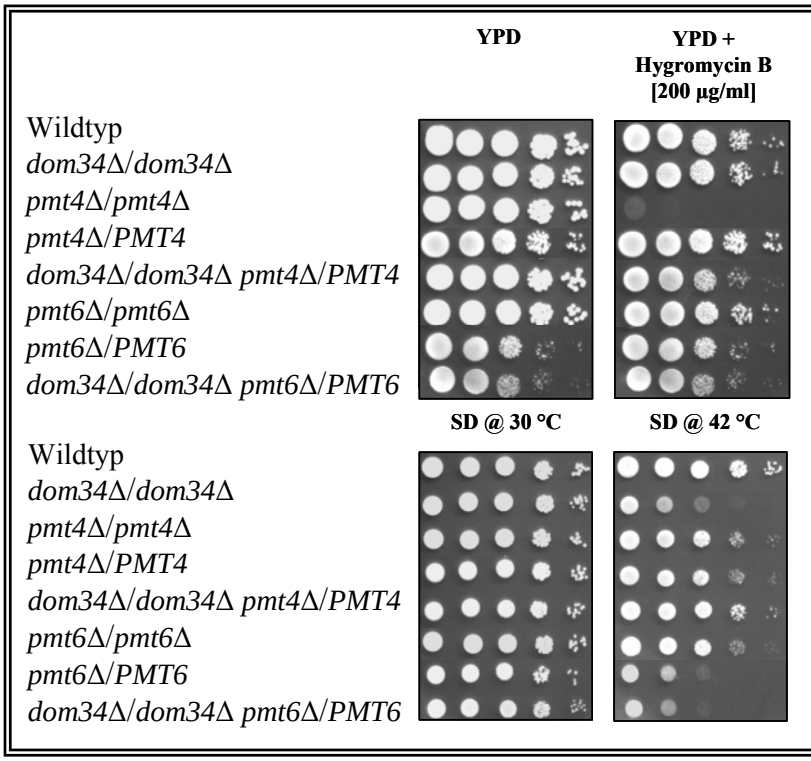


Abb. 3.25: Sensitivität gegen Hygromycin B oder eine erhöhte Wachstumstemperatur auf YPD- oder Minimalmedium-Platten verschiedener *C. albicans*-Stämme. Zellen einer Übernacht-Kultur der Stämme CAF2-1, SK51, *pmt4*Δ/*pmt4*Δ (SPCa6), *pmt4*Δ/*PMT4* (CAP4-2), *dom34*Δ/*dom34*Δ *pmt4*Δ/*PMT4* (SK73), *pmt6*Δ/*pmt6*Δ (SPCa8), *pmt6*Δ/*PMT6* (CAP2-3) und *dom34*Δ/*dom34*Δ *pmt6*Δ/*PMT6* (SK74) wurden auf 10^5 bis 10^1 Zellen verdünnt und in einem Volumen von jeweils 5 µl auf YPD- oder SD-Platten getropft. Die Inkubation erfolgte bei 30 °C bzw. 42 °C für 2-3 Tage.

Die Hyphenbildung der Mutanten auf Lee's-Platten wurde nach etwa dreitägiger Inkubation bei 37 °C mikroskopiert (Abbildung 3.26).

Im Vergleich zu den Sensitivitätstests ergibt sich bei der Untersuchung der Morphologie der Mutanten ein nicht so eindeutiges Verhalten (Abbildung 3.26). Die *pmt1*Δ/*PMT1*- und *pmt1*Δ/*pmt1*Δ-Mutanten sind auf Lee's-Medium nicht mehr in der Lage, Hyphen auszubilden, während es der *dom34*Δ/*dom34*Δ *pmt1*Δ/*PMT1*-Mutante noch zu einem sehr geringen Anteil gelingt. Bei der *dom34*Δ/*dom34*Δ *pmt5*Δ/*PMT5*-Mutante verhält es sich anders. Während die *pmt5*Δ*PMT5*- und die *pmt5*Δ/*pmt5*Δ-Mutante keinen Defekt in der Hyphenbildung zeigen, ist es der *dom34*Δ/*dom34*Δ *pmt5*Δ/*PMT5*-Mutante nicht mehr möglich, Hyphen zu bilden (Abbildung 3.26). Die *pmt4*Δ/*PMT4*-Mutante ist bereits leicht eingeschränkt bei der Hyphenbildung in Relation zum Wildtyp. Eine *pmt4*Δ/*pmt4*Δ-Mutante ist gar nicht mehr in der Lage, Hyphen zu formen (Abbildung 3.26). Im Gegensatz zu diesen Phänotypen verhält sich die *dom34*Δ/*dom34*Δ *pmt4*Δ/*PMT4*-Mutante unauffällig; es ist also kein Defekt zu erkennen (Abbildung 3.26). Bei der Betrachtung der Hyphenbildung in den *pmt6*Δ-Mutanten erkennt man keinen Effekt in der Fähigkeit, Hyphen zu formen. Weder die heterozygote *pmt6*Δ-Mutante des CAI4- (Timpel *et al.*, 2000), noch die des *dom34*Δ/*dom34*Δ-Stammhintergrunds können auf Lee's-Medium Hyphen bilden.

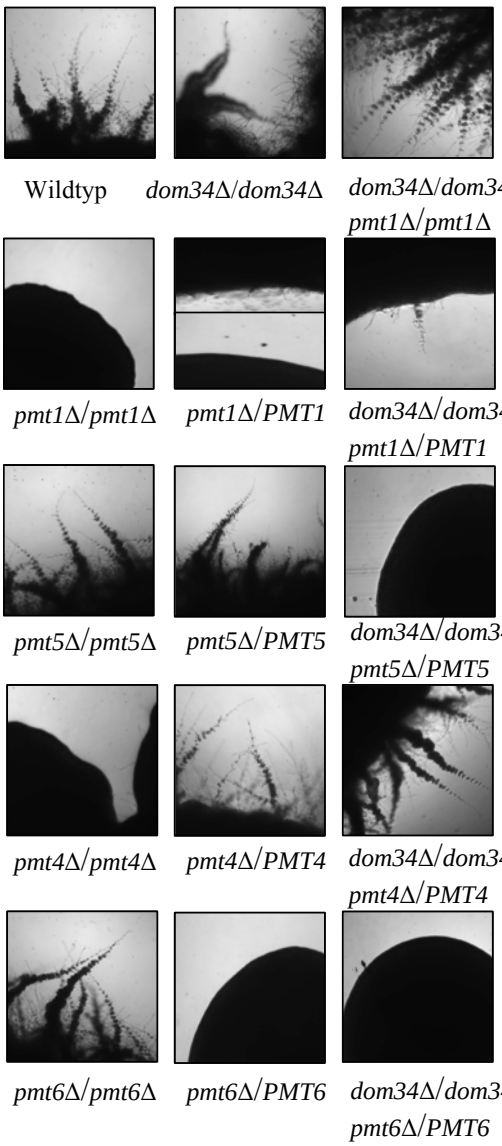


Abb. 3.26: Hyphenbildung verschiedener *C. albicans*-Stämme auf Lee's-Platten. Die Stämme CAF2-1, SK51, SK53, SPCa2, CAP1-3, SK72, SPCa10, P5-1, SK75, SPCa6, CAP4-2, SK73, SPCa8, CAP2-3 und SK74 wurden auf dem Medium ausgestrichen und nach etwa dreitägiger Inkubation bei 37 °C fotografiert. Gezeigt sind Ränder von Einzelkolonien.

Diese Ergebnisse zeigen insgesamt, dass genetische Interaktionen nicht nur zwischen *DOM34* und *PMT1*, sondern auch zwischen *DOM34* und Genen für andere Pmt-Isoformen, besonders *PMT5*, auftreten.

3.5 Analyse der Zellwand der *dom34*Δ-Mutanten

Es ist bekannt, dass in Deletionsmutanten der Protein-*O*-mannosyltransferase-Isoformen von *S. cerevisiae* und *C. albicans* eine veränderte Zellwandzusammensetzung vorliegt (Gentzsch und Tanner, 1996; Kapteyn *et al.*, 2000; Prill, 2004). Phänotypen, wie Wachstumsdefekte, Sensitivitäten gegen Zellwand-destabilisierende Agenzien (Klis *et al.*, 2002) oder Veränderungen der Morphologie können daraus resultieren. Kapteyn *et al.* (2000) zeigten, dass in der CAP1-312-Mutante (*pmt1*Δ/*pmt1*Δ) der Chitingehalt erhöht ist. Dieses konnte von Prill (2004) bestätigt werden. Hier sollten die *dom34*Δ-Mutanten biochemisch auf eine mögliche Veränderung in der Zellwand-zusammensetzung hin analysiert werden.

Tab. 3.4: Zusammensetzung von Zellwänden verschiedener *C. albicans*-Stämme.

Genotyp / Komponente	Wildtyp	*pmt1*Δ	*dom34*Δ	*dom34*Δ *pmt1*Δ
Glukan total	58,8	44,3	62,8	61,8
β1,3-Glukan	38,5	32,2	46,1	40,3
β1,6-Glukan	20,3	12,1	16,7	21,5
Mannan	21,4	1,6	22,3	3,8
Chitin	0,82	0,71	0,9	0,83

Die Analyse der Zellwände der Stämme CAI4, CAP1-3121, *dom34*Δ/*dom34*Δ (SK47) und *dom34*Δ/*dom34*Δ *pmt1*Δ/*pmt1*Δ (SK24) wurde, wie in Kapitel 2.8 beschrieben, durchgeführt. Die Daten sind in µg/ mg Zellwand Trockengewicht angegeben.

SDS-extrahierte Zellwände wurden präpariert, bei denen keine nicht-kovalent gebundenen Proteine mehr vorliegen. Es wurden die Stämme CAI4, CAP1-3121 (*pmt1*Δ/*pmt1*Δ) SK47 (*dom34*Δ/*dom34*Δ) und SK24 (*dom34*Δ/*dom34*Δ *pmt1*Δ/*pmt1*Δ) untersucht. Anschließend wurde der Anteil von Glukan (β1,3- und β1,6-Glukan), Mannoproteinen und Chitin an der Zellwand der Mutanten und des Wildtyps bestimmt. In Tabelle 3.4 ist die chemische Zusammensetzung von SDS-extrahierten Zellwänden verschiedener *C. albicans*-Stämme in µg/ mg Zellwand Trockengewicht aufgelistet. Aufgeführt sind neben der *pmt1*Δ-Mutante auch die *dom34*Δ und *dom34*Δ *pmt1*Δ-Mutante. Die *pmt1*Δ-Mutante weist starke Veränderungen der Zellwandzusammensetzung auf. Sie zeigt einen reduzierten Anteil an β1,3-Glukan und β1,6-Glukan, so dass der Glukangesamtanteil von 58,8 µg/ mg des Wildtyps in der *pmt1*Δ-Mutante auf 44,3 µg/ mg sinkt. Der Anteil an Mannoproteinen ist in der Mutante im Vergleich zum Wildtyp sehr gering. Die *pmt1*Δ-Mutante weist lediglich 1,6 µg/ mg Mannoproteine im Vergleich zu 21,4 µg/ mg im Wildtyp auf (Tab. 3.4). Während die *pmt1*Δ-Mutante ausgeprägte Veränderungen in der Zellwandzusammensetzung zeigt, kommt es in der *dom34*Δ-Mutante zu keinen schwerwiegenden Veränderungen (Tabelle 3.4). Die Doppeldeletionsmutante zeigt in Relation zum Wildtyp kaum Unterschiede beim Anteil von β1,3-Glukan und β1,6-Glukan. Der geringe Anteil an Glukan der *pmt1*Δ-Mutante wird in der Doppelmutante auf Wildtypwerte erhöht. Wie die *pmt1*Δ-Mutante weist auch die Doppeldeletionsmutante eine Reduktion des Mannoproteinanteils auf. Während in der *pmt1*Δ-Mutante 1,6 µg/ mg gefunden werden, zeigt die Doppeldeletionsmutante eine Menge von 3,8 µg/ mg Zellwand Trockengewicht. Obwohl der Wert in der Doppeldeletionsmutante im Vergleich zur *pmt1*Δ-Mutante erhöht ist, wird das Wildtypniveau von 21,4 µg/ mg nicht erreicht. Es erfolgt keine

vollständige Suppression des *pmt1*Δ-Zellwanddefekts in der Doppeldeletionsmutante (Tab. 3.4).

3.6 Einfluss der *dom34*-Deletion auf die *O*-Glykosylierung von Substraten der Protein-*O*-mannosyltransferasen aus *C. albicans*

Prill (2004) zeigte, dass verschiedene Proteine von *C. albicans*, wie beispielsweise Pir1p oder Als1p, in einer *pmt1*Δ-Mutante eine veränderte *O*-Glykosylierung aufweisen. Hier sollte nach Phänotypen der *dom34*Δ-Mutation gesucht werden.

3.6.1 Rbt5p/ Rbt51p

Bei den Proteinen Rbt5p (*orf19.5636*) und Rbt51p (*orf19.5674*) handelt es sich um zwei Plasmamembranproteine aus 242 bzw. 252 Aminosäuren (molekulare Masse etwa 25 kDa), die zu 70 % identisch sind. Sie sind stark *O*-glykosyliert und mittels eines Glykosyl-phosphatidylinositol (GPI)-Ankers in der Plasmamembran lokalisiert (De Groot *et al*., 2003). *RBT5*, aber nicht *RBT51* wird unter Eisen-Mangel-Bedingungen induziert und vermittelt die Aufnahme von Haemoglobin. Das *RBT5*-Gen steht unter der Kontrolle des Transkriptions-repressors Tup1p (Braun *et al.*, 2000). Die Rbt-Proteine gehören zu einer Familie, die eine CFEM-Domäne aufweisen (Conserved Fungal-specific Extracellular Membrane-spanning); 8 Cysteine sind in einem charakteristischen Abstand zu einander in kurzer Abfolge aufzufinden (Kulkarni *et al.*, 2003). Als Korrektur publizierter Daten (persönliche Mitteilung Kornitzer; Weissman und Kornitzer 2004) wiesen die Autoren nach, dass CaRbt51p in *pmt1*Δ- und *pmt2*Δ-Mutanten weniger stark *O*-glykosyliert ist.

Hier sollten *C. albicans*-Stämme auf Veränderungen in der *O*-Glykosylierung von Rbt51p untersucht werden; die Zellen wurden in YPD-Vollmedium angezogen, in dem die Biosynthese von Rbt51p, nicht aber von RBT5p, erfolgt. Auffällig sind zwei Doppelbanden bei etwa 50 kDa und 67 kDa (Abbildung 3.27). Die Signale der Doppelbanden von etwa 67 kDa sind bei allen getesteten Zellextrakten unverändert. Bei den Doppelbanden von ca. 50 kDa erkennt man sowohl in der *dom34*Δ-Mutante, als auch in der *pmt1*Δ-Mutante, dass die beiden Banden nicht gleich stark, wie beim Wildtyp, detektiert werden können (Abbildung 3.27). Die langsamer laufende, größere Form wird stärker als beim Wildtyp exprimiert und teilweise sind die Doppelbanden wegen der starken Expression der größeren Form, kaum noch als diese zu erkennen. Es ergibt sich in der *dom34*Δ- und der *pmt1*Δ-Einzeldeletionsmutante ein Phänotyp, welcher in der Doppeldeletionsmutante supprimiert wird. In der vorletzten Spur ist der Zellextrakt der Doppeldeletion mit dem Plasmid pSK2 (CaDom34p^{FLAG}) aufgetragen. Die Suppression des Glykosylierungsphänotyps durch die *dom34*Δ-Mutation in einer *pmt1*Δ-Mutante wird durch die Expression des *DOM34*-Gens wieder aufgehoben; es wird mittels des Plasmids der *pmt1*Δ-Status wiederhergestellt.

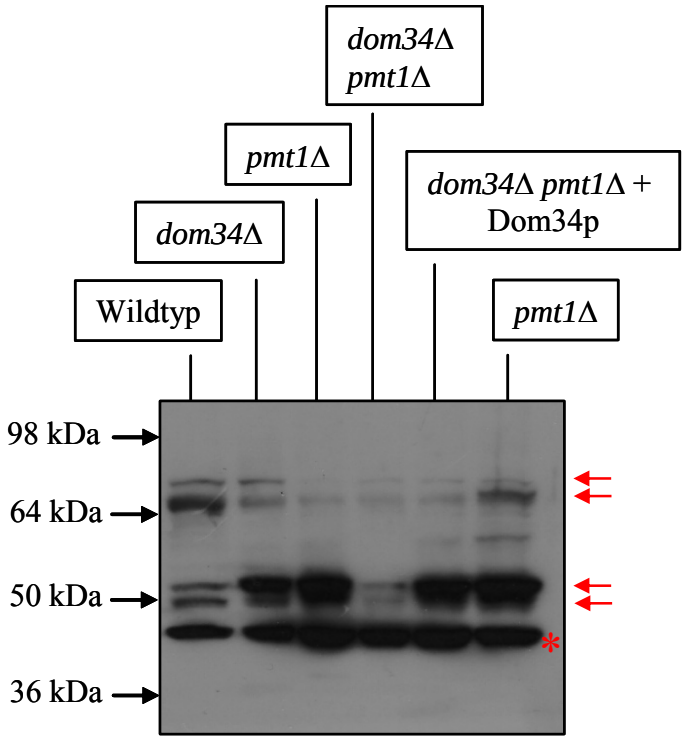


Abb. 3.27: Immunoblot von Rbt51p von Zellextrakten veschiedener *C. albicans*-Stämme. Zellextrakte der Stämme CAF2-1, SK51, SPCa2, SK53, sowie der *dom34*Δ/*dom34*Δ *pmt1*Δ/*pmt1*Δ-Doppeldeletions-mutante mit dem Plasmid pSK2 (SK37) wurden in einer 7,5 %igen SDS-PAGE aufgetrennt. Nach dem Transfer auf eine Nitrocellulose-membran erfolgte die Detektion mittels eines Anti-Rbt5p/ Rbt51p-Primär-Antikörpers, sowie eines Sekundär-Antikörpers (Anti-Kaninchen, konjugiert mit Peroxidase). Der rote Stern bei etwa 40 kDa markiert eine unspezifsche Kreuzreaktions-Bande (Weissman und Kornitzer, 2004). Die verschiedenen Formen des Proteins sind durch rote Pfeile markiert.

3.6.2 CaPir1p

Bei dem ScPir2p (Protein with internal repeats), das auch als Hsp150p (Heat shock protein 150) bezeichnet wird, handelt es sich um ein Zellwandprotein, welches kovalent an das β1,3-Glukangerüst gebunden ist (Russo *et al.*, 1992; Kapteyn *et al.*, 1999). *CaPIR1* kodiert für ein aus 346 Aminosäuren bestehendes Protein, welches eine theoretische molekulare Masse von 36,5 kDa besitzt. Da in *C. albicans* bis heute nur ein Protein der Pir-Familie bekannt ist, wurde das ScPir2p-Homolog von *C. albicans* als CaPir1p bezeichnet. Interessanterweise gibt es in *C. albicans* aber zwei unterschiedliche Allele (*orf19.220* und *orf19.7851*). Mit einem Anti-Serum gegen ScPir2p, welches auch verschiedene, mit Pir2p verwandte Proteine erkennt (Russo *et al.*, 1992), wurden Zellextrakte der *dom34*Δ-Mutanten und des Wildtyps CAF2-1 mittels gelelektrophoretischer Auftrennung untersucht (Abb. 3.28).

Man erkennt Pir1p-Banden bei etwa 60 kDa und 90 kDa. Die größte Form des Proteins läuft bei einer Größe von ca. 140-200 kDa und ist als nicht scharf abgegrenzte Bande vermutlich glykosyliert. Das Bandenmuster ist beim Wildtyp, der *dom34*Δ-Mutante und der *dom34*Δ/*dom34*Δ *pmt1*Δ/*pmt1*Δ-Doppeldeletionsmutante identisch. In der *pmt1*Δ-Mutante ist dagegen im Wesentlichen eine diffuse Bande von etwa 55-70 kDa zu erkennen. Durch das Einführen einer Deletion des *DOM34*-Gens im *pmt1*Δ/*pmt1*Δ-Stammhintergrund wird daher der Glykosylierungsdefekt des CaPir1p-Substrats korrigiert. Wie auch schon bei Rbt51p wird der Glykosylierungsphänotyp der Einzeldeletionen in der Doppeldeletion supprimiert. Durch die Expression des *DOM34*-Gens mittels Plasmid pSK2 wird dieser Effekt wieder aufgehoben; es wird mittels des Plasmids der *pmt1*Δ-Status wiederhergestellt (Abb. 3.28 **B.**).

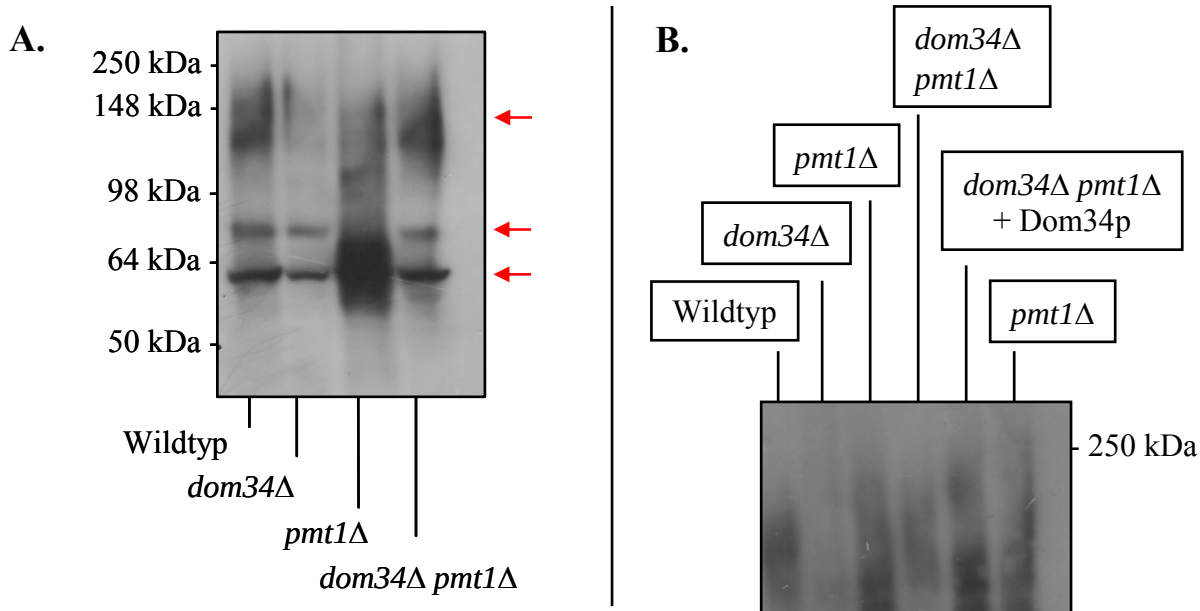


Abb. 3.28: Immunoblot von CaPir1p von Zellextrakten veschiedener *C. albicans*-Stämme. A.: Zellextrakte der Stämme CAF2-1, SK51, SPCa2 und SK53 wurden in einer 7,5 %igen SDS-PAGE aufgetrennt. **B.**: Die Zellextrakte des Wildtyps (CAF2-1), der *dom34*Δ- (SK51), der *pmt1*Δ- (SPCa2) und der *dom34*Δ/*dom34*Δ *pmt1*Δ/*pmt1*Δ-Doppeldeletionsmutante (SK53), sowie der *dom34*Δ/*dom34*Δ *pmt1*Δ/*pmt1*Δ-Doppeldeletionsmutante mit dem Plasmid pSK2 (SK37) wurden in einer 7,5 %igen SDS-PAGE aufgetrennt. Nach dem Transfer auf eine Nitrocellulose-membran erfolgte die Detektion mittels eines Anti-ScPir2p-Antiserums, sowie eines Sekundär-Antikörpers (Anti-Kaninchen, konjugiert mit Peroxidase). Die verschiedenen Formen des Proteins sind durch rote Pfeile markiert.

3.6.3 Als1p

ALS1 (*orf6.1115*) kodiert für ein Zellwandprotein, das zu der Als-Proteinfamilie gezählt wird. Diese Proteinfamilie besteht aus mindestens acht Mitgliedern (Sheppard *et al.*, 2004). Als1p ist ein relativ großes Protein, welches aus 1260 Aminosäuren besteht und eine theoretische molekulare Masse von 133 kDa aufweist. Für Als1p wurde bereits gezeigt, dass es *N*- und *O*-glykosyliert ist (Kapteyn *et al.*, 2000). Es konnte in Zellextrakten von *pmt1*Δ-Mutanten ein verändertes Laufverhalten von CaAls1p festgestellt werden (Timpel *et al.*, 1998; Prill *et al.*, 2005).

Wie aus Abbildung 3.29 ersichtlich wird, können mindestens 3 verschiedene Formen des Als1p detektiert werden. Die größte Form von über 250 kDa, die wahrscheinlich dem vollständig modifizierten Vorläuferprotein entspricht, ist in allen Stämmen, außer in der *pmt1*Δ-Mutante, in der es deutlich schneller migriert, vorhanden. Bei der Hauptbande von etwa 110 kDa und den anderen Banden von etwa 155 kDa und 53 kDa verhalten sich alle Mutanten und der Wildtyp identisch. Die kleinste Form von Als1p mit einer Masse von circa 38 kDa, wahrscheinlich ein Degradationsprodukt, fehlt in der *pmt1*Δ-Mutante fast völlig bzw.

läuft schneller. Obwohl die Natur der detektierten Proteinformen unklar ist, kann der *pmt1*Δ-Glykosylierungsphänotyp somit offenbar durch eine *dom34*Δ-Mutation supprimiert werden.

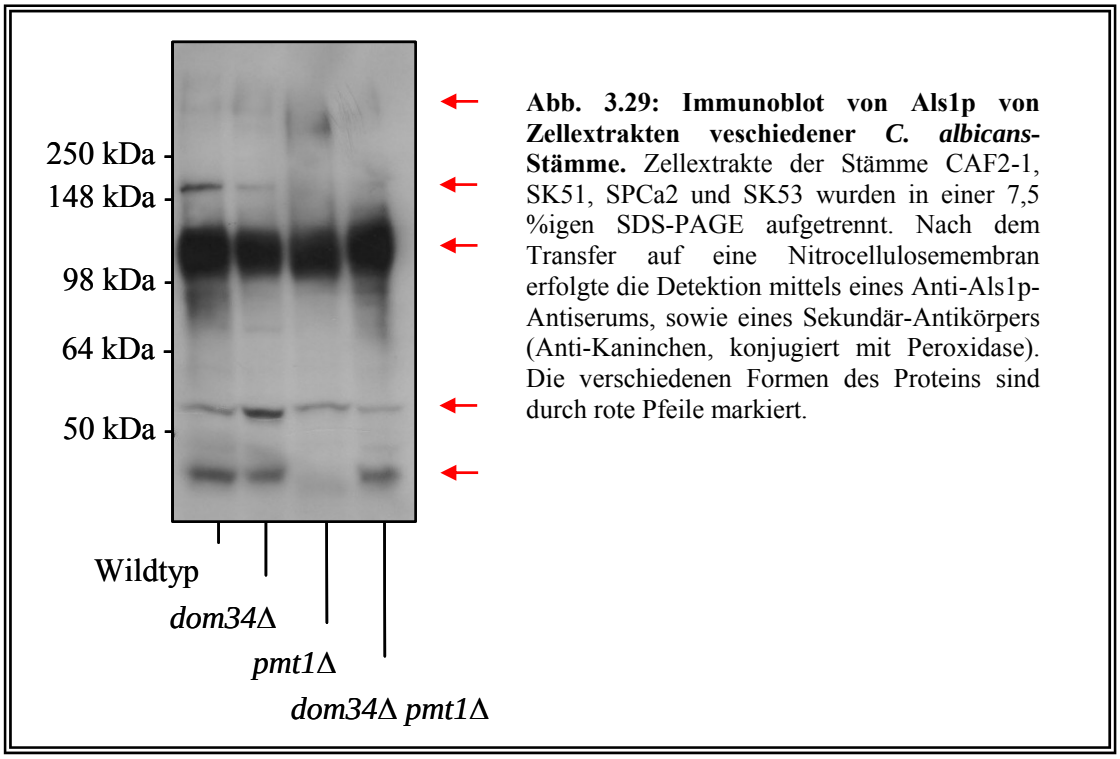


Abb. 3.29: Immunoblot von Als1p von Zellextrakten veschiedener *C. albicans*-Stämme. Zellextrakte der Stämme CAF2-1, SK51, SPCa2 und SK53 wurden in einer 7,5 %igen SDS-PAGE aufgetrennt. Nach dem Transfer auf eine Nitrocellulosemembran erfolgte die Detektion mittels eines Anti-Als1p-Antiserums, sowie eines Sekundär-Antikörpers (Anti-Kaninchen, konjugiert mit Peroxidase). Die verschiedenen Formen des Proteins sind durch rote Pfeile markiert.

3.7 Phosphorylierungsstatus von Dom34p

Die in *S. cerevisiae* erhaltenen Ergebnisse zeigen, dass Dom34p an vielen unterschiedlichen zellulären Prozessen, wie dem Zell-Zyklus, der Translation oder auch der Morphogenese beteiligt ist (Davis und Engbrecht, 1998). Die Phosphorylierung und Dephosphorylierung von Proteinen stellt ein wichtiges Regulationsprinzip sowohl in prokaryotischen-, als auch in eukaryotischen Zellen dar. Hierdurch wird es Zellen ermöglicht, auf veränderte Umweltbedingungen zu reagieren. Das Phosphat wird auf die Hydroxylgruppen der Aminosäuren Serin, Threonin oder Tyrosin (*O*-Phosphorylierungen) oder auch auf Histidin-Reste übertragen (Klumpp und Krieglstein, 2002).

In der Abbildung 3.30 ist die Vorhersage des Programms NetPhos 2.0 (http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos) für mögliche Phosphorylierungsstellen von CaDom34p dargestellt. Daher ist es durchaus möglich, dass Dom34p phosphoryliert wird.

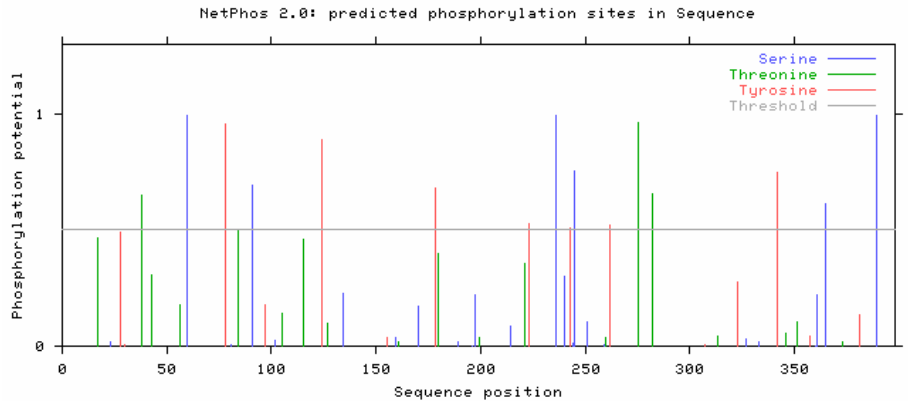


Abb. 3.30: Vorhersage des Programms NetPhos 2.0 für potentielle Phosphorylierungsstellen von CaDom34p. Abgebildet sind die potentiellen Phosporylierungspositionen der Aminosäuren Serin, Threonin und Tyrosin als verschieden farbige Balken. Es erfolgt eine in Prozent angegebene Wahrscheinlichkeitsangabe. Ein Schwellenwert von 50 % ist in grau dargestellt (Threshold).

In einer Immunoblotanalyse konnte das Fusionsprotein als eine Doppelbande bei etwa 50 kDa detektiert werden (rote Pfeile in Abbildung 3.31). Nach einer Behandlung von 5 Minuten bis zu 2 Stunden mit 2 U alkalischer Phosphatase verschwindet die obere der beiden Banden (Abb. 3.31).

Dieses Ergebnis legt nahe, dass CaDom34p sowohl phosphoryliert (langsamer wandernde Form), als auch nicht-phosphoryliert (schneller wandernde Form) in der Zelle vorliegt (Abbildung 3.31). Als nächstes war von Interesse, festzustellen, in welchen Deletionsstämmen sich die Mengenverteilung von phosphoryliertem- und nicht-phosporyliertem Dom34p verändert. Zuerst wurden Mutanten mit Defekten in beiden

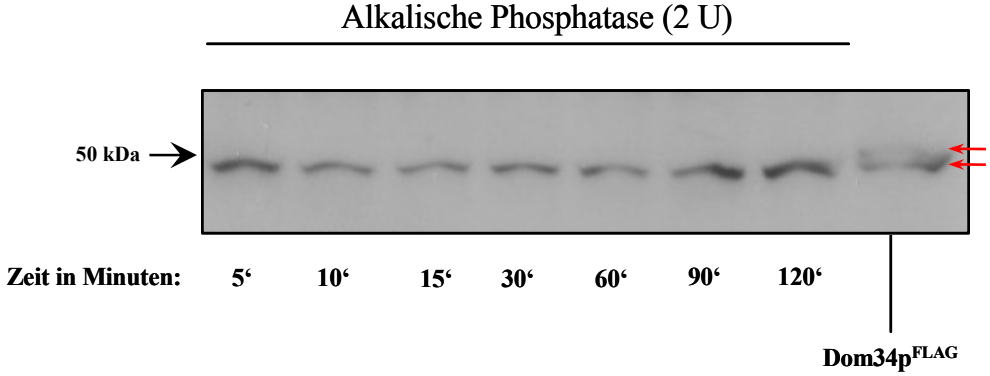


Abb. 3.31: Immunoblot-Analyse von Zellextrakten des Stammes CAI4 + pSK2 (SK71) mit und ohne Vorbehandlung mit alkalischer Phosphatase. Der Stamm SK71 wurde in SD-Medium angezogen und Zellextrakte wurden isoliert. Mit alkalischer Phosphatase (2 U) zwischen 5 Minuten und bis zu 2 Stunden vorbehandelte und unbehandelte Zellextrakte wurden in einer 7,5 %igen SDS-PAGE aufgetrennt. Nach dem Transfer auf eine Nitrocellulosemembran erfolgte die Detektion mittels eines Anti-FLAG-Antikörpers (konjugiert mit Peroxidase).

Proteinkinase A (PKA)-Isoformen untersucht (Abbildung 3.32); dabei handelte es sich um die *tpk1*Δ/*tpk1*Δ-Mutante und die *tpk2*Δ/*tpk2*Δ-Mutante. Beide Untereinheiten besitzen unterschiedliche Funktionen; Tpk1p ist für die Hyphenbildung auf festen Medien

verantwortlich und Tpk2p wird für filamentöses Wachstum in flüssigen Medien benötigt (Bockmühl *et al.*, 2001). Tpk1p und Tpk2p sind außerdem an der Stressantwort beteiligt (Sonneborn *et al.*, 2000). Zellen wurden in SD-Medium (induzierter Promotor) und zum anderen in SD-Medium mit zusätzlichem 2,5 µM Methionin und Cystein (reprimierter Promotor) angezogen. Es wurden Zellextrakte des Vergleichsstamms CAI4 und der Deletionsstämme tranformiert mit dem Plasmid pSK2 hergestellt. Ein Teil der Zellextrakte wurde vor der Immunoblot-Analyse mit 2 U alkalischer Phosphatase für 2 Stunden vorbehandelt. Im Immunoblot erkennt man bei allen Stämmen und dem Kontrollstamm, dass nur unter Induktionsbedingungen (SD-Medium) die Doppelbande des Dom34-Proteins zu detektieren ist; unter reprimierenden Bedingungen (SD-Medium mit zusätzlichem Methionin und Cystein (2,5 µM) im Medium) kann, wie erwartet, kein Signal entdeckt werden. Weiterhin ist ersichtlich, dass nach einer Vorbehandlung mit 2 U alkalischer Phosphatase bei 37 °C nur noch die untere der beiden Banden im Immunoblot erscheint. Es ist nur die schneller laufende, kleine Form des Dom34-Proteins detektierbar (Abbildung 3.32). Es bleibt festzuhalten, dass die Verteilung von phosphoryliertem und nicht phosporyliertem Protein sich in beiden *tpk*Δ-Mutanten in Relation zum Kontrollstamm nicht wesentlich verändert (Abb. 3.32).

