

**Identifizierung und Charakterisierung essentieller Gene/Proteine
der humanpathogenen Hefe *Candida albicans* als mögliche
Wirkstoff-Zielorte**

**Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften**

**vorgelegt beim Fachbereich Biologie
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main**

**von
Dietmar Eschrich
aus Darmstadt**

Frankfurt a.M. 2001

(DF1)

vom Fachbereich Biologie der Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation
angenommen.

Dekan: Prof. Dr. K.-D. Entian

Erster Gutachter: Prof. Dr. K.-D. Entian

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. B. Ludwig

Datum der Disputation: 16.10.2001

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. K.-D. Entian in der Zeit von November 1997 bis März 2001 am Institut für Mikrobiologie der Universität Frankfurt a.M. durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. K.-D. Entian danke ich für die Überlassung des Themas, seine Betreuung und die Bereitstellung des Arbeitsplatzes.

Herrn Prof. Dr. B. Ludwig danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Besonders danke ich weiterhin Dr. P. Kötter für seine Betreuung, M. Buchhaupt für viele fruchtbare Diskussionen sowie allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Arbeitsgruppe für die Zusammenarbeit.

1. Einleitung.....	4
1.1 Behandlung von Mycosen	5
1.2 Das Krankheitsbild der Candidiasis	6
1.3 Das Genom von <i>C. albicans</i>	8
1.4 Molekularbiologisches Arbeiten mit <i>C. albicans</i>	10
1.5 Die Gluconeogenese von <i>C. albicans</i> als mögliche Wirkorte für Antimykotika	12
Die Gluconeogenese und der Glyoxylat-Zyklus in <i>S. cerevisiae</i>	13
Die Regulation der Gluconeogenese und des Glyoxylat-Zyklus in <i>S. cerevisiae</i>	14
Die Gluconeogenese und der Glyoxylat-Zyklus in <i>C. albicans</i>	16
1.6 Essentielle Gene von <i>C. albicans</i> als mögliche Wirkorte antimykotischer Stoffe	17
Herstellung konditional letaler <i>S. cerevisiae</i> Stämme durch das Cre/ <i>loxP</i> System	19
1.7 Aufgabenstellung.....	21
2. Material und Methoden	22
2.1 Verwendete Organismen	22
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> und <i>Candida albicans</i> Stämme	22
<i>Escherichia coli</i> Stamm	23
2.2 Verwendete Plasmide	24
2.3 Nährmedien und Dauerkulturen	28
Hefemedien	28
Bakterienmedien.....	29
Dauerkulturen.....	30
2.4 Zellanzucht, Zellernte und Rohextraktgewinnung	30
2.5 Keimschlauchinduktion bei <i>C. albicans</i>	30
2.6 Proteinbestimmungen und Enzymtests.....	31
Fructose-1,6-bisphosphatase (FBPase)	31
Phosphoenolpyruvat Carboxykinase (PEPCK).....	32
Isocitrat Lyase	32
Malat Synthase	33
β -Galaktosidase	33
2.7 Klassisch genetische Techniken	33
Konstruktion diploider Hefestämme	33
Sporulation und Tetradenanalyse	34
2.8 Integration von DNS ins Hefegenom	34
<i>S. cerevisiae</i> Integrationen	34
<i>C. albicans</i> Integrationen	34
2.9 Isolierung von Plasmid-DNS aus <i>E. coli</i>	35
Schnelle Plasmidisolierung	35
Schnelle Plasmidisolierung in Mikrotiterplatten.....	35
Plasmidisolierung zur DNS-Sequenzierung, ("TB-Methode")	36
2.10 DNS-Isolierungen aus Hefe.....	37
Isolierung von chromosomaler DNS aus Hefezellen	37
Isolierung von Plasmid-DNS aus Hefe	37
2.11 Isolierung von RNS aus Hefe für Northern-Hybridisierungen.....	38
2.12 Transformationstechniken	38
Transformation von <i>E. coli</i>	38
Transformation von Hefen	39
2.13 Enzymatische DNS-Modifikationen.....	39

Restriktionsschneideansätze und Ligation	39
Phosphatase-Behandlung	40
Auffüllen 5'-überstehender Enden ("Fill in"-Reaktion)	40
Radioaktive Markierung von PCR-Fragmenten.....	40
2.14 Polymerase Ketten Reaktion ("Polymerase Chain Reaction"; PCR)	41
2.15 DNS-Sequenzierung	41
2.16 Elektrophoretische Techniken	42
Agarose-Gelelektrophorese für DNS-Fragmente.....	42
Agarose-Gelelektrophorese zur RNS-Auftrennung	42
2.17 "Northern"-Blot	43
RNS-Transfer	43
"Northern"-Hybridisierung.....	43
2.18 Herstellung temperaturempfindlicher (ts) Allele von <i>NEP1</i>	44
2.19 Zwei-Hybrid System.....	45
2.20 GFP-Fusionen und Bestimmung der Proteinlokalisierung (Green fluorescent protein).....	45
2.21 FACS-Analysen von Hefezellen	46
2.22 Färbungen und Fluoreszenzmikroskopie.....	46
2.23 Oligonukleotidtablelle	48
3. Ergebnisse.....	51
3.1 Isolierung von <i>FBP1</i> , <i>PCK1</i> , <i>ICL1</i> und <i>MLS1</i> aus <i>C. albicans</i>	51
3.2 Sequenzanalyse der <i>C. albicans</i> Gluconeogenese und Glyoxylat-Zyklus Gene	52
3.3 Gluconeogenese und Glyoxylat-Zyklus Enzymaktivitäten in <i>C. albicans</i>	55
3.4 Regulation der Gluconeogenese und des Glyoxylat-Zyklus von <i>C. albicans</i>	57
3.5 Kohlenstoffquellen-abhängige Transkription von <i>CaFBP1</i> in <i>C. albicans</i> SC5314.....	60
3.6 Deletion und regulierte Expression von <i>CaFBP1</i>	61
3.7 Zellaggregation von <i>C. albicans</i> unter Kohlenstoffmangel.....	64
3.8 Induktion des morphologischen Wechsels in <i>C. albicans</i> CAE3 (Δ <i>fbp1</i> / <i>fbp1</i>)	65
3.9 Split-Marker-Selektion zur Klonierung heterologer essentieller Gene	68
3.10 Konstruktion der Split-Marker-Kassette	71
3.11 Stamm SDE8-1A als Testkandidat für die Split-Marker-Selektion	73
3.12 Isolierung des Gens <i>CaYLR186</i> von <i>C. albicans</i> durch Split-Marker-Selektion	79
3.13 Sequenzanalyse von ScYlr186p sowie Sequenzvergleich mit homologen Proteinen	83
3.14 Funktionelle Komplementation von Δ <i>ylr186w</i> mit homologen Genen anderer Organismen.....	89
3.15 Phänotypische Analyse von Δ <i>ylr186w</i> in <i>S. cerevisiae</i>	91
3.16 Cre-induzierter Verlust von <i>YLR186w</i>	97
Erzeugung extragener Suppressoren der <i>YLR186w</i> Deletion.....	97
Genetische Analyse extragener Suppressoren von Δ <i>ylr186w</i>	98
3.17 Zelluläre Lokalisation von ScYlr186p	105
Komplementation von Δ <i>ylr186w</i> durch GFP-Ylr186p	105
Struktur und Lokalisation von GFP-Ylr186p in unsynchronisierten Zellen	105
Zelluläre Lokalisation und Struktur von GFP-Nep1p nach Arretierung.....	107
Zelluläre Lokalisation von GFP-Nep1p während der Zygotenbildung.....	108
3.18 Thiabendazol-Empfindlichkeit bei erhöhter Expression von GFP-Nep1p.....	109
3.19 Zelluläre Lokalisation von CaNep1p und C2F in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	114
GFP-C2F komplementiert den letalen Phänotyp von Δ <i>nep1</i>	114
GFP-C2F lokalisiert im Zellkern von <i>S. cerevisiae</i>	116
GFP-CaNep1p verhält sich ähnlich wie GFP-ScNep1p.....	117
3.20 Zwei-Hybrid-Analysen.....	119

ScNep1p wechselwirkt mit sich selbst, zeigt aber keine Wechselwirkung mit Tubulin.....	119
Suche nach Nep1p interagierenden Proteinen.....	120
Suche nach Ydl148p interagierenden Proteinen	128
3.21 Herstellung und Analyse temperaturempfindlicher (ts) <i>NEP1</i> -Allele in <i>S. cerevisiae</i> ..	129
3.22 Multicopy-Suppression von <i>nep1-ts1</i>	133
3.23 GFP-Fusion von <i>nep1-ts1</i>	139
4. Diskussion	142
4.1 Die Gluconeogenese und der Glyoxylat-Zyklus in <i>C. albicans</i>	142
4.2 Split-Marker-Selektion zur Identifizierung essentieller Gene von <i>C. albicans</i>	147
4.3 Charakterisierung von Nep1p.....	149
5. Zusammenfassung	155
6. Literaturverzeichnis	156

1. Einleitung

Pilze sind in der Natur ubiquitär vorkommende Mikroorganismen, die durchweg heterotroph leben. Die etwa 100.000 - 200.000 verschiedenen Arten ernähren sich als Saprophyten, Parasiten oder in symbiontischer Lebensgemeinschaft. Ihre wichtigste Funktion im Stoffkreislauf ist es, totes organisches Material abzubauen und Mineralien für Pflanzen freizusetzen. Bedeutende Nutzenanwendungen für den Menschen sind die alkoholische Gärung, Produktion von Antibiotika und Nahrungsmitteln sowie die Förderung des Baumwachstums durch Mykorrhiza. Pilze sind jedoch auch als Krankheitserreger bei Pflanzen und Tieren bekannt und sorgen hier für enorme Schäden. Von den 162 wichtigsten Infektionskrankheiten mitteleuropäischer Nutzpflanzen werden 83% durch Pilze verursacht. Die Schäden belaufen sich jährlich auf Milliardenbeträge und haben Hungersnöte zur Folge (Sitte *et al.*, 1991). Bei Menschen und Tieren verursachen Pilze verschiedenste Krankheiten, die indirekt mit der Lebensweise zusammenhängen (Mykotoxikosen und mykogene Allergien) oder bei denen sie direkt als Pathogene Mykosen von Warmblütern hervorrufen.

Pilzinfektionen beim Menschen durch *Histoplasma capsulatum*, *Cryptococcus neoformans*, *Pneumocystis carinii*, *Aspergillus*-Arten oder *Candida*-Arten nahmen im Laufe der letzten Jahre stetig zu, wenngleich sie bei weitem nicht die Häufigkeit bakterieller Infektionen erreichen. Insbesondere bei immunsupprimierten Patienten sind opportunistische Pilzinfektionen häufige Begleiterscheinungen, welche oft zum Tode führen (Fischer-Hoch und Hutwagner, 1995; Groll *et al.*, 1998). Die Zahl immunsupprimierter und schwerkranker Patienten steigt (und somit auch die Zahl opportunistischer Infektionen). Immunsupprimiert sind Patienten nach HIV ("human immunodeficiency virus") -Infektion, nach Chemotherapie induzierter Neutropenia, nach Organtransplantation, nach starken Verbrennungen oder Neugeborene mit sehr niedrigem Geburtsgewicht. Weiterhin begünstigt die steigende Anzahl intensiver medizinischer Eingriffe beim Menschen und die steigende Nutzung von Prothesen und Kathetern bei gleichzeitigem Einsatz von Kortikosteroiden und Breitband-Antibiotika Pilzinfektionen (Bodey, 1988; Groll *et al.*, 1998).