Anschließend wurde untersucht, unter welchen Wachstumsbedingungen sich die Phosphorylierung des Fusionsproteins verändert. Dazu wurden die Zellen in osmotisch

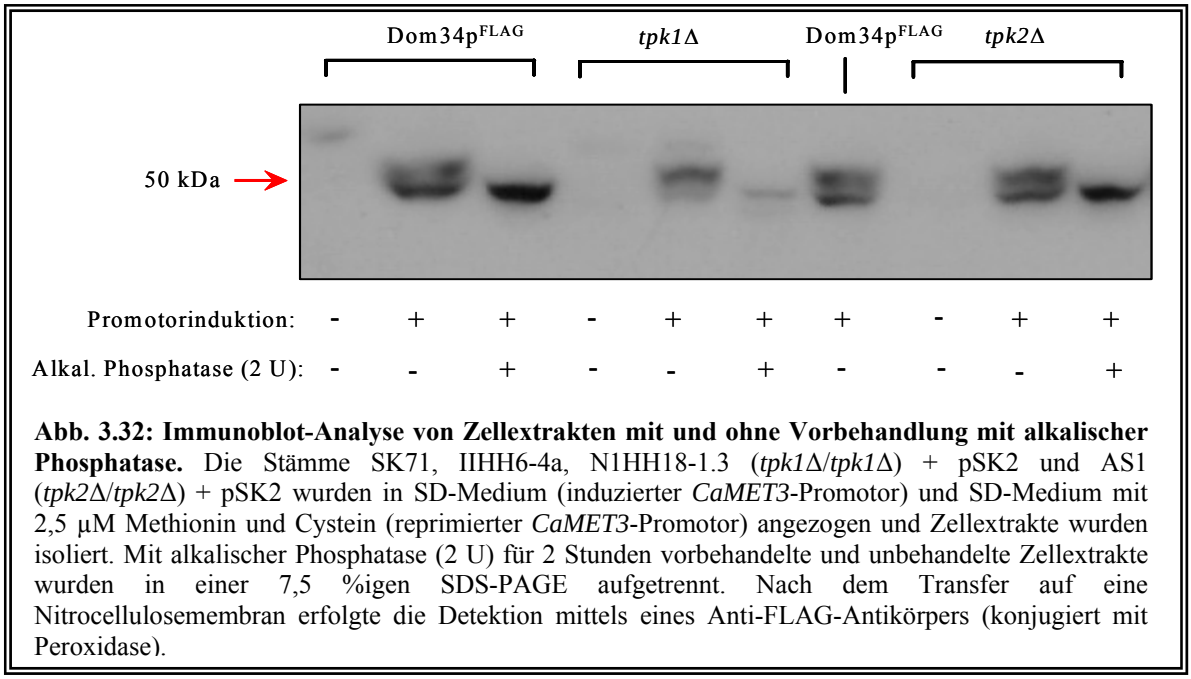


Abb. 3.32: Immunoblot-Analyse von Zellextrakten mit und ohne Vorbehandlung mit alkalischer Phosphatase. Die Stämme SK71, IIHH6-4a, N1HH18-1.3 (*tpk1*Δ/*tpk1*Δ) + pSK2 und AS1 (*tpk2*Δ/*tpk2*Δ) + pSK2 wurden in SD-Medium (induzierter *CaMET3*-Promotor) und SD-Medium mit 2,5 µM Methionin und Cystein (reprimierter *CaMET3*-Promotor) angezogen und Zellextrakte wurden isoliert. Mit alkalischer Phosphatase (2 U) für 2 Stunden vorbehandelte und unbehandelte Zellextrakte wurden in einer 7,5 %igen SDS-PAGE aufgetrennt. Nach dem Transfer auf eine Nitrocellulosemembran erfolgte die Detektion mittels eines Anti-FLAG-Antikörpers (konjugiert mit Peroxidase).

verändertem Medium (1,2 M Sorbitol oder destilliertes Wasser für 3 Stunden) inkubiert, bevor Zellextrakte hergestellt wurden. Außerdem wurden die Zellen in SD-Medium bei erhöhter Temperatur inkubiert (35 °C und 42 °C). Ein Teil der Zellextrakte wurde vor der Immunoblot-Analyse mit 2 U alkalischer Phosphatase für 2, 4 oder 6 Stunden vorbehandelt. Es wurden immer gleiche Proteinmengen (48 mg) der Zellextrakte eingesetzt. In der Abbildung 3.33 sind die Resultate dargestellt.

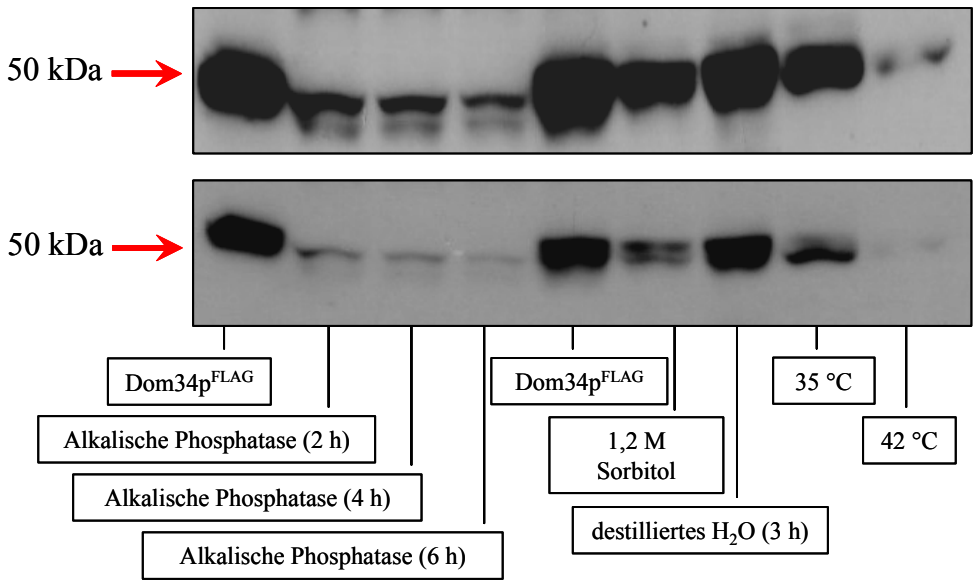


Abb. 3.33: Immunoblot-Analyse von Zellextrakten mit und ohne Vorbehandlung mit alkalischer Phosphatase. Der Stamm SK71 wurde in SD-Medium, SD-Medium mit 1,2 M Sorbitol oder für eine Dauer von 3 Stunden unter Hungerbedingungen in destilliertem Wasser bei einer Temperatur von 30 °C, 35 °C oder 42 °C inkubiert. Mit alkalischer Phosphatase (2 U) für 2, 4 und 6 Stunden vorbehandelte und unbehandelte Zellextrakte wurden in einer 7,5 %igen SDS-PAGE aufgetrennt. Nach dem Transfer auf eine Nitrocellulosemembran erfolgte die Detektion mittels eines Anti-FLAG-Antikörpers (konjugiert mit Peroxidase). Dargestellt sind verschieden lange Belichtungszeiten des Röntgenfilms.

Die Dom34p-Doppelbande konnte bei diesem Versuch beim Kontroll-Zellextrakt aufgelöst werden (Abbildung 3.33); nach einer Vorbehandlung des Zellextraktes mit alkalischer Phosphatase trat aber lediglich die untere der beiden Banden im Immunoblot auf. Die Inkubation der Zellen in osmotisch verändertem Medium (SD-Medium mit 1,2 M Sorbitol oder destilliertem Wasser für 3 Stunden) hatte keinerlei Einfluss auf den Phosphorylierungsstatus von Dom34p (Abbildung 3.33). Bei einer erhöhten Wachstums-temperatur ändert sich die Mengenverteilung von phosphoryliertem- und nicht-phosporyliertem Protein, welche im Kontrollstamm bei 30 °C in etwa gleich verteilt ist, gänzlich. Bei einer Inkubationstemperatur von 35 °C wurde hauptsächlich die untere, also nicht phosphorylierte Form des Dom34p detektiert und die langsamer laufende Form war nur noch schwach erkennbar; dieses Verhalten wird bei weiter erhöhter Temperatur von 42 °C noch verstärkt. Somit verändert sich unter bestimmten Stressbedingungen der Phosphorylierungsstatus von CaDom34p.

3.8 Genomweite Transkriptanalyse

Deletionen des *DOM34*-Gens im genetischen Hintergrund des Wildtyps und einer *pmt1*Δ-Mutante verursachten verschiedene Phänotypen, wie in den vorangegangenen Kapiteln gezeigt wurde. Um mehr Einblicke in die Funktion und Rolle von CaDom34p zu erhalten, wurden genomweite Transkriptanalysen der *dom34*Δ-Mutante und der Doppeldeletionsmutante *dom34*Δ/*dom34*Δ *pmt1*Δ/*pmt1*Δ im Vergleich zum Wildtyp CAF2-1 durchgeführt. Es wurden kommerzielle DNA-Mikroarrays der Firma Eurogentec benutzt. Diese enthalten mit 6039 offenen Leserastern (ORFs) etwa 98 % der Gene von *C. albicans*. Die markierte cDNA von zwei zu vergleichenden Proben wurde an einen DNA-Mikroarray hybridisiert. Nach dem Waschen und dem Scannen der Arrays erfolgte die Normalisierung und statistische Auswertung der Daten mit Hilfe der Computerprogramme SAM (http://www-stat.stanford.edu/~tibs/SAM; Tusher *et al.*, 2001) und GeneSpring 7.2 (Silicon Genetics). In der Abbildung. 3.34 **A.** erkennt man den Ausschnitt eines hybridisierten DNA-Mikroarrays mit 200 je zweifach vorhandenen ORFs. Das Verhältnis der Signalintensitäten von Experiment und Referenz liefert eine Aussage über die differentielle Expression eines jeden Gens. In der Abbildung 3.34 **B.** ist das Ergebnis eines Vergleichs der *dom34*Δ-Mutante mit dem Wildtyp exemplarisch als so genannter „Scatterplot" dargestellt. Hierbei werden die Signalintensitäten jedes Gens unter den beiden Bedingungen graphisch dargestellt. Gene, welche unter beiden Bedingungen in gleichem Maße exprimiert werden, sind bei dieser Art der Darstellung auf der Winkelhalbierenden zu finden. Differentiell exprimierte Gene hingegen sind oberhalb bzw. unterhalb dieser Linie lokalisiert.

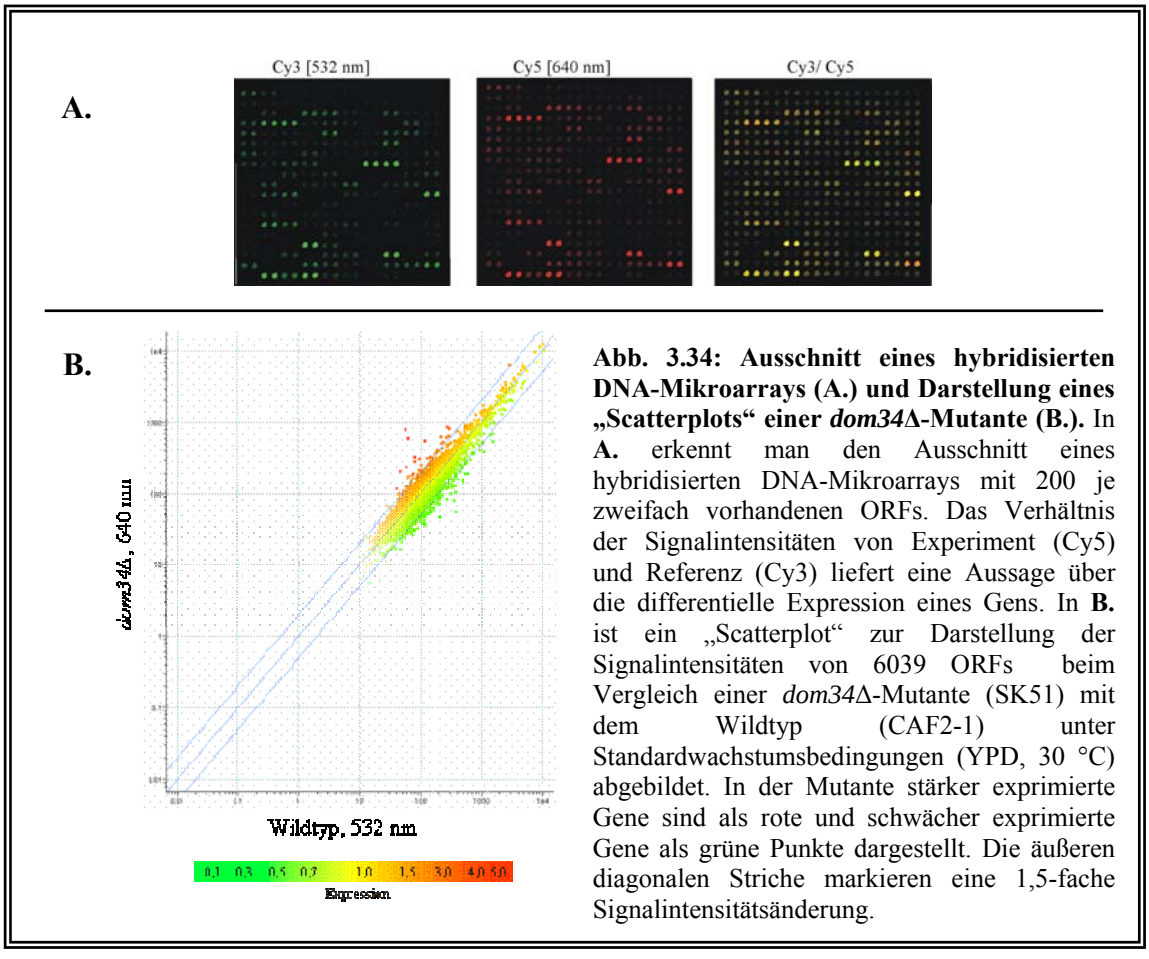


Abb. 3.34: Ausschnitt eines hybridisierten DNA-Mikroarrays (A.) und Darstellung eines „Scatterplots" einer *dom34*Δ-Mutante (B.). In **A.** erkennt man den Ausschnitt eines hybridisierten DNA-Mikroarrays mit 200 je zweifach vorhandenen ORFs. Das Verhältnis der Signalintensitäten von Experiment (Cy5) und Referenz (Cy3) liefert eine Aussage über die differentielle Expression eines Gens. In **B.** ist ein „Scatterplot" zur Darstellung der Signalintensitäten von 6039 ORFs beim Vergleich einer *dom34*Δ-Mutante (SK51) mit dem Wildtyp (CAF2-1) unter Standardwachstumsbedingungen (YPD, 30 °C) abgebildet. In der Mutante stärker exprimierte Gene sind als rote und schwächer exprimierte Gene als grüne Punkte dargestellt. Die äußeren diagonalen Striche markieren eine 1,5-fache Signalintensitätsänderung.

Um auch kleine Veränderungen im Expressionsniveau einzelner Gene zuverlässig zu bestimmen, ist es notwendig, die aufgrund experimenteller und biologischer Variabilität abweichenden Ergebnisse statistisch abzusichern. Im Verlauf dieser Arbeit wurden deshalb für jede Auswertung mindestens drei Hybridisierungen (Replikate) durchgeführt. Die cDNA dieser drei Hybridisierungen vom Wildtyp und der Mutante 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 mindestens einem der drei Experimente ein Farbtausch durchgeführt („dye swap"). Jedes offene Leseraster ist auf den eingesetzten DNA-Mikroarrays zweimal vorhanden, so dass sich für einen ORF sechs Verhältniswerte ergeben. Diese Verhältnisse der Signalintensität des Experimentes dividiert durch die Signalintensität der Referenz der sechs Einzelwerte wurden für weitere Analysen gemittelt. Als reguliert wurden in allen Experimenten nur die Gene bezeichnet, die eine mit Hilfe des Programms SAM ermittelte statistisch signifikante Abweichung (mindestens 1,5-fach) von der Referenz zeigten. Die Gene, die im Anhang in den Genlisten aufgeführt sind, beinhalten ebenfalls lediglich die Gene, die im Mittel eine mindestens 1,5-fache Signalintensitätsänderung zur Referenz zeigten.

Es sollte eine vergleichende Transkriptomanalyse der *dom34*Δ-Mutanten im genetischen Hintergrund des Wildtyps und einer *pmt1*Δ-Mutante durchgeführt werden. Die Zellen wurden in YPD-Vollmedium bei 30 °C bis zu einer $OD_{600\ nm}$ von 0,5 angezogen. Nach einer Normalisierung der Daten und einer statistischen Auswertung (siehe 2.7.6) konnten in allen drei Mutanten insgesamt 603 verschiedene, statistisch signifikant regulierte Gene mit einer mindestens 1,5-fach abweichenden Expression identifiziert werden. Es wurden 347 stärker exprimierte Gene und 256 schwächer exprimierte Gene im Vergleich zur Referenz festgestellt (Tab. 3.5, Anhang - Tab. 8.1, Anhang - Tab. 8.2, Anhang - Tab. 8.3). Regulierte Gene wurden in funktionelle Kategorien nach MIPS (Munich Information Center for Protein Sequences: http://mips.gsf.de/proj/yeast/CYGD/db; Mewes *et al.*, 1997) eingeteilt.

Tab. 3.5: Anzahl der mindestens 1,5-fach signifikant regulierten Gene der Mutanten.

Expression	erhöht (347 Gene)	erniedrigt (256 Gene)	insgesamt (Σ)
*dom34*Δ	152	86	238
*pmt1*Δ	186	61	247
*dom34*Δ *pmt1*Δ	9	109	118

Alle Gene der Stämme SK51, SPCa2 und SK53, die dieser Tabelle zu Grunde liegen, waren mindestens 1,5-fach reguliert. Insgesamt wurden 603 verschiedene Gene gefunden, die mindestens einmal in einer der Mutanten reguliert waren. Es wurden 347 stärker exprimierte Gene und 256 schwächer exprimierte Gene festgestellt.

Um Ähnlichkeiten, aber auch Unterschiede zwischen den Transkriptomprofilen der verschiedenen *dom34*Δ-Mutanten und der *pmt1*Δ-Mutante aufzuzeigen, wurden so genannte Clusteranalysen (Eisen *et al.*, 1995) durchgeführt. Hierbei werden Gruppen von Genen, sogenannte Cluster, zusammengestellt, welche in den vorgegebenen Experimenten ein ähnliches Expressionsniveau zeigen. Des Weiteren kann anhand eines Vergleichs der Expressionsniveaus dieser Gene die Ähnlichkeit bzw. die Unterschiede verschiedener Experimente gezeigt werden. In Abbildung 3.35 erkennt man eine zweidimensionale Clusteranalyse aller 6039 Gene der getesteten Mutanten. Der Grad der Regulation ist in verschiedenen Farben dargestellt; eine grüne Farbe kennzeichnet eine verringerte Expression, wohingegen eine rote Farbgebung für eine erhöhte Expression steht. Wenn im Vergleich zur Referenz (Wildtyp CAF2-1) keine- oder kaum Veränderung der Expression festgestellt wurde, dann wurde eine gelbe Farbe zur Darstellung gewählt. Graue Bereiche bedeuten, dass keine Daten für das Experiment zur Verfügung standen. Das horizontale Dendogramm, welches Ähnlichkeiten der Genexpressionsmuster aufzeigt, deutet an, dass die Transkriptomprofile der *dom34*Δ- und *pmt1*Δ-Einzeldeletionsmutanten sehr viel ähnlicher zueinander sind, als zur *dom34*Δ/*dom34*Δ *pmt1*Δ/*pmt1*Δ-Doppeldeletionsmutante (Abbildung 3.35). Das vertikale Dendogramm zeigt Ähnlichkeiten zwischen den verschiedenen Experimenten an.

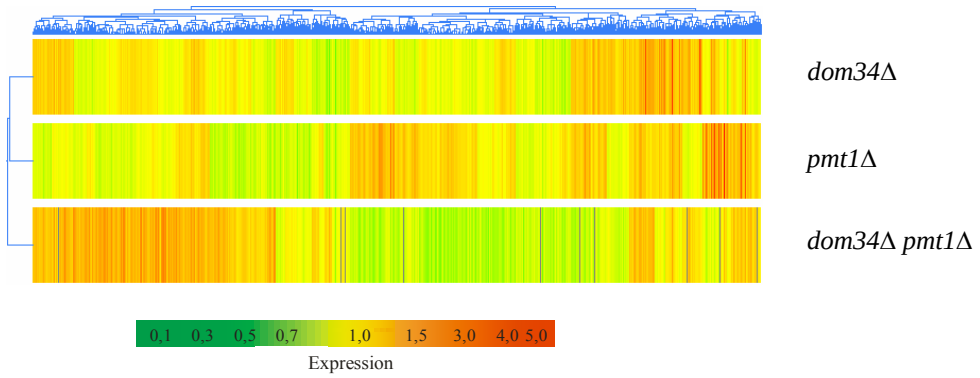


Abb. 3.35: Zweidimensionale Clusteranalyse von Genexpressionsverhältnissen. Es wurden die Stämme SK51, SPCa2 und SK53 untersucht. Die Clusteranalyse wurde mit allen 6039 ORFs durchgeführt. Die Verhältnisse der Genexpression von Experiment und Referenz sind als Rot-Grün-Skala dargestellt. Eine grüne Farbe kennzeichnet eine verringerte Expression, während eine rote Farbgebung für eine erhöhte Expression steht. Graue Felder bedeuten, dass keine Daten für das Experiment zur Verfügung standen. Ähnlichkeiten zwischen Genexpressionsmustern werden durch das horizontale Dendogramm angezeigt. Das vertikale Dendogramm zeigt Gruppen von gleich-regulierten Genen.

In Abbildung 3.36 sind alle 603 Gene, welche in zumindest einem der Experimente eine 1,5-fache signifikante Abweichung zur Referenz CAF2-1 zeigten (Anhang - Tab. 8.1, Anhang - Tab. 8.2, Anhang - Tab. 8.3), abgebildet. Auffällig ist, dass viele Gene der Doppeldeletions-mutante *dom34*Δ/*dom34*Δ *pmt1*Δ/*pmt1*Δ nur schwach reguliert sind und deshalb in der Abbildung gelb, hellgrün oder hellorange erscheinen. Wie bereits oben angedeutet, sind in der Doppeldeletion zwar 118 Gene der 6039 *C. albicans*-Gene insgesamt statistisch reguliert, doch ist diese veränderte Expression nur schwach in Relation zum Wildtyp (Anhang - Tab. 8.3). Von allen 109 schwächer exprimierten Genen dieser Mutante ist nur ein einziges Gen

(*IPF3192*), dessen Funktion unbekannt ist, etwas stärker als zweifach verändert reguliert. Alle anderen 108 schwächer exprimierten Gene sind im Vergleich zum Wildtyp geringer als zweifach reguliert.

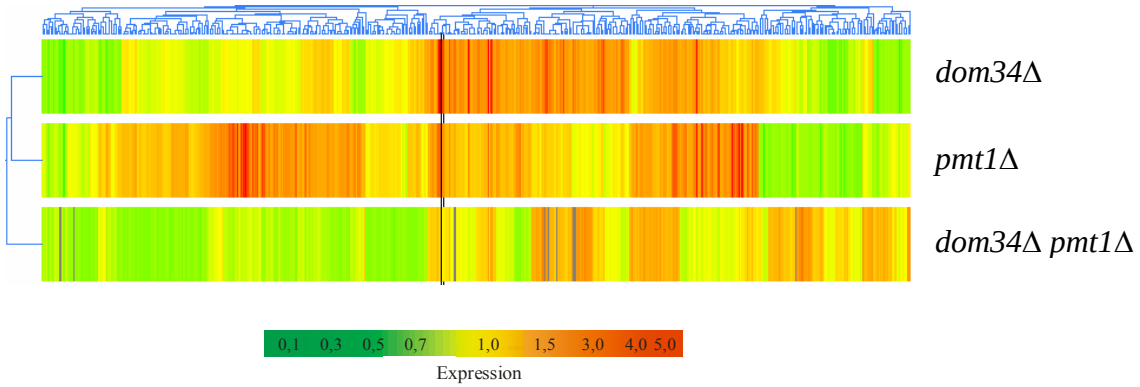


Abb. 3.36: Zweidimensionale Clusteranalyse von Genexpressionsverhältnissen aller signifikant regulierten Gene. Es wurden die Stämme SK51, SPCa2 und SK53 untersucht. Die Clusteranalyse wurde mit 603 Genen durchgeführt, welche zumindest in einem der 3 Experimente eine 1,5-fache signifikante Abweichung von der Referenz zeigten. Die Verhältnisse der Genexpression von Experiment und Referenz sind als Rot-Grün-Skala dargestellt. Eine grüne Farbe kennzeichnet eine verringerte Expression, während eine rote Farbgebung für eine erhöhte Expression steht. Graue Felder bedeuten, dass keine Daten für das Experiment zur Verfügung standen. Ähnlichkeiten zwischen Genexpressionsmustern werden durch das horizontale Dendogramm angezeigt. Das vertikale Dendogramm zeigt Gruppen von gleich-regulierten Genen.

Um zu überprüfen, wie die Gene, welche in einem der Experimente besonders stark oder schwach reguliert wurden, in der anderen *dom34*Δ-Mutante oder der *pmt1*Δ-Mutante reguliert sind, wurden diese Gene seperat in einem zweidimensionalen Cluster angeordnet (Abbildung 3.37).

In Abbildung 3.37 und in der Tabelle 8.4 des Anhangs sind alle 126 Gene dargestellt, welche in einem der 3 Experimente mindestens um den Faktor 2,0 in einer der Mutanten verstärkt exprimiert waren oder eine mindestens um den Faktor 0,5 erniedrigte Expression im Vergleich zum Wildtyp aufwiesen. Wie aus Abbildung 3.37 deutlich wird, ist die *dom34*Δ/*dom34*Δ *pmt1*Δ/*pmt1*Δ-Mutante oftmals anders reguliert als die Einzeldeletions-mutanten. So ist beispielsweise die Expression der Gene *CDR1* und *DDR48*, die nach MIPS (http://mips.gsf.de/proj/yeast/CYGD/db) in die funktionelle Kategorie „zelluläre Überlebens-mechanismen“ eingeteilt werden, in den Einzeldeletionsmutanten stark erhöht, während sie in der Doppeldeletionsmutante im Vergleich zur Referenz CAF2-1 nicht signifikant erhöht exprimiert werden. Weitere Gene, die in den Einzeldeletionsmutanten ähnlich reguliert werden und von der Regulation in der Doppeldeletionsmutante abweichen, sind beispielsweise *NOG1*, ein G-Protein, oder auch das für einen Adhäsionsfaktor kodierende Gen *ALS1*. Auch die Gene *ALS6*, *PLB3*, *PLB4.5F* *ALS5*, *ALS6* oder *ALS11.3F* sind unterschiedlich im Verhältnis zu den Einzeldeletionsmutanten reguliert. Dennoch unterscheiden sich die Genexpressionsprofile der Einzeldeletionsmutanten zum Teil doch erheblich. Als Beispiel sei das für eine Untereinheit eines Proteins des Translokationkomplexes kodierende *SEC61*-Gen genannt. In der *pmt1*Δ-Mutante wird es stark erhöht exprimiert (Faktor 2,8), während es in der *dom34*Δ-Mutante im Vergleich zur Referenz

nicht signifikant reguliert wird (geringer als 1,5-fach) und in der Doppeldeletionsmutante herunterreguliert vorliegt (Faktor 0,7). Auch Gene, wie beispielsweise *HWP1*, *ALS4.3F* oder *ALS1.3EOC* sind in den Einzeldeletionsmutanten unterschiedlich reguliert.

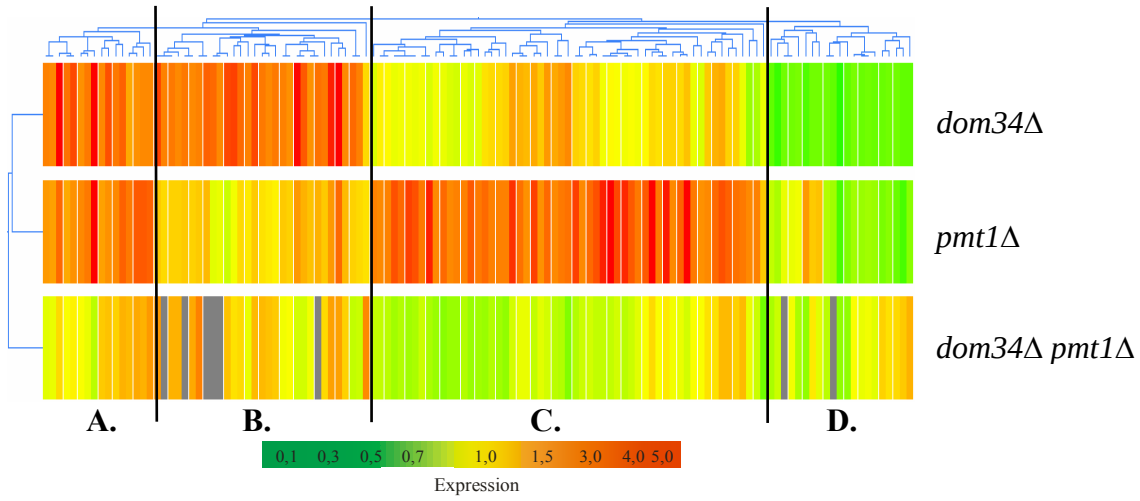


Abb. 3.37: Zweidimensionale Clusteranalyse von Genexpressionsverhältnissen aller signifikant ≥2.0- und ≤0,5-fach regulierten Gene. Es wurden die Stämme SK51, SPCa2 und SK53 untersucht. Gezeigt ist eine Clusteranalyse von Genen, welche in mindestens einem Experiment eine um den Faktor 2,0 verstärkte Expression oder eine um den Faktor 0,5 niedrigere Expression als der Wildtyp aufweisen. Die Verhältnisse der Genexpression von Experiment und Referenz sind als Rot-Grün-Skala dargestellt. Eine grüne Farbe kennzeichnet eine verringerte Expression, während eine rote Farbgebung für eine erhöhte Expression steht. Graue Felder bedeuten, dass keine Daten für das Experiment zur Verfügung standen. Ähnlichkeiten zwischen Genexpressionsmustern werden durch das horizontale Dendogramm angezeigt. Das vertikale Dendogramm zeigt Gruppen von gleich-regulierten Genen. Die erhaltene Clusteranalyse wurde in vier Gruppen (**A.** bis **D.**) eingeteilt (schwarze Trennstriche in der Abbildung), um die Regulation bestimmter Gene der Mutanten besser miteinander vergleichen zu können. Eine genaue Auflistung aller hier gezeigten Gene ist im Anhang dokumentiert (Tab. 8.4).

In Abbildung 3.38 sind so genannte Venn-Diagramme zur Darstellung gemeinsam regulierter Gene abgebildet. Dabei zeigen die Schnittmengen zweier Mutanten die Anzahl der Gene, welche in zwei der Mutanten gemeinsam reguliert sind. Gleiche Gene, die in mindestens drei verschiedenen Mutanten reguliert werden, sind in der mittleren Schnittmenge der Venn-Diagramme zu finden. Es konnte nur ein einziges schwächer exprimiertes Gen, *IPF6518*, (Homologie zu *S. cerevisiae* YNR018W; möglicherweise ein membranständiges Protein), dessen Funktion nicht bekannt ist, in einer mittleren Schnittmenge gefunden werden. Bei dem Gen, welches sowohl in der Doppeldeletionsmutante (Faktor 1,9), als auch in der *dom34*Δ-Mutante (Faktor 3,7) stärker exprimiert wird, handelt es sich um *IPF14682*, bei dem es sich um einen Transkriptionsfaktor handeln könnte. In der Gruppe der 39 stärker exprimierten Gene, welche in den beiden Einzeldeletionsmutanten *dom34*Δ und *pmt1*Δ reguliert werden, befinden sich beispielsweise Gene des Metabolismus und der Energiegewinnung (*MXR1*, *IFD5*, *IFD4*, *FRE30.53*, *FRE30.3*, *GFA1*, *GAL10*, *PHR1*, *PCK1*) oder der Zellwandsynthese (*CHS2*, *ECM331*, *ECM22*).

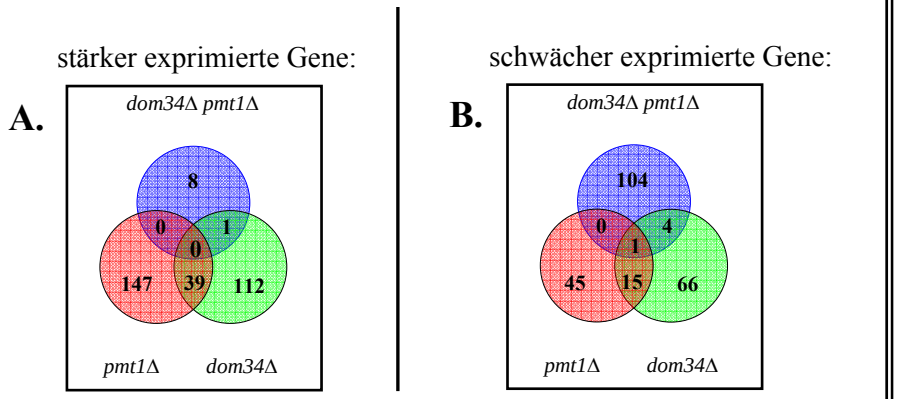


Abb. 3.38: Venn-Diagramme zur Darstellung gemeinsam regulierter Gene. Es wurden die Stämme SK51, SPCa2 und SK53 untersucht. In **A.** erkennt man alle mindestens 1,5-fach stärker exprimierten Gene der Mutanten in Relation zum Wildtyp CAF2-1. In **B.** sind alle mindestens 1,5-fach schwächer regulierten Gene der Mutanten in Relation zum Wildtyp CAF2-1 dargestellt. Die Schnittmengen geben die Anzahl der gemeinsam regulierten Gene der Mutanten an.

In der Gruppe der 4 schwächer exprimierten Gene, welche sowohl in der *dom34*Δ-Mutante, als auch in der Doppeldeletionsmutante *dom34*Δ/*dom34*Δ *pmt1*Δ/*pmt1*Δ reguliert werden, befinden sich 3 unbekannte Gene und ein in den Transport bzw. die Transporterleichterung involviertes Gen (*IPF7686*). In der Gruppe der 15 schwächer exprimierten Gene, welche in beiden Einzeldeletionsmutanten (*dom34*Δ-Mutante und *pmt1*Δ-Mutante) reguliert werden, befinden sich beispielsweise 3 Gene des Metabolismus (*ERG6*, *ERG16*, *GDH3*). Des Weiteren finden sich ein Transkriptionsfaktor (*IPF7289*) und ein Gen für die Umwelt-interaktion (*CDR4*).

Um weitere Ähnlichkeiten und Unterschiede zwischen den Transkriptomprofilen der verschiedenen *dom34*Δ-Mutanten und der *pmt1*Δ-Mutante aufzuzeigen, wurden Cluster-analysen mit Gruppen von Genen durchgeführt, die in mindestens zwei der drei Mutanten gleichartig reguliert wurden (Schnittmengen der Abb. 3.38). In Abbildung 3.39 wurde eine Clusteranalyse aller 20 signifikant schwächer exprimierten Gene durchgeführt, welche in mindestens zwei der drei Mutanten gleich reguliert wurden (Schnittmengen der Abbildung 3.38 **B.**). Auch hier ist die Doppeldeletionsmutante im Vergleich zu den Einzeldeletions-mutanten fast vollständig unterschiedlich reguliert. So ist die Genexpression von *ERG6*, *ERG16* oder *CDR4* in den Einzeldeletionsmutanten erniedrigt, während sie in der Doppeldeletion sogar leicht erhöht ist. Dies ist aber nicht grundsätzlich für alle Gene der Fall. *ERG1* beispielsweise wird in allen Mutanten ähnlich, leicht reduziert, exprimiert (Abbildung 3.39).

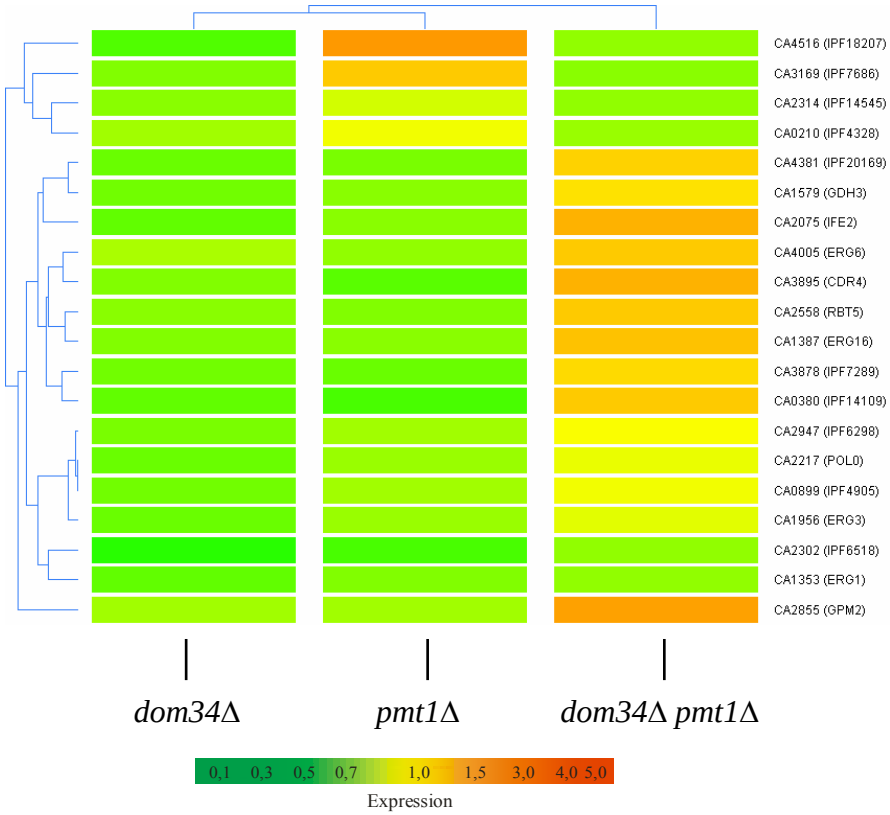


Abb. 3.39: Zweidimensionale Clusteranalyse ausgesuchter Gene. Es wurden die Stämme SK51, SPCa2 und SK53 untersucht. Gezeigt werden 20 signifikant regulierte, schwächer exprimierte Gene, welche in mindestens zwei der drei Mutanten gleich reguliert wurden (Schnittmengen der Abbildung 3.38 **B.**). Die Verhältnisse der Genexpression von Experiment und Referenz sind als Rot-Grün-Skala dargestellt. Eine grüne Farbe kennzeichnet eine verringerte Expression, während eine rote Farbgebung für erhöhte Expression steht. Ähnlichkeiten zwischen Genexpressionsmustern werden durch das vertikale Dendogramm angezeigt. Das horizontale Dendogramm zeigt Gruppen von gleich-regulierten Genen.

In Abbildung 3.40 wurde eine Clusteranalyse aller 40 signifikant stärker exprimierten Gene, welche in mindestens zwei der drei Mutanten gleich reguliert wurden (Schnittmengen der Abbildung 3.38 **A.**), durchgeführt. Bei verschiedenen Genen ist die Genexpression in den Einzeldeletionsmutanten erhöht, während sie in der Doppeldeletion im Vergleich zum Wildtyp CAF2-1 unverändert oder leicht erniedrigt ist. Zu dieser Gruppe von Genen gehören beispielsweise *MXR1*, *RTA3*, *PHR2*, *DDR48* oder auch *ERK1* (Abbildung 3.40). Es gibt allerdings auch tendentiell gleich regulierte Gene aller Mutanten, wie beispielsweise die Eisenreduktasen *FRE30.3* und *FRE30.53* oder auch *GAL10* oder *ALS1.3EOC*. Nach Erstellung und Auswertung der zweidimensionalen Clusteranalysen bleibt festzuhalten, dass die Doppeldeletionsmutante in Relation zu den Einzeldeletionsmutanten (*dom34*Δ- und *pmt1*Δ-Mutante) häufig unterschiedlich reguliert ist. Dies wird auch deutlich, wenn man Abbildung 3.38 näher betrachtet.

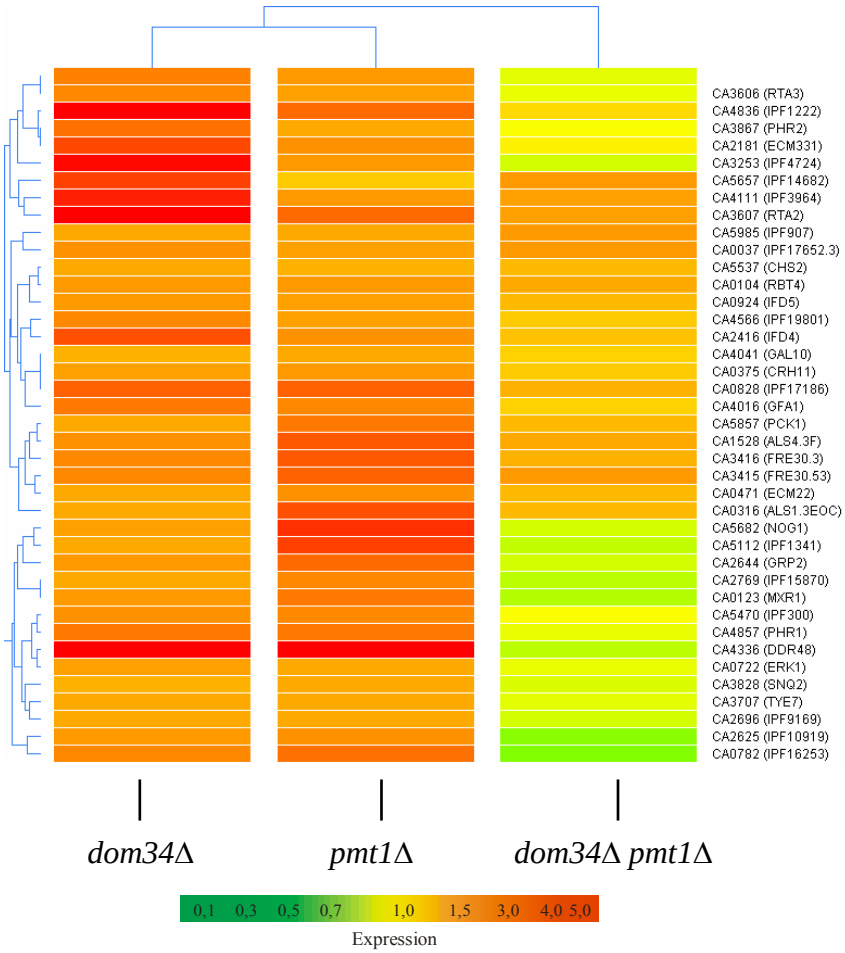


Abb. 3.40: Zweidimensionale Clusteranalyse ausgesuchter Gene. Es wurden die Stämme SK51, SPCa2 und SK53 untersucht. Gezeigt werden 40 signifikant stärker exprimierte Gene, welche in mindestens zwei der drei Mutanten gleich reguliert wurden (Schnittmengen der Abbildung 3.38 **A.**). Die Verhältnisse der Genexpression von Experiment und Referenz sind als Rot-Grün-Skala dargestellt. Eine grüne Farbe kennzeichnet eine verringerte Expression, während eine rote Farbgebung für eine erhöhte Expression steht. Ähnlichkeiten zwischen Genexpressionsmustern werden durch das vertikale Dendogramm angezeigt. Das horizontale Dendogramm zeigt Gruppen von gleich-regulierten Genen.

3.8.1 Einfluss der *dom34*Δ-Mutante auf das Transkriptom von *C. albicans*

In Abbildung 3.41 ist die Einteilung in funktionelle Kategorien nach MIPS für die 238 mindestens 1,5-fach regulierten Gene der *dom34*Δ-Mutante gezeigt. Dabei ist es durchaus möglich, dass ein Protein in mehrere, meist verwandte Kategorien eingeteilt wird, da es verschiedene Aufgaben in der Zelle erfüllt. Bei den 86 schwächer exprimierten Genen ist die größte Gruppe mit 25 % die der Gene des Metabolismus; die zweitgrößte funktionelle Kategorie mit 22 % ist die der zellulären Bestimmung. 30 Gene, oder auch 18 % der schwächer exprimierten Gene fallen in die Kategorie der unbekannten- und unklassifizierten Proteine (Abbildung 3.41). Sehr stark herunterregulierte Gene der *dom34*Δ-Mutante sind zum Beispiel *ERG1* und *ERG3* oder auch *RHR2*, Gene des Metabolismus. Bei den 152 stärker

exprimierten Genen stellen die Gene der unbekannten- und unklassifizierten Proteine die größte Gruppe mit 77 Genen oder auch 30 % (Abbildung 3.41). Die zweitgrößte Kategorie ist die der zellulären Bestimmung (17 %) und die drittgrößte funktionelle Gruppe ist die des Metabolismus (29 Gene, was 11 % entspricht). Stark hochregulierte Gene sind *URA3*, *DDR48*, *ECM331* oder auch *RTA2*. *RTA2* zeigt eine sehr starke Regulation; allerdings gehört es zu den unbekannten Proteinen, so dass keine genaue Aussage zur Funktion zu treffen ist. *URA3* aus der Kategorie des Metabolismus ist ebenfalls stark hochreguliert. An diesem Beispiel wird ersichtlich, wie wichtig es ist, die Deletionsstämme zu rekonstituieren, so dass keine Positionseffekte aufgrund der Genomlokalisation zu Stande kommen können (siehe 3.2.2). Bei *DDR48* handelt es sich um ein Stressprotein; *ECM331* ist in die Zellwand-Synthese involviert (Anhang - Tab. 8.1).

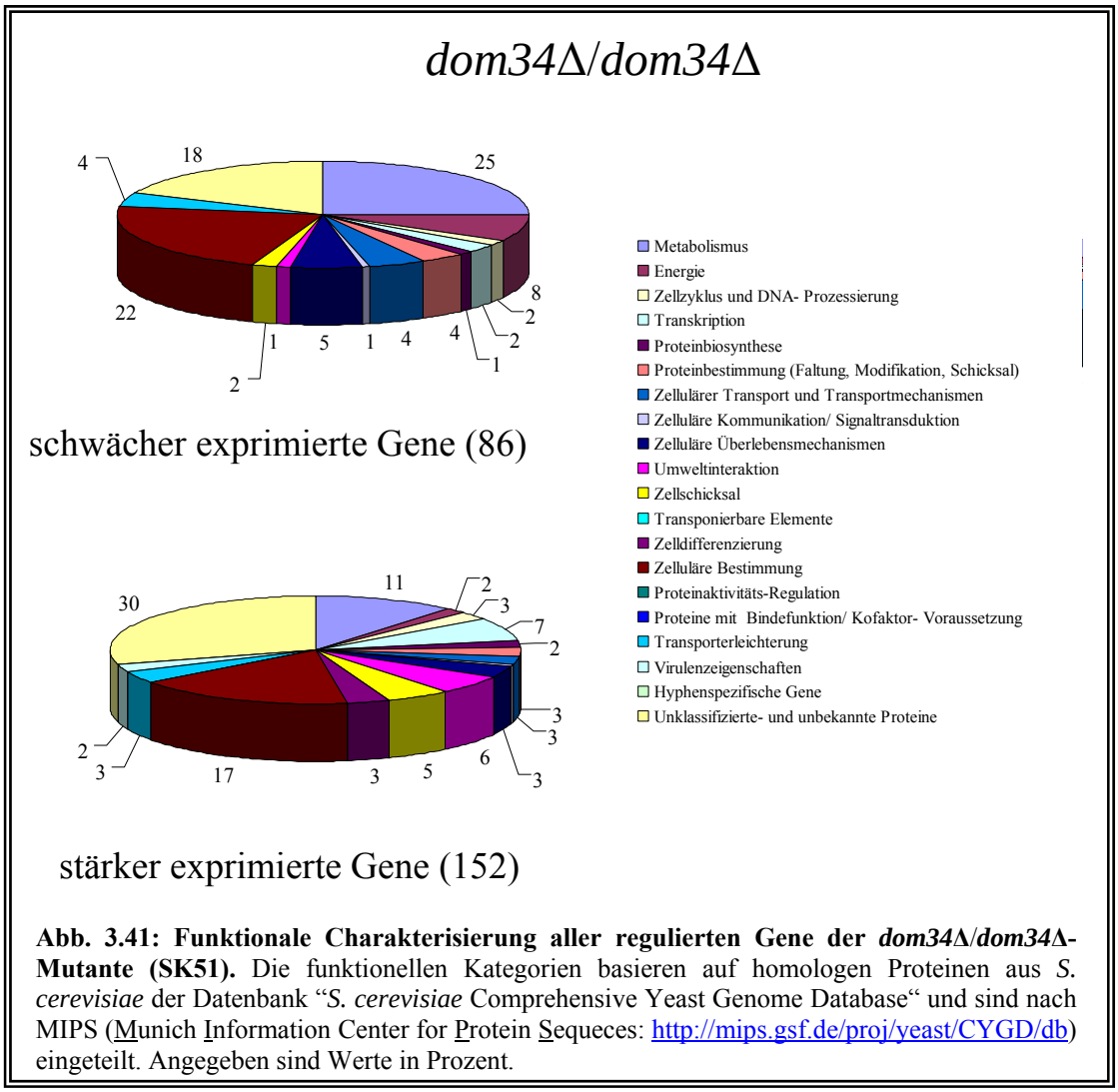


Abb. 3.41: Funktionale Charakterisierung aller regulierten Gene der *dom34Δ/dom34Δ*-Mutante (SK51). Die funktionellen Kategorien basieren auf homologen Proteinen aus *S. cerevisiae* der Datenbank "*S. cerevisiae* Comprehensive Yeast Genome Database" und sind nach MIPS (Munich Information Center for Protein Sequeces: http://mips.gsf.de/proj/yeast/CYGD/db) eingeteilt. Angegeben sind Werte in Prozent.

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

In Abbildung 3.42 ist die Einteilung in funktionelle Kategorien nach MIPS für die 247 mindestens 1,5-fach regulierten Gene der *pmt1*Δ-Mutante gezeigt. Sowohl bei den 186 stärker

exprimierten Genen, als auch bei den 61 schwächer exprimierten Genen, stellen die Gene der zellulären Bestimmung, des Metabolismus und die der unbekannten- und unklassifizierten Proteine die drei größten Gruppen (Abbildung 3.42). In der Gruppe der stark hochregulierten Gene finden sich *PET9*, ein ADP/ ATP-Transporter, *PCK1*, eine Phosphoenolpyruvat Carboxykinase und *SEC61*, einer Untereinheit des Protein/ Endoplasmatisches Retikulum-Translokationkomplexes. Ebenfalls stark exprimiert sind *RPP2*, ein saures, ribosomales Protein und das Stressprotein *DDR48*, welches auch schon in der *dom34*Δ-Mutante hochreguliert war (Anhang - Tab. 8.1, Anhang - Tab. 8.2). Die am stärksten negativ regulierten Gene sind beispielsweise *PMT1* und *CDR4*, welche unter anderem an der Abwehr von verschiedenen Wirkstoffen und Chemikalien beteiligt sind (Anhang - Tab. 8.2).

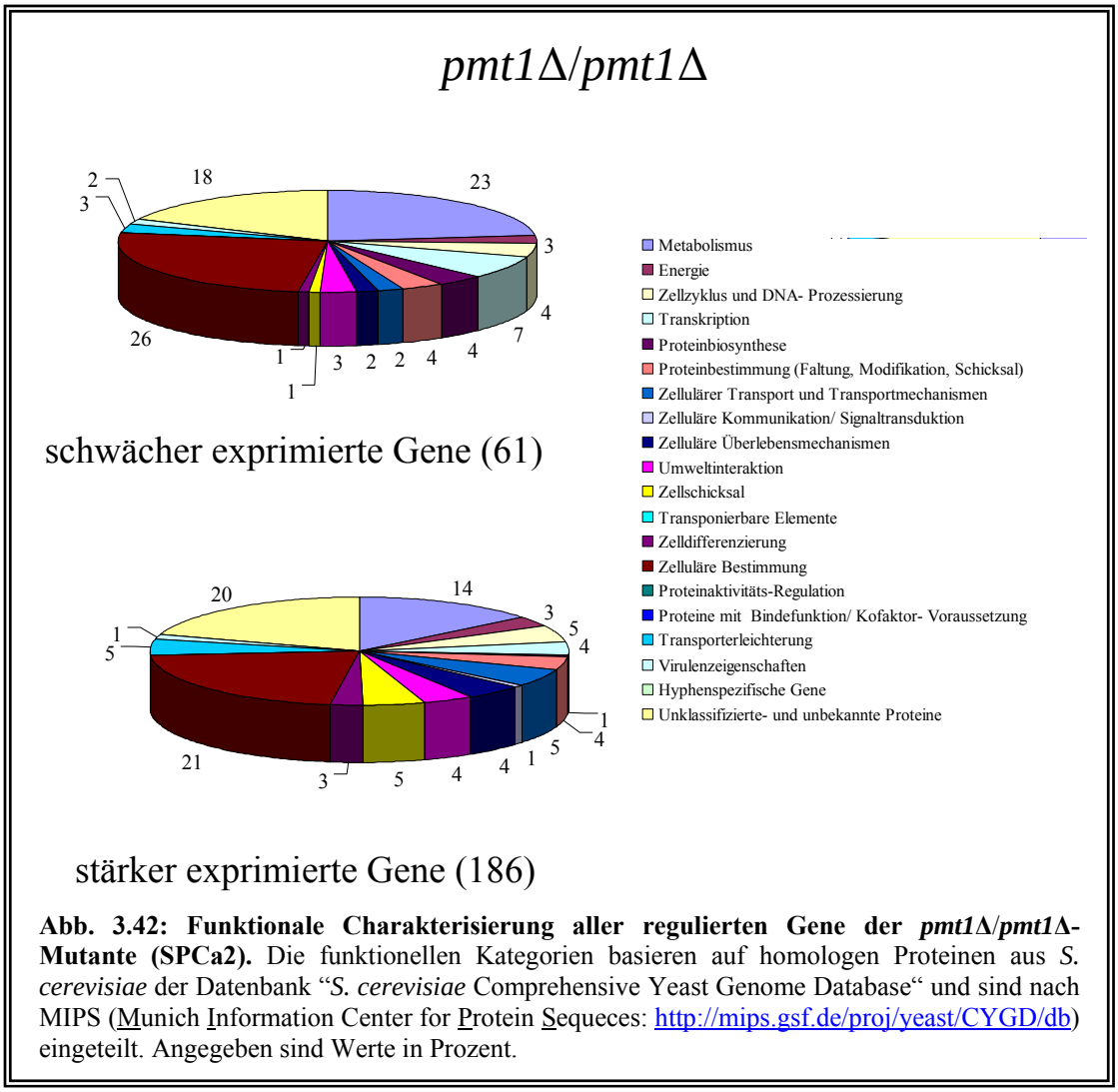


Abb. 3.42: Funktionale Charakterisierung aller regulierten Gene der *pmt1*Δ/*pmt1*Δ-Mutante (SPCa2). Die funktionellen Kategorien basieren auf homologen Proteinen aus *S. cerevisiae* der Datenbank "*S. cerevisiae* Comprehensive Yeast Genome Database" und sind nach MIPS (Munich Information Center for Protein Sequeces: http://mips.gsf.de/proj/yeast/CYGD/db) eingeteilt. Angegeben sind Werte in Prozent.

Beim Vergleich der erzielten Ergebnisse der Transkriptomanalyse der *pmt1*Δ-Mutante dieser Arbeit und der von Prill (2004) durchgeführten Analyse der Mutante können viele Genregulationen bestätigt werden. So werden beispielsweise die Gene *KAR2* und *SSR1*, die nach MIPS in die funktionelle Katgorie „zelluläre Bestimmung" eingeordnet werden in

beiden Untersuchungen mit einem Faktor von 1,7- bis 2,0-fach hochreguliert identifiziert. Das oben erwähnte Stressprotein *DDR48* wird bei Prill (2004) mit einem Faktor von 1,8 und in dieser Arbeit mit 8,8-facher verstärkter Regulation gefunden. Das *CDR1*-Gen wird von Prill (2004) als 1,6-fach hochreguliert beschrieben; in dieser Arbeit wurde ein Faktor von 1,8 bestimmt. Auch das für das bei der Hyphenbildung involvierte Hwp1-Protein kodierende *HWP1*-Gen wird in beiden Analysen als verstärkt exprimiert identifiziert.

Im Gegensatz zu Prill (2004), der feststellte, dass in einer *pmt1*Δ-Deletionsmutante die Expression von Genen des Glyzerinstoffwechsels (*GPD1*, *GPD2*) betroffen sind (*GPD1*: Faktor 0,41 und *GPD2*: Faktor 0,43), konnte dieses im Rahmen dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Die Expression von *GPD1* war mit dem Faktor 1,01 nahezu unverändert und die von *GPD2* war leicht erhöht (Faktor 1,27). Prill (2004) stellte die Hypothese auf, dass die verminderte Expression der Gene des Glyzerinstoffwechsels ein Zeichen dafür sein könnte, dass eine *pmt1*Δ-Deletionsmutante einem zu hohen osmotischen Druck seitens des Mediums ausgesetzt ist und aufgrund der geschwächten Zellwand den verstärkten Wassereinstrom des Mediums nicht verhindern kann. Dagegen spricht, dass in der Doppeldeletion keine signifikante Erhöhung der Expression von Genen des Glyzerinstoffwechsels zu beobachten ist, obwohl auch in dieser Mutante die Zellwand im Vergleich zum Wildtyp stark verändert vorliegt (Tab. 3.4). Insgesamt bleibt festzuhalten, dass sich die Resultate der Transkriptomanalyse der *pmt1*Δ-Deletionsmutante von Prill (2004) und dieser Arbeit zum Teil auch voneinander unterscheiden. Als Begründung für die teilweise unterschiedlichen Ergebnisse der Transkriptomanalyse der *pmt1*Δ-Mutante können beispielsweise Unterschiede in Wachstum und 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.

3.8.3 Einfluss der *dom34*Δ *pmt1*Δ-Mutante auf das Transkriptom von *C. albicans*

In Abbildung 3.43 ist die Einteilung in funktionelle Kategorien nach MIPS für die 118 mindestens 1,5-fach regulierten Gene der *dom34*Δ/*dom34*Δ *pmt1*Δ/*pmt1*Δ-Mutante gezeigt. Zu erst einmal fällt auf, dass in der Doppeldeletionsmutante im Vergleich zu den Einzeldeletionsmutanten nur etwa halb so viele Gene in Relation zum Wildtyp signifikant verändert exprimiert werden. Außerdem handelt es sich bei der Mutante um die einzige, in der eine größere Zahl Gene schwächer exprimiert werden (109); nur 9 Gene werden stärker exprimiert. Die größte Gruppe der stärker exprimierten Gene fällt in die Kategorie der unbekannten- und unklassifizierten Proteine (Abbildung 3.43). Die nächstgrößeren funktionellen Kategorien sind zelluläre Bestimmung und Metabolismus (Abbildung 3.43). Wenn man sich den Grad der Regulation von sowohl stärker-, als auch schwächer exprimierten Genen im Vergleich zum Wildtyp CAF2-1 genauer anschaut, fällt auf, dass der Grad der Regulation insgesamt sehr viel schwächer als bei den Einzeldeletionsmutanten ausfällt (Anhang - Tab. 8.1, Anhang - Tab. 8.2, Anhang - Tab. 8.3). Das Transkriptom der Doppeldeletionsmutante kommt, wie oben beschrieben, von allen Mutanten dem des Wildtyps am nächsten.

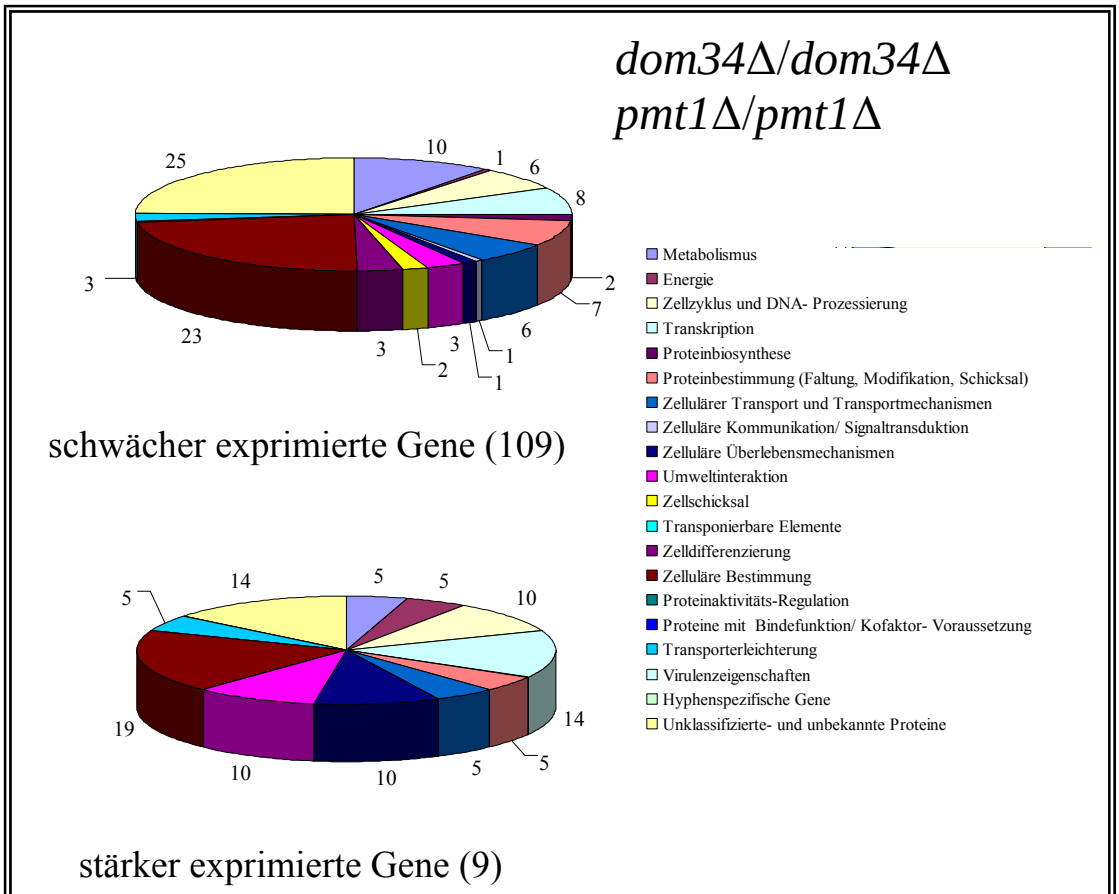


Abb. 3.43: Funktionale Charakterisierung aller regulierten Gene der *dom34Δ/dom34Δ pmt1Δ/pmt1Δ*-Mutante (SK53). Die funktionellen Kategorien basieren auf homologen Proteinen aus *S. cerevisiae* der Datenbank "*S. cerevisiae* Comprehensive Yeast Genome Database" und sind nach MIPS (Munich Information Center for Protein Sequeces: http://mips.gsf.de/proj/yeast/CYGD/db) eingeteilt. Angegeben sind Werte in Prozent.

4. Diskussion

Durch die Entwicklung der Medizin und neue Therapien stiegen die Infektionsraten opportunistischer Krankheitserreger in den letzen Jahren. Diese Entwicklung wird unter anderem begünstigt durch Immunsuppressiva bei Organverpflanzungen, langfristige Therapien mit Antibiotika oder Immunmangelsyndrome, wie AIDS und Leukämie (Matthews, 1994; Morschhäuser *et al.*, 1997). Dem humanpathogenen Pilz *C. albicans* kommt dabei eine besondere Bedeutung zu (Pfaller *et al.*, 1999). Das geschwächte oder defekte Immunsystem begünstigt die Verbreitung des Kommensalen *C. albicans*. Dieses kann in einer oft tödlich verlaufenden, systemischen Candidose resultieren. Bis zum heutigen Tage stehen nur wenige wirksame Antimykotika, welche nur geringe Nebenwirkungen aufweisen, zur Verfügung. Auch die Zunahme von Resistenzen erschwert die Therapie von Candidosen.

Der erste Schritt einer Candidose ist die Adhäsion des pathogenen Erregers an die Wirtsoberfläche. Diese Adhäsion wird unter anderem durch glykosylierte Oberflächen-proteine vermittelt. Die für die initiale Reaktion der *O*-Glykosylierung verantwortlichen Proteine sind die Protein-*O*-mannosyltransferasen. Es konnte gezeigt werden, dass Glykosylierungsmutanten eine reduzierte Virulenz und verminderte Adhäsion aufweisen (Timpel *et al.*, 1998). In *S. cerevisiae* konnte ein Einfluss von *DOM34* auf die *O*-Glykosylierung verschiedener Proteine nachgewiesen werden (Finck *et al*., 1996; Wickert, 1998). Weiterhin zeigte Wickert (1998), dass ein synthetischer Phänotyp zwischen *dom34*Δ- und *pmt1*Δ-Mutationen in einer Doppeldeletionsmutante auftrat.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluss des *DOM34*-Genprodukts des humanpathogenen Pilzes *C. albicans* auf die *O*-Glykosylierung, das Wachstum und die Sensitivität gegenüber Zellwand-destabilisierenden Substanzen charakterisiert. Ferner wurde überprüft, ob in der pathogenen Hefe *C. albicans*, ähnlich wie in der apathogenen Hefe *S. cerevisiae*, ein synthetischer Phänotyp der Deletionen von *PMT1* und *DOM34* existiert. Des Weiteren wurden mittels einer Transkriptomanalyse die verschiedenen *dom34*Δ-Mutanten untersucht, um ein besseres Verständnis der molekularen Prozesse und der vermuteten Interaktion der *DOM34*- und *PMT1*-Genprodukte zu erlangen.

4.1 Die Deletion von *DOM34* verursacht diverse Phänotypen

Nach der erfolgten Disruption des *DOM34*-Gens im CAI4- und im *pmt1*Δ-Stammhintergrund wurden die Auswirkungen des Genverlustes auf den Phänotypen der betroffenen Stämme untersucht. Dabei wurde unter anderem der Einfluss auf das Wachstum, die Morphologie und die Sensitivität der Zellen charakterisiert.

4.1.1 Suppression des Wachstumsdefekts einer *pmt1*Δ-Mutante durch *dom34*Δ

In unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass bei *S. cerevisiae* ein synthetischer Phänotyp der *pmt1*Δ- und *dom34*Δ-Deletionen auftritt. In dieser Arbeit wurde überprüft, ob dieser synthetische Phänotyp auch in dem pathogenen Pilzes *C. albicans* aufzufinden ist. Bei früheren Wachstumsuntersuchungen wurde festgestellt, dass die *pmt1*Δ-Mutante ein verlangsamtes Wachstum in *C. albicans* zeigte (Timpel *et al.*, 1998). Von Davis und

Engbrecht (1998) konnte zudem gezeigt werden, dass eine *Scdom34*Δ-Mutante einen Wachstumsdefekt bei 30 °C aufweist, der bei einer verringerten Temperatur von 15 °C noch verstärkt wird. Im Rahmen dieser Arbeit konnte nicht festgestellt werden, dass die *Cadom34*Δ-Deletionsmutante einen Wachstumsdefekt bei 30 °C und 15 °C aufweist. Bei stark erhöhter Temperatur von 42 °C konnte die *dom34*Δ-Mutante jedoch nicht wachsen.

Bei der generierten *dom34*Δ/*dom34*Δ *pmt1*Δ/*pmt1*Δ-Doppeldeletionsmutante konnte, anders als bei *S. cerevisiae* (Wickert, 1998), kein synthetischer Phänotyp gefunden werden, da eine Suppression des Wachstumsdefekts der *pmt1*Δ-Mutante in der Doppeldeletionsmutante beobachtet wurde. Auch die Sensitivität der *dom34*Δ-Mutante gegen eine erhöhte Temperatur von 42 °C wurde in einer Doppeldeletionsmutante supprimiert. Im Gegensatz zu *S. cerevisiae*, wo ein synthetischer Phänotyp der *pmt1*Δ- und *dom34*Δ-Mutationen auftrat, konnten wir bei *C. albicans* einen antagonistischen Phänotyp identifizieren.

4.1.2 Sensitivitäten einer *dom34*Δ-Mutante

Die Deletion des *DOM34*-Gens supprimiert den Wachstumsdefekt einer *pmt1*Δ-Deletion. Da für *C. albicans* gezeigt wurde, dass eine *pmt1*Δ-Deletionsmutante unterschiedliche Sensitivitäten gegenüber verschiedenen Aminoglykosiden und Zellwand-destabilisierenden Agenzien aufweist (Timpel *et al.*, 1998), sollte dieses auch bei *dom34*Δ-Mutanten untersucht werden. Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine Sensitivität der *dom34*Δ-Mutante gegen SDS, Aluminiumsalze, gegen Azole, Congo Red, Hygromycin B und G418 bei einer Wachstumstemperatur von 37 °C festgestellt werden.

Eine zentrale Komponente des Signaltransduktionsweges, welcher die Expression von Zellwandkomponenten kontrolliert, ist die Proteinkinase C (PKC) (Banuett, 1998). Von *S. cerevisiae* ist bekannt, dass viele Mutanten des PKC-Weges sensitiv gegenüber niedrigen Konzentrationen von SDS sind. Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass Mutanten des PKC-Signaltransduktionsweges eine erhöhte Sensitivität gegenüber Aluminium zeigen (Schott und Gardner, 1997). Azole inhibieren die Synthese des Ergosterols. Hierbei wird das zu dem Cytochrom P450 gehörende Enzym Erg11p, welches durch Demethylierung von Lanosterol das Ergosterol bildet, inhibiert. Dies führt zu einer Anhäufung toxischer Sterolderivate in der Zellmembran (Tuite, 1992). Die festgestellten Sensitivitäten der *dom34*Δ-Deletionsmutante deuten darauf hin, dass die Zelloberfläche in einer *dom34*Δ-Mutante verändert ist.