1.1 Behandlung von Mycosen

Pilzinfektionen stellen ein zunehmendes Problem dar, insbesondere deshalb, weil lediglich eine limitierte Zahl antimykotischer Medikamente existiert. Obwohl eine Vielzahl antimykotisch wirksamer Stoffe bekannt ist (Vanden Bossche *et al.*, 1995; Bennett, 1996), können diese aufgrund starker Nebenwirkungen, die sie im Menschen auslösen, nicht als Medikamente eingesetzt werden (Georgopapadakou und Walsh, 1994). Von Bedeutung für die Behandlung von Mykosen sind folgende Wirkstoffe: **Amphotericin B** ist ein fungizides Polyen-Antimykotikum, das aus *Streptomyces* Arten isoliert wird und gegen Hefen (*Candida sp.*, *Cryptococcus neoformans*) sowie filamentöse Pilze (*Aspergillus sp.*) wirkt. Die fungizide Wirkung beruht auf der hydrophoben Anlagerung an Ergosterin, wodurch die Membranpermeabilität erhöht wird. Leider treten häufig starke Nebenwirkungen (z.B. Nierenversagen) bei der Behandlung mit diesem Medikament auf (White *et al.*, 1998). **Flucytosin** wirkt als Antimetabolit des Cytosins fungistatisch, wird jedoch wegen der Gefahr sekundärer Resistenzentwicklungen (Schonebeck und Ansehn, 1973; Bennett, 1996) nur in Kombination mit Amphotericin B bei schweren systemischen Infektionen eingesetzt. Aufgrund der starken Nebenwirkungen von Amphotericin B und der schnellen Resistenzentwicklung gegen Flucytosin, haben Azolderivate wie **Fluconazol** (Rogers und Galgiani, 1986) an Bedeutung gewonnen und sind heute häufig das Medikament der Wahl zur Behandlung von Candidosen. Fluconazol ist ein Azol-Antimykotikum, dessen fungizide Wirkung im Pilz (wie bei allen Azol-Derivaten) auf der Inhibierung der für die Pilze essentiellen Ergosterin-Synthese beruht; gleiches gilt für **Itraconazol**, ein weiteres Azol-Antimycotikum. Fluconazol kann nicht bei *C. krusei* und *C. glabrata* Infektionen eingesetzt werden, da diese Organismen resistent gegen dieses Azol-Derivat sind. Weiterhin finden **Nystatin** und **Natamycin** (beides Polyen-Derivate) sowie einige weitere Azolderivate Anwendung in der lokalen Behandlung von Pilzinfektionen. All diese antimykotisch wirksamen Stoffe gehören in die Stoffklasse der Azole oder Polyene und inhibieren mit Ausnahme von Flucytosin die Ergosterin-Synthese bzw. stören die Funktion von Ergosterin. Dies verdeutlicht die Gefahren bei Auftreten von Resistenzen besonders. Seit Beginn der 90er Jahre häufen sich Berichte über Resistenzen gegen Antimykotika (Franz *et al.*, 1998; Vanden Bossche *et al.*, 1998). So treten insbesondere bei AIDS-Patienten mit wiederholter oropharyngealer Candidiasis Fluconazol-resistente Stämme auf (Rex *et al.*, 1995; White *et al.*, 1998).

1.2 Das Krankheitsbild der Candidiasis

Eine durch den opportunistisch pathogenen Pilz *C. albicans* verursachte Mycose wird als Candidiasis bezeichnet. Die Candidiasis unterliegt keiner geographischen Begrenzung, da sie meist bei Patienten vorkommt, die für eine Überwucherung durch die eigene Sprosspilzflora disponiert sind. Begünstigende Faktoren für eine Candidiasis sind HIV-Infektionen, Immunsuppression, intravasale Katheter, Breitband-Antibiotikatherapie, antineoplastische Chemotherapie, Granulozytopenie, Verbrennungen, Drogenabusus und hämatologische Erkrankungen. Man unterscheidet oberflächliche Infektionen von tiefen invasiven (systemischen) Infektionen. Zu den besiedelten Oberflächen zählen insbesondere Areale, die einen erhöhten Flüssigkeitsgehalt aufweisen (z.B. Hautfalten). Häufiges Waschen und mangelhaftes Abtrocknen oder berufliche Exposition der Hände oder Füße mit Wasser können auch Infektionen des Nagelwalls bedingen (Candida-Nagelmykosen). Von der vulvovaginalen Candidiasis sind insbesondere junge Frauen, Frauen mit Diabetes mellitus und Schwangere betroffen. Orale Kontrazeptiva begünstigen ebenfalls eine Vaginal-Candidiasis. Selten kommt es durch sexuelle Übertragung zu einer Infektion des männlichen Geschlechtsorgans (Candida-Balanitis). Die Candida-Infektion der Mundschleimhaut wird als Mundsoor bezeichnet und dehnt sich oft bis auf den Pharynx aus. Diese oropharyngeale Candidiasis tritt besonders bei kleinen Kindern, Patienten mit Diabetes mellitus, unter Breitspektrum-Antibiotikatherapie und in fortgeschrittenen Stadien der HIV-Infektion auf. Breitet sich die Infektion weiter aboral aus, so entsteht die Candida-Ösophagitis. Diese systemische Form tritt besonders bei Patienten mit fortgeschrittener, gelegentlich auch akuter HIV-Infektion und bei Patienten mit hämatologischen Erkrankungen auf. Weitere gelegentlich vorkommende systemische Infektionen findet man im Magen (Gastritis), den Harnwegen, dem Bauchfell (Peritonitis), der Herzinnenhaut (Endokarditis, meistens bei Patienten mit vorgeschädigter oder künstlicher Herzklappe), der Hirnhaut (Meningitis) oder im Respirationstrakt. Eine besondere Form der systemischen Candidiasis ist die Candida-Sepsis. Sie erfolgt durch Einschwemmung von *Candida* in die Blutbahn, von wo aus sich die Erreger in allen Organen ansiedeln können und sich multiple Mikroabszesse bilden. Besonders betroffen sind hierbei die Nieren, das Gehirn, die Augen sowie Milz und Leber. Disponiert sind Patienten mit intravenösen Kathetern, Urinkathetern, Verbrennungen, intraabdominellen Operationen, Patienten unter Breitspektrum-Antibiotikatherapie und mit Mukosaschädigung infolge antineoplastischer Chemotherapie.

Die Abwehr von Pilzinfektionen erfolgt sowohl durch das angeborene als auch das adaptive Immunsystem. Die wichtigste Rolle spielen hierbei die phagozytierenden polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (kurz Neutrophile; Romani *et al.*, 1996). Patienten mit Krankheiten, bei denen die Funktion dieser Zellen gestört ist (z.B. Myeloperoxidase Defizienz), sind prädisponiert für systemische Candidosen (Johnston und Newman, 1977; Parry *et al.*, 1981; Nielsen *et al.*, 1986). Aber auch Makrophagen sind wesentlich an den Abwehrreaktionen gegen *C. albicans* beteiligt (Vazquez-Torres und Balish, 1997). Makrophagen zerstören extrazelluläre Pathogene und präsentieren gleichzeitig deren Peptide den CD4-T-Zellen, was zur Entstehung von bewaffneten CD4-T-Effektorzellen führt, die spezifisch für den aufgenommenen Mikroorganismus sind. Eine wichtige Funktion dieser bewaffneten CD4-T-Effektorzellen ist es wiederum, auf die Makrophagen einzuwirken und deren Fähigkeit zu steigern, die aufgenommenen Mikroorganismen zu zerstören (Makrophagenaktivierung). HIV benutzt das CD4-Molekül als Rezeptor und befällt daher in erster Linie die CD4-T-Zellen. Als Folge kommt es zum Absinken des Verhältnisses von CD4-/CD8-T-Zellen im peripheren Blut. Chronische Infektionen mit opportunistischen Pathogenen, die normalerweise von zellulären Immunmechanismen kontrolliert werden, treten bei HIV-Patienten regelmäßig auf. Neben *C. albicans* ist *Pneumocystis carinii* ein weiterer opportunistisch pathogener Pilz, der insbesondere bei HIV-Patienten zu Pneumonien führt. Die Phagozytose von *C. albicans* Zellen durch Makrophagen und Neutrophile führt nicht immer zum Abtöten des Pathogens. *C. albicans* (als auch *C. tropicalis*) wechselt seine Wachstumsform und schaltet auf filamentöses Wachstum um. Dadurch durchwächst der Pilz den Wirt und tötet ihn ab (Stanley und Hurley, 1969; Sasada und Johnston, 1980; Marodi *et al.*, 1991; Lo *et al.*, 1997).