Die Aminoglykoside Hygromycin B und G418 binden an die kleine Untereinheit des Ribosoms und stören dort den Prozess der Translokation (Recht *et al.*, 1999). Der Mechanismus, der zu erhöhter Sensitivität in verschiedenen *N*-Glykosylierungsmutanten in *S. cerevisiae* führt, ist unbekannt (Dean, 1995). 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. Diese Sensitivitäten können laut Hanna *et al.* (2003) durch eine Überexpression von Ubiquitin aufgehoben werden. Dies gelang allerdings nicht bei der *pmt1*Δ-Mutante (Prill, 2004). Daher ist davon auszugehen, dass es sich in *C. albicans* bei den Deletionsmutanten um einen anderen Mechanismus handelt. Von ScDom34p wird angenommen, dass es in die Translation involviert ist (Schmid *et al.*, 2002). Prill (2004)

stellte die Hypothese auf, dass Dom34p unter anderem eine Funktion bei der Rekrutierung von Pmt-Proteinen besitzt und mit Proteinmannosyltransferasen in einem Komplex an der kleinen Untereinheit der Ribosomen gebunden vorliegt. Wie schon bei der Wachstumsanalyse, konnte auch bei den Sensitivitätstests bei allen getesteten Substanzen eine Suppression der Sensitivitäten der *dom34*Δ- oder *pmt1*Δ-Einzeldeletionsmutante in der *dom34*Δ/*dom34*Δ *pmt1*Δ/*pmt1*Δ-Doppelmutante gezeigt werden.

4.1.3 Einfluss der *dom34*-Deletionen auf die Hyphenmorphogenese und Chlamydosporenbildung

Die Bildung von Hyphen wird bei *C. albicans* durch verschiedene Stimuli ausgelöst und trägt zur Virulenz von *C. albicans* bei. Umweltreize werden vermutlich mittels Sensoren registriert und an Signaltransduktionswege weitergegeben, welche die Transkription von Genen, die zur Entwicklung von Hyphen benötigt werden, regulieren. Es ist bekannt, dass bei *C. albicans* die Hyphenbildung unter Hungerbedingungen von zwei Signaltransduktionswegen reguliert wird. Einer der Wege enthält die MAP-Kinase Cek1p und den Transkriptionsfaktor Cph1p und der zweite Hauptweg enthält die Proteinkinase A-Isoformen (Tpk1p und Tpk2p in *C. albicans*) und den Transkriptionsfaktor Efg1p (Ernst, 2000).

Die Ergebnisse von Timpel *et al.* (1998) zeigten, dass *pmt1*Δ-Mutanten nur noch eingeschränkt in der Lage sind, Hyphen auszubilden. Diese Ergebnisse konnten bestätigt werden, da sowohl auf festen, als auch in flüssigen Medien die Hyphenbildung der Mutante stark beeinträchtigt war. Die Hyphenbildung der *pmt1*Δ-Mutante ist, abhängig vom Stimulus, unterschiedlich stark eingeschränkt. So kann die Mutante in bestimmtem Flüssigmedium (Serum- und Spidermedium) noch Hyphen ausbilden. Ihre Induktion erfolgt jedoch zeitlich verzögert und erreicht maximal 20 % des Wildtypwerts. Eine mögliche Erklärung für die zeitliche Verzögerung in der Hyphenbildung der Mutante könnte eine erhöhte Anforderung an die Chitinsynthese sein, da der Chitingehalt der Zellwand der *pmt1*Δ-Mutante erhöht ist. Da in der Zellwand von Hyphen bis zu dreimal mehr Chitin eingelagert wird (Braun und Calderone, 1978), könnte die Chitinsynthese der limitierende Schritt in der Hyphenbildung sein. DNA-Mikroarrays konnten diese Annahme aber nicht bestätigen, da keine erhöhte Transkription der Chitinsynthase-Gene gefunden wurde.

Timpel *et al.* (2000) zeigten, dass der Hyphendefekt einer *pmt6*Δ-Mutante durch eine Überexpression von Komponenten der beiden Signaltransduktionswege supprimiert werden kann. Es wurde vermutet, dass eine glykosylierte Sensorkomponente der beiden Signaltransduktionswege, die sich in der Zellwand oder der Plasmamembran befindet, durch mangelnde *O*-Glykosylierung in der *pmt6*Δ-Mutante funktionslos wird. Pmt6p scheint eine spezielle Funktion zu haben, da der Defekt in der *pmt1*Δ-Mutante nicht in gleicher Weise supprimiert werden konnte. Die *dom34*Δ-Deletionsmutante hatte keine Defekte in der Hyphenbildung. In der *dom34*Δ/*dom34*Δ *pmt1*Δ/*pmt1*Δ-Doppeldeletionsmutante erfolgte aber eine Suppression des *pmt1*Δ-Phänotyps auf Wildtyp-Niveau, was den Ergebnissen der Sensitivitätstests entspricht.

Neben der Hefe- und Hyphen-Form ist *C. albicans* in der Lage, weitere morphologische Wachstumsformen, wie Pseudohyphen und die Opaque-Form auszubilden (Ernst, 2000). Eine

andere Form, die Chlamydospore, wird als Überdauerungsstadium diskutiert (Joshi *et al.*, 1993). Lediglich die *pmt1*Δ-Mutante zeigte veränderte Chlamydosporen, die kürzer und gedrungener als die des Wildtyps erscheinen, während die *dom34*Δ-Mutante und die Doppeldeletionsmutante keinen Defekt bei der Chlamydosporenbildung aufwiesen. Auch hier konnte, wie schon bei der Wachstumsanalyse, der Hyphenmorphogenese und den Sensitivitätstests, eine antagonistische Wirkung beider Einzeldeletionen in der *C. albicans*-Doppeldeletion festgestellt werden.

4.1.4 Die Überexpression von *DOM34* verursacht elongierte Zellen und eine verstärkte Pseudohypheninduktion

Die Deletion des *DOM34*-Gens hatte im *C. albicans* Wildtyp keinen Einfluss auf die Morphogenese der Hyphen- oder die Chlamydosporenbildung. Von Davis und Engbrecht (1998) wurde gezeigt, dass *S. cerevisiae dom34*Δ-Mutanten nur noch eingeschränkt bis gar nicht mehr in der Lage sind, Pseudohyphen auszubilden.

Es wurde untersucht, wie sich die Überexpression des *DOM34*-Gens auf die Hyphen- und Pseudohyphenbildung auswirkt. Bei moderater Überexpression von *DOM34* durch ein drittes Allel zeigten sich elongierte Zellen und zum Teil auch Pseudohyphen. In der *pmt1*Δ-Mutante erfolgte durch die Überexpression eine verstärkte Pseudohypheninduktion, welche die generelle Tendenz dieser Mutante, Pseudohyphen zu formen und Aggregate auszubilden, verstärkt.

4.2 Einfluss einer *dom34*Δ-Mutation auf die Zelloberfläche

Die Zellwandanalyse der verschiedenen Mutanten ergab, dass die *pmt1*Δ-Einzeldeletionsmutante, sowie die Doppeldeletionsmutante im Vergleich zum Wildtyp eine veränderte Zusammensetzung der Zellwand aufweisen. Es wird deutlich, dass eine reduzierte *O*-Glykosylierung in den Mutanten einen deutlichen Einfluss auf die Zusammensetzung der Zellwand ausübt.

In der Doppeldeletionsmutante konnte keine vollständige Suppression der Zellwandzusammensetzung beobachtet werden, wie es von der Suppression der Wachstumsphänotypen erwartet werden konnte. Die drastische Reduktion der Mannoproteine der *pmt1*Δ-Mutante auf nur 1,6 µg/ mg Zellwand Trockengewicht im Vergleich zu 21,4 µg/ mg des Wildtyps steigt in der Doppeldeletionsmutante lediglich auf 3,8 µg/ mg. Der Glukananteil der Doppeldeletionsmutante ist im Vergleich zum Wildtyp kaum verändert und es erfolgt eine Suppression des *pmt1*Δ-Zellwanddefekts bezüglich des Glukananteils.

Insgesamt lässt sich feststellen, dass die Zellwand der *dom34*Δ-Deletionsmutante kaum verändert ist, wohingegen die *pmt1*Δ-Mutante eine drastische Veränderung der Zellwand aufweist, die in der *dom34*Δ/*dom34*Δ *pmt1*Δ/*pmt1*Δ-Doppeldeletionsmutante teilweise, aber nicht vollständig aufgehoben wird. Dennoch scheint die Teilsuppression in der Doppeldeletionsmutante ausreichend zu sein, um Sensitivitätsphänotypen der *pmt1*Δ-Mutante supprimieren zu können. Die stark hydrophilen Eigenschaften der Zelloberfläche der *pmt1*Δ-Mutante durch den Verlust an Mannoproteinen werden in der Doppeldeletionsmutante

reduziert. In diesem Zusammenhang wäre es von Interesse, die Virulenz der Doppeldeletionsmutante im Vergleich zu den Einzeldeletionsmutanten im Tiermodell näher zu analysieren.

Stämme mit Mutationen in Genen für Protein-Mannosyltransferasen zeigen verschieden stark ausgeprägte Tendenzen zur Zellaggregation (Timpel *et al.*, 1998; Prill, 2000; Klinkert, 2002). Zellaggregate können durch eine veränderte Zelloberfläche verursacht werden. Die *pmt1*Δ/*pmt1*Δ-Mutante aggregiert sehr stark. Ein Grund dafür könnte eine eingeschränkte Funktion der Chitinase sein, welche für eine korrekte Zelltrennung unabdingbar ist. Bei *C. albicans* wurden in *pmt1*Δ-Mutanten eine verminderte Chitinaseaktivität an der Zelloberfläche und eine erhöhte Aktivität im Mediumüberstand im Vergleich zum Wildtyp gemessen (Timpel *et al.*, 1998).

Bei *C. albicans* existieren vier für Chitinsynthasen kodierende Gene. Es handelt sich um *CHS1*, *CHS2*, *CHS3* und *CHS8*, wovon sich einzig die Disruption von *CHS1* als essentiell erwies. Interessanterweise sind Chs2p und Chs8p zusammen für etwa 95 % der Synthaseaktivität *in vitro* verantwortlich (Selvaggini *et al.*, 2004; Munro *et al.*, 2003). Bei *S. cerevisiae* existieren drei Chitinsynthase-Gene *CHS1*, *CHS2* und *CHS3*, von denen nur die gleichzeitige Disruption von *CHS2* und *CHS3* letal ist (Cabib *et al.*, 2001). Bei der hier durchgeführten Transkriptomanalyse konnte eine moderate Erhöhung der Expression der Chitinase *CHS2* in *pmt1*Δ-Mutanten um den Faktor 1,5 festgestellt werden, andere Chitinsynthase-Gene zeigten keine veränderte Expression im Vergleich zum Wildtyp. Da auch in der *dom34*Δ-Mutante eine moderate Erhöhung der Expression der Chitinase um den Faktor 1,6 festgestellt wurde, obwohl die Mutante im Vergleich zum Wildtyp keine Tendenz zur Zellaggregation aufweist, scheint diese Hypothese allerdings eher unwahrscheinlich. Auch wenn der Wirkmechanismus nicht bekannt ist, erfolgt in der Doppeldeletionsmutante eine Suppression des Flokkulationsphänotyps einer *pmt1*Δ-Mutante.

4.3 Substrate von Pmt1p zeigen in der Doppeldeletionsmutante eine veränderte *O*-Glykosylierung

Es konnte von Prill (2004) gezeigt werden, dass verschiedene *C. albicans* Proteine, wie Pir1p oder Als1p in einer *pmt1*Δ-Mutante eine veränderte *O*-Glykosylierung aufweisen, wie auch aus dem elektrophoretischen Laufverhalten ersichtlich ist.

Mit einem Antiserum gegen das ScPir-Protein lassen sich verschiedene Formen des Pir1-Proteins in *C. albicans* detektieren (Kandasamy *et al.*, 2000). Die größte Form des Proteins läuft bei einer Größe von ca. 140-200 kDa und ist als nicht scharf abgegrenzte Bande erkennbar. Bei den Banden geringerer molekularer Masse handelt es sich entweder um Abbauprodukte, unreife Vorstufen von Pir1p oder um eine Kreuzreaktion des Antiserums mit anderen Proteinen. Kapteyn *et al.* (2000) berichten dass das Anti-Pir2-Serum in *S. cerevisiae* in geringem Maße mit ScPir1p reagiert. Kandasamy *et al.* (2000) konnten in *C. albicans* zwei Formen mit dem ScPir2p/ HSP150-Antiserum detektieren, welche eine Größe von 150 kDa und 66 kDa haben. In der *pmt1*Δ-Mutante ist das Laufverhalten von CaPir1p verändert. Die Hauptform hat eine Größe von 55-70 kDa, daneben wird eine 110 kDa-Form beobachtet. In der *dom34*Δ-Mutante und der Doppeldeletionsmutante lässt sich ein dem Wildtyp entsprechendes Bandenmuster von CaPir1p detektieren. Damit wird der Glykosylierungs-

defekt, der durch die *pmt1*Δ-Mutation ausgelöst wird in der Doppeldeletionsmutante supprimiert.

Für Als1p wurde bereits eine Pmt1p-vermittelte *O*-Glykosylierung festgestellt (Kapteyn *et al.*, 2000; Timpel *et al.*, 1998). Mittels des Als1p-Antiserums wurden mehrere Banden verschiedener Größe detektiert. Die größte, sichtbare Bande des Wildtypextrakts und der *dom34*Δ-Mutante entspricht der von Kapteyn *et al.* (2000) berichteten Größe von mehr als 250 kDa für Als1p. Das Laufverhalten dieser Als1p-Bande ist in der *pmt1*Δ-Mutante um ca. 60 kDa verändert. Bei der auf einer Höhe von etwa 155 kDa laufenden Bande ist das Laufverhalten in der *pmt1*Δ-Mutante nur wenig reduziert. Es könnte sich bei dieser von dem Als-Antiserum erkannten Form um ein anderes Protein der aus wenigstens acht Mitgliedern bestehenden Als-Proteinfamilie handeln (Hoyer, 2001; Sheppard *et al.*, 2004). Die kleinste Form, vermutlich ein Abbauprodukt, ist in der *pmt1*Δ-Mutante kaum zu detektieren.

Bei der Analyse von Rbt51p fallen in der Immunoblot-Analyse zwei Doppelbanden bei etwa 50 kDa und 67 kDa auf. Diese Banden sind bei allen Stämmen, wenn auch mit unterschiedlich starker Intensität, zu beobachten. Bei den Doppelbanden von ca. 67 kDa treten keine Veränderungen unter den Mutanten auf. Doch sowohl in der *dom34*Δ-Mutante, als auch in der *pmt1*Δ-Mutante sind die Banden in unterschiedlicher Intensität vertreten, wobei die langsamer laufende, größere Form stärker als beim Wildtyp auftritt. Teilweise sind die Doppelbanden wegen der starken Synthese der größeren Form kaum noch zu erkennen. In der Doppeldeletionsmutante lässt sich eine Intensitätsverteilung der 50 kDa-Doppelbande wie beim Wildtyp erkennen. Auch bei Rbt51p wird somit der *pmt1*Δ-Phänotyp in der *dom34*Δ/*dom34*Δ *pmt1*Δ/*pmt1*Δ-Doppeldeletionsmutante supprimiert. Die Suppression des veränderten Laufverhaltens im Immunoblot von Pir1p und Rbt51p einer *pmt1*Δ-Mutation in der Doppeldeletionsmutante konnte durch die Expression des *DOM34*-Gens mittels pSK2 wieder aufgehoben werden; es wurde der *pmt1*Δ-Phänotyp wiederhergestellt.

Wickert (1998) zeigte, dass bei *S. cerevisiae* in der *dom34*Δ-Mutante ein *O*-Glykosylierungsdefekt verschiedener sekretierter Proteine, wie hIGF-1, Chitinase oder a-Agglutinin auftritt. Er konnte auch zeigen, dass in der *dom34*Δ *pmt1*Δ-Deletionsmutante die Glykosylierung von hIGF-1 wieder hergestellt ist. Es erfolgte in Bezug auf die Glykosylierung von hIGF-1 offensichtlich eine Suppression des Glykosylierungsdefektes der Einzeldeletionsmutanten in der Doppeldeletion. Dieses Ergebnis zeigt eine antagonistische Interaktion der *pmt1*Δ- und *dom34*Δ-Mutation, im Gegensatz zu weiteren synthetischen Phänotypen.

4.4 Dom34p ist phosphoryliert

Die mit *S. cerevisiae* und *C. albicans* erhaltenen Ergebnisse zeigen, dass Dom34p in unterschiedliche zelluläre Prozesse, direkt oder indirekt, involviert ist. Dies könnte bedeuten, dass die Aktivität des Proteins, abhängig von den Umweltbedingungen, reguliert werden muss, z.B. durch Proteinphosphorylierung. Durch diese posttranslationale Modifikation der Proteine wird es Zellen ermöglicht, auf veränderte Umweltbedingungen, wie beispielsweise Nährstoffmangel (Dean und Cartee, 2000) oder oxidativen Stress (Kishi *et al.*, 2001) zu reagieren. Wie gezeigt, besitzt CaDom34p diverse putative Phosphorylierungsstellen. Mittels einer alkalischen Phosphatase-Behandlung des Zellextrakts verschiedener Stämme konnte

erstmalig für ein Dom34-Protein gezeigt werden, dass das CaDom34p teilweise phosphoryliert wird. Die Phosphorylierung ist unabhängig von der Proteinkinase A (PKA), denn bei zwei *C. albicans*-Mutanten mit Mutationen in den Isoformen der PKA konnte keine Veränderung der Verteilung von phosphoryliertem und dephosphoryliertem Dom34p festgestellt werden. Bei den Mutanten handelte es sich um die *tpk1*Δ/*tpk1*Δ-Mutante und die *tpk2*Δ/*tpk2*Δ-Mutante, in denen jeweils eine der beiden katalytischen Einheiten der *C. albicans*-PKA deletiert wurde.

Bei der weiteren Analyse des Phosphorylierungsstatus des Dom34p unter einigen Stressbedingungen, wie einem osmotisch verändertem Medium oder einer schrittweise erhöhten Wachstumstemperatur, wurde ermittelt, dass ab einer Wachstumstemperatur von 35 °C sich das Phosphorylierungsmuster zu Gunsten des dephosphorylierten Dom34p verschiebt. Da *dom34*Δ-Mutanten bei 42 °C nicht lebensfähig sind, könnte daraus abgeleitet werden, dass die phosphorylierte Form von Dom34p die funktionell aktive Form darstellt. Weitere Versuche, bei denen der Phosphorylierungsstatus von Dom34p unter anderen Stressbedingungen getestet wird oder auch gezielte Aminosäureaustausche der potentiellen Phosphorylierungsstellen, müssen allerdings noch erfolgen.

4.5 Der Einfluss der *dom34*Δ-Mutation auf das Transkriptom von *C. albicans*

Dom34p ist in viele unterschiedliche zelluläre Prozesse involviert, die in der Mutante defekt sind und vermutlich spezifische Änderungen der Genexpression anderer Gene hervorrufen. Es wurde mit der Mikroarray-Technik eine vergleichende Transkriptomanalyse der Mutanten mit dem Wildtyp durchgeführt. Die Clusteranalyse aller regulierten Gene beweist, dass sich das Expressionsprofil der Doppeldeletionsmutante deutlich von denen der Einzeldeletionsmutanten unterscheidet.

Bei der Analyse der DNA-Mikroarrays der Einzeldeletionsmutanten fällt auf, dass die Expression von mehr Genen erhöht als erniedrigt ist. Dabei könnte es sich um einen Kompensationsmechanismus der Zelle handeln. Die Deletion von *pmt1*Δ oder *dom34*Δ resultiert in einer Stresssituation der Zelle, die durch eine reduzierte- oder fehlende *O*-Mannosylierung hervorgerufen wird. Es werden vermutlich viele falsch gefaltete, instabile und in ihrer Funktion eingeschränkte Proteine, unter denen sich wahrscheinlich auch Sensoren der Zelloberfläche und Zellwandproteine befinden, erzeugt.

Nach einer Normalisierung der Daten und einer statistischen Auswertung konnten in allen drei Mutanten insgesamt 603 statistisch signifikant regulierte Gene mit einer mindestens 1,5-fach abweichenden Expression identifiziert werden. Es wurden 347 stärker exprimierte Gene und 256 schwächer exprimierte Gene festgestellt. In den Einzeldeletionsmutanten sind mehr Gene (338) im Vergleich zum Wildtyp stärker exprimiert und nur 147 Gene sind insgesamt schwächer exprimiert. In der Doppeldeletion ist die Situation gänzlich verschieden. Man findet nur 9 Gene, die im Vergleich zum Wildtyp stärker exprimiert werden. Allerdings sind 109 Gene schwächer exprimiert, wobei ihr Grad der Regulation schwächer als bei den Einzeldeletionsmutanten ausfällt. Das Transkriptom der Doppeldeletionsmutante kommt von allen Mutanten dem des Wildtyps am nächsten. Auch die Venn-Diagramme deuten an, dass

sich das Transkriptom der Doppeldeletion von denen der Einzeldeletionen unterscheidet. Es werden viel mehr Gene der Einzeldeletionsmutanten ähnlich reguliert, als dass der Fall bei der Doppeldeletion und einer der Einzeldeletionen ist. Dieses Ergebnis ist nicht sehr erstaunlich, da bei fast allen Versuchen eine Suppression der Phänotypen der Einzeldeletionsmutanten in der Doppeldeletionsmutante erfolgte.

Bei den Einzeldeletionsmutanten werden Gene, die in der Zellwand-Biogenese involviert sind, stärker exprimiert. Dabei handelt es sich beispielsweise um *ECM331* oder auch *ECM22* (*ECM331*: *dom34*Δ - 3,6-fach, *pmt1*Δ - 2,0-fach; *ECM22*: *dom34*Δ - 1,6-fach, *pmt1*Δ - 1,9-fach). Aber auch Gene, die eine Rolle bei der Ausschleusung von Antibiotika oder Antimykotika aus der Zelle besitzen, wie *CDR1* (*dom34*Δ - 2,3-fach, *pmt1*Δ - 1,8-fach), sind stärker exprimiert. Bei der *dom34*Δ-Deletionsmutante fällt auf, dass verstärkt Transkriptionsfaktoren und Gene, die an der Proteinbiosynthese beteiligt sind, stärker exprimiert werden. Es ist daher auch hier davon auszugehen, dass es sich um einen Kompensationsmechanismus der Zelle gegenüber der durch die Deletion verursachten Stresssituation handelt.

Grundsätzlich bleibt anzumerken, dass mittels der Transkriptomanalysen bei Standardwachstumsbedingungen in YPD-Vollmedium nur ein Teilbereich der Umweltbedingungen analysiert wurde. Es ist bekannt, dass die Expression vieler Gene von den Wachstumsbedingungen abhängt und hierbei insbesondere von der Wahl des Mediums. In einer vergleichenden Transkriptomanalyse von *S. cerevisiae* in SD-Minimalmedium, bzw. YPD-Vollmedium, wurden mehr als 10 % aller Gene differentiell exprimiert (Wodicka *et al.*, 1997). Weiterhin könnte darüber spekuliert werden, wie sich das Transkriptom beispielsweise bei einer erhöhten Wachstumstemperatur verändern würde, da bei den Mutanten zum Teil doch erhebliche Sensitivitäten auftraten. Weitere Transkriptomanalysen unter veränderten Bedingungen, wie zum Beispiel bei Osmostress oder bei erhöhter Wachstumstemperatur von 42 °C können weitere Hinweise auf die Funktion von Dom34p bei der Regulation der Pmt-Isoformen liefern.

4.6 Wirkung von *dom34*Δ auf heterozygote *pmt*-Mutationen

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass in *C. albicans* eine Suppression des *pmt1*Δ-Phänotyps durch die Einführung einer Deletion des *DOM34*-Gens erzielt wird. Dieses war unerwartet, da in *S. cerevisiae* ein synthetischer Phänotypeffekt der beiden Einzeldeletionen *pmt1*Δ und *dom34*Δ zu beobachten war. Dieses Ergebnis wirft die Frage auf, ob *DOM34* nicht nur mit *PMT1*, sondern auch mit anderen *PMT*-Isoformen genetische Interaktionen zeigt. Daher wurden verschiedene einzelne *PMT*-Allele im *dom34*Δ/*dom34*Δ-Stammhintergrund disruptiert und näher untersucht.

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 nur Mitglieder der Pmt2- und Pmt4-Subfamilien (Willer *et al.*, 2003). Zur Pmt1-Familie von *S. cerevisiae* und *C. albicans* gehören Pmt1p und Pmt5p und im Falle von *S. cerevisiae* auch Pmt7p. Es ist zu vermuten, dass, aufgrund der Substratspezifität von Pmt-Proteinen (Gentzsch und Tanner, 1996; Prill *et al.*, 2005), die Aktivität der einzelnen Mitglieder einer Pmt-Gruppe in der Zelle reguliert sein muss. So ist es denkbar, dass die Aktivität von Pmt5p reduziert oder

gar reprimiert wird, wenn Pmt1p ein Protein mannosyliert. Ähnliche Regulationen könnten auch für die anderen Pmt-Proteinfamilien gelten.

Durch die Deletion einzelner Allele für Protein-*O*-mannosyltransferasen in einem *dom34*Δ/*dom34*Δ-Stammhintergrund ergeben sich gegensätzliche Effekte. So zeigt beispielsweise die *dom34*Δ/*dom34*Δ *pmt5*Δ/*PMT5*-Mutante eine sehr starke Sensitivität gegenüber Hygromycin B, während die Einzelmutationen *dom34*Δ/*dom34*Δ, *pmt5*Δ/*pmt5*Δ und *pmt5*Δ/*PMT5* nicht sensitiv sind. In diesem Fall ergibt sich ein additiver oder sogar synergistischer Phänotyp aus der Kombination der Einzelmutationen. Ähnlich wie in *S. cerevisiae*, zeigt die Doppelmutante also einen synthetischen Phänotyp bezüglich einer Hygromycin B-Sensitivität. Auch bei der Hypheninduktion der Mutante auf Lee's-Medium kann dieser Effekt beobachtet werden. Während die Deletionsmutanten *dom34*Δ/*dom34*Δ, *pmt5*Δ/*pmt5*Δ und *pmt5*Δ/*PMT5* keinen Defekt der Hypheninduktion zeigen, ist es der *dom34*Δ/*dom34*Δ *pmt5*Δ/*PMT5*-Mutante nicht möglich, Hyphen auszubilden. Anders verhält es sich bei der *pmt1*Δ-Mutante. Während die Deletionsmutanten *pmt1*Δ/*pmt1*Δ und *pmt1*Δ/*PMT1* nicht mehr in der Lage sind, Hyphen zu bilden, sind vereinzelt bereits Hyphen in der *dom34*Δ/*dom34*Δ *pmt1*Δ/*PMT1*-Mutante zu erkennen. Somit wird der durch die *pmt1*Δ-Mutation verursachte Phänotyp durch Mutation von *DOM34* teilweise aufgehoben. Auch bei den anderen untersuchten Kombinationen von *dom34*Δ- und *pmt*Δ-Mutationen konnten teilweise synthetische Effekte gefunden werden. Interessant ist die Tatsache, dass es nicht möglich war, *pmt2*Δ/*PMT2*-Transformanten in einer *dom34*Δ/*dom34*Δ-Mutante zu erhalten. Prill (2004) konnte zeigen, dass bereits die Deletion eines der beiden *PMT2*-Allele im CAI4-Stammhintergrund einen relativ starken Phänotyp hervorruft und aufgrund eines synthetischen Phänotyps homozygote *pmt2*Δ-Mutanten nicht konstruiert werden konnten, da die Deletion beider Allele des *PMT2*-Gens letal für die Zelle ist. Möglicherweise ist die Disruption eines der beiden *PMT2*-Allele im *dom34*Δ/*dom34*Δ-Stammhintergrund bereits letal für die Zelle. Auch dieses Ergebnis spricht für die Hypothese, dass Dom34p eine Regulationsfunktion bei der Funktion der Isoformen der Protein-*O*-mannosyltransferase von *C. albicans* hat. Dass diese Regulation der Proteinmannosyltransferasen durch Dom34p wahrscheinlich nicht auf der Ebene der *PMT*-Transkription erfolgt, konnte mittels einer „Real-Time"-PCR-Analyse gezeigt werden (Subanovic, 2005).

Auch eine direkte Interaktion von Dom34p mit den unterschiedlichen Pmt-Isoformen konnte mit einem für membranständige Proteine angepassten 2-Hybrid-System (Split-Ubiquitin-System) bis heute nicht festgestellt werden (I. Schmidt, persönliche Mitteilung). Weitere Analysen von homozygoten *pmt*Δ-Mutanten der Stammhintergründe CAI4 und *dom34*Δ/*dom34*Δ könnten hilfreich sein, um die Regulationshypothese zu unterstützen.

4.7 Modell

Wickert (1998) zeigte, dass bei einer Deletion des *DOM34*- und *PMT1*-Gens in *S. cerevisiae* eine Verstärkung der *pmt1*Δ-Phänotypen in der Doppeldeletionsmutante erfolgte. In der Abbildung 4.1 ist ein Modell zur möglichen Regulationsfunktion von Dom34p für die Aktivität der Isoformen der Protein-*O*-mannosyltransferase dargestellt. Über eine aktivierende Wirkung von Dom34p (rote Pfeile in Abb. 4.1) auf Pmt1p oder die anderen Pmt-Isoformen (PmtXp in der Abbildung) ist nichts bekannt (siehe Fragezeichen in Abb. 4.1). Einen Einfluss von Dom34p auf Pmt1p könnte mittels des von Weston *et al.* (1993) vorgestellten und von Timpel *et al.* (1998) adaptierten *in vitro* Peptid-Tests zur Überprüfung der Pmt1p-Aktivität analysiert werden. Sofern Dom34p eine aktivierende Wirkung auf Pmt1p ausübt, müsste in einer *dom34*Δ-Mutante die Aktivität verringert sein. Dieser *in vitro* Peptid-Test zur Überprüfung der Mannosylierungsaktivität kann nur zur Aktivitätsbestimmung von Pmt1p und nicht zur Aktivitätsbestimmung der anderen Pmt-Isoformen eingesetzt werden. Ein Enzymtest zur Überprüfung der Aktivität der anderen Pmt-Isoformen existiert nicht. Ein Protein X wird von Pmt1p glykosyliert, was in der Abbildung durch den dicken, schwarzen Pfeil und die Mannoseketten des Proteins nach erfolgter Glykosylierung dargestellt wird. Welchen Einfluss die anderen Isoformen der Proteinmannosyltransferasen auf die Glykosylierung des Protein X besitzen, ist unbekannt. Symbolisiert wird dieses durch den unterbrochenen, schwarzen Pfeil. In einer *dom34*Δ-Deletionsmutante ist der mögliche Aktivierungseffekt von Dom34p auf Pmt1p nicht mehr vorhanden. Dieser resultiert in einer verminderten Glykosylierung des Protein X. In einer *pmt1*Δ-Deletionsmutante ergibt sich eine

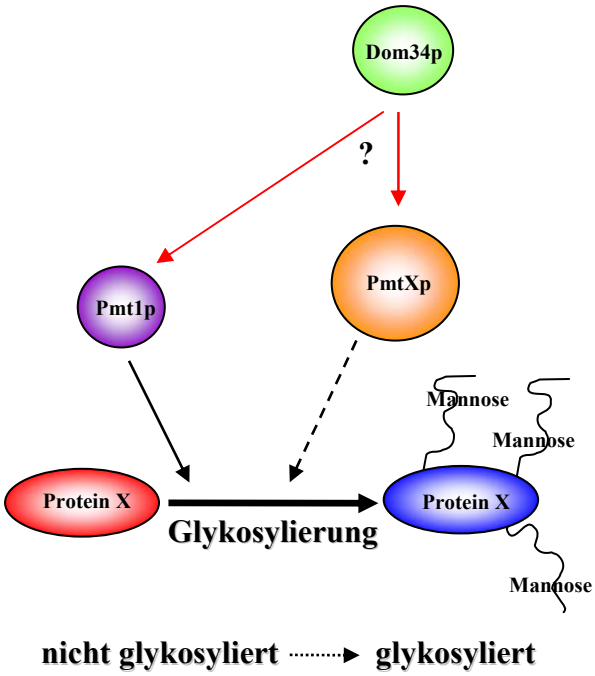


Abbildung 4.1: Modell zur möglichen Regulationsfunktion von Dom34p bei den Isoformen der Protein-*O*-mannosyltransferase. Details siehe Text.

verminderte Glykosylierung des Protein X. Eventuell können andere Pmt-Isoformen den Glykosylierungsdefekt teilweise supprimieren, so dass lediglich ein unterglykosyliertes- und kein unglykosyliertes Protein X entsteht. In einer *dom34*Δ *pmt1*Δ-Doppeldeletionsmutante wird der Phänotyp der Einzeldeletionsmutanten verstärkt. Dieses resultiert in einer stark verminderten Glykosylierung des Protein X.

Wickert (1998) konnte bei der Charakterisierung der Sekretion von hIGF-1 in der Hefe *S. cerevisiae* auch zeigen, dass in der *dom34*Δ *pmt1*Δ-Doppeldeletionsmutante der *pmt1*Δ-Phänotyp abgeschwächt wird und wildtypähnliche Zustände auftreten. Im Rahmen dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass *C. albicans pmt1*Δ-Phänotypen durch die Deletion des *DOM34*-Gens supprimiert werden. Bei der Analyse von heterozygoten *pmt*Δ-Mutationen in einem *dom34*Δ/*dom34*Δ-Stammhintergrund zeigte sich, dass genetische Interaktionen nicht nur zwischen *DOM34* und *PMT1*, sondern auch zwischen *DOM34* und Genen für andere Pmt-Isoformen auftreten. Im Gegensatz zu *pmt1*-Mutationen erfolgt keine Aufhebung der Phänotypen, sondern eine Verstärkung von *pmt5*-Phänotypen durch eine *dom34*-Mutation. In der Abbildung 4.2 ist ein weiteres Modell zur möglichen Regulationsfunktion von Dom34p für die Aktivität der Isoformen der Protein-*O*-mannosyltransferase dargestellt. Carr-Schmid *et al.* (2002) postulierten, dass Dom34p durch die Bindung von 3'-Bereichen bestimmter mRNAs die Regulation der Translation dieser mRNAs beeinflusst. Es ist denkbar, dass Dom34p erkennt, um welches Protein oder RNA es sich handelt, verdeutlicht durch die gebogenen Doppelpfeile, und daraufhin ganz gezielt Pmt1p stimuliert oder die anderen Pmt-Isoformen teilweise oder vollständig inhibiert. Dom34p reguliert die Aktivität der Pmt-Proteine also proteinspezifisch. Das zu glykosylierende Protein X oder die mRNA des Proteins steuert die Funktion von Dom34p in Bezug auf die Regulation für die Aktivität der Pmt-Isoformen. Aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit könnte Dom34p einen reprimierenden Effekt auf die anderen Pmt-Proteine (PmtXp) besitzen. Dieses wird durch das rote Symbol dargestellt. Die Ebene der möglichen Repression ist unbekannt. Auch eine aktivierende Wirkung auf Pmt1p ist denkbar, was durch den roten Pfeil angezeigt wird. Über die Wirkung von Dom34p auf andere Proteine, die einen Einfluss auf die Pmt-Isoformen ausüben könnten, ist nichts bekannt (siehe schwarzen Pfeil und Fragezeichen in der Abbildung). Ein Protein X wird von Pmt1p glykosyliert, was in der Abbildung durch den dicken, schwarzen Pfeil und die Mannoseketten des Proteins nach erfolgter Glykosylierung dargestellt wird. Welchen Einfluss die anderen Pmt-Isoformen auf die Glykosylierung des Protein X besitzen, ist nicht bekannt. Dieses wird durch den unterbrochenen, schwarzen Pfeil symbolisiert. In einer *pmt1*Δ-Deletionsmutante ergibt sich eine verminderte Glykosylierung des Protein X. In einer *dom34*Δ-Deletionsmutante wird die blockierende Wirkung von Dom34p auf die anderen Pmt-Isoformen aufgehoben. Die anderen Pmt-Proteine könnten einen Einfluss auf die Glykosylierung des Protein X besitzen. Dieser Effekt auf den Glykosylierungsstatus des Protein X kann jedoch nicht festgestellt werden, da das Protein X weiterhin vollständig durch Pmt1p glykosyliert wird. In einer Doppeldeletionsmutante wird der Phänotyp der Einzeldeletionsmutanten aufgehoben. Da die reprimierende Wirkung von Dom34p auf die anderen Pmt-Isoformen durch die Deletion des *DOM34*-Gens aufgehoben wurde, könnten die anderen Pmt-Proteine möglicherweise die Aufgaben von Pmt1p bei der Glykosylierung des Protein X zumindest teilweise übernehmen. Das Protein X wird vollständig glykosyliert und die Einzeldeletionsdefekte werden supprimiert.

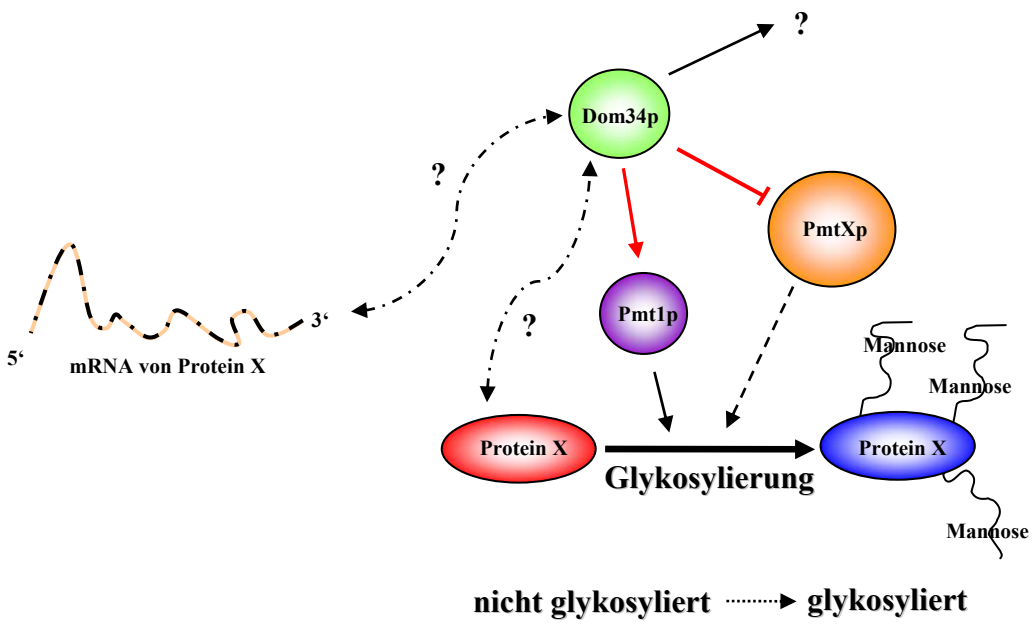


Abbildung 4.2: Modell zur möglichen Regulationsfunktion von Dom34p bei den Isoformen der Protein-*O*-mannosyltransferase. Details siehe Text.

Festzuhalten bleibt, dass in *S. cerevisiae* in der *dom34*Δ *pmt1*Δ-Mutante beziehungsweise in der *dom34*Δ/*dom34*Δ *pmt1*Δ/*pmt1*Δ-Deletionsmutante in *C. albicans* ein unterschiedlicher Effekt auftritt; in *S. cerevisiae* erfolgt ein synthetischer Phänotyp und in *C. albicans* wird ein antagonistischer Phänotyp beobachtet.

5. Zusammenfassung

Das Dom34-Protein ist ein in Eukaryoten und in Archaebakterien konserviertes Protein, das in verschiedene zelluläre Prozesse involviert ist. In der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* konnte eine Beteiligung von Dom34p an Translation, Filamentbildung und der *O*-Glykosylierung nachgewiesen werden. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Bedeutung des *DOM34*-Genproduktes des humanpathogenen Pilzes *Candida albicans* auf die Wachstumseigenschaften und *O*-Glykosylierung zu charakterisieren. Insbesondere sollte das funktionelle Verhältnis von Dom34p zu der Proteinmannosyl-Transferase-1 (Pmt1p) charakterisiert werden.

Nach der Disruption des *DOM34*-Gens in verschiedenen Stammhintergründen konnte bei der Charakterisierung der Mutanten festgestellt werden, dass eine *dom34*Δ/*dom34*Δ-Mutante Wachstumsdefekte bei einer Temperatur von 42 °C zeigt. Bei 37 °C ist die Deletionsmutante besonders sensitiv gegenüber Zellwand-destabilisierenden Substanzen, Azol-Antimykotika und Hygromycin B. Auch das Glykosylierungsmuster des sekretorischen Proteins Rbt51p ist in der *dom34*Δ/*dom34*Δ-Mutante verändert. Eine Phosphorylierung des Dom34-Proteins konnte bei 37 °C, nicht aber bei einer Temperatur von 42 °C nachgewiesen werden.

Im Gegensatz zu *S. cerevisiae*, wo sich synthetische Phänotypen der *pmt1*Δ- und *dom34*Δ-Deletionen zeigten, konnte bei *C. albicans* eine Suppression von *pmt1*Δ-Phänotypen durch eine Deletion des *DOM34*-Gens erzielt werden. Verschiedene Defekte einer *pmt1*Δ/*pmt1*Δ-Mutante, wie Sensitivitäten gegenüber Zellwand-destabilisierenden Substanzen und $AlCl_3$, aber auch Defekte der Flokkulation, der Zelloberflächenhydrophobizität und der Morphogenese der Einzeldeletionsmutante wurden in einer Dopppeldeletionsmutante aufgehoben. Es erfolgte eine Teilsuppression der veränderten Zellwandzusammensetzung einer *pmt1*Δ-Mutante. Weiterhin wurden *O*-Glykosylierungsdefekte verschiedener Zellwandproteine, die in einer *pmt1*Δ/*pmt1*Δ-Mutante auftreten, supprimiert. Um zu untersuchen, ob eine *dom34*-Mutation auch Mutationen anderer *PMT*-Gene beeinflussen kann, wurden heterozygote *pmt*Δ-Mutationen in einem *dom34*Δ/*dom34*Δ-Stammhintergrund generiert und charakterisiert. Es zeigte sich, dass genetische Interaktionen nicht nur zwischen *DOM34* und *PMT1*, sondern auch zwischen *DOM34* und Genen für andere Pmt-Isoformen, besonders *PMT5*, auftreten. Anders als im Fall von *pmt1*-Mutationen, verstärkt eine *dom34*-Mutation die *pmt5*-Phänotypen. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass Dom34p Pmt-Funktionen blockieren, aber auch aktivieren kann.

Eine vergleichende Transkriptomanalyse der Mutanten ergab, dass bei den *dom34*Δ- und *pmt1*Δ-Einzeldeletionsmutanten Gene, die in die Zellwand-Biogenese involviert sind, stärker exprimiert werden. Auch Gene, die eine Rolle bei der Ausschleusung von Antimykotika aus der Zelle besitzen, sind stärker exprimiert. Das Transkriptom der Doppeldeletionsmutante kam von allen Mutanten dem des Wildtyps am nächsten. Somit bestätigen die Transkriptomdaten die Suppression der *pmt1*Δ-Phänotypen durch die Deletion von *DOM34*. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass dem Dom34-Protein eine positive oder negative Regulationsfunktion für die Aktivität der fünf Isoformen der Protein-*O*-Mannosyltransferase von *C. albicans* zukommt, wobei die Ebene der Regulation noch offen bleibt.

6. Literaturverzeichnis

Abeijon, C. und Hirschberg, C.B. (1987) Subcellular site of synthesis of the *N*-acetylgalactosamin (β1-0) 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 lumenal 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

Ashman, R.B. (1998) *Candida albicans*: pathogenesis, immunity and host defence. Res. Immunol **149**: 281-288

Backen, A.C. (2000) Evaluation of the *CaMAL2* promoter for regulated expression of genes in *Candida albicans*. Yeast **16**: 1121-1129

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 derevatives in yeast. Eur. J. Biochem. **101**: 185-190

Beckerman, J., Chibana, H., Turner, J. und Magee, P.T. (2001) Single-copy *IMH3* allele is sufficient to confer resistance to mycophenolic acid in *Candida albicans* and to mediate transformation of clinical Candida species. Infect. Immun. **69**:108-14

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

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

Bodey, G.P. (1993) What's new in fungal infection in leukemic patients. Leukemia Lymphoma **11**: 127-35

Bouchara, J.P., Tronchin, G., Annaix, V., Robert, R. und Senet, J.M. (1990) Laminin receptors on *Candida albicans* germ tubes. Infect. Immun. **58:** 48-54

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

Brassart, D., Woltz, A., Golliard, M. und Neeser, J.R. (1991) In vitro inhibition of adhesion of *Candida albicans* clinical isolates to human buccal epithelial cells by Fuc alpha1-2Gal beta bearing complex carbohydrates. Infect. Immun. **59:** 1605-1613

Braun, B.R., Head, W.S., Wang, M.X., Johnson, A.D. (2000) Identification and characterization of TUP1-regulated genes in *Candida albicans*. Genetics **156**: 31-44

Braun, P.C., und Calderone, R.A. (1978). Chitin synthesis in *Candida albicans*: comparison of yeast and hyphal forms. J. Bacteriol. **133**: 1472-1477

Broach, J.R., Strathern, J.N. und Hicks, J.B. (1979) Transformation in yeast: development of a hybrid cloning vector and isolation of the CAN1 gene. Gene **8**: 121-133

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

Brown, D.H. Jr., Slobodkin, I.V. und Kumamoto, C.A. (1996) Stable transformation and regulated expression of an inducible reporter construct in *Candida albicans* using restriction enzyme-mediated integration. Mol. Gen. Genet. **251**: 75-80

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

Calderone, R.A. und Braun, P.C. (1991) Adherence and receptor relationships of *Candida albicans*. Microbiol. Rev. **55**: 1-20

Cameron B.J., und Douglas, L.J. (1996) Blood group glycolipids as epithelial cells receptors for *Candida albicans*. Infect. Immun. **64:** 891-896

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

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

Casal, M. und Linares M.J. (1981) The comparison of six media for chlamydospore production by *Candida albicans*. Mycopathologia **76**: 125-128

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

Castrillon, D.H., Gonczy, P., Alexander, S., Rawson, R., Eberhart, C.G., Viswanathan, S., DiNardo, S. und Wasserman, S.A. (1993) Toward a molecular genetic analysis of spermatogenesis in *Drosophila melanogaster*: characterization of male-sterile mutants generated by single P element mutagenesis. Genetics. **135**: 489-505

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, M.W., Anne, J., Volckaert, G., Huysmans, E., Vandenberghe, A. und De Wachter, R. (1984) The nucleotide sequences of the 5 S rRNAs of seven molds and a yeast and their use in studying ascomycete phylogeny. Nucleic Acids Res. **12**: 4881-92

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

Colina, A.R., Aumont, F., Deslauriers, N., Belhumeur, P. und de Repentigny, L. (1996) Evidence for degradation of gastrointestinal mucin by Candida albicans secretory aspartyl proteinase. Infect Immun.**64**: 4514-4519

Coukell, A.J. und Brogden, R.N. (1998) Liposomal Amphotericin B. Drugs **55:** 585-612

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. und Haynes, K. (2000) *Candida glabrata* displays pseudohyphal growth. FEMS Microbiol. Lett. **189**: 115-120

Cutler, J. E. (1991) Putative virulence factors of *Candida albicans.* Annu. Rev. Microbiol. **45**: 187-218

Davis, L. und Engbrecht, J (1998) Yeast *dom34* mutants are defective in multiple developmental pathways and exhibit decreased levels of polyribosomes. Genetics **149**: 45-56

De Groot, P.W., Hellingwerf, K.J., Klis, F.M. (2003) Genome-wide identification of fungal GPI proteins. Yeast. **20**: 781-796

Dean, D.J. und Cartee, G.D. (2000) Calorie restriction increases insulin-stimulated tyrosine phosphorylation of insulin receptor and insulin receptor substrate-1 in rat skeletal muscle. Acta Physiol Scand. **169**: 133-139

Dean, N. (1995) Yeast glycosylation mutants are sensitive to aminoglycosides. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **92**: 1287-1291

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

Douglas, L.J. (2003) *Candida* biofilms and their role in infection. Trends Microbiol. **11**: 30-36 (Review)

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

DiDomenico, B. (1999) Novel antifungal drugs. Curr. Op. Microbiol. **2**: 509-519

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. 2nd International conference on molecular mechanisms of fungal cell wall biogenesis. Salamanca (Spain) 27.08.2003 - 01.09. 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

Edmond, M.B., Wallace, S.E., McClish, D.K., Pfaller, M.A., Jones, R.N. und Wenzel, R.P. (1999) Nosocomial bloodstream infections in United States hospitals: a three-year analysis. Clin. Infect. Dis. **29:** 239-44

Eisen, M.B., Spellman, P.T., Brown, P.O. und Botstein, D. (1998) Cluster analysis and display of genome-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

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

Feinberg A.P. und Vogelstein B. (1983) A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. Anal. Biochem. **132**: 6-13

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

Finck M., Bergmann N., Jansson B. und Ernst J.F. (1996) Defective threonine-linked glycosylation of human insulin-like growth factor in mutants of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Glycobiology **6**: 313-320

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

Frolova, L. Goff, X.L., Rasmussen, H.H., Cheperegin, S. und Drugeon, G., Kress, M., Arman, I., Haenni, A.L., Celis, J.E., Philippe, M., *et al.* (1994) A highly conserved eukaryotic protein family possessing properties of polypeptide chain release factors. Nature **372**: 701-703

Fu, Y., Ibrahim, A.S., Fonzi, W. Ramos, C.F. und Ghannoum, M.A. (1999) 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

Gellerfors P., Axelsson K., Helander A., Johansson S., Kenne L., Lindqvist S., Pavlu B., Skottner A. und Fryklund L. (1989) Isolation and characterization of a glycosylated form of human insulin-like growth factor I produced in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Biol. Chem. **264**: 11444-11449

Gemmill, 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

Gentzsch, 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

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

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

Glee, P.M., Sundstrom, P. und Hazen, K.C. (1995) Expression of surface hydrophobic proteins by *Candida albicans in vivo.* Infec. Immun. **63**: 1373-1379

Gow, N.A.R. (1997) Germ tube growth of *Candida albicans.* Curr. Top. Med. Mycol. **8**: 43-55

Greenspan, D. und Greenspan, J.S. (1996) HIV-related oral disease. Lancet **348:** 729-733

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

Hartsel, S. und Bolard, J. (1996) Amphotericin B: new life for an old drug. Trends. Pharmacol. Sci. **17**: 445-449

Haselbeck, A. und Tanner, W. (1983) *O*-Glycosylation in *Saccharomyces cerevisiae* is initiated at the endoplasmic reticulum. FEBS Lett. **158**: 335-338

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

Herrero, A.B., Uccelletti, D., Hirschberg, C.B., Dominguez, A. und Abeijon, C. (2002) The Golgi GDPase of the Fungal Pathogen *Candida albicans* Affects Morphogenesis, Glycosylation, and Cell Wall Properties. Eukaryot Cell **3**: 420-431

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

Hoyer, L.L. (2001) The *ALS* gene family of *Candida albicans*. Trends Microbiol. **9**: 176-180

Hoyer, L.L., Payne, T.L., Bell, M., Myers, A.M. und Livi, G.P. (1998) *Candida albicans ALS3* and insights into the nature of the *ALS* gene family. Curr. Genet. **33**: 451-459

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

Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K. und Kimura, A. (1983) Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. J. Bacteriol. **153**: 163-168

Jacobson, A. (2004) Regulation of mRNA decay: decapping goes solo. Mol Cell. **15**: 1-2. (Review).

Janbon, G., Sherman, F. und Rustchenko, E. (1998) Monosomy of a specific chromosome determines L-sorbose utilization: a novel regulatory mechanism in *Candida albicans*. Proc Natl Acad Sci U S A. **95**: 5150-5155

Jehn, U. (1997) System-Mykosen bei abwehrgeschwächten Patienten, speziell in der Hämatologie und Onkologie. In Jehn, U. (Hrsg): Klinische Mykologie, Landsberg

Joshi K.R., Solanki A. und Prakash P. (1993) Morphological identification of *Candida* species on glucose agar, rice extract agar and corn meal agar with and without Tween-80. Indian J. Pathol. Microbiol. **36**: 48-52

Jurado, L.A., Coloma, A. und Cruces, J. (2000) Identification of a human homolog of the *Drosophila* rotated abdomen gene (*POMT1*) encoding a putativ ptotein *O*-mannosyl-transderase, and assignment to human chromosome 9q34.1. Genomics **58**: 171-180

Kaminishi, H., Miyaguchi, H., Tamaki, T., Suenaga, N., Hisamatsu, M., Mihashi, I., Matsumoto, H., Maeda, H. und Hagihara, Y. (1995) Degradation of humoral host defense by Candida albicans proteinase. Infect Immun. **63**: 984-988

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., 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

Kapteyn, J.C., Montijin, 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 β1,6-glucan-deficient mutants. Mol. Microbiol. **31**: 1835-1844

Kelly, R., Miller, S.M., Kurtz, M.B. und Kirsch, D.R. (1987) Directed mutagenesis in *Candida albicans*: One-step gene disruption to isolate *ura3*-mutants. Mol. Cell. Biol. **7:** 199-207

Kelly, R., Miller, S.M. und Kurtz, M.B. (1988) One-step gene disruption by cotransformation to isolate double auxotrophs in *Candida albicans*. Mol. Gen. Genet. **214**: 24-31

Kishi, Y., Mahadeo, D., Cervi, D.N., Clements, C., Cotter, D.A. und Sameshima, M. (2000) Glucose-induced pathways for actin tyrosine dephosphorylation during Dictyostelium spore germination. Exp Cell Res. **261**: 187-198

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

Klumpp, S. und Krieglstein, J. (2002) Phosphorylation and dephosphorylation of histidine residues in proteins. Eur J Biochem. 269: 1067-1071. (Review)

Koch, Y. und Rademacher, K.H. (1980) Chemical and enzymatic changes in the cell walls of *Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae* by scanning electron microscopy. Can J Microbiol. **26**: 965-970

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

Korting, H.C., Hube, B., Oberbauer, S., Januschke, E., Hamm, G., Albrecht, A., Borelli, C. und Schaller, M. (2003) Reduced expression of the hyphal-independent *Candida albicans* proteinase genes *SAP1* and *SAP3* in the *efg1* mutant is associated with attenuated virulence during infection of oral epithelium. J. Med. Microbiol. **52:** 632-32

Kulkarni, R.D., Kelkar, H.S., Dean, R.A. (2003) An eight-cysteine-containing CFEM domain unique to a group of fungal membrane proteins. Trends Biochem Sci. **28**: 118-121

Kumamoto, C.A. (2002) Candida biofilms. Curr Opin Microbiol. **6:** 608-611

Kuranda, M.J. und Robbins, P.W. (1991) Chitinase is required for cell separation during growth of *Saccharomyces cerevisiae*. Biol Chem. **266**: 19758-19767

Kurtz, M.B., Cortelyou, M.W., Miller, S.M., Lai, M. und Kirsch, D.R. (1987) Development of autonomously replicating plasmids for *Candida albicans*. Mol. Cell. Biol. **7:** 209-217

Lachke, S.A., Lockhart, S.R., Daniels, K.J. und Soll, D.R. (2003) Skin facilitates *Candida albicans* mating. Infect. Immun. **9:** 4970-4976

Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. Nature **227**: 680-685

Lalo, D., Stettler, S., Mariotte, S., Slonimski, P.P. und Thuriaux, P. (1993) Two yeast Chromosomes are related by a fossil duplication of their centromeric regions. C.R. Acad. Sci. Paris/ Sciences de la vie **316**: 367-373

Lalo, D., Stettler, S., Mariotte, S., Gendreau, E und Thuriaux, P. (1994) Organization of the centromeric region of chromosome XIV in Saccharomyces cerevisiae. Yeast **10**: 523-533

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

Lee, K.L., Buckley, H.R. und Campbell, C.C. (1975) An amino acid liquid synthetic medium for the development of mycelial and yeast forms of *Candida albicans*. Sabouraudia. **13**:148-153

Leuker, C.E. und Ernst, J.F. (1994) Toxicity of a heterologous leucyl-tRNA (antiKodon CAG) in the pathogen *Candida albicans*: *in vivo* evidence for non-standard decoding of CUG Kodons. 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**: 3735-3740

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

Losberger C. und Ernst J.F. (1989) Sequence and transcript analysis of the *Candida albicans URA3* gene encoding orotidine-5'-phosphate decarboxylase. Curr. Genet. **16**: 153-158

Lopez-Ribot, J.L., Monteagudo, C., Sepulveda, P., Casanova, M., Martinz, 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

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. und Bussey, H. (1999) The *KTR* and *MNN1* mannosyltransferase families of *Saccharomyces cerevisiae* Biochem.Biophys.Acta **1426**:323-334

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

Magee, B.B. und Magee, P.T. (2000) Induction of mating in *Candida albicans* by the constructon of *MTLa* and *MTLα* strains. Science **289**: 310-313

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

Marr ,K.A., Seidel, K., White, T.C. und Bowden, R.A. (2000) Candidemia in allogeneic blood and marrow transplant recipients: evolution of risk factors after the adoption of prophylactic fluconazole. J. Infect. Dis. **181:** 309-316

Martin-Blanco, E. und Bellido-García, A. (1996) Mutations in the *rotated abdomen* locus affect muscle development and reveal an intrinsic asymetriy in *Drosophila*. P. Natl. Acad. Sci. USA **93**: 6048-6052

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

Matthews, R.C. (1994) Pathogenicity determinants of *Candida albicans*: potential targets for immunotherapy? Microbiology **140**: 1505-1511

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

McCusker, J.H. und Davis, R.W. (1991) The use of proline as a nitrogen source causes hypersensitivity to, and allows more economical use of 5FOA in *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast. **7**: 607-608

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

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

Montezari, M. und Hedrick, H.G. (1984) Factors affecting spore formation in a *Candida albicans* strain. Appl. Environ. Microbiol. **47:** 1341-1342

Moreno, I., Pedreno, Y., Maicas, S., Sentandreu, R., Herrero, E. und Valentin, E. (2003) Characterization of a *Candida albicans* gene encoding a putative trabscriptional 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

Morschhauser, J., Virkola, R., Korhonen, T.K. und Hacker, J. (1997) Degradation of human subendothelial extracellular matrix by proteinase-secreting Candida albicans. FEMS Microbiol Lett. **153**: 349-355

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

Mullis K.B. und Faloona F.A. (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. Methods Enzymol. **155** :335-350

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**: 146-158

Müller, H., Ziegler, B. und Schweizer, B. (1993) UV/ VIS-Spektroskopie in der Nukleinsäureanalytik. Biotechnol. Tech. **4:** 25-29

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

Navarro-Garcia, F., Sanchez, M., Nombela, C. und Pla, J. (2001) Virulence genes in the pathogenic yeast Candida albicans. FEMS Microbiol. Rev. **25**: 245-68 (Review)

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. (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

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

Peterson, 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

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

Prill, S.K.-H. (2000) Bedeutung des Pmt4-Proteins für die Proteinglykosylierung des humanpathogenen Pilzes *Candida albicans*. Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Prill, S.K.-H. (2004) Untersuchungen zur Funktion der fünf Isoformen der Protein-*O*-mannosyltransferase des humanpathogenen Pilzes *Candida albicans*. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Prill, S.K.-H., Klinkert, B., Timpel, C., Gale, C.A., Schroppel, K. und Ernst, J.F. (2005) *PMT* family of *Candida albicans*: five protein mannosyltransferase isoforms affect growth, morphogenesis and antifungal resistance. Mol. Microbiol. **55**: 546-560

Rademacher F., Kehren V., Stoldt V.R. und Ernst J.F. (1989) A *Candida albicans* chaperonin subunit (CaCct8p) as a suppressor of morphogenesis and Ras phenotypes in *Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae*. Microbiology **144**: 2951-2960

Ragan, M.A., Logsdon, J.M.-Jr., Sensen, C.W., Charlebois, R.L. und Doolittle, W.F. (1996) An archaebacterial homolog of pelota, a meiotic cell division protein in eukaryotes. FEMS Microbiol Lett. **144**: 151-155

Ram, A.F., Kapteyn, J.C., Montijn, R.C., Caro, L.H., Douwes, J.E., Baginsky, W., Mazur, P., van den Ende, H. und Klis, F.M. (1998) Loss of the plasma membrane-bound protein Gas1p in *Saccharomyces cerevisiae* results in the release of beta1,3-glucan into medium and induces a compensation mechanism to ensure cell wall integrity. J Bacteriol. **180**: 1418-1424

Ramage, G., Wickes, B.L. und Lopez-Ribot, J.L. (2001) Biofilms of *Candida albicans* and their associated resistance to antifungal agents. Am Clin Lab. **20**: 42-44 (Review)

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 morpological transition in *Candida albicans*. J. Bacteriol. **170**: 895-899

Rouabhia, M., Schaller, M., Corbucci, C., Vecchiarelli, A., Prill, S.K.-H., Giasson, L. und Ernst, J.F. (2005) Epithelial damage and virulence of the fungal pathogen *Candida albicans* requires the five isoforms of protein mannosyltransferases (Pmt proteins). Infect. Immun. **73**: 4571-4580

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.

Sanglard, D., Ischer, F., Koymans, L. und Bille, J. (1998) Amino Acid substitutions in the cytochrome P-450 lanosterol 14α-demethylase (CYP51A1) from azole-resistant *Candida albicans* clinical isolates contribute to resistance to azole antifungal agents. Antimicrob. Agents Chemother. **42**: 241-253

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 Kodon 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

Scherer, S. und Magee, P.T. (1990) Genetics of *Candida albicans.* Microbiol. Rev. **54**: 226-41

Schott, E.J. und Gardner, R.C. (1997) Aluminum-sensitive mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Gen. Genet. **254**: 63-72

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 S*accharomyces cerevisiae*. Microbiology **150**: 921-998

Shamsadin, R., Adham, I.M., von Beust, G. und Engel, W. (2000) Molecular cloning, expression and chromosome location of the human pelota gene PELO. Cytogenet Cell Genet. **90**: 75-80

Shaw, J.A., Mol, P.C., Bowers, B., Silverman, S.J., Valdivieso, M.H., Duran, A. und Cabib, E. (1991) The function of chitin synthases 2 and 3 in the Saccharomyces cerevisiae cell cycle. J Cell Biol. **114**:111-123

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

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. **279**: 30480-30509

Sheppard, D.C., Yeaman, M.R., Welch, W.H., Phan, Q.T., Fu, Y., Ibrahim, A.S., Filler, S.G., Zhang, M., 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

Shepherd, M.G. (1987) Cell envelope of *Candida albicans*. Crit. Rev. Microbiol. **15**: 7-25

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.

Skerl, K.G., Calderone, R.A., Segal, E., Sreevalsan, T. und Scheld, W.M. (1984) *In vitro* binding of *Candida albicans* yeast cells to human fibronection. Can. J. Microbiol. **30:** 221-27

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 Klis, F.M. (2001) Differential regulation of cell wall biogenesis during growth and development in yeast. Microbiology **147**: 781-794

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. Micobiol. **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. (1996) 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

Strahl-Bolsinger, S., Gentzsch, M. und Tanner, W. (1999) Protein *O*-mannosylation. Biochim. Biophys. Acta **1426**: 279-307

Strahl-Bolsinger, S., Immervoll, T., Deutzmann, R. und Tanner, W. (1993) *PMT1*, the gene for a key enzyme of protein *O*-glycosylation in *Saccaromyces cerevisiae*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **90**: 8164-8168

Struhl, K. (1989) Helix-turn-helix, zinc-finger, and leucine-zipper motifs for eukaryotic transcriptional regulatory proteins. Trends Biochem Sci. **14**: 137-140 (Review)

Subanovic, M. (2005) Regulation der Genexpression durch defekte *O*-Glykosylierung bei dem humanpathogenen Pilz *Candida albicans*. Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Sundstrom, P. (2002) Adhesion in *Candida spp.* Cell Microbiol. **8:** 461-469

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, 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

Tanner, W. und Lehle, L. (1987) Protein glycosylation in yeast. Biochim. Biophys. Acta **906**: 81-99

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., 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

Towbin H, Staehelin T, Gordon J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A **(76)**:4350-4404

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 Mikroarrays applied to the ionizing radiation response. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **98:** 5116-5121

van den Bossche, H., Marichal, P. und Odds, F.C. (1994) Molecular mechanisms of drug resistance in fungi. Trends Microbiol. **2**: 393-400

Vazquez de Aldana, C.R., Correa, J., San Segundo, P., Bueno, A., Nebreda, A.R., Mendez, E. und del Rey, F. (1991) Nucleotide sequence of the exo-1,3-beta-glucanase-encoding gene, *EXG1*, of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Gene. **97**: 173-182

Vazquez-Torres, A. und Balish, E. (1997) Macrophages in resistance to candidiasis. Microbiol. Mol. Biol. Rev. **61**: 170-192

Viscoli, C. Girmenia, C., Marinus, A., Collette, L., Martino, P., Lebau, B., Spence, D., Krcmery, V. De Pauw, B. und Meunier, F. (1999) Candidemia in cancer patients. A prospective, multicenter surveillance study in Europe b ythe Invasice Fungal Infection Gruop of the European Organisation for Research and Treatment of Cancer. Clin. Infect. Dis. **28:** 1071-1079

Wallrapp, C., Verrier, S.B., Zhouravleva, G., Philippe, H., Philippe, M., Gress, T.M. und Jean-Jean, O. (1998) The product of the mammalian orthologue of the *Saccharomyces cerevisiae HBS1* gene is phylogenetically related to eukaryotic release factor 3 (eRF3) but does not carry eRF3-like activity. FEBS Lett.**440**: 387-392

Waring, A.J. und Edwards, J.E. Jr. (2004) Functional and structural diversity in the Als protein family of *Candida albicans*. J Biol. Chem. **279**: 30480-30489

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 pyrophosporylase in two yeast species Mol. Microbiol. **36**: 1156-1166

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

Weissman, Z. und Kornitzer, D. (2004) A family of *Candida* cell surface haem-binding proteins involved in haemin and haemoglobin-iron utilization. Mol Microbiol. **53**:1209-1220 **Erratum (2005)**: Mol Microbiol. **57**:1808

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

Wey, S.B., Mori, M., Pfaller, M.A.,Woolson, R.F. und Wenzel, R.P. (1988) Hospital-acquired candidemia: the attribute mortality and excess length of stay. Arch. Inter. Med. **148**: 264-265

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

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., Amselgruber, W., Deutzmann, R. und Strahl, S. (2002) Charecterization of POMT2, a novel member of the *PMT* protein O-mannosyltransferase family specifically localized to the acrosome of mammalian spermatids. Glycobiology **11**: 771-783

Willer, T., Brandl, M., Sipiczki, M. und Strahl, S. (2005) Protein *O*-mannosylation is crucial for cell wall integrity, septation and viability in fission yeast. Mol. Microbiol **57**: 156-170

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

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

Wilson, B.R., 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, I.B.H., Gavel, Y. und Heijne, G. (1991) Amino acid distribution around *O*-linked glycosylation sites. Biochem. J. **275**: 529-534

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

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

Yanisch-Perron C., Vieira J. und Messing J. (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. Gene. **33**: 103-119

Zimmermann, F.K. (1975) Procedures used in the induction of mitotic recombination and mutation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Mut. Res. **31**: 71-86

Zink, S., Nass, T., Rosen, P. und Ernst, J.F. (1996) Migration of the fungal pathogen *Candida albicans* across endothelial monolayers Infect. Immun. **12:** 5085-5091

7. Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
alkal.	alkalische
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxidsulfat
ARS	autonomous replication site
Asn	Asparagin
ATP	Adenosintriphosphat
BMFZ	Biologisch medizinisches Forschungszentrum, Düsseldorf
bp	Basenpaare
BSA	Bovine Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
Ca	*Candida albicans*
ca.	circa
cDNA	komplementäre DNA
Cys	Cystein
CWP	cell wall protein
Da	Dalton
dH_2O	destilliertes Wasser
Dm	*Drosophila melanogaster*
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	desoxy-Nukleosidtriphosphate
Dol-*P*-Man	Dolichol-Phospho-Mannose
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FOA	5-Fluoro-Orotic Acid
G	Guanin
GalNAc	N-Acetylgalaktosamin
GDP	Guanosindiphosphat
GMP	Guanosinmonophosphat
Glc	Glukose
G418	Geneticin 418
GPI	glycosyl-phospahtidylinositol anchor
GlcNAc	N-Acetylglukosamin
h	Stunde
HEPES	2-[4-(2Hydroxyethyl)-1piperazinyl]-ethansulfonsäure
HMW	High molekular weightmarker
H_2O	Wasser
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
lat.	lateinisch

liq.	liquid
LB-Medium	Lura Bertami-Medium
M	Molar
mA	Milliampere
Man	Mannose
MAP	mitogen activated protein
Met	Methionin
min	Minuten
MIPS	Munich Information Center for Protein Sequences
ml	Milliliter
mM	Millimolar
Mn^{2+}	Mangan
mRNA	messenger Ribonucleinsäure
NBT	4-Nitrotetrazolium Chloridblau
nm	Nanometer
O$D_{600\ nm}$	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
PKA	Proteinkinase A
RNA	Ribonucleinsäure
RNAse A	Ribonuclease A
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkription-PCR
S	Svedberg
Sc	*Saccharomyces cerevisiae*
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylgelelektrophorese
sec	Sekunde
Ser	Serin
s.o.	siehe oben
Sp	*Schizosaccharomyces pombe*
s.u.	siehe unten
T	Thymin
TEMED	N,N,N,N-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)aminoethansulfonsäure
Tab.	Tabelle
Thr	Threonin
Upm	Umdrehungen pro Minute
UTR	"untranslated region" (untranslatierte Region)
U	Unit
UDP	Uridindiphosphat

UV	ultraviolettes Licht
WT	Wildtyp
YNB	yeast nitrogen base
z.B.	zum Beispiel
@	bei einer Wachstumstemperatur von
^{R}	Resistenzgen
∅	Durchmesser
Σ	Summe