Candida albicans ist der häufigste aus klinischem Material isolierbare opportunistisch (fakultativ) pathogene Pilz des Menschen, der als Kommensale auf der Haut, Schleimhäuten, im Vaginaltrakt und im Verdauungstrakt von Warmblütern zu finden ist. Er gehört zur Gruppe der Ascomyceten und hat eine dimorphe Lebensweise, d.h. neben einer hefeartigen Wachstumsform kann *C. albicans* als filamentöser Pilz ein Mycel bilden. Der Wechsel zwischen den Wachstumsformen wird durch Umweltfaktoren wie pH-Wert, Temperatur oder verschiedene Substanzen (Tab. 1.1) induziert (Odds, 1988). Diesem morphologischen Wechsel von der Hefe zum filamentösen Pilz wird eine Bedeutung in der Virulenz beigemessen (Ryley und Ryley, 1990; Cutler, 1991; Odds, 1994). So konnten Lo *et al.* (1997) zeigen, dass ein *C. albicans* Stamm, bei dem die Transkriptionsfaktoren für die Induktion

hyphalen Wachstums *CPHI* und *EFGI* deletiert wurden, nicht mehr filamentös wachsen kann und gleichzeitig seine Virulenz verloren hat.

Bedingungen mit bevorzugt hyphalem Wachstum	Bedingungen mit bevorzugt hefeartigem Wachstum
- pH > 6,5-7,0	- pH < 6,5-7,0
- Temperatur > 35°C	- Temperatur < 35°C
- Zelldichte < 10 ⁶ ml ⁻¹	- Zelldichte > 10 ⁶ ml ⁻¹
- N-acetyl-D-glucosamin	- Glucose als Kohlenstoffquelle
- Prolin	
- 10 % Serum	
- Phagozytose durch Makrophagen	

Tab. 1.1 : Bevorzugte Wachstumsformen von *C. albicans* unter verschiedenen Wachstumsbedingungen (Odds, 1988).

1.3 Das Genom von *C. albicans*

Die Handhabung von *C. albicans* im Labor ist einfacher als die anderer pathogener Pilze, weshalb dieser zum Modellorganismus für pathogene Pilze wurde, bei dem insbesondere der Dimorphismus sowie weitere Virulenzfaktoren untersucht werden. Weiterhin ist von Vorteil, dass die Genomsequenzierung weit fortgeschritten ist und die gesamte Sequenz des Erbgutes in naher Zukunft zur Verfügung stehen wird. Das Genom ist mit ca. 16 Millionen Basenpaaren, die für etwa 8000 Gene kodieren (für Proteine >100 Aminosäuren), etwas größer als das von *S. cerevisiae* (etwa 12 Millionen Basenpaare mit 6200 Genen). Das *C. albicans* Genom ist in 8 homologe Chromosomenpaare organisiert, mit Größen von 1,03 - 4,3 mb. Aneuploidie, Translokationen und Längenpolymorphismen treten auf und werden unter dem Begriff genomische Variabilität zusammengefasst. Translokationen treten ausschließlich an sogenannten MRS ("major repeat sequence") -Regionen auf (Chu *et al.*, 1993; Navarro-Garcia *et al.*, 1995). MRS variieren von 10 kb bis 100 kb und besitzen eine zentrale Sequenz, die etwa 2 kb groß ist und als RPS ("repeated sequence") bezeichnet wird (Iwaguchi *et al.*, 1992). RPS Regionen variieren in der Anzahl von 1-25 Kopien und scheinen für den Längenpolymorphismus der Chromosomen verantwortlich zu sein (Chibana *et al.*, 2000). Eine attraktive Hypothese für den Mechanismus der Translokationen ist, dass

Crossing-over Ereignisse zwischen nicht homologen Chromosomen mittels der MRS stattfinden. Stabile Aneuploidie wurde für das Fehlen von Chromosom 7 gezeigt (Magee und Magee, 1997). Stress wie etwa Wachstum auf Sorbose als einzige Kohlenstoffquelle oder Selektion auf Fluconazol-Resistenz führen zum Verlust eines homologen Chromosoms (Rutschenko *et al.*, 1997; Perepnikhatka *et al.*, 1999). Diese Aneuploidie ist jedoch nur vorübergehend und wird durch Reduplikation des verbliebenen Homologs wieder aufgehoben, wenn der Selektionsdruck verloren geht (Barton und Gull, 1992). Auch auf Genebene existiert von Stamm zu Stamm eine signifikante Variabilität (Scherer und Stevens, 1987; Bretagne *et al.*, 1997). Selbst zwischen den beiden Allelen eines Gens in einem Stamm existieren Variationen (White, 1997).

C. albicans findet man nur in der diploiden Wachstumsphase, was das molekularbiologische Arbeiten mit *C. albicans* erschwert und eine klassische Genetik unmöglich macht (Sheperd *et al.*, 1985; Odds, 1988; Scherer und Magee, 1990). Es gelang bisher nicht, einen vollständigen sexuellen Zyklus bei *C. albicans* zu induzieren. Trotzdem findet man im Genom von *C. albicans* Paarungstyploci (Hull und Johnson, 1999) und viele, wenn nicht sogar alle Gene, von denen bekannt ist, dass die *S. cerevisiae* Homologen an der Meiose, der Sporulation und der Paarung beteiligt sind (Gehring und Snyder, 1990; Sadhu *et al.*, 1992; Hoyer *et al.*, 1995; Leberer *et al.*, 1996; Diener und Fink, 1996; Newport und Agabian, 1997; Raymond *et al.*, 1998; Csank *et al.*, 1998). Die Möglichkeit, dass *C. albicans* doch die Fähigkeit für einen sexuellen Zyklus besitzt, wird durch jüngste Experimente untermauert, bei denen es gelang diploide *Candida* Stämme zu paaren, welchen zuvor je einer der beiden Paarungstyploci deletiert worden war (Magee und Magee, 2000; Hull *et al.*, 2000).