8. Anhang

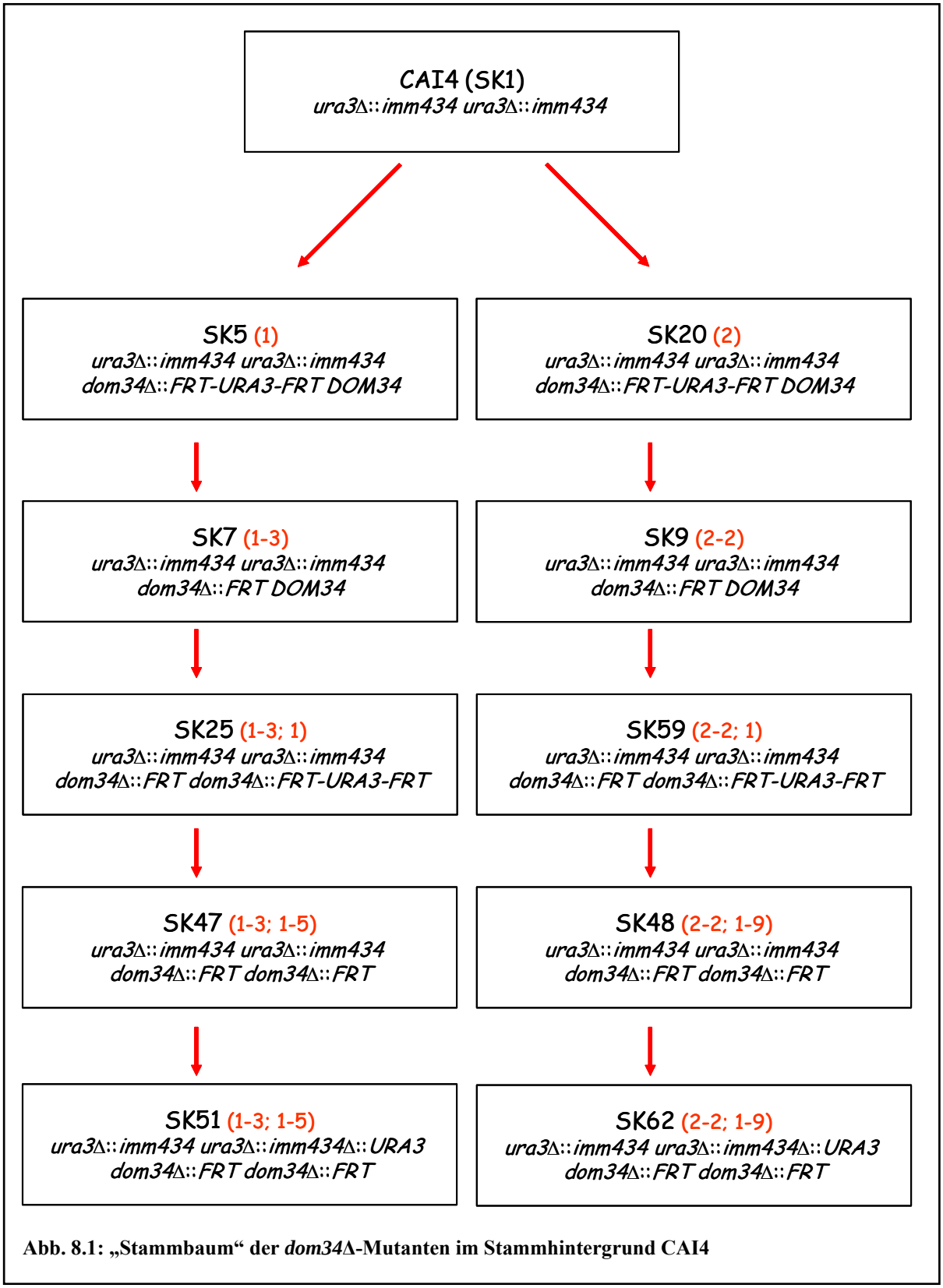


Abb. 8.1: „Stammbaum“ der *dom34*Δ-Mutanten im Stammhintergrund CAI4

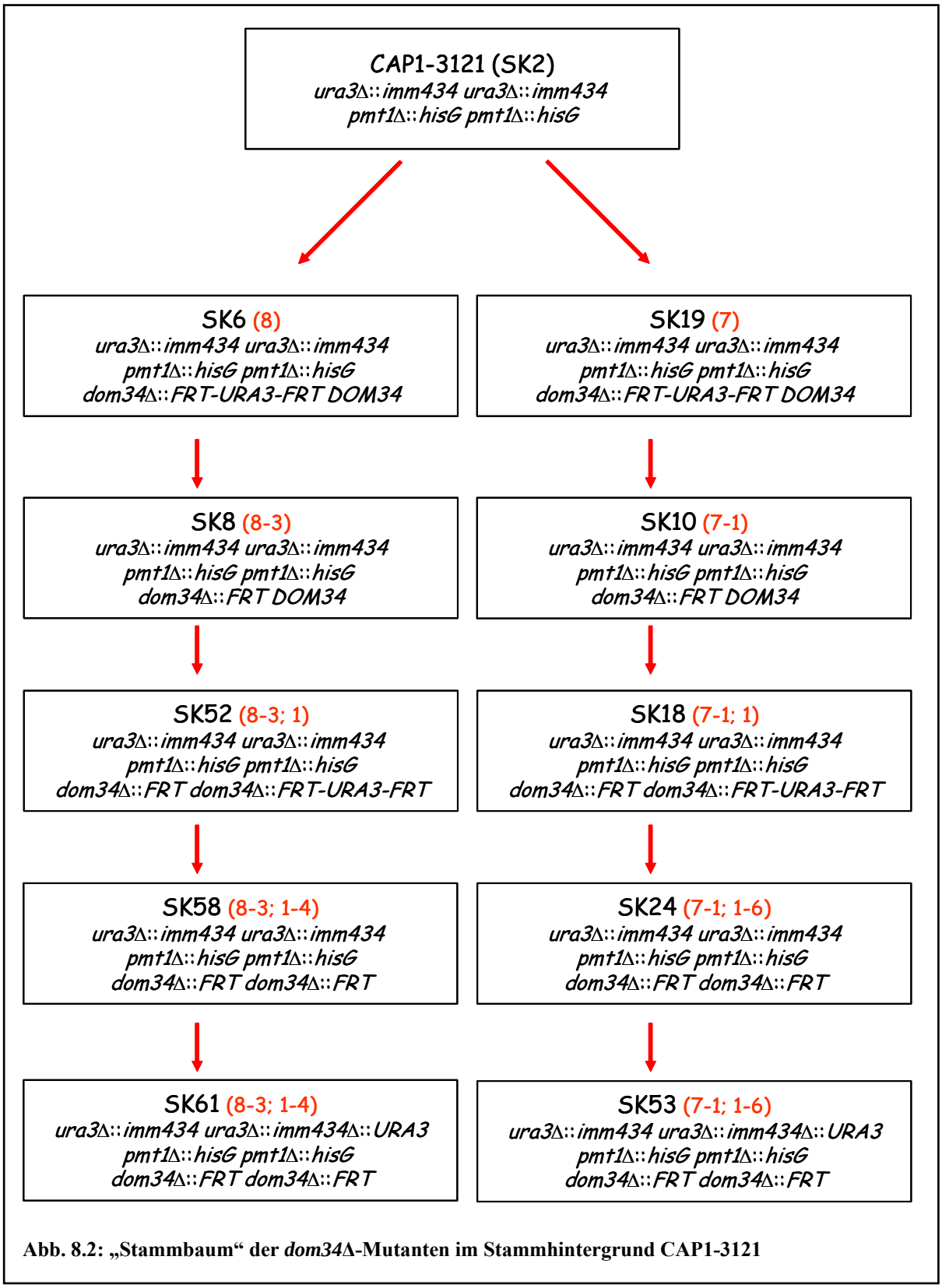


Abb. 8.2: „Stammbaum“ der *dom34*Δ-Mutanten im Stammhintergrund CAP1-3121

Tab. 8.1: **Regulierte Gene in der *dom34*Δ/*dom34*Δ-Mutante im Vergleich zum Wildtyp-Stamm CAF2-1. Die Zellen wurden auf eine $OD_{600\ nm}$ von 0,5 in YPD-Medium bei 30 °C angezogen. Die Einteilung in die unten aufgeführten funktionellen 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/)	-fache Regulation

Stärker exprimierte Gene:
*dom34*Δ/*dom34*Δ – Wildtyp (152 Gene):

Metabolismus (29 Gene):

URA3	CA2801	*C. albicans* orotidine-5-monophosphate decarboxylase	3,69
IFD4	CA2416	putative aryl-alcohol dehydrogenase (by homology)	3,35
PHR2	CA3867	pH-regulated protein 2	2,51
PHR1	CA4857	GPI-anchored pH responsive glycosyl transferase	2,47
GFA1	CA4016	glutamine:fructose-6-phosphate amidotransferase	2,38
CDR1	CA6066	multidrug resistance protein (by homology)	2,29
IPF13407	CA1926	unknown function	2,22
RNH1	CA0277	ribonuclease H (by homology)	2,16
ALS4.3F	CA1528	agglutinin-like protein, 3-prime end	1,95
IPF15604	CA0457	transcription factor (by homology)	1,86
IPF8746	CA1548	putative alpha-1,3-mannosyltransferase (by homology)	1,83
IFD5	CA0924	putative aryl-alcohol dehydrogenase (by homology)	1,81
MXR1	CA0123	methionine sulfoxide reductase	1,78
DPP3	CA3668	diacylglycerol pyrophosphate phosphatase by homology	1,77
GRP2	CA2644	reductase (by homology)	1,76
IFD1	CA0840	putative aryl-alcohol dehydrogenase (by homology)	1,75
CDR2	CA6099	*C. albicans* drug resistance protein 2	1,71
GUT1	CA0929	glycerol kinase (by homology)	1,69
TYE7	CA3707	basic helix-loop-helix transcription factor by homology	1,62
ECM22	CA0471	putative protein involved in cell wall biogenesis (by homology)	1,62
HIP1	CA3708	histidine permease (by homology)	1,61
CHS2	CA5537	chitin synthase	1,60
IPF7414	CA2243	putative transcription factor (by homology)	1,59
CHS3.3F	CA3711	chitin-UDP acetyl-glucosaminyl transferase 3, 5-prime end	1,57
IPF11897	CA3733	unknown function	1,57
IPF907	CA5985	unknown function	1,56
PCK1	CA5857	phosphoenolpyruvate carboxykinase	1,54
GAL10	CA4041	UDP-glucose 4-epimerase by homology	1,51
SNQ2	CA3828	multidrug resistance protein (by homology)	1,51

Energie (4 Gene):

IFD4	CA2416	putative aryl-alcohol dehydrogenase (by homology)	3,35
IFD5	CA0924	putative aryl-alcohol dehydrogenase (by homology)	1,81
IFD1	CA0840	putative aryl-alcohol dehydrogenase (by homology)	1,75
PCK1	CA5857	phosphoenolpyruvate carboxykinase	1,54

Zellzyklus und DNA- Prozessierung (7 Gene):

ECM331	CA2181	involved in cell wall biogenesis and architecture (by homology)	3,59
IPF5009	CA4089	unknown function	2,04
DPP3	CA3668	diacylglycerol pyrophosphate phosphatase by homology	1,77
MAK16	CA2670	nuclear viral propagation protein (by homology)	1,70
PWP2	CA5466	periodic tryptophan protein (by homology)	1,61
CHS2	CA5537	chitin synthase	1,60
ROT1	CA1583	suppressor of TOR2 mutations (by homology)	1,59

Transkription (18 Gene):

IPF14682	CA5657	putative transcription factor (by homology)	3,72
PLC3	CA3159	phosphatidylinositol phospholipase C	2,40
RPB5	CA3494	DNA-directed RNA polymerase I, II, III (by homology)	2,39
BRR2	CA4411	RNA helicase-related protein (by homology)	2,28
DRS1	CA6029	ATP dependent RNA helicase (by homology)	1,96
RRP3.3 EOC	CA5957	RNA-dependent ATPase, helicase, required for maturation of 35S primary transcript, 3-prime end (by homology)	1,87
MPP10	CA0813	component of the U3 small nucleolar ribonucleoprotein (by homology)	1,86
IPF15604	CA0457	transcription factor (by homology)	1,86
RRP1	CA5882	nvolved in processing rRNA precursor species to mature rRNAs (by homology)	1,81
SPB1	CA0443	putative methyltransferase by homology	1,79
IPF4776	CA1443	unknown function	1,72
RPA135	CA5633	DNA-directed RNA polymerase I, 135 KD subunit (by homology)	1,65
IPF1568	CA5414	unknown function	1,63
ECM22	CA0471	putative protein involved in cell wall biogenesis (by homology)	1,62
TYE7	CA3707	basic helix-loop-helix transcription factor by homology	1,62
IPF9169	CA2696	similar to *S. cerevisiae* Bur6p functional homolog of human NC2alpha (by homology)	1,59
IPF7414	CA2243	putative transcription factor (by homology)	1,59
IPF907	CA5985	unknown function	1,56

Proteinbiosynthese (5 Gene):

IPF61	CA6098	unknown function	1,98
SPB1	CA0443	putative methyltransferase by homology	1,79
PPQ1	CA3829	phosphoprotein phosphatase (by homology)	1,57
TIF5	CA0667	translation initiation factor eIF5 (by homology)	1,56
GCD10	CA4506	translation initiation factor eIF3 RNA-binding subunit (by homology)	1,52

Proteinbestimmung (Faltung, Modifikation, Schicksal) (7 Gene):

SAP9	CA4700	aspartyl proteinase 9 (by homology)	2,79
IPF10278	CA0945	DNA-J- like protein (by homology)	2,33
IPF13407	CA1926	unknown function	2,22
DRS1	CA6029	ATP dependent RNA helicase (by homology)	1,96
IPF8746	CA1548	putative alpha-1,3-mannosyltransferase (by homology)	1,83
SMF12	CA1879	manganese transporter (by homology)	1,59
MAP1	CA4387	methionine aminopeptidase, isoform 1 (by homology)	1,55

Zellulärer Transport und Transportmechanismen (7 Gene):

RAD4	CA2881	exzision repair protein (by homology)	1,71
IPF7475	CA1921	similar to *S. cerevisiae* Chs7p involved in control of protein export from the ER (by homology)	1,65
PMC1	CA1645	Ca^{2+}-transporting P-type ATPase (by homology)	1,62

HIP1	CA3708	histidine permease (by homology)	1,61
SAC6.5F	CA0408	actin filament bundling protein, fimbrin, 5-prime end (by homology)	1,60
SMF12	CA1879	manganese transporter (by homology)	1,59
ALR1	CA0796	divalent cation transporter (by homology)	1,53

Zelluläre Kommunikation/ Signaltransduktion (1 Gen):

IPF15604	CA0457	transcription factor (by homology)	1,86

Zelluläre Überlebensmechanismen (9 Gene):

DDR48	CA4336	stress protein (by homology)	7,63
IPF1222	CA4836	similar to superoxide dismutase (by homology)	7,36
IPF14682	CA5657	putative transcription factor (by homology)	3,72
CDR1	CA6066	multidrug resistance protein (by homology)	2,29
MXR1	CA0123	methionine sulfoxide reductase	1,78
IPF11548	CA3094	serine/ threonine protein kinase (by homology)	1,71
CDR2	CA6099	*C. albicans* drug resistance protein 2	1,71
ALR1	CA0796	divalent cation transporter (by homology)	1,53
SNQ2	CA3828	multidrug resistance protein (by homology)	1,51

Umweltinteraktion (15 Gene):

IPF14682	CA5657	putative transcription factor (by homology)	3,72
CDR1	CA6066	multidrug resistance protein (by homology)	2,29
FRE30.53	CA3415	strong similarity to ferric reductase, internal fragment (by homology)	2,11
FRE30.3	CA3416	strong similarity to ferric reductase Fre2p, 3-prime end (by homology)	2,07
AKR1	CA1102	ankyrin repeat-containing protein by homology	1,83
ENA21.3	CA4425	P-type ATPase, 3-prime end (by homology)	1,78
CCH1	CA4608	calcium channel protein (by homology)	1,75
CDR2	CA6099	*C. albicans* drug resistance protein 2	1,71
ERK1	CA0722	mitogen-activated protein kinase (FUS3 homolog)	1,64
PMC1	CA1645	Ca^{2+}-transporting P-type ATPase (by homology)	1,62
HIP1	CA3708	histidine permease (by homology)	1,61
SMF12	CA1879	manganese transporter (by homology)	1,59
FRE7	CA5621	ferric reductase transmembrane component (by homology)	1,59
ALR1	CA0796	divalent cation transporter (by homology)	1,53
SNQ2	CA3828	multidrug resistance protein (by homology)	1,51

Zellschicksal (13 Gene):

ECM331	CA2181	involved in cell wall biogenesis and architecture (by homology)	3,59
GFA1	CA4016	glutamine:fructose-6-phosphate amidotransferase	2,38
MCD4	CA5003	sporulation protein (by homology)	1,94
AKR1	CA1102	ankyrin repeat-containing protein by homology	1,83
RBT4	CA0104	repressed by Tup1 protein	1,82
DPP3	CA3668	diacylglycerol Pyrophosphate Phosphatase by homology	1,77
CCH1	CA4608	calcium channel protein (by homology)	1,75
ERK1	CA0722	mitogen-activated protein kinase (FUS3 homolog)	1,64
AXL2	CA2164	similar to *S. cerevisiae* Axl2p required for axial pattern of budding (by homology)	1,62
PWP2	CA5466	periodic tryptophan protein (by homology)	1,61
SAC6.5F	CA0408	actin filament bundling protein, fimbrin, 5-prime end (by homology)	1,60
CHS2	CA5537	chitin synthase	1,60
CHS3.3F	CA3711	chitin-UDP acetyl-glucosaminyl transferase 3, 5-prime end	1,57

Zelluläre Bestimmung (45 Gene):

IPF1222	CA4836	similar to superoxide dismutase (by homology)	7,36
SAP9	CA4700	aspartyl proteinase 9 (by homology)	2,79
PHR2	CA3867	pH-regulated protein 2	2,51
PHR1	CA4857	GPI-anchored pH responsive glycosyl transferase	2,47
PLC3	CA3159	phosphatidylinositol phospholipase C	2,40
RPB5	CA3494	DNA-directed RNA polymerase I, II, III (by homology)	2,39
GFA1	CA4016	glutamine: fructose-6-phosphate amidotransferase	2,38
CDR1	CA6066	multidrug resistance protein (by homology)	2,29
BRR2	CA4411	RNA helicase-related protein (by homology)	2,28
IPF5009	CA4089	unknown function	2,04
DRS1	CA6029	ATP dependent RNA helicase (by homology)	1,96
ALS4.3F	CA1528	agglutinin-like protein, 3-prime end	1,95
RRP3.3 EOC	CA5957	RNA-dependent ATPase, helicase,required for maturation of 35S primary transcript, 3-prime end (by homology)	1,87
MPP10	CA0813	component of the U3 small nucleolar ribonucleoprotein (by homology)	1,86
IPF15604	CA0457	transcription factor (by homology)	1,86
IPF8746	CA1548	putative alpha-1,3-mannosyltransferase (by homology)	1,83
SPB1	CA0443	putative methyltransferase by homology	1,79
CRH11	CA0375	probable membrane protein (by homology)	1,72
CDR2	CA6099	*C. albicans* drug resistance protein 2	1,71
MAK16	CA2670	nuclear viral propagation protein (by homology)	1,70
RPA135	CA5633	DNA-directed RNA polymerase I, 135 KD subunit (by homology)	1,65
IPF7475	CA1921	similar to *S. cerevisiae* Chs7p involved in control of protein export from the ER (by homology)	1,65
ERK1	CA0722	mitogen-activated protein kinase (FUS3 homolog)	1,64
IPF1568	CA5414	unknown function	1,63
PMC1	CA1645	Ca^{2+}-transporting P-type ATPase (by homology)	1,62
TYE7	CA3707	basic helix-loop-helix transcription factor by homology	1,62
AXL2	CA2164	similar to *S. cerevisiae* Axl2p required for axial pattern of budding (by homology)	1,62
PWP2	CA5466	periodic tryptophan protein (by homology)	1,61
HIP1	CA3708	histidine permease (by homology)	1,61
SAC6.5F	CA0408	actin filament bundling protein, fimbrin, 5-prime end (by homology)	1,60
CHS2	CA5537	chitin synthase	1,60
IPF9169	CA2696	similar to *S. cerevisiae* Bur6p functional homolog of human NC2alpha (by homology)	1,59
SMF12	CA1879	manganese transporter (by homology)	1,59
ALS1.3 EOC	CA0316	agglutinin-like protein, 3-prime end	1,58
IPF11897	CA3733	unknown function	1,57
CHS3.3F	CA3711	chitin-UDP acetyl-glucosaminyl transferase 3, 5-prime end	1,57
KRR1	CA4096	involved in cell division and spore germination	1,56
TIF5	CA0667	translation initiation factor eIF5 (by homology)	1,56
IPF907	CA5985	unknown function	1,56
MAP1	CA4387	methionine aminopeptidase, isoform 1 (by homology)	1,55
PCK1	CA5857	phosphoenolpyruvate carboxykinase	1,54
ALR1	CA0796	divalent cation transporter (by homology)	1,53
GCD10	CA4506	translation initiation factor eIF3 RNA-binding subunit (by homology)	1,52
SNQ2	CA3828	multidrug resistance protein (by homology)	1,51
GAL10	CA4041	UDP-glucose 4-epimerase by homology	1,51

Transporterleichterung (9 Gene):

CDR1	CA6066	multidrug resistance protein (by homology)	2,29

ENA21.3	CA4425	P-type ATPase, 3-prime end (by homology)	1,78
CCH1	CA4608	calcium channel protein (by homology)	1,75
CDR2	CA6099	*C. albicans* drug resistance protein 2	1,71
PMC1	CA1645	Ca^{2+}-transporting P-type ATPase (by homology)	1,62
HIP1	CA3708	Histidine permease (by homology)	1,61
SMF12	CA1879	manganese transporter (by homology)	1,59
ALR1	CA0796	divalent cation transporter (by homology)	1,53
SNQ2	CA3828	multidrug resistance protein (by homology)	1,51

Virulenzeigenschaften (6 Gene):

SAP9	CA4700	aspartyl proteinase 9 (by homology)	2,79
FRE30.53	CA3415	strong similarity to ferric reductase, internal fragment (by homology)	2,11
FRE30.3	CA3416	strong similarity to ferric reductase Fre2p, 3-prime end (by homology)	2,07
ALS4.3F	CA1528	agglutinin-like protein, 3-prime end	1,95
FRE7	CA5621	ferric reductase transmembrane component (by homology)	1,59
ALS1.3 EOC	CA0316	agglutinin-like protein, 3-prime end	1,58

Unklassifizierte- und unbekannte Proteine (77 Gene):

RTA2	CA3607	unknown function	18,09
DDR48	CA4336	stress protein (by homology)	7,63
IPF4724	CA3253	unknown function	5,83
IPF3964	CA4111	unknown function	4,79
IPF7459	CA3657	unknown function	3,76
RTA4	CA3835	protein involved in 7-aminocholesterol resistance (by homology)	3,54
IPF15442	CA0188	unknown function	3,17
IPF4119	CA0125	unknown function	3,04
IPF17186	CA0828	unknown function	2,92
IPF10429	CA0721	unknown function	2,80
IPF20026	CA5113	unknown function	2,71
IPF17574	CA0485	unknown function	2,59
IPF19142	CA0184	unknown function	2,44
IPF18732	CA1234	histidine-rich glycoprotein precursor (by homology)	2,37
BRR2	CA4411	RNA helicase-related protein (by homology)	2,28
IPF8661	CA4718	unknown function	2,27
IPF11849	CA1365	unknown function	2,26
IPF10153	CA3747	membrane transporter by homology	2,17
RTA3	CA3606	unknown function	2,16
IPF10911	CA2629	unknown function	2,14
IPF16253	CA0782	unknown function	2,13
IPF18641. EXON1	CA1639	unknown function, exon 1	2,07
IPF19801	CA4566	unknown function	2,04
IPF12811	CA2348	putative serine/ threonine kinase	2,00
IPF12148	CA3007	unknown function	2,00
IPF20152	CA3975	unknown function	1,97
IPF300	CA5470	unknown function	1,96
MCD4	CA5003	sporulation protein (by homology)	1,94
IPF17652. 3	CA0037	reverse transcriptase, 3-prime end (by homology)	1,93
IPF13756. 5F	CA2413	unknown function	1,89
IPF3618	CA4339	unknown function	1,89
IPF14362	CA4400	unknown function	1,89
DBP9	CA0715	dead box helicase	1,86

IPF4257	CA4003	unknown function	1,85
IPF4443	CA0051	unknown function	1,83
IPF14119	CA0689	unknown function	1,83
IPF6665	CA4289	unknown function	1,83
IPF525	CA5613	unknown function	1,80
IPF13717	CA0712	unknown function	1,80
IPF4119.5	CA4174	unknown function, 5-prime end	1,79
IPF630	CA6016	unknown function	1,78
IPF18641. EXON2	CA1640	unknown function, exon 2	1,77
IPF18447	CA2592	putative zinc-finger protein (by homology)	1,75
NOG1	CA5682	nucleolar G-protein (by homology)	1,74
IPF8108	CA2046	unknown function	1,73
IPF3709	CA5051	unknown function	1,72
IPF18034	CA0283	unknown function	1,70
IPF13202	CA3033	unknown function	1,68
IPF11615	CA1047	RNA-binding proteins (by homology)	1,67
IPF16479	CA0098	unknown function	1,67
IPF14019	CA1950	unknown function	1,66
IPF4999	CA2874	unknown function	1,63
IPF13116	CA2030	unknown function	1,63
IPF7819	CA3563	unknown function	1,62
PMC1	CA1645	Ca^{2+}-transporting P-type ATPase (by homology)	1,62
IPF15870	CA2769	unknown function	1,61
IPF3767	CA0057	unknown function	1,60
IPF4012	CA1039	unknown function	1,59
IPF10262	CA1160	unknown function	1,59
IPF522	CA5614	unknown function	1,58
IPF20058	CA0500	unknown function	1,58
IPF12606. 5EOC	CA0693	unknown function, 5-prime end	1,58
IPF15015	CA0276	unknown function	1,55
IPF20118	CA2868	unknown function	1,55
IPF893	CA5336	unknown function	1,55
IPF1341	CA5112	similarity to mucin proteins (by homology)	1,54
TCI1	CA1370	protein phosphatase Two C-Interacting protein (by homology)	1,54
RRP6	CA2593	involved in 5.8S rRNA processing (by homology)	1,54
IPF407	CA5848	unknown function	1,54
IPF5607	CA2814	unknown function	1,53
IPF1136	CA5787	unknown function	1,52
IPF19908	CA1242	unknown function	1,51
IPF19026	CA0349	unknown function	1,51
IPF9525	CA1822	unknown function	1,51
IPF6424	CA2394	unknown function	1,51
IPF14911	CA2547	unknown function	1,51
IPF12084	CA3104	unknown function	1,51

Gen-Name	Gen-Nummer	Beschreibung (nach CandidaDB: http://genolist.pasteur.fr/CandidaDB/)	-fache Regulation

Schwächer exprimierte Gene:
dom34Δ/*dom34Δ* – Wildtyp (86 Gene):

Metabolismus (41 Gene):

IFE2	CA2075	unknown function	0,38
RHR2	CA5788	DL-glycerol phosphatase	0,38
ERG1	CA1353	squalene epoxidase	0,38
ERG3	CA1956	C5,6 desaturase	0,43
GDH3	CA1579	NADP-glutamate dehydrogenase (by homology)	0,44
IPF8321	CA2938	similar to *S. cerevisiae* Glg2p self-glucosylating initiator of glycogen synthesis (by homology)	0,44
IPF7289	CA3878	similar to *S. cerevisiae* Upc2p RNA polymerase II transcription factor	0,44
RNR22	CA4492	ribonucleoside-diphosphate reductase (by homology)	0,45
GLK1	CA0263	aldohexose specific glucokinase (by homology)	0,47
DAK2.3 EOC	CA0311	dihydroxyacetone kinase, 3-prime end (by homology)	0,51
CDR4	CA3895	Multidrug resistance protein	0,52
ERG16	CA1387	cytochrome P450 lanosterol 14a-demethylase	0,52
IPF7686	CA3169	putative mitochondrial phosphate carrier protein (by homology)	0,52
PDX3	CA4261	pyridoxamine-phosphate oxidase (by homology)	0,54
SUR2	CA2225	hydroxylation of C-4 of the sphingoid moiety of ceramide by homology	0,56
TPS2	CA5066	threalose-6-phosphate phosphatase (by homology)	0,57
HXT61	CA1070	sugar transporter	0,57
COX15	CA1688	cytochrome oxidase assembly factor (by homology)	0,58
IPF2400	CA5891	putative aldehyde reductase (by homology)	0,58
IPF4959	CA6057	D-xylulose reductase (by homology)	0,58
POT14	CA0290	acetyl-CoA acetyltransferase (by homology)	0,58
PFK2	CA3112	6-phosphofructokinase, beta subunit	0,59
TPS3.3	CA5505	alpha,alpha-trehalose-phosphate synthase, regulatory subunit, 3-prime end (by homology)	0,59
HXT5.3F	CA1069	sugar transporter, 3-prime end	0,60
CBP4	CA3877	ubiquinol-cytochrome-c reductase assembly factor (by homology)	0,62
IPF1509	CA4639	putative alanine transaminase (by homology)	0,62
ERG24	CA0300	C-14 sterol reductase (by homology)	0,62
PHO11	CA0616	Secreted acid phosphatase	0,62
IPF1798	CA5264	unknown function	0,64
GPM2	CA2855	phosphoglycerate mutase (by homology)	0,64
GSY1	CA5467	UDP glucose-starch glucosyltransferase, glycogen synthase (by homology)	0,64
IPF9550	CA4570	similar to *S. cerevisiae* Osm1p osmotic growth protein	0,65
IPF16795	CA0821	glycerate/ formate-dehydrogenase (by homology)	0,65
FAS2.5F	CA6105	fatty-acyl-CoA synthase, alpha chain, 5-prime end	0,65
IPF6464	CA4480	putative triacylglycerol lipase (by homology)	0,66
HXK2.3F	CA0127	hexokinase II, 3-prime end (by homology)	0,66
TPI1	CA5950	triose phosphate isomerase	0,66
NCP1	CA3327	NADPH-cytochrome P450 reductase	0,66
ERG6	CA4005	sterol transmethylase	0,66
ILV3	CA4802	dihydroxyacid dehydratase (by homology)	0,67

NTH1	CA5824	Neutral trehalase	0,67

Energie (13 Gene):

IPF8321	CA2938	similar to *S. cerevisiae* Glg2p self-glucosylating initiator of glycogen synthesis (by homology)	0,44
GLK1	CA0263	aldohexose specific glucokinase (by homology)	0,47
TPS2	CA5066	threalose-6-phosphate phosphatase (by homology)	0,57
COX15	CA1688	cytochrome oxidase assembly factor (by homology)	0,58
TPS3.3	CA5505	alpha, alpha-trehalose-phosphate synthase, regulatory subunit, 3-prime end (by homology)	0,59
PFK2	CA3112	6-phosphofructokinase, beta subunit	0,59
CBP4	CA3877	ubiquinol-cytochrome-c reductase assembly factor (by homology)	0,62
GSY1	CA5467	UDP glucose-starch glucosyltransferase, glycogen synthase (by homology)	0,64
GPM2	CA2855	phosphoglycerate mutase (by homology)	0,64
IPF9550	CA4570	similar to *S. cerevisiae* Osm1p osmotic growth protein	0,65
TPI1	CA5950	triose phosphate isomerase	0,66
HXK2.3F	CA0127	hexokinase II, 3-prime end (by homology)	0,66
NTH1	CA5824	neutral trehalase	0,67

Zellzyklus und DNA- Prozessierung (3 Gene):

RNR22	CA4492	ribonucleoside-diphosphate reductase (by homology)	0,45
DOM34	CA3043	probable involvement in meiotic and mitotic divisions (by homology)	0,61
MSH2	CA4413	DNA mismatch repair protein (by homology)	0,64

Transkription (4 Gene):

IPF7289	CA3878	similar to *S. cerevisiae* Upc2p RNA polymerase II Transcription factor	0,44
PFS2	CA3310	polyadenylation Factor I subunit (by homology)	0,57
CAF16	CA3880	ABC ATPase (by homology)	0,62
IPF1798	CA5264	unknown function	0,64

Proteinbiosynthese (2 Gene):

DOM34	CA3043	probable involvement in meiotic and mitotic divisions (by homology)	0,61
MRPL38	CA2607	ribosomal protein of the large subunit (L14), mitochondrial, by homology	0,66

Proteinbestimmung (Faltung, Modifikation, Schicksal) (6 Gene):

COX15	CA1688	cytochrome oxidase assembly factor (by homology)	0,58
STF2	CA2738	ATP synthase regulatory factor (by homology)	0,60
CBP4	CA3877	ubiquinol-cytochrome-c reductase assembly factor (by homology)	0,62
AUT1	CA2148	similar to *S. cerevisiae* Aut1p essential for autophagocytosis (by homology)	0,62
QRI8	CA5565	E2 ubiquitin-conjugation enzyme (by homology)	0,63
FAS2.5F	CA6105	fatty-acyl-CoA synthase, alpha chain, 5-prime end	0,65

Zellulärer Transport und Transportmechanismen (7 Gene):

GLK1	CA0263	aldohexose specific glucokinase (by homology)	0,47
IPF7686	CA3169	putative mitochondrial phosphate carrier protein (by homology)	0,52
HXT61	CA1070	sugar transporter	0,57
IPF4991	CA1075	putative membrane protein	0,58

HXT5.3F	CA1069	sugar transporter, 3-prime end	0,60
AUT1	CA2148	similar to *S. cerevisiae* Aut1p essential for autophagocytosis (by homology)	0,62
PTR21	CA4707	peptide transporter	0,67

Zelluläre Kommunikation/ Signaltransduktion (1 Gen):

CMK1	CA6135	Ca^{2+}/ calmodulin-dependent ser/ thr protein kinase (by homology)	0,56

Zelluläre Überlebensmechanismen (9 Gene):

DAK2.3 EOC	CA0311	dihydroxyacetone kinase, 3-prime end (by homology)	0,51
CDR4	CA3895	multidrug resistance protein	0,52
ERG16	CA1387	cytochrome P450 lanosterol 14a-demethylase	0,52
TPS2	CA5066	threalose-6-phosphate phosphatase (by homology)	0,57
IPF6629	CA4127	unknown function	0,57
QDR1	CA4501	putative antibiotic resistance proteins (by homology)	0,62
QRI8	CA5565	E2 ubiquitin-conjugation enzyme (by homology)	0,63
IPF9550	CA4570	similar to *S. cerevisiae* Osm1p osmotic growth protein	0,65
NCP1	CA3327	NADPH-cytochrome P450 reductase	0,66

Umweltinteraktion (2 Gene):

CDR4	CA3895	multidrug resistance protein	0,52
IPF6629	CA4127	unknown function	0,57

Zellschicksal (3 Gene):

OPT1	CA1902	oligopeptide transporter	0,44
CMK1	CA6135	Ca^{2+}/ calmodulin-dependent ser/ thr protein kinase (by homology)	0,56
QRI8	CA5565	E2 ubiquitin-conjugation enzyme (by homology)	0,63

Zelluläre Bestimmung (36 Gene):