Eine Besonderheit von *C. albicans* ist, dass ein Abweichen vom genetischen Standard-Code existiert. Das Kodon CTG kodiert in den meisten Organismen für Leucin, in *C. albicans* jedoch für Serin, wofür eine eigene Seryl-tRNS_{CAG} existiert (Santos und Tuite, 1995). Diese Abweichung hat weitreichende Konsequenzen für die Expression von Fremdgenen in *C. albicans*. CTG ist ein sehr selten genutztes Kodon in *C. albicans* Genen (Santos und Tuite, 1995), nicht jedoch in anderen Eukaryonten (z.B. *S. cerevisiae*). Exprimiert man *C. albicans* Gene in *S. cerevisiae* hat das zur Folge, dass nur sehr wenige CTG Kodone von *C. albicans*, welche für ein Serin kodieren, in *S. cerevisiae* "falsch übersetzt" werden. So ist es nicht verwunderlich, dass *C. albicans* Gene in *S. cerevisiae* häufig in funktionelle Proteine übersetzt werden. Bringt man jedoch ein *S. cerevisiae* Gen in *C. albicans* so existieren in

dieser Sequenz zahlreiche CTG Kodone, mit der Folge, dass die Aminosäuresequenz erheblich abweicht, was häufig zum Funktionsverlust des Proteins führt.

1.4 Molekularbiologisches Arbeiten mit *C. albicans*

C. albicans ist nicht für klassisch genetische Methoden zugänglich (siehe oben). Es stehen aber eine ganze Reihe molekularbiologischer Werkzeuge zur Verfügung, die auch von *S. cerevisiae* bekannt sind. So sind Gendeletionen in *C. albicans* möglich, wenngleich dies nicht mit der Effizienz geschieht, wie man das von *S. cerevisiae* gewohnt ist. Die gebräuchlichste Methode hierfür ist die URA-Blaster Strategie (Fonzi und Irwin, 1993), bei der beide Allele eines Gens nacheinander disruptiert bzw. deletiert werden. Eine *hisG-URA3-hisG* Kassetten, welche an beiden Enden homologe Bereiche zu Sequenzen des zu deletierenden Gens enthält, wird über homologe Rekombination in das Genom integriert und somit das gewünschte Gen deletiert bzw. disruptiert. Nach Selektion mit 5FOA (5-Fluororotsäure) führt die intra-chromosomale Rekombination zwischen den in Tandem angeordneten *hisG* Wiederholungen zum Verlust des *URA3* Gens. Die gleiche Kassetten kann nun in einer weiteren Transformationsrunde für die Deletion/Disruption des zweiten Allels eingesetzt werden. Obwohl dies die gängigste Strategie zur Gendeletion in *C. albicans* ist, birgt sie eine Reihe von Nachteilen, welche durch neuere Strategien umgangen werden können. So ist ein Problem, dass der Verlust der Ura3p Aktivität und die damit verbundenen Resistenz gegen 5FOA auf verschiedenste Arten erfolgen kann. Zum einen können Punktmutationen in *URA3* zur Resistenz gegen 5FOA führen. Dies hat zur Folge, dass in weiteren Transformationsrunden die *hisG-URA3-hisG* Kassetten aufgrund der Sequenzidentität immer in das gleiche bereits deletierte Allel integriert. Auch könnten Punktmutationen in anderen Genen des Uracil-Stoffwechsels zu 5FOA resistenten Klonen führen, wie dies bei anderen Pilzen beschrieben ist (Kwon-Chung *et al.*, 1992). Ist dies der Fall ist eine Selektion auf Uracil-prototrophe Kolonien mit der *hisG-URA3-hisG* Kassetten in der zweiten Transformationsrunde unmöglich. Auch können 5FOA resistente Klone entstehen, wenn das Chromosom nicht intrachromosomal rekombiniert, sondern durch eine mitotische Rekombination die genetische Information des Wildtyp-Allels auf das mutierte Allel übertragen wird. So geht die *URA3* Kassetten verloren und die ursprüngliche Wildtypsituation wird wieder hergestellt. Weitere Probleme ergeben sich, wenn man in der zweiten Transformationsrunde die gleiche *hisG-URA3-hisG* Kassetten einsetzt, da sich gezeigt hat, dass sie bevorzugt dort integriert, wo das erste Allel bereits deletiert wurde. All dies verdeutlicht die Notwendigkeit neuer Strategien zur Gendeletion. Eine davon ist der Einsatz des URA-

Flippers (Morschhäuser *et al.*, 1999), wobei eine Deletionskassette eingesetzt wird, welche die FLP-Rekombinase, das *URA3* Gen sowie flankierende Sequenzen für eine sequenz-spezifische Rekombination (vermittelt durch die FLP-Rekombinase) trägt. Nach Deletion des ersten Allels mit dieser Kassette kann die gesamte Kassette mittels der durch sie kodierten FLP-Rekombinase wieder aus dem Genom entfernt werden und solche Klone ohne starken Selektionsdruck (wie dies bei 5FOA Selektionen der Fall ist) identifiziert werden. Ein Nachteil der bisher beschriebenen Kassetten ist ihre Größe, die sie nicht zum Einsatz für PCR-vermittelte Gendeletionen befähigen.

Die Entwicklung von Stämmen mit mehreren Auxotrophiemarkern, lassen nun auch bei *C. albicans* die PCR-vermittelte Gendeletion zu (Wilson *et al.*, 1999). Hier wird in einem Stamm, der zwei Auxotrophiemarker besitzt ($\Delta his1\Delta/his1$ und $\Delta ura3/\Delta ura3$), je ein Allel mit einer Kassette deletiert, welche das PCR amplifizierte *HIS1* bzw. *URA3* Gen und zusätzlich kurze homologe Flanken zu dem zu deletierenden Gen enthält. Da Transformationen mutagen sind besteht jedoch die Gefahr, dass weitere Mutationen eingefügt werden und diese zu Phänotypen führen die mit der gewünschten Gendeletion nicht in Zusammenhang stehen. Deshalb müssen bei der Phänotypanalyse von Deletionsmutanten immer mehrere unabhängige Transformanten untersucht werden.