ERG1	CA1353	squalene epoxidase	0,38
ERG3	CA1956	C5,6 desaturase	0,43
GDH3	CA1579	NADP-glutamate dehydrogenase (by homology)	0,44
RNR22	CA4492	ribonucleoside-diphosphate reductase (by homology)	0,45
GLK1	CA0263	aldohexose specific glucokinase (by homology)	0,47
CDR4	CA3895	multidrug resistance protein	0,52
ERG16	CA1387	cytochrome P450 lanosterol 14a-demethylase	0,52
SUR2	CA2225	hydroxylation of C-4 of the sphingoid moiety of ceramide by homology	0,56
IPF14545	CA2314	unknown function	0,56
CMK1	CA6135	Ca^{2+}/ calmodulin-dependent ser/ thr protein kinase (by homology)	0,56
TPS2	CA5066	threalose-6-phosphate phosphatase (by homology)	0,57
HXT61	CA1070	sugar transporter	0,57
IPF6629	CA4127	unknown function	0,57
COX15	CA1688	cytochrome oxidase assembly factor (by homology)	0,58
POT14	CA0290	acetyl-CoA acetyltransferase (by homology)	0,58
IPF4991	CA1075	putative membrane protein	0,58
PFK2	CA3112	6-phosphofructokinase, beta subunit	0,59
TPS3.3	CA5505	alpha,alpha-trehalose-phosphate synthase, regulatory subunit, 3-prime end (by homology)	0,59
HXT5.3F	CA1069	sugar transporter, 3-prime end	0,60
CBP4	CA3877	ubiquinol-cytochrome-c reductase assembly factor (by homology)	0,62

PHO11	CA0616	secreted acid phosphatase	0,62
QRI8	CA5565	E2 ubiquitin-conjugation enzyme (by homology)	0,63
GPM2	CA2855	phosphoglycerate mutase (by homology)	0,64
GSY1	CA5467	UDP glucose-starch glucosyltransferase, glycogen synthase (by homology)	0,64
MSH2	CA4413	DNA mismatch repair protein (by homology)	0,64
IPF1798	CA5264	unknown function	0,64
IPF9550	CA4570	similar to *S. cerevisiae* Osm1p osmotic growth protein	0,65
FAS2.5F	CA6105	fatty-acyl-CoA synthase, alpha chain, 5-prime end	0,65
HXK2.3F	CA0127	hexokinase II, 3-prime end (by homology)	0,66
TPI1	CA5950	triose phosphate isomerase	0,66
NCP1	CA3327	NADPH-cytochrome P450 reductase	0,66
ERG6	CA4005	sterol transmethylase	0,66
MRPL38	CA2607	ribosomal protein of the large subunit (L14), mitochondrial, by homology	0,66
ILV3	CA4802	dihydroxyacid dehydratase (by homology)	0,67
NTH1	CA5824	neutral trehalase	0,67
PTR21	CA4707	peptide transporter	0,67

Transporterleichterung (7 Gene):

OPT1	CA1902	oligopeptide transporter	0,44
CDR4	CA3895	multidrug resistance protein	0,52
IPF7686	CA3169	putative mitochondrial phosphate carrier protein (by homology)	0,52
HXT61	CA1070	sugar transporter	0,57
HXT5.3F	CA1069	sugar transporter, 3-prime end	0,60
QDR1	CA4501	putative antibiotic resistance proteins (by homology)	0,62
PTR21	CA4707	peptide transporter	0,67

Unklassifizierte- und unbekannte Proteine (30 Gene):

IPF6518	CA2302	unknown function	0,16
IPF6235	CA2216	*C. albicans* Tca2 retrotransposon	0,24
IPF18207	CA4516	unknown function	0,33
IPF6238	CA2752	GAG protein of retrotransposon pCal	0,38
IPF14109	CA0380	unknown function	0,40
IPF20169	CA4381	unknown function	0,42
POL0	CA2217	pol polyprotein, reverse transcripase	0,43
IPF4905	CA0899	unknown function	0,45
IPF17510	CA2038	unknown function	0,46
IPF6298	CA2947	unknown function	0,48
IPF2857	CA5526	unknown function	0,49
RBT5	CA2558	repressed by Tup1 protein 5	0,53
IPF3352	CA4780	unknown function	0,54
IPF11363	CA2802	unknown function	0,55
IPF9255	CA3637	unknown function	0,56
IPF17283	CA2021	unknown function	0,57
IPF1674	CA4874	putative transcription initiation factor (by homology)	0,57
IPF8043	CA4557	unknown function	0,59
IPF4065	CA0386	unknown function	0,60
IPF6156	CA1625	similar to *C. elegans* LIM homeobox protein	0,60
IPF15301	CA5076	unknown function	0,60
IPF6881	CA2186	putative phosphatidyl synthase	0,61
IPF14550	CA2822	unknown function	0,61
IPF15297	CA5078	unknown function	0,62
IPF11915	CA3014	similar to *S. cerevisiae* Pcl7p cyclin like protein interacting with Pho85p (by homology)	0,63
IPF14282	CA0446	similar to mucin proteins (by homology)	0,64
IPF7279	CA3882	putative cobalamin-dependent homocysteine S-methyltransferase (by homology)	0,64

IPF4328	CA0210	unknown function	0,65
IPF6730	CA1121	unknown function	0,65
IPF4671	CA3368	unknown Function	0,66

Tab. 8.2: **Regulierte Gene in der *pmt1*Δ/*pmt1*Δ-Mutante im Vergleich zum Wildtyp-Stamm CAF2-1. Die Zellen wurden auf eine $OD_{600\ nm}$ von 0,5 in YPD-Medium bei 30 °C angezogen. Die Einteilung in die unten aufgeführten funktionellen 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/)	-fache Regulation

Stärker exprimierte Gene:
*pmt1*Δ/*pmt1*Δ – Wildtyp (186 Gene):

Metabolismus (51 Gene):

PET9	CA5388	ADP/ ATP carrier protein (by homology)	4,94
IPF11335	CA0926	member of the phosphate permease family (by homology)	3,25
ALS4.3F	CA1528	agglutinin-like protein, 3-prime end	3,17
HWP1	CA2825	hyphal wall protein	2,99
GRP2	CA2644	reductase (by homology)	2,78
RNH35	CA4876	RNase H (by homology)	2,71
MXR1	CA0123	methionine sulfoxide reductase	2,44
PHR1	CA4857	GPI-anchored pH responsive glycosyl transferase	2,44
PCK1	CA5857	phosphoenolpyruvate carboxykinase	2,36
IPF11589	CA3177	similar to *S. cerevisiae* Pho13p 4-nitrophenyl-phosphatase	2,31
RGT1	CA1172	regulator of glucose-induced genes (by homology)	2,26
UGP1	CA0435	UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase (by homology)	2,25
PHO11	CA0616	Secreted acid phosphatase	2,18
IPF5013	CA4087	similar to *S. cerevisiae* Mct1p malonyl-CoA:ACP transferase (by homology)	2,15
GAL7	CA4044	UDP-glucose-hexose-1-phosphate uridylyltransferase (by homology)	2,15
IFA2	CA0335	unknown function	2,10
GFA1	CA4016	glutamine:fructose-6-phosphate amidotransferase	2,10
HSP12	CA0627	heat shock protein (by homology)	2,03
EXG1	CA0822	glucan 1,3-beta-glucosidase	2,03
IFD4	CA2416	putative aryl-alcohol dehydrogenase (by homology)	2,02
IPF13744	CA2114	protein involved in regulation of carbon metabolism (by homology)	1,99
MNT1	CA3469	mannosyltransferase involved in n-linked and o-linked glycosylation	1,99
ALP1	CA3334	amino-acid permease (by homology)	1,93
ECM22	CA0471	putative protein involved in cell wall biogenesis (by homology)	1,91
ADH5	CA2391	probable alcohol dehydrogenase (by homology)	1,91
PMI40	CA0988	mannose-6-phosphate isomerase (phosphomannose isomerase) (pmi) (phosphohexomutase)	1,89
DPM1	CA3899	dolichol-phosphate (beta-D) mannosyltransferase 1 by homology	1,81
CDR1	CA6066	multidrug resistance protein (by homology)	1,80
MET15	CA2565	O-acetylhomoserine O-acetylserine sulphydrylase	1,79
IFD5	CA0924	putative aryl-alcohol dehydrogenase (by homology)	1,73
IPF11713	CA1330	unknown function	1,72
IPF8854	CA0854	similar to *S. cerevisiae* Mnn1p alpha-1,3-mannosyltransferase (by homology)	1,70

UGA11. EXON1	CA0773	4-aminobutyrate aminotransferase, exon 1 (by homology)	1,68
GLC7	CA3224	ser/ thr phosphoprotein phosphatase 1 (by homology)	1,65
SNQ2	CA3828	multidrug resistance protein (by homology)	1,64
PHR2	CA3867	pH-regulated protein 2	1,62
GAL1	CA4040	galactokinase	1,62
PLC1	CA2448	1-phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate phosphodiesterase	1,61
IPF13166.3 EOC	CA0953	unknown function, 3-prime end	1,61
BGL21	CA1541	endo-beta-1,3-glucanase (by homology)	1,57
DLD1	CA4905	D-lactate ferricytochrome C oxidoreductase (by homology)	1,56
IPF907	CA5985	unknown function	1,55
GAL10	CA4041	UDP-glucose 4-epimerase by homology	1,55
TYE7	CA3707	basic helix-loop-helix transcription factor by homology	1,54
CHS2	CA5537	chitin synthase	1,53
PSD2.5F	CA1012	phosphatidylserine decarboxylase 2, 5-prime end (by homology)	1,52
CDC11	CA2610	septin by homology	1,52

Energie (11 Gene):

PCK1	CA5857	phosphoenolpyruvate carboxykinase	2,36
UGP1	CA0435	UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase (by homology)	2,25
ATP4	CA3479	F1F0-ATPase complex, F0 subunit B (by homology)	2,20
IPF5013	CA4087	similar to *S. cerevisiae* Mct1p malonyl-CoA:ACP transferase (by homology)	2,15
IFD4	CA2416	putative aryl-alcohol dehydrogenase (by homology)	2,02
ADH5	CA2391	probable alcohol dehydrogenase (by homology)	1,91
IFD5	CA0924	putative aryl-alcohol dehydrogenase (by homology)	1,73
ARD8	CA3288	D-arabinitol dehydrogenase	1,68
GLC7	CA3224	ser/ thr phosphoprotein phosphatase 1 (by homology)	1,65
IPF15672	CA2392	unknown function	1,57
DLD1	CA4905	D-lactate ferricytochrome C oxidoreductase (by homology)	1,56

Zellzyklus und DNA- Prozessierung (18 Gene):

IPF1445	CA4908	similar to *S. cerevisiae* Apc1p subunit of anaphase-promoting complex	4,69
CDC22.3 EOC	CA1828	DNA Polymerase III, 3-prime end	3,37
IRR1.3F	CA5355	cohesin complex subunit, 3-prime end (by homology)	3,11
IPF6748	CA3393	unknown function	2,76
MEC1	CA2364	cell cycle checkpoint protein (by homology)	2,40
IPF643	CA6009	similar to *S. cerevisiae* Ptp3p protein tyrosine phosphatase (by homology)	2,29
IFA2	CA0335	unknown function	2,10
HSP12	CA0627	heat shock protein (by homology)	2,03
ECM331	CA2181	involved in cell wall biogenesis and architecture (by homology)	2,03
DOC1	CA0002	component of the anaphase promoting complex (by homology)	1,79
KAR2	CA0915	dnaK-type molecular chaperone (by homology)	1,79
TRF4	CA4054	topoisomerase I-related protein	1,71
GLC7	CA3224	ser/ thr phosphoprotein phosphatase 1 (by homology)	1,65
CDC5	CA2986	cell-cycle protein kinase (by homology)	1,65
PLC1	CA2448	1-phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate phosphodiesterase	1,61
IPF19753	CA2159	similar to *S. cerevisiae* Tfb1p transcription initiation factor (by homology)	1,56
CHS2	CA5537	chitin synthase	1,53
CDC11	CA2610	septin by homology	1,52

Transkription (14 Gene):

RGT1	CA1172	regulator of glucose-induced genes (by homology)	2,26
MTR2.3	CA5501	mRNA transport protein, 3-prime end (by homology)	2,07
IPF5866	CA2133	unknown function	1,93
YOX1	CA5202	similar to homoeodomain protein (by homology)	1,93
ECM22	CA0471	putative protein involved in cell wall biogenesis (by homology)	1,91
IPF20135	CA3523	unknown function	1,86
MRF1	CA1333	mitochondrial respiratory function protein (by homology)	1,71
PRP31	CA0224	pre-mRNA splicing protein (by homology)	1,65
GAL1	CA4040	galactokinase	1,62
IPF19753	CA2159	similar to *S. cerevisiae* Tfb1p transcription initiation factor (by homology)	1,56
IPF907	CA5985	unknown function	1,55
IPF9169	CA2696	similar to *S. cerevisiae* Bur6p functional homolog of human NC2alpha (by homology)	1,55
TYE7	CA3707	basic helix-loop-helix transcription factor by homology	1,54
IPF763	CA5502	putative transcription factor with a Cys4-zinc finger (by homology)	1,54

Proteinbiosynthese (2 Gene):

RPP2	CA5125	acidic ribosomal protein by homology	7,32
GLC7	CA3224	ser/ thr phosphoprotein phosphatase 1 (by homology)	1,65

Proteinbestimmung (Faltung, Modifikation, Schicksal) (14 Gene):

IPF1445	CA4908	similar to *S. cerevisiae* Apc1p subunit of anaphase-promoting complex	4,69
SEC61	CA3197	ER protein-translocation complex subunit	2,76
UGP1	CA0435	UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase (by homology)	2,25
MNT1	CA3469	mannosyltransferase involved in n-linked and o-linked glycosylation	1,99
LAP42	CA4274	aminopeptidase yscI precursor, vacuolar (by homology)	1,98
SPC3	CA3600	signal peptidase subunit (by homology)	1,82
DOC1	CA0002	component of the anaphase promoting complex (by homology)	1,79
KAR2	CA0915	dnaK-type molecular chaperone (by homology)	1,79
YKE2.3	CA3842	gim complex component, 3-prime end (by homology)	1,78
CPR3	CA3978	cyclophilin (peptidylprolyl isomerase), mitochondrial (by homology)	1,73
IPF11713	CA1330	unknown function	1,72
IPF8854	CA0854	similar to *S. cerevisiae* Mnn1p alpha-1,3-mannosyltransferase (by homology)	1,70
IPF11900	CA3730	unknown function	1,56
IPF20016	CA4514	similar to *S. cerevisiae* Sec63p ER protein-translocation complex subunit (by homology)	1,53

Zellulärer Transport und Transportmechanismen (19 Gene):

PET9	CA5388	ADP/ ATP carrier protein (by homology)	4,94
NUP2.3 EOC	CA3476	nucleoporine involved in nuclear protein export, 3-prime end (by homology)	3,28
SEC61	CA3197	ER protein-translocation complex subunit	2,76
ATP4	CA3479	F1F0-ATPase complex, F0 subunit B (by homology)	2,20
MTR2.3	CA5501	mRNA transport protein, 3-prime end (by homology)	2,07
ALP1	CA3334	amino-acid permease (by homology)	1,93
KAR2	CA0915	dnaK-type molecular chaperone (by homology)	1,79
SEC13	CA3392	protein transport protein	1,65
MYO2	CA5247	myosin heavy chain (by homology)	1,64
SEC18.5F	CA5270	vesicular fusion protein by homology, 5-prime end	1,58
SEC24	CA0958	component of COPII coat of ER-Golgi vesicles(by homology)	1,57
IPF11900	CA3730	unknown function	1,56

IPF2485	CA5827	unknown function	1,54
FET34.3 EOC	CA1431	iron transport multicopper oxidase, 3-prime end (by homology)	1,54
IPF20016	CA4514	similar to *S. cerevisiae* Sec63p ER protein-translocation complex subunit (by homology)	1,53
YPT32	CA0470	small GTP-binding protein essential for Golgi function (by homology)	1,52
IPF4991	CA1075	putative membrane protein	1,52
ERV25	CA5707	component of COPII-coated vesicles (by homology)	1,51
GOG5	CA2980	GDP-mannose transporter (by homology)	1,51

Zelluläre Kommunikation/ Signaltransduktion (3 Gene):

IFA2	CA0335	unknown function	2,10
IPF9230	CA3810	similar to *S. cerevisiae* Ste3p pheromone a-factor receptor (by homology)	1,86
PLC1	CA2448	1-phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate phosphodiesterase	1,61

Zelluläre Überlebensmechanismen (9 Gene):

DDR48	CA4336	stress protein (by homology)	8,77
GSH1. EXON2	CA0583	gamma-glutamylcysteine synthetase, exon 2 (by homology)	5,00
IPF1222	CA4836	similar to superoxide dismutase (by homology)	2,80
MXR1	CA0123	methionine sulfoxide reductase	2,44
SNG2	CA2618	drug transporter (by homology)	2,14
HSP12	CA0627	heat shock protein (by homology)	2,03
SOD22.3F	CA5588	superoxide dismutase, 3-prime end (by homology)	1,95
HOL3	CA0459	member of major facilitator superfamily multidrug-resistance protein subfamily 1 (by homology)	1,92
IPF4055	CA4493	unknown function	1,88
IPF16273	CA0793	similar to *S. cerevisiae* Dtr1p dityrosine transporter (by homology)	1,86
CDR1	CA6066	multidrug resistance protein (by homology)	1,80
SSK2	CA1205	MAP kinase kinase kinase of the high osmolarity signal transduction pathway (by homology)	1,70
SNQ2	CA3828	multidrug resistance protein (by homology)	1,64
QDR1	CA4501	putative antibiotic resistance proteins (by homology)	1,62
GPX2	CA0558	glutathione peroxidase (by homology)	1,55
PPZ1	CA3683	ser/ thr phosphatase required for normal osmoregulation (by homology)	1,55

Umweltinteraktion (14 Gene):

IPF11335	CA0926	member of the phosphate permease family (by homology)	3,25
FRE30.3	CA3416	strong similarity to ferric reductase Fre2p, 3-prime end (by homology)	3,14
FRE30.53	CA3415	strong similarity to ferric reductase, internal fragment (by homology)	2,93
IPF6748	CA3393	unknown function	2,76
ATP4	CA3479	F1F0-ATPase complex, F0 subunit B (by homology)	2,20
IFA2	CA0335	unknown function	2,10
HSP12	CA0627	heat shock protein (by homology)	2,03
IPF9230	CA3810	similar to *S. cerevisiae* Ste3p pheromone a-factor receptor (by homology)	1,86
CDR1	CA6066	multidrug resistance protein (by homology)	1,80
SSK2	CA1205	MAP kinase kinase kinase of the high osmolarity signal transduction pathway (by homology)	1,70
SNQ2	CA3828	multidrug resistance protein (by homology)	1,64
ERK1	CA0722	mitogen-activated protein kinase (FUS3 homolog)	1,63

FET34.3 EOC	CA1431	iron transport multicopper oxidase, 3-prime end (by homology)	1,54
IPF763	CA5502	putative transcription factor with a Cys4-zinc finger (by homology)	1,54

Zellschicksal (17 Gene):

IPF6748	CA3393	unknown function	2,76
IPF643	CA6009	similar to *S. cerevisiae* Ptp3p protein tyrosine phosphatase (by homology)	2,29
GFA1	CA4016	glutamine: fructose-6-phosphate amidotransferase	2,10
IFA2	CA0335	unknown function	2,10
EXG1	CA0822	glucan 1,3-beta-glucosidase	2,03
ECM331	CA2181	involved in cell wall biogenesis and architecture (by homology)	2,03
IPF9230	CA3810	similar to *S. cerevisiae* Ste3p pheromone a-factor receptor (by homology)	1,86
RBT4	CA0104	repressed by Tup1 protein	1,79
IPF6796	CA2505	unknown function	1,73
GLC7	CA3224	ser/ thr phosphoprotein phosphatase 1 (by homology)	1,65
MYO2	CA5247	Myosin heavy chain (by homology)	1,64
ERK1	CA0722	mitogen-activated protein kinase (FUS3 homolog)	1,63
PLC1	CA2448	1-phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate phosphodiesterase	1,61
IPF6003	CA1345	similar to *S. cerevisiae* Msb2p multicopy suppressor of a CDC24 bud emergence defect (by homology)	1,60
IPF763	CA5502	putative transcription factor with a Cys4- zinc finger (by homology)	1,54
CHS2	CA5537	chitin synthase	1,53
CDC11	CA2610	septin by homology	1,52

Zelldifferenzierung (9 Gene):

PHR1	CA4857	GPI-anchored pH responsive glycosyl transferase	2,44
IPF10919	CA2625	similar to Flo1p (by homology)	1,96
YKE2.3	CA3842	gim complex component, 3-prime end (by homology)	1,78
SSK2	CA1205	MAP kinase kinase kinase of the high osmolarity signal transduction pathway (by homology)	1,70
MYO2	CA5247	myosin heavy chain (by homology)	1,64
PHR2	CA3867	pH-regulated protein 2	1,62
PLC1	CA2448	1-phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate phosphodiesterase	1,61
ECM41.3	CA2386	involved in cell wall biogenesis and architecture, 3-prime end (by homology)	1,55
IPF2485	CA5827	unknown function	1,54

Zelluläre Bestimmung (77 Gene):

RPP2	CA5125	acidic ribosomal protein by homology	7,32
PET9	CA5388	ADP/ ATP carrier protein (by homology)	4,94
IPF1445	CA4908	similar to *S. cerevisiae* Apc1p subunit of anaphase-promoting complex	4,69
ALS1.3 EOC	CA0316	agglutinin-like protein, 3-prime end	3,52
CDC22.3 EOC	CA1828	DNA Polymerase III, 3-prime end	3,37
NUP2.3 EOC	CA3476	nucleoporine involved in nuclear protein export, 3-prime end (by homology)	3,28
ALS4.3F	CA1528	agglutinin-like protein, 3-prime end	3,17
IRR1.3F	CA5355	cohesin complex subunit, 3-prime end (by homology)	3,11
HWP1	CA2825	hyphal wall protein	2,99
IPF1222	CA4836	similar to superoxide dismutase (by homology)	2,80
SEC61	CA3197	ER protein-translocation complex subunit	2,76

PHR1	CA4857	GPI-anchored pH responsive glycosyl transferase	2,44
PCK1	CA5857	phosphoenolpyruvate carboxykinase	2,36
IPF11589	CA3177	similar to *S. cerevisiae* Pho13p 4-nitrophenyl-phosphatase	2,31
RGT1	CA1172	regulator of glucose-induced genes (by homology)	2,26
ATP4	CA3479	F1F0-ATPase complex, F0 subunit B (by homology)	2,20
PHO11	CA0616	secreted acid phosphatase	2,18
GAL7	CA4044	UDP-glucose-hexose-1-phosphate uridylyltransferase (by homology)	2,15
GFA1	CA4016	glutamine:fructose-6-phosphate amidotransferase	2,10
IFA2	CA0335	unknown function	2,10
MTR2.3	CA5501	mRNA transport protein, 3-prime end (by homology)	2,07
EXG1	CA0822	glucan 1,3-beta-glucosidase	2,03
MNT1	CA3469	mannosyltransferase involved in n-linked and o-linked glycosylation	1,99
LAP42	CA4274	aminopeptidase yscI precursor, vacuolar (by homology)	1,98
SOD22.3F	CA5588	superoxide dismutase, 3-prime end (by homology)	1,95
IPF17676	CA0411	similar to *S. cerevisiae* Cst13p involved in chromosome stability (by homology)	1,95
ALP1	CA3334	amino-acid permease (by homology)	1,93
IPF5866	CA2133	unknown function	1,93
YOX1	CA5202	similar to homoeodomain protein (by homology)	1,93
ADH5	CA2391	probable alcohol dehydrogenase (by homology)	1,91
PMI40	CA0988	mannose-6-phosphate isomerase (phosphomannose isomerase) (pmi) (phosphohexomutase)	1,89
IPF4055	CA4493	unknown function	1,88
IPF9230	CA3810	similar to *S. cerevisiae* Ste3p pheromone a-factor receptor (by homology)	1,86
IPF20135	CA3523	unknown function	1,86
CRH11	CA0375	probable membrane protein (by homology)	1,85
SPC3	CA3600	signal peptidase subunit (by homology)	1,82
DPM1	CA3899	dolichol-phosphate (beta-D) mannosyltransferase 1 by homology	1,81
CDR1	CA6066	multidrug resistance protein (by homology)	1,80
MET15	CA2565	O-acetylhomoserine O-acetylserine sulphydrylase	1,79
KAR2	CA0915	dnaK-type molecular chaperone (by homology)	1,79
YKE2.3	CA3842	gim complex component, 3-prime end (by homology)	1,78
IPF6796	CA2505	unknown function	1,73
CPR3	CA3978	cyclophilin (peptidylprolyl isomerase), mitochondrial (by homology)	1,73
IPF11713	CA1330	unknown function	1,72
TRF4	CA4054	topoisomerase I-related protein	1,71
MRF1	CA1333	mitochondrial respiratory function protein (by homology)	1,71
IPF8854	CA0854	similar to *S. cerevisiae* Mnn1p alpha-1,3-mannosyltransferase (by homology)	1,70
ARD8	CA3288	D-arabinitol dehydrogenase	1,68
GLC7	CA3224	ser/ thr phosphoprotein phosphatase 1 (by homology)	1,65
CDC5	CA2986	cell-cycle protein kinase (by homology)	1,65
SEC13	CA3392	protein transport protein	1,65
PRP31	CA0224	pre-mRNA splicing protein (by homology)	1,65
MYO2	CA5247	myosin heavy chain (by homology)	1,64
SNQ2	CA3828	multidrug resistance protein (by homology)	1,64
ERK1	CA0722	mitogen-activated protein kinase (FUS3 homolog)	1,63
PHR2	CA3867	pH-regulated protein 2	1,62
IPF6003	CA1345	similar to *S. cerevisiae* Msb2p multicopy suppressor of a CDC24 bud emergence defect (by homology)	1,60
SEC18.5F	CA5270	vesicular fusion protein by homology, 5-prime end	1,58
BGL21	CA1541	endo-beta-1,3-glucanase (by homology)	1,57
SEC24	CA0958	component of COPII coat of ER-Golgi vesicles(by homology)	1,57
DLD1	CA4905	D-lactate ferricytochrome C oxidoreductase (by homology)	1,56
IPF19753	CA2159	similar to *S. cerevisiae* Tfb1p transcription initiation factor (by	1,56

		homology)	
IPF11900	CA3730	unknown function	1,56
GAL10	CA4041	UDP-glucose 4-epimerase by homology	1,55
IPF907	CA5985	unknown function	1,55
IPF9169	CA2696	similar to *S. cerevisiae* Bur6p functional homolog of human NC2alpha (by homology)	1,55
TYE7	CA3707	basic helix-loop-helix transcription factor by homology	1,54
FET34.3 EOC	CA1431	iron transport multicopper oxidase, 3-prime end (by homology)	1,54
IPF763	CA5502	putative transcription factor with a Cys4-zinc finger (by homology)	1,54
CHS2	CA5537	chitin synthase	1,53
IPF20016	CA4514	similar to *S. cerevisiae* Sec63p ER protein-translocation complex subunit (by homology)	1,53
CDC11	CA2610	septin by homology	1,52
YPT32	CA0470	small GTP-binding protein essential for Golgi function (by homology)	1,52
IPF4991	CA1075	putative membrane protein	1,52
PSD2.5F	CA1012	phosphatidylserine decarboxylase 2, 5-prime end (by homology)	1,52
ERV25	CA5707	component of COPII-coated vesicles (by homology)	1,51
GOG5	CA2980	GDP-mannose transporter (by homology)	1,51

Transporterleichterung (18 Gene):

PET9	CA5388	ADP/ ATP carrier protein (by homology)	4,94
IPF11335	CA0926	member of the phosphate permease family (by homology)	3,25
SEC61	CA3197	ER protein-translocation complex subunit	2,76
IFC4	CA0442	unknown function	2,25
ATP4	CA3479	F1F0-ATPase complex, F0 subunit B (by homology)	2,20
SNG2	CA2618	drug transporter (by homology)	2,14
ALP1	CA3334	amino-acid permease (by homology)	1,93
HOL3	CA0459	member of major facilitator superfamily multidrug-resistance protein subfamily 1 (by homology)	1,92
IPF16273	CA0793	similar to *S. cerevisiae* Dtr1p dityrosine transporter (by homology)	1,86
CDR1	CA6066	multidrug resistance protein (by homology)	1,80
KAR2	CA0915	dnaK-type molecular chaperone (by homology)	1,79
SNQ2	CA3828	multidrug resistance protein (by homology)	1,64
QDR1	CA4501	putative antibiotic resistance proteins (by homology)	1,62
IPF11900	CA3730	unknown function	1,56
IPF13485	CA1019	unknown function	1,56
FET34.3EOC	CA1431	iron transport multicopper oxidase, 3-prime end (by homology)	1,54
IPF20016	CA4514	similar to *S. cerevisiae* Sec63p ER protein-translocation complex subunit (by homology)	1,53
GOG5	CA2980	GDP-mannose transporter (by homology)	1,51

Virulenzeigenschaften (5 Gene):

ALS1.3 EOC	CA0316	agglutinin-like protein, 3-prime end	3,52
ALS4.3F	CA1528	agglutinin-like protein, 3-prime end	3,17
FRE30.3	CA3416	strong similarity to ferric reductase Fre2p, 3-prime end (by homology)	3,14
FRE30.53	CA3415	strong similarity to ferric reductase, internal fragment (by homology)	2,93
ALS12.3F	CA0413	agglutinin-like protein, 3-prime end	2,80

Unklassifizierte- und unbekannte Proteine (72 Gene):

DDR48	CA4336	stress protein (by homology)	8,77

IPF7666	CA1120	unknown function	6,28
IPF5131	CA5134	unknown function	6,20
IPF10564	CA3328	unknown function	5,11
NOG1	CA5682	nucleolar G-protein (by homology)	4,35
IPF1252	CA5664	conserved hypothetical protein	3,94
IPF1341	CA5112	similarity to mucin proteins (by homology)	3,88
IPF10510	CA1265	unknown function	3,78
IPF6755	CA3388	unknown function	3,59
IPF3229	CA3477	unknown function	3,49
IPF1387	CA5094	unknown function	3,45
IPF17186	CA0828	unknown function	2,96
IPF4782	CA2327	probable membrane protein (by homology)	2,92
IPF13508	CA1305	unknown function	2,79
RTA2	CA3607	unknown function	2,70
IPF7109	CA5650	unknown function	2,63
IPF8535	CA2156	unknown function	2,55
IPF16253	CA0782	unknown function	2,52
IPF7726	CA4735	unknown function	2,44
IPF5015	CA4085	unknown function	2,44
ECE1	CA1402	cell elongation protein	2,44
IPF8495	CA5061	unknown function	2,41
IPF2532	CA0356	unknown function	2,37
IPF2535	CA0355	unknown function	2,34
RBT1	CA2830	repressed by Tup1 protein 1	2,25
IPF652	CA6006	unknown function	2,11
IPF2275	CA4262	unknown function	2,09
IPF300	CA5470	unknown function	2,07
IPF15870	CA2769	unknown function	2,07
SSR1	CA5213	secretory stress response protein 1 (by homology)	2,03
IPF3506	CA5953	unknown function	2,00
IPF10055	CA1624	unknown function	1,97
IPF9211.5F	CA3142	unknown function, 3-prime end	1,94
POX18	CA1711	lipid-transfer protein (by homology)	1,88
KRE1	CA2589	secretory pathway protein	1,81
IPF4724	CA3253	unknown function	1,79
CRN1.3F	CA4940	actin-binding protein, 3-prime end (by homology)	1,79
IPF10662	CA3827	unknown function	1,77
IPF3964	CA4111	unknown function	1,77
IPF1631	CA4888	unknown function	1,77
IPF8038	CA4560	unknown function	1,76
IPF19568	CA4870	unknown function	1,76
IPF2690.5F	CA5811	unknown function, 5-prime end	1,76
IPF230	CA5444	unknown function	1,74
IPF19749	CA1988	unknown function	1,73
RTA3	CA3606	unknown function	1,72
IPF14510	CA1779	unknown function	1,70
IPF5556	CA1363	acid phosphatase (by homology)	1,70
IPF17652.3	CA0037	reverse transcriptase, 3-prime end (by homology)	1,69
IPF2690.3F	CA5812	unknown function, 3-prime end	1,68
GLC7	CA3224	ser/ thr phosphoprotein phosphatase 1 (by homology)	1,65
IPF14618	CA0286	unknown function	1,65
IPF19801	CA4566	unknown function	1,65
IPF677	CA5994	unknown function	1,65
IPF946	CA5968	unknown function	1,64
IPF17289	CA3422	unknown function	1,63
IPF1566	CA5412	unknown function	1,61
IPF5806	CA4216	unknown function	1,60
IPF5981	CA5547	similar to *S. cerevisiae* Gin3p (by homology)	1,59
IPF351	CA5868	unknown function	1,58

IPF618	CA6022	GPI-anchored cell surface protein (by homology)	1,57
IPF5795	CA4213	unknown function	1,56
IPF9116	CA2994	unknown function	1,56
IPF4213	CA4702	unknown function	1,55
IPF564	CA5596	unknown function	1,55
IPF918	CA5980	unknown function	1,55
IPF5918	CA0669	unknown function	1,54
IPF16901	CA2020	unknown function	1,54
IPF3342	CA4775	unknown function	1,52
IFA12	CA2755	unknown function	1,52
ERC4	CA6037	ethionine resistance protein (by homology)	1,51
IPF1164	CA4810	subunit NUHM of NADH: ubiquinone oxidoreductase (by homology)	1,51

Gen-Name	Gen-Nummer	Beschreibung (nach CandidaDB: http://genolist.pasteur.fr/CandidaDB/)	-fache Regulation

Schwächer exprimierte Gene: *pmt1*Δ/*pmt1*Δ – Wildtyp (61 Gene):

Metabolismus (26 Gene):

PMT1	CA4424	mannosyltransferase;	0,11
CDR4	CA3895	multidrug resistance protein	0,37
IPF7289	CA3878	similar to *S. cerevisiae* Upc2p RNA polymerase II transcription factor	0,41
HMG1	CA1628	3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase 1 (by homology)	0,48
IPF7602	CA1761	oxidoreductase (by homology)	0,48
LYS4	CA4869	homoaconitate hydratase	0,49
PHO84	CA0083	high-affinity inorganic phosphate/ H^+ symporter by homology	0,49
ERG1	CA1353	squalene epoxidase	0,51
APT1	CA4551	adenine phosphoribosyltransferase	0,53
GDH3	CA1579	NADP-glutamate dehydrogenase (by homology)	0,54
IPF19766	CA2746	unknown function	0,54
ERG16	CA1387	cytochrome P450 lanosterol 14a-demethylase	0,55
ERG9	CA1676	farnesyl-diphosphate farnesyltransferase	0,55
IFE2	CA2075	unknown function	0,55
IPF4553	CA2167	unknown function	0,56
URA6	CA1763	uridine-monophosphate kinase(by homology)	0,58
ERG6	CA4005	sterol transmethylase	0,59
ERG3	CA1956	C5,6 desaturase	0,61
PLB4.5F	CA0185	phospholipase, 5-prime end (by homology)	0,62
PHO84.3EOC	CA1782	inorganic phosphate transport protein, 3-prime end (by homology)	0,63
GPM2	CA2855	phosphoglycerate mutase (by homology)	0,64
ERG251	CA0875	C-4 sterol methyl oxidase (by homology)	0,65
PLB4.3F	CA0186	phospholipase, 3-prime end (by homology)	0,65
SDH12	CA2470	succinate dehydrogenase (by homology)	0,65
PMT1	CA4424	mannosyltransferase	0,11
CDR4	CA3895	multidrug resistance protein	0,37