Ein Problem in der Funktionsanalyse stellen essentielle Gene von *C. albicans* dar. Essentielle Gene sind erforderlich für das vegetative Wachstum der Hefe auf Vollmedium. Der Nachweis, dass ein Gen essentiell für das vegetative Wachstum ist, erfolgt in *S. cerevisiae* durch Deletion eines Allels und einer anschließenden Tetradenanalyse, bei der (sollte ein essentielles Gen deletiert worden sein) immer zwei lebende und zwei tote Segreganten einer Tetrade entstehen. Da bei *C. albicans* dieser sexuelle Zyklus fehlt, scheidet diese Nachweismethode aus und es kann nur ein indirekter Nachweis für die Notwendigkeit eines Gens für das vegetative Wachstum erbracht werden. Das zweite Allel kann nur dann deletiert werden, wenn eine weitere Kopie dieses mutmaßlich essentiellen Gens an einem anderen Genort integriert wurde (Petter *et al.*, 1997) oder wenn dessen Expression, z.B durch Vorschalten des *MET3* Promotors, reguliert erfolgt (Care *et al.*, 1999; Warit *et al.*, 2000).

Weiterhin erschwerend für die Analyse essentieller *C. albicans* Gene ist das Fehlen autosomal replizierender, stabiler Plasmide. Lediglich extrem instabile Plasmide sind in der Literatur beschrieben (Cannon *et al.*, 1992; Pla *et al.*, 1996).

Für Genexpressionsanalysen stehen mehrere Reportergene zur Verfügung. *LAC4* kodiert für eine β -Galaktosidase von *Kluyveromyces lactis* und wurde bereits erfolgreich für Expressionsstudien in *C. albicans* eingesetzt (Leuker *et al.*, 1992; Leuker *et al.*, 1997). Ein weiteres bereits erfolgreich eingesetztes Reportergen ist die Luciferase von *Renilla reniformis*, die zur Analyse der Genexpression von *GAL1*, *EF1- α 2*, *WH11* und *OP4* eingesetzt wurde. Von noch größerem Nutzen sollte in naher Zukunft der Einsatz einer an *C. albicans* angepassten GFP-Variante sein (Cormack *et al.*, 1997). GFP als Reportergen wurde zum Beispiel bei der Analyse des *MET3* Promotors benutzt (Care *et al.*, 1999). GFP kann außerdem zur *in vivo* Lokalisation von Proteinen in *C. albicans* eingesetzt werden (M. Buchhaupt, unveröffentlicht).

Obwohl für die genetische Manipulation von *C. albicans* bei weitem nicht die Mannigfaltigkeit an Werkzeugen zur Verfügung steht, wie man sie von *S. cerevisiae* kennt, ist *C. albicans* doch geeignet für die molekularbiologische Bearbeitung und wurde deshalb im Laufe der letzten Jahre zu dem Modellorganismus für einen humanpathogenen Pilz.

1.5 Die Gluconeogenese von *C. albicans* als mögliche Wirkorte für Antimykotika

Der steigenden Zahl immunsupprimierter Patienten und der damit verbunden zunehmenden Zahl opportunistischer Pilzinfektionen steht nur eine limitierte Zahl antimykotischer Medikamente, bei denen vermehrt Resistenzen auftreten, gegenüber. Dies verdeutlicht die Notwendigkeit, weitere antimykotisch wirksame Stoffe mit neuen Wirkorten zu finden. Deshalb wurden im Rahmen dieser Doktorarbeit die Gluconeogenese und der Glyoxylat-Zyklus von *C. albicans* als mögliche neue Wirkorte für antimykotisch wirksame Stoffe näher charakterisiert. Außerdem wurde eine Methode entwickelt, um zusätzliche potentielle Wirkorte der *Candida* Zelle zu identifizieren und zu charakterisieren, eine Grundvoraussetzung für die anschließende Suche nach antimykotisch wirksamen Substanzen.

Die Gluconeogenese und der Glyoxylat-Zyklus sind bei der Hefe *S. cerevisiae* bereits ausführlich untersucht. Sie sind in *S. cerevisiae* essentiell für das vegetative Wachstum auf nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquellen wie etwa Ethanol oder Acetat, nicht jedoch auf fermentierbaren Kohlenstoffquellen (Glucose, Galaktose, Fructose usw.).

Die Gluconeogenese und der Glyoxylat-Zyklus in *S. cerevisiae*

Das Wachstum auf nicht-fermentierbaren Substraten erfordert eine erhebliche Umstellung des Stoffwechsels. So kann der Energiebedarf der Zelle bei Wachstum auf nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquellen nur aerob durch vollständige Oxidation der Substrate zu Kohlendioxid und Wasser im Citrat-Zyklus und der Atmungskette gedeckt werden. Aus den Substraten müssen darüber hinaus, mit Hilfe der Glyoxylat-Zyklus Enzyme Isocitrat Lyase (kodiert von *ICL1*, Fernandez *et al.*, 1992; Schöler und Schüller, 1993) und Malat Synthase (codiert von *MLS1*, Hartig *et al.*, 1992) sowie der Gluconeogenese, höhermolekulare Metabolite für den Baustoffwechsel synthetisiert werden (Abb.1.1). Die Gluconeogenese stellt im Prinzip die Umkehrung der Glykolyse dar, deren irreversible Reaktionen der Phosphofruktokinase und der Pyruvat Kinase von den gluconeogenetischen Schlüsselenzymen Fructose-1,6-bisphosphatase (codiert von *FBP1*, Sedivy und Fraenkel, 1985, Entian *et al.*, 1988) und Phosphoenolpyruvat Carboxykinase (codiert von *PCK1*, Vlades-Hevia *et al.*, 1989; Stucka *et al.*, 1988) umgekehrt werden.

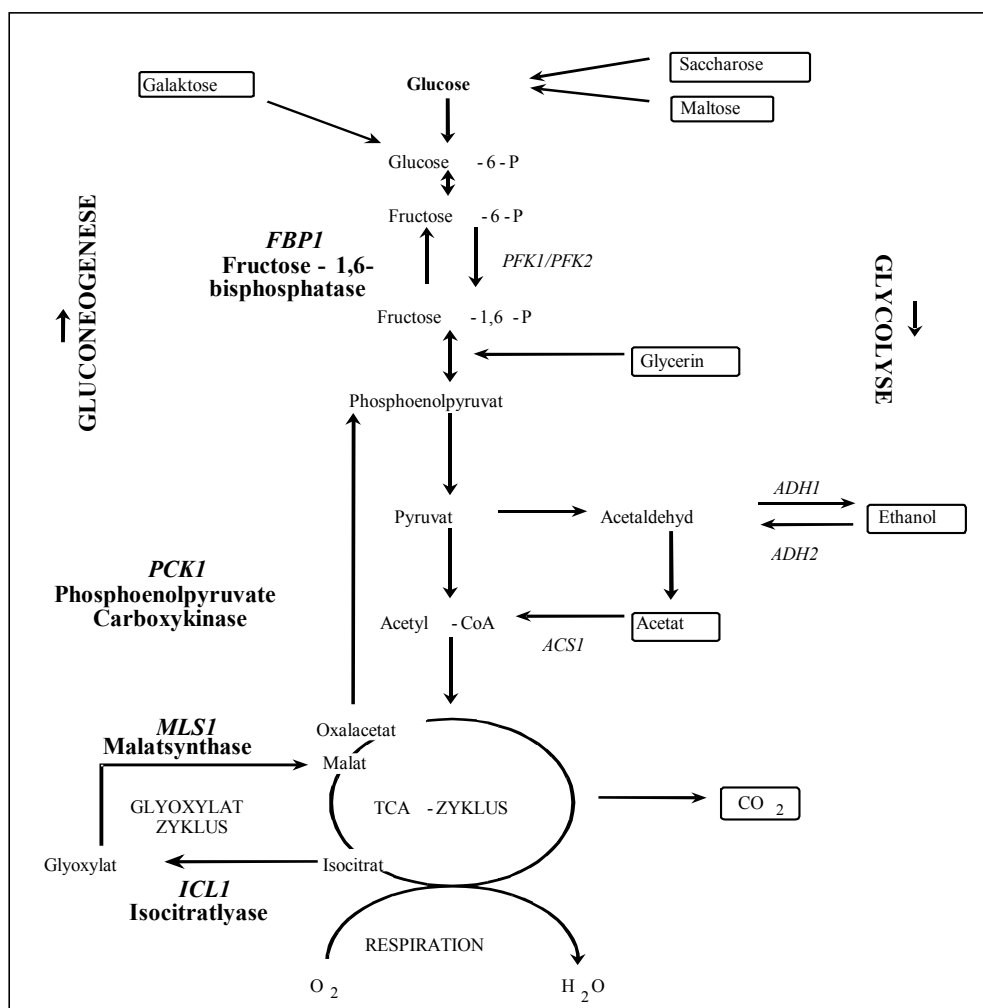


Abb. 1.1 : Schematische Darstellung des Kohlenstoffwechsels der Hefe *S. cerevisiae*.

Die Regulation der Gluconeogenese und des Glyoxylat-Zyklus in *S. cerevisiae*

Die Expression der Glyoxylat-Zyklus und der gluconeogenischen Gene in *S. cerevisiae* unterliegt der Glucoserepression (einen Überblick geben Entian und Barnett, 1992; Gancedo, 1992; Gancedo, 1998; Johnston und Carlson, 1992; Ronne, 1995, Entian und Schüller, 1997). Die Cat1p Proteinkinase ist für die Derepression dieser Gene essentiell. Deletionsuntersuchungen an den jeweiligen Promotoren sowie genetische Daten deuteten auf einen gemeinsamen positiven Regulationsmechanismus über sequenzverwandte *cis*-Elemente für die Gene des Glyoxylat-Zyklus und der Gluconeogenese hin. In den Promotoren von *PCK1* und *FBP1* wurden jeweils zwei für die Derepression der Gene essentielle UAS ("upstream activating sequence") -Elemente identifiziert (Proft *et al.*, 1995a; Niederacher *et al.*, 1992). Ein funktionelles UAS-Element im Promotor von *ICL1* wurde als CSRE ("carbon source-responsive element") beschrieben (Schöler und Schüller, 1994). Aus diesen charakterisierten UAS/CSRE-Elementen konnte die Konsensussequenz CGGRYRNMNGGA abgeleitet werden (Proft *et al.*, 1995b). Im Promotor von *MLS1* wurden ebenfalls zwei funktionelle UAS/CSRE-Elemente charakterisiert (Caspary *et al.*, 1997).

Die Expression der gluconeogenischen Gene erfolgt hauptsächlich positiv durch UAS/CSRE-Elemente. Dennoch enthalten die meisten der Promotoren dieser Gene auch negativ regulatorische Elemente. So findet man in den Promotoren von *FBP1*, *ICL1* und *MLS1* Bindestellen für den Repressor Mig1p (Mercado *et al.*, 1991; Schöler und Schüller, 1994; Hedges *et al.*, 1995; Caspary *et al.*, 1997). Interessanterweise kommt es aber in einer *mig1/mig2*-Deletionsmutante nicht zu einem Repressionsausfall dieser Gene. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass die Repressoren bei einem Wechsel zu fermentativen Wachstumsbedingungen vor allem dem schnellen Abschalten der gluconeogenischen Gene dienen. Durch Gelretardierungsexperimente konnte gezeigt werden, dass die UAS/CSRE-Elemente spezifisch mit Proteinen aus Rohextrakten dereprimierter Zellen interagieren (Niederacher *et al.*, 1992; Schöler und Schüller, 1994; Proft *et al.*, 1995b; Rahner *et al.*, 1996; Caspary *et al.*, 1997; Kratzer und Schüller, 1997). Dieser Befund deutet eine direkte Vermittlung derepressionsspezifischer Transkriptionsaktivierung durch die UAS/CSRE-Elemente an. Als essentieller Faktor für die UAS/CSRE-abhängige Genaktivierung wurde *CAT8* isoliert (Hedges *et al.*, 1995). Mutanten in *CAT8* zeigen einen Derepressionsausfall der gluconeogenischen Gene, während die Systeme zur Verwertung alternativer Zucker nicht betroffen sind (Hedges *et al.*, 1995). *CAT8* codiert für ein Protein der Cys₆-Zink-Cluster