Energie (3 Gene):

GPM2	CA2855	phosphoglycerate mutase (by homology)	0,64
CYT1	CA0864	cytochrome-c1 (by homology)	0,64
SDH12	CA2470	succinate dehydrogenase (by homology)	0,65

Zellzyklus und DNA- Prozessierung (5 Gene):

TPD3	CA5896	ser/ thr protein phosphatase (by homology)	0,52
IPF3121	CA4651	unknown function	0,58
IPF9057	CA2649	unknown function	0,65
CDC54	CA2176	cell division control protein (by homology)	0,66
IPF4291	CA4251	unknown function	0,66

Transkription (8 Gene):

IPF7289	CA3878	similar to *S. cerevisiae* Upc2p RNA polymerase II transcription	0,41

		factor	
TPD3	CA5896	ser/ thr protein phosphatase (by homology)	0,52
GAR1	CA1789	nucleolar rRNA processing protein (by homology)	0,55
IPF4553	CA2167	unknown function	0,56
IPF3121	CA4651	unknown function	0,58
RPC11	CA5513	RNA polymerase III C11 subunit (by homology)	0,60
HSH49	CA3579	*C. albicans* spliceosome-associated essential protein	0,65
IPF4253	CA4006	unknown function	0,66

Proteinbiosynthese (4 Gene):

MRPL16	CA0910	ribosomal protein	0,54
IPF3698	CA5056	similar to *S. cerevisiae* Rsm24p mitochondrial ribosomal protein (S24) (by homology)	0,65
RPL39.3	CA4225	ribosomal protein L39, 3-prime end	0,65
IPF8752	CA4226	similar to *S. cerevisiae* Mrpl24p ribosomal protein of the large subunit, mitochondrial (by homology)	0,66

Proteinbestimmung (Faltung, Modifikation, Schicksal) (4 Gene):

PMT1	CA4424	mannosyltransferase	0,11
ANP1	CA0528	golgi mannosyltransferase (by homology)	0,55
CBP3	CA2518	involved in cytochrome-c reductase assembly (by homology)	0,62
PET117	CA3013	cytochrome c oxidase assembly factor (by homology)	0,63

Zellulärer Transport und Transportmechanismen (2 Gene):

PHO84	CA0083	high-affinity inorganic phosphate/H+ symporter by homology	0,49
PHO84.3EOC	CA1782	inorganic phosphate transport protein, 3-prime end (by homology)	0,63

Zelluläre Überlebensmechanismen (2 Gene):

CDR4	CA3895	multidrug resistance protein	0,37
ERG16	CA1387	cytochrome P450 lanosterol 14a-demethylase	0,55

Umweltinteraktion (3 Gene):

CDR4	CA3895	multidrug resistance protein	0,37
PHO84	CA0083	high-affinity inorganic phosphate/ H^+ symporter by homology	0,49
PHO84.3EOC	CA1782	inorganic phosphate transport protein, 3-prime end (by homology)	0,63

Zellschicksal (1 Gen):

TPD3	CA5896	ser/ thr protein phosphatase (by homology)	0,52

Zelldifferenzierung (1 Gen):

IPF19766	CA2746	unknown function	0,54

Zelluläre Bestimmung (29 Gene):

PMT1	CA4424	mannosyltransferase	0,11
CDR4	CA3895	multidrug resistance protein	0,37
HMG1	CA1628	3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase 1 (by homology)	0,48
LYS4	CA4869	homoaconitate hydratase	0,49
PHO84	CA0083	high-affinity inorganic phosphate/ H^+ symporter by homology	0,49
ERG1	CA1353	squalene epoxidase	0,51

GDH3	CA1579	NADP-glutamate dehydrogenase (by homology)	0,54
MRPL16	CA0910	ribosomal protein	0,54
ERG16	CA1387	cytochrome P450 lanosterol 14a-demethylase	0,55
ERG9	CA1676	farnesyl-diphosphate farnesyltransferase	0,55
ANP1	CA0528	golgi mannosyltransferase (by homology)	0,55
GAR1	CA1789	nucleolar rRNA processing protein (by homology)	0,55
IPF3121	CA4651	unknown function	0,58
URA6	CA1763	uridine-monophosphate kinase(by homology)	0,58
ERG6	CA4005	sterol transmethylase	0,59
ERG3	CA1956	C5,6 desaturase	0,61
CBP3	CA2518	involved in cytochrome-c reductase assembly (by homology)	0,62
PHO84.3 EOC	CA1782	inorganic phosphate transport protein, 3-prime end (by homology)	0,63
PET117	CA3013	cytochrome c oxidase assembly factor (by homology)	0,63
GPM2	CA2855	phosphoglycerate mutase (by homology)	0,64
CYT1	CA0864	cytochrome-c1 (by homology)	0,64
SDH12	CA2470	succinate dehydrogenase (by homology)	0,65
IPF9057	CA2649	unknown function	0,65
ERG251	CA0875	C-4 sterol methyl oxidase (by homology)	0,65
RPL39.3	CA4225	ribosomal protein L39, 3-prime end	0,65
HSH49	CA3579	*C. albicans* spliceosome-associated essential protein	0,65
CDC54	CA2176	cell division control protein (by homology)	0,66
IPF4291	CA4251	unknown function	0,66
IPF8752	CA4226	similar to *S. cerevisiae* Mrpl24p ribosomal protein of the large subunit, mitochondrial (by homology)	0,66

Transporterleichterung (3 Gene):

CDR4	CA3895	multidrug resistance protein	0,37
PHO84	CA0083	high-affinity inorganic phosphate/ H^+ symporter by homology	0,49
PHO84.3 EOC	CA1782	inorganic phosphate transport protein, 3-prime end (by homology)	0,63

Virulenzeigenschaften (2 Gene):

PLB4.5F	CA0185	phospholipase, 5-prime end (by homology)	0,62
PLB4.3F	CA0186	phospholipase, 3-prime end (by homology)	0,65

Unklassifizierte- und unbekannte Proteine (20 Gene):

IPF14109	CA0380	unknown function	0,31
IPF6518	CA2302	unknown function	0,31
IPF17840	CA0059	unknown function	0,35
IPF20169	CA4381	unknown function	0,49
RBT5	CA2558	repressed by Tup1 protein 5	0,52
IPF20163	CA4135	unknown function	0,53
IPF14850	CA0046	hypothetical protein	0,59
IPF4247	CA4009	unknown function	0,62
IPF635	CA6013	unknown function	0,62
IPF10493.5 EOC	CA0831	unknown function	0,63
IPF13755	CA2412	unknown function	0,63
IPF7525	CA4188	unknown function	0,63
POL0	CA2217	pol polyprotein, reverse transcripase	0,63
IPF4905	CA0899	unknown function	0,65
IFQ3	CA2597	unknown function	0,65
IPF6298	CA2947	unknown function	0,65
IPF7400	CA0984	unknown function	0,65
URA1	CA4745	dihydroorotate dehydrogenase	0,66
VTC4	CA0697	putative polyphosphate synthetase (by homology)	0,66

IPF7403	CA2710	unknown function	0,66

Tab. 8.3: **Regulierte Gene in der *dom34*Δ/*dom34*Δ *pmt1*Δ/*pmt1*Δ-Mutante im Vergleich zum Wildtyp-Stamm CAF2-1. Die Zellen wurden auf eine $OD_{600\ nm}$ von 0,5 in YPD-Medium bei 30 °C angezogen. Die Einteilung in die unten aufgeführten funktionellen 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/)	-fache Regulation

Stärker exprimierte Gene: *dom34*Δ/*dom34*Δ *pmt1*Δ/*pmt1*Δ – Wildtyp (9 Gene):

Metabolismus (1 Gen):

FDH11.3	CA6000	glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase, 3-prime end (by homology)	1,57

Energie (1 Gen):

ATP1. EXON2	CA4456	F1F0-ATPase complex, F1 alpha subunit, exon 2	2,26

Zellzyklus und DNA- Prozessierung (2 Gene):

CDC16	CA2462	subunit of anaphase-promoting complex (by homology)	1,72
IPF8741.3F	CA1551	unknown function, 3-prime end	1,59

Transkription (3 Gene):

IPF14682	CA5657	putative transcription factor (by homology)	1,87
IPF16051	CA0577	unknown function	1,84
IPF8741.3F	CA1551	unknown function, 3-prime end	1,59

Proteinbestimmung (Faltung, Modifikation, Schicksal) (1 Gene):

CDC16	CA2462	subunit of anaphase-promoting complex (by homology)	1,72

Zellulärer Transport und Transportmechanismen (1 Gen):

ATP1. EXON2	CA4456	F1F0-ATPase complex, F1 alpha subunit, exon 2	2,26

Zelluläre Überlebensmechanismen (2 Gene):

IPF14682	CA5657	putative transcription factor (by homology)	1,87
FDH11.3	CA6000	glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase, 3-prime end (by homology)	1,57

Umweltinteraktion (2 Gene):

ATP1. EXON2	CA4456	F1F0-ATPase complex, F1 alpha subunit, exon 2	2,26
IPF14682	CA5657	putative transcription factor (by homology)	1,87

Zelluläre Bestimmung (4 Gene):

ATP1. EXON2	CA4456	F1F0-ATPase complex, F1 alpha subunit, exon 2	2,26
CDC16	CA2462	subunit of anaphase-promoting complex (by homology)	1,72
IPF17402	CA1488	unknown function	1,59
IPF8741.3F	CA1551	unknown function, 3-prime end	1,59

Transporterleichterung (1 Gen):

ATP1. EXON2	CA4456	F1F0-ATPase complex, F1 alpha subunit, exon 2	2,26

Unklassifizierte- und unbekannte Proteine (3 Gene):

IPF17681	CA2899	similar to *S. cerevisiae* Rsm23p involved in mitochondrial function (by homology)	1,73
IPF17402	CA1488	unknown function	1,59
IPF14990	CA3049	unknown function	1,50

Gen-Name	Gen-Nummer	Beschreibung (nach CandidaDB: http://genolist.pasteur.fr/CandidaDB/)	-fache Regulation

Schwächer exprimierte Gene:
*dom34*Δ/*dom34*Δ *pmt1*Δ/*pmt1*Δ – Wildtyp (109 Gene):

Metabolismus (19 Gene):

TRR1	CA3059	thioredoxin reductase (by homology)	0,55
IPF4536	CA4670	unknown function	0,56
LYS14	CA0404	transcription factor involved in lysine biosynthesis (by homology)	0,56
ALG8	CA3463	glucosyltransferase (by homology)	0,57
IPF7686	CA3169	putative mitochondrial phosphate carrier protein (by homology)	0,57
PLC1	CA2448	1-phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate phosphodiesterase	0,58
IPF2965	CA3061	unknown function	0,59
APA2	CA2765	ATP adenylyltransferase II (by homology)	0,59
CDC8	CA0569	dTMP kinase (by homology)	0,59
RGT1	CA1172	regulator of glucose-induced genes (by homology)	0,60
MIG1	CA1593	transcriptional regulator	0,60
IPF13176.3	CA2964	ornithine carbamoyltransferase, 3-prime end (by homology)	0,61
GRP6	CA0672	putative reductase (by homology)	0,61
OCH1	CA5690	Alpha-1,6-mannosyltransferase (by homology)	0,62
BTS1	CA4277	geranylgeranyl diphosphate synthase (by homology)	0,64
MNT1	CA3469	mannosyltransferase involved in n-linked and o-linked glycosylation	0,65
URA5	CA2056	orotate phosphoribosyltransferase (by homology)	0,65
IPF11777	CA0777	unknown function	0,66

Energie (1 Gen):

IPF17050	CA0925	unknown function	0,63

Zellzyklus und DNA- Prozessierung (12 Gene):

IPF4972	CA0461	unknown function	0,54
RFC1	CA4578	DNA replication factor C (by homology)	0,54
IPF9141	CA0964	similar to *S. cerevisiae* Ctf4p DNA-directed DNA polymerase alpha-binding protein (by homology)	0,55
DOC1	CA0002	component of the anaphase promoting complex (by homology)	0,56
RPT1	CA4064	26S protease regulatory subunit 7 (by homology)	0,57
IPF7841	CA2931	similar to *S. cerevisiae* Ndc1p nuclear envelope protein (by homology)	0,57
PLC1	CA2448	1-phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate phosphodiesterase	0,58
SUN42	CA5232	putative cell wall beta-glucosidase (by homology)	0,63
IPF112	CA6115	unknown function	0,64
MEC3	CA2321	G2-specific checkpoint protein (by homology)	0,65
TFB2	CA2877	transcription/ repair factor (by homology)	0,65
PAT1	CA1523	topoisomerase II-associated protein (by homology)	0,66

Transkription (15 Gene):

MED8	CA2328	transcriptional regulation mediator (by homology);	0,51
NCB2	CA3794	transcriptional repressor by homology	0,52
LYS14	CA0404	transcription factor involved in lysine biosynthesis (by	0,56

		homology)	
BRF1	CA4090	TFIIIB subunit	0,58
IPF11215	CA3790	unknown function	0,59
RGT1	CA1172	regulator of glucose-induced genes (by homology)	0,60
MIG1	CA1593	transcriptional regulator	0,60
IPF6231	CA4602	unknown function	0,60
IPF7575	CA1097	putative endo-exonuclease (by homology)	0,63
YOX1	CA5202	similar to homoeodomain protein (by homology)	0,63
TPK1	CA2355	cAMP-dependent protein kinase 2 (by homology)	0,64
TFB2	CA2877	transcription/repair factor (by homology)	0,65
IPF11777	CA0777	unknown function	0,66
PAT1	CA1523	topoisomerase II-associated protein (by homology)	0,66
MTR2.3	CA5501	mRNA transport protein, 3-prime end (by homology)	0,66

Proteinbiosynthese (3 Gene):

MRPL19	CA3009	ribosomal protein (by homology)	0,59
RPS15.3	CA6123	40S ribosomal protein S15, 3-prime end (by homology)	0,61
IPF10558	CA3239	unknown function	0,64

Proteinbestimmung (Faltung, Modifikation, Schicksal) (7 Gene):

DOC1	CA0002	component of the anaphase promoting complex (by homology)	0,56
ALG8	CA3463	glucosyltransferase (by homology)	0,57
RPT1	CA4064	26S protease regulatory subunit 7 (by homology)	0,57
SNC2. EXON2	CA5257	strong similarity to synaptobrevin, exon 2 (by homology)	0,59
IPF15606	CA0535	similar to *S. cerevisiae* Erd1p required for retention of luminal ER proteins	0,59
OCH1	CA5690	Alpha-1,6-mannosyltransferase (by homology)	0,62
VPS35	CA4565	protein-sorting protein, vacuolar (by homology)	0,62
SPC3	CA3600	signal peptidase subunit (by homology)	0,62
IPF10558	CA3239	unknown function	0,64
MNT1	CA3469	mannosyltransferase involved in n-linked and o-linked glycosylation	0,65
IPF1428	CA4914	similar to ubiquitination protein Bul1p (by homology)	0,65
UBP2	CA0476	ubiquitin-specific proteinase (by homology)	0,65
IPF12403	CA3805	unknown function	0,66
SEC61	CA3197	ER protein-translocation complex subunit	0,66

Zellulärer Transport und Transportmechanismen (7 Gene):

IPF7686	CA3169	putative mitochondrial phosphate carrier protein (by homology)	0,57
TRS23	CA4042	targeting and fusion of ER to golgi transport vesicles by homology	0,58
SNC2. EXON2	CA5257	strong similarity to synaptobrevin, exon 2 (by homology)	0,59
IPF2485	CA5827	unknown function	0,61
VPS35	CA4565	protein-sorting protein, vacuolar (by homology)	0,62
MYO2	CA5247	myosin heavy chain (by homology)	0,63
SEC24	CA0958	component of COPII coat of ER-Golgi vesicles(by homology)	0,63
SYS1	CA5279	similar to ypt6 suppressor in S. cerevisae (by homology)	0,65
SEC61	CA3197	ER protein-translocation complex subunit	0,66
MTR2.3	CA5501	mRNA transport protein, 3-prime end (by homology)	0,66
IPF11873	CA3425	similar to *S. cerevisiae* Swa2p clathrin-binding protein required for normal clathrin function and for uncoating of clathrin-coated vesicles (by homology)	0,67

Zelluläre Kommunikation/ Signaltransduktion (1 Gen):

PLC1	CA2448	1-phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate phosphodiesterase	0,58

Zelluläre Überlebensmechanismen (2 Gene):

IPF16273	CA0793	similar to *S. cerevisiae* Dtr1p dityrosine transporter (by homology)	0,60
IPF1126	CA5781	unknown function	0,61

Umweltinteraktion (5 Gene):

IPF20009	CA4130	unknown function	0,59
CCC2	CA1655	putative copper-transporting ATPase (by homology)	0,60
IPF1126	CA5781	unknown function	0,61
IPF4322	CA2524	unknown function	0,64
TPK1	CA2355	cAMP-dependent protein kinase 2 (by homology)	0,64

Zellschicksal (4 Gene):

PLC1	CA2448	1-phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate phosphodiesterase	0,58
SUN42	CA5232	putative cell wall beta-glucosidase (by homology)	0,63
SVL3	CA0570	involved in vacuole function (by homology)	0,63
MYO2	CA5247	myosin heavy chain (by homology)	0,63

Zelluläre Bestimmung (43 Gene):

MED8	CA2328	transcriptional regulation mediator (by homology)	0,51
NCB2	CA3794	transcriptional repressor by homology	0,52
IPF4972	CA0461	unknown function	0,54
RFC1	CA4578	DNA replication factor C (by homology)	0,54
IPF9141	CA0964	similar to *S.s cerevisiae* Ctf4p DNA-directed DNA polymerase alpha-binding protein (by homology)	0,55
IPF4536	CA4670	unknown function	0,56
LYS14	CA0404	transcription factor involved in lysine biosynthesis (by homology)	0,56
ALG8	CA3463	glucosyltransferase (by homology)	0,57
RPT1	CA4064	26S protease regulatory subunit 7 (by homology)	0,57
IPF7841	CA2931	similar to *S. cerevisiae* Ndc1p nuclear envelope protein (by homology)	0,57
TRS23	CA4042	targeting and fusion of ER to golgi transport vesicles by homology	0,58
BRF1	CA4090	TFIIIB subunit	0,58
CDC8	CA0569	dTMP kinase (by homology)	0,59
SNC2. EXON2	CA5257	strong similarity to synaptobrevin, exon 2 (by homology)	0,59
IPF15606	CA0535	similar to *S. cerevisiae* Erd1p required for retention of luminal ER proteins	0,59
MRPL19	CA3009	ribosomal protein (by homology)	0,59
IPF11215	CA3790	unknown function	0,59
RGT1	CA1172	regulator of glucose-induced genes (by homology)	0,60
MIG1	CA1593	transcriptional regulator	0,60
CCC2	CA1655	putative copper-transporting ATPase (by homology)	0,60
IPF13176.3	CA2964	ornithine carbamoyltransferase, 3-prime end (by homology)	0,61
IPF1126	CA5781	unknown function	0,61
RPS15.3	CA6123	40S ribosomal protein S15, 3-prime end (by homology)	0,61
IPF4160	CA5804	unknown function	0,61
OCH1	CA5690	Alpha-1,6-mannosyltransferase (by homology)	0,62
VPS35	CA4565	protein-sorting protein, vacuolar (by homology)	0,62
SPC3	CA3600	signal peptidase subunit (by homology)	0,62
IPF14545	CA2314	unknown function	0,62
MYO2	CA5247	myosin heavy chain (by homology)	0,63

SEC24	CA0958	component of COPII coat of ER-Golgi vesicles(by homology)	0,63
IPF7575	CA1097	putative endo-exonuclease (by homology)	0,63
YOX1	CA5202	similar to homoeodomain protein (by homology)	0,63
IPF112	CA6115	unknown function	0,64
IPF10558	CA3239	unknown function	0,64
ARP8	CA1164	actin-related protein (by homology)	0,64
MNT1	CA3469	mannosyltransferase involved in n-linked and o-linked glycosylation	0,65
TFB2	CA2877	transcription/ repair factor (by homology)	0,65
UBP2	CA0476	ubiquitin-specific proteinase (by homology)	0,65
PEX11	CA0310	peroxisomal membrane protein - peroxin by homology	0,65
IPF11777	CA0777	unknown function	0,66
PAT1	CA1523	topoisomerase II-associated protein (by homology)	0,66
SEC61	CA3197	ER protein-translocation complex subunit	0,66
MTR2.3	CA5501	mRNA transport protein, 3-prime end (by homology)	0,66

Transporterleichterung (5 Gene):

IPF7686	CA3169	putative mitochondrial phosphate carrier protein (by homology)	0,57
IPF16273	CA0793	similar to *S. cerevisiae* Dtr1p dityrosine transporter (by homology)	0,60
CCC2	CA1655	putative copper-transporting ATPase (by homology)	0,60
IPF4322	CA2524	unknown function	0,64
SEC61	CA3197	ER protein-translocation complex subunit	0,66

Unklassifizierte- und unbekannte Proteine (46 Gene):

IPF3192	CA3490	unknown function	0,47
IPF4305	CA4244	unknown function	0,52
IPF16652	CA4515	unknown function	0,53
IPF13506.3	CA1307	unknown function	0,54
IPF12498.3F	CA0834	unknown function	0,55
IPF3539	CA2617	unknown function	0,55
IPF5500	CA2436	unknown function	0,56
LYS14	CA0404	transcription factor involved in lysine biosynthesis (by homology)	0,56
CCT2	CA3174	chaperonin of the TCP1 ring complex,cytosolic (by homology to *S. cerevisiae*)	0,57
IPF14861	CA0755	unknown function	0,57
IPF14603	CA0785	unknown function	0,58
IPF10668	CA2044	unknown function	0,58
IPF4325	CA0212	unknown function	0,58
IPF6878	CA4129	unknown function	0,58
IPF13508	CA1305	unknown function	0,59
IPF5369	CA2286	unknown function	0,59
IPF10435	CA3776	unknown function	0,59
IPF3364	CA4787	unknown function	0,59
IPF12501	CA0833	unknown function	0,60
IPF6518	CA2302	unknown function	0,60
IPF12233	CA2458	unknown function	0,60
IPF14487	CA3500	unknown function	0,60
IPF15220	CA0326	unknown function	0,60
IPF3701	CA5055	unknown function	0,61
IPF18586	CA1933	unknown function	0,61
IPF12272	CA1686	unknown function	0,62
IPF12383	CA0887	unknown function	0,63
IPF8069	CA1399	unknown function	0,63
LOC1	CA3997	putative double-stranded RNA-binding protein (by homology)	0,63
IPF18207	CA4516	unknown function	0,63
IPF14663	CA1591	unknown function	0,64

IPF3342	CA4775	unknown function	0,64
IPF19775	CA3065	unknown function	0,64
IPF2527	CA4079	unknown function	0,64
ACF3	CA5091	endo-1,3-beta-glucanase	0,64
IPF3340	CA4773	unknown function	0,65
IPF1072	CA5760	unknown function	0,65
IPF2804	CA5933	unknown function	0,65
IPF2280	CA4264	unknown function	0,65
IPF4328	CA0210	unknown function	0,66
IPF7353	CA2716	unknown function	0,66
IPF2275	CA4262	unknown function	0,66
IPF1531	CA4632	unknown function	0,66
CRN1.3F	CA4940	actin-binding protein, 3-prime end (by homology)	0,66
IPF11777	CA0777	unknown function	0,66
IPF11873	CA3425	similar to *S. cerevisiae* Swa2p clathrin-binding protein required for normal clathrin function and for uncoating of clathrin-coated vesicles (by homology)	0,67

Tab. 8.4: **Alle Gene, welche in mindestens einer der Mutanten eine statistisch signifikante Regulation von ≥2,0 oder ≤0,5 aufwiesen. Die Gruppen der Einteilung wurden anhand des von GeneSpring 7.2 (Silicon Genetics) vorgeschlagenen vertikalen Dendogramms von links nach rechts (A. bis D.) gewählt (Abb. 3.37). Wurden keine Daten erhalten, ist dieses in der Tabelle vermerkt.**

Gen-Name	Gen-Nummer	Beschreibung (nach CandidaDB: http://genolist.pasteur.fr/CandidaDB/)	-fache Regulation			
			dom34Δ	*pmt1Δ*	*dom34Δ pmt1Δ*	
CDR1	CA6066	multidrug resistance protein (by homology)	2,29	1,80	0,97	
RTA3	CA3606	unknown function	2,16	1,72	0,98	
PGA3	CA4836	similar to superoxide dismutase (by homology)	7,36	2,80	1,19	
PHR2	CA3867	pH-regulated protein 2	2,51	1,62	1,05	
ECM331	CA2181	involved in cell wall biogenesis and architecture (by homology)	3,59	2,03	1,09	**A.**
IPF300	CA5470	unknown function	1,96	2,07	1,05	
PHR1	CA4857	GPI-anchored pH responsive glycosyl transferase	2,47	2,44	1,00	
DDR48	CA4336	stress protein (by homology)	7,63	8,77	0,79	
IPF19801	CA4566	unknown function	2,04	1,65	1,29	
IFD4	CA2416	putative aryl-alcohol dehydrogenase (by homology)	3,35	2,02	1,35	
GFA1	CA4016	glutamine:fructose-6-phosphateamidotransferase	2,38	2,10	1,25	
IPF17186	CA0828	unknown function	2,92	2,96	1,56	
PCK1	CA5857	phosphoenolpyruvate carboxykinase	1,54	2,36	1,47	
ALS4.3f	CA1528	agglutinin-like protein, 3-prime end	1,95	3,17	1,71	
FRE30.3f	CA3416	ferric reductase, 5 prime end fragment (by homology)	2,07	3,14	1,53	
FRE30.53f	CA3415	ferric reductase, internal fragment (by homology)	2,11	2,93	1,90	
IPF14682	CA5657	putative transcription factor (by homology)	3,72	1,28	1,87	
BRR2	CA4411	RNA helicase-related protein (by homology)	2,28	1,15	keine Daten	
IPF19142	CA0184	unknown function	2,44	1,16	1,59	
IPF5009	CA4089	unknown function	2,04	1,17	1,54	
RPB5	CA3494	DNA-directed RNA polymerase I, II, III (by homology)	2,39	1,21	keine Daten	
IPF18641.5f	CA1639	unknown function, 5-prime end	2,07	1,17	1,71	
IPF10153	CA3747	membrane transporter by homology	2,17	1,24	2,31	
IPF4119	CA0125	unknown function	3,04	1,36	keine Daten	**B.**
IPF20026	CA5113	unknown function	2,71	0,90	keine Daten	
IPF10911	CA2629	unknown function	2,14	0,94	keine Daten	
URA3	CA2801	*C. albicans* orotidine-5-monophosphate decarboxylase	3,69	0,81	1,41	
IPF7459	CA3657	unknown function	3,76	0,99	1,13	
IPF10429	CA0721	unknown function	2,80	1,12	1,16	
IPF11849	CA1365	unknown function	2,26	1,05	0,99	
RTA4	CA3835	protein involved in 7-aminocholesterol resistance (by homology)	3,54	1,25	1,49	
IPF18732	CA1234	histidine-rich glycoprotein precursor (by homology)	2,37	1,08	1,51	
UTR2	CA0605	1,3-1,4-beta-glucanase (by homology)	2,03	1,07	1,36	

IPF10278	CA0945	DNA-J-like protein (by homology)	2,33	1,04	1,32
IPF8661	CA4718	unknown function	2,27	1,22	1,02
IPF12148	CA3007	unknown function	2,00	1,20	1,05
PGA23	CA3253	unknown function	5,83	1,79	0,87
PGA52	CA0188	unknown function	3,17	1,46	0,89
IPF12811	CA2348	putative serine/ threonine kinase	2,00	1,32	1,02
IPF17574	CA0485	unknown function	2,59	1,46	keine Daten
PLC3	CA3159	phosphatidylinositol phospholipase C	2,40	1,26	1,16
IPF3964	CA4111	unknown function	4,79	1,77	1,82
RTA2	CA3607	unknown function	18,09	2,70	1,75
RNH1	CA0277	ribonuclease H (by homology)	2,16	1,43	1,24
SAP9	CA4700	aspartyl proteinase 9 (by homology)	2,79	1,16	0,83
IPF13407	CA1926	unknown function	2,22	1,15	0,85
ATP1	CA4456	F1F0-ATPase complex, F1 alpha subunit	1,11	1,09	2,26
IPF643	CA6009	similar to *S. cerevisiae* Ptp3p protein tyrosine phosphatase (by homology)	0,87	2,29	0,81
IPF652	CA6006	unknown function	1,03	2,11	0,83
UGP1	CA0435	UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase (by homology)	1,02	2,25	0,79
IPF1387	CA5094	unknown function	0,94	3,45	0,69
IPF6748	CA3393	unknown function	0,97	2,76	0,75
IPF10510	CA1265	unknown function	0,96	3,78	0,68
CDC22.3EOC	CA1828	DNA Polymerase III, 3-prime end	0,94	3,37	0,73
MEC1	CA2364	cell cycle checkpoint protein (by homology)	0,96	2,40	0,85
GSH1.3f	CA0583	gamma-glutamylcysteine synthetase, 3 prime end (by homology)	0,88	5,00	0,71
MTR2.3f	CA5501	mRNA transport protein, 3-prime end (by homology)	0,97	2,07	0,66
IPF13508.3f	CA1305	unknown function	0,94	2,79	0,60
IPF2275.5eoc	CA4262	unknown function	0,88	2,09	0,66
IFC4	CA0442	unknown function	0,84	2,25	0,65
ATP4	CA3479	F1F0-ATPase complex, F0 subunit B (by homology)	0,95	2,20	0,74
IPF11335	CA0926	member of the phosphate permease family (by homology)	0,86	3,25	0,66
IPF2532	CA0356	unknown function	0,89	2,37	0,68
SEC61	CA3197	ER protein-translocation complex subunit	1,08	2,76	0,66
RBT1	CA2830	repressed by Tup1 protein 1	1,13	2,25	0,75
IPF11589	CA3177	similar to *S. cerevisiae* Pho13p 4-nitrophenylphosphatase	1,10	2,31	0,67
RGT1	CA1172	regulator of glucose-induced genes (by homology)	1,16	2,26	0,60
NOG1	CA5682	nucleolar G-protein (by homology)	1,74	4,35	0,88
IPF7109	CA5650	unknown function	1,46	2,63	0,99
SSR1	CA5213	secretory stress response protein 1 (by homology)	1,36	2,03	1,00
PGA13	CA5112	similarity to mucin proteins	1,54	3,88	0,83
EXG1	CA0822	glucan 1,3-beta-glucosidase	1,21	2,03	0,96
GRP2	CA2644	reductase (by homology)	1,76	2,78	0,89
PGA54	CA2769	unknown function	1,61	2,07	0,80
MXR1	CA0123	methionine sulfoxide reductase	1,78	2,44	0,73
IPF16253	CA0782	unknown function	2,13	2,52	0,55
IPF1252	CA5664	conserved hypothetical protein	1,19	3,94	0,73
MNT4	CA2618	putative mannosyltransferase	1,10	2,14	0,84
RNH35	CA4876	RNase H (by homology)	1,06	2,71	0,88
IPF3229	CA3477	unknown function	1,15	3,49	0,83
PET9	CA5388	ADP/ ATP carrier protein (by homology)	0,97	4,94	0,83

C.

RPP2	CA5125	acidic ribosomal protein by homology	1,02	7,32	0,82
IPF6755	CA3388	unknown function	0,99	3,59	0,90
IPF1445	CA4908	similar to *S. cerevisiae* Apc1p subunit of anaphase-promoting complex	0,96	4,69	0,79
YRB2.3eoc	CA3476	Ran-GTPase-binding protein involved in nuclear export, 3-prime end (by homology)	1,00	3,28	0,84
IPF8495	CA5061	unknown function	0,95	2,41	0,97
IML2	CA5355	unknown function	1,02	3,11	1,05
IPF5131	CA5134	unknown function	1,11	6,20	1,18
IPF5015	CA4085	unknown function	1,08	2,44	1,05
IPF10564	CA3328	unknown function	1,17	5,11	1,10
IPF5013	CA4087	similar to *S. cerevisiae* Mct1p malonyl-CoA:ACP transferase (by homology)	1,15	2,15	1,03
IPF4782	CA2327	probable membrane protein (by homology)	1,13	2,92	1,00
IPF7666	CA1120	unknown function	1,29	6,28	0,89
IPF7726	CA4735	unknown function	0,92	2,44	1,07
HSP12	CA0627	heat shock protein (by homology)	0,86	2,03	1,05
GAL7	CA4044	UDP-glucose-hexose-1-phosphate uridylyltransferase (by homology)	1,25	2,15	1,14
ALS12.3f	CA0413	agglutinin-like protein, 3-prime end	1,46	2,80	1,15
ALS1	CA0316	agglutinin-like protein	1,58	3,52	1,50
HWP1	CA2825	hyphal wall protein	1,15	2,99	1,42
PGA31	CA2156	unknown function	1,16	2,55	1,25
ECE1	CA1402	cell elongation protein	0,93	2,44	1,47
PHO11	CA0616	secreted acid phosphatase	0,62	2,18	0,98
IPF2535	CA0355	unknown function	0,67	2,34	0,84
IPF3192	CA3490	unknown function	0,93	1,28	0,47
RHR2	CA5788	DL-glycerol phosphatase	0,38	0,80	0,73
IPF6235	CA2216	*C. albicans* Tca2 retrotransposon	0,24	0,68	0,85
IPF17510	CA2038	unknown function	0,16	0,94	keine Daten
GLK1	CA0263	aldohexose specific glucokinase (by homology)	0,47	0,93	1,02
IPF2857	CA5526	unknown function	0,49	0,98	0,71
IPF18207	CA4516	unknown function	0,33	1,86	0,63
IPF8321	CA2938	similar to *S. cerevisiae* Glg2p self-glucosylating initiator of glycogen synthesis (by homology)	0,44	1,25	1,11
OPT1	CA1902	oligopeptide transporter	0,44	1,29	0,95
RNR22	CA4492	ribonucleoside-diphosphate reductase (by homology)	0,45	0,71	0,79
IPF6238	CA2752	GAG protein of retrotransposon pCal	0,38	0,65	keine Daten
IPF6518	CA2302	unknown function	0,16	0,31	0,60
ERG1	CA1353	squalene epoxidase	0,38	0,51	0,62
IPF6298	CA2947	unknown function	0,48	0,65	1,04
POL0	CA2217	pol polyprotein, reverse transcripase	0,43	0,63	1,00
IPF4905	CA0899	unknown function	0,45	0,65	1,01
ERG3	CA1956	C5,6 desaturase	0,43	0,61	0,96
PGA10	CA4381	unknown function	0,42	0,49	1,23
GDH3	CA1579	NADP-glutamate dehydrogenase (by homology)	0,44	0,54	1,16
IPF7289	CA3878	similar to *S. cerevisiae* Upc2p RNA polymerase II transcription factor	0,44	0,41	1,17
PGA45	CA0380	unknown function	0,40	0,31	1,28
IFE2	CA2075	unknown function	0,38	0,55	1,51

D.

Erklärung:

Die hier vorgelegte Dissertation habe ich eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt. Die Dissertation wurde in der vorgelegten- oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, 10.02.2006

Sven Kluge