Familie. Die Regulation von Cat8p erfolgt sowohl auf der Ebene der Transkription als auch posttranslational. Es konnte gezeigt werden, dass die Transkription von *CAT8* der Glucoserepression unterliegt und negativ durch den Repressor Mig1p reguliert wird (Hedges *et al.*, 1995). Der Befund, dass Cat8p als Fusionsprotein mit der DNS-Bindedomäne des Transkriptionsaktivators Gal4p spezifisch unter Derepressionsbedingungen die Transkription eines Reportergens aktivieren kann, deutet auf eine posttranslationale Aktivierung des Proteins hin (Rahner *et al.*, 1996; Randez-Gil *et al.*, 1997). Diese Aktivierung von Cat8p korreliert bei Wachstum mit nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquellen mit dem Auftreten mehrfach phosphorylierter Formen des Proteins (Randez-Gil *et al.*, 1997). Durch genetische Studien konnte gezeigt werden, dass die Cat1p/Cat3p-Proteinkinase sowohl für die Expression, als auch für die Aktivierung von Cat8p essentiell ist (Hedges *et al.*, 1995; Rahner *et al.*, 1996; Randez-Gil *et al.*, 1997). Ob Cat8p ein direktes Substrat der Cat1p/Cat3p Proteinkinase darstellt, ist jedoch fraglich (Randez-Gil *et al.*, 1997). Obwohl die experimentellen Befunde Cat8p als wahrscheinlichen direkten Transkriptionsaktivator UAS/CSRE-abhängiger Transkriptionsaktivierung ausweisen, scheint Sip4p, ein weiterer Transkriptionsfaktor, ebenfalls an der positiven Regulation der UAS/CSRE-Elemente beteiligt zu sein (Vincent und Carlson, 1998).

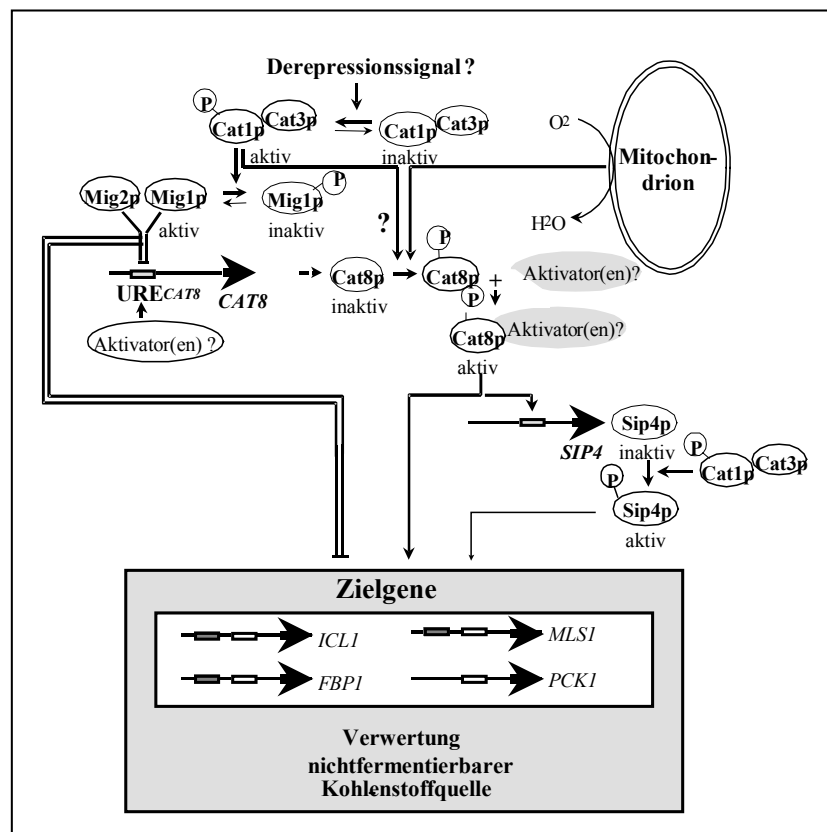


Abb. 1.2 : Schema der Regulation der Gluconeogenese Gene *PCK1* und *FBPI* sowie der Glyoxylat-Zyklus Gene *ICL1* und *MLS1* in *S. cerevisiae*.

Die Gluconeogenese und der Glyoxylat-Zyklus in *C. albicans*

Da *C. albicans* auf nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquellen wächst, muss eine vollständige Enzymausstattung für den Glyoxylat-Zyklus sowie die Gluconeogenese vorhanden sein. Das einzige bisher beschriebene Enzym dieser Stoffwechselwege ist die Phosphoenolpyruvat Carboxykinase (CaPck1p) (Leuker *et al.*, 1997). Lediglich in dem sehr nahen verwandten Organismus *Candida tropicalis* wurden die Gene für die Glyoxylat-Zyklus Enzyme Isocitrat Lyase (Atomi *et al.*, 1990) und Malat Synthase (Ueda *et al.*, 1986) isoliert. Für die Fructose 1,6-bisphosphatase liegen jedoch auch hier keine Informationen vor.

Über die Regulation der Gluconeogenese und des Glyoxylat-Zyklus in *C. albicans* stehen wenig Informationen zur Verfügung, jedoch scheinen die gleichen regulatorischen Mechanismen zu existieren wie in *S. cerevisiae*. Die Expression von *CaPCK1* wird auf Ebene der Transkription Kohlenstoffquellen-abhängig reguliert. Das Gen ist Glucose reprimiert und die Genexpression wird auf nicht-fermentierbaren Kohlestoffquellen induziert (Leuker *et al.*, 1997). Der Promotor von *CaPCK1* besitzt mögliche UAS/CSRE-Elemente, die für die transkriptionelle Kontrolle wichtig sein könnten. Auch existieren in *C. albicans* Homologe zu den regulatorischen Proteine Cat1p, Mig1p und Cat8p von *S. cerevisiae*. Cat1p ist in *S. cerevisiae* ein essentielles Protein für das Wachstum auf Kohlenstoffquellen, für deren Verwertung Enzyme benötigt werden, die Glucose reprimiert sind (z.B. nicht-fermentierbare Kohlenstoffquellen, Saccharose), nicht jedoch wenn die Zelle mit Glucose als Kohlenstoffquelle wächst. CaCat1p kann die $\Delta cat1$ Deletion in *S. cerevisiae* komplementieren und verhilft dem Stamm wieder zu Wachstum auf Saccharose. Ein wesentlicher Unterschied von CaCat1p in *C. albicans* zu ScCat1p in *S. cerevisiae* ist, dass in *C. albicans* die Proteinkinase unter allen Wachstumsbedingungen (auch mit Glucose als Kohlenstoffquelle) essentiell ist (Petter *et al.*, 1997). Dies bedeutet, dass CaCat1p andere Stoffwechselwege reguliert als dies ScCat1p in *S. cerevisiae* tut, oder dass die gleichen Stoffwechselwege reguliert werden, sie aber in *C. albicans* von generell essentieller Funktion sind. CaMig1p wurde isoliert und ist in *S. cerevisiae* funktionell (Zaragoza *et al.*, 2000). Der deutlichste Effekt von $\Delta mig1$ in *S. cerevisiae* ist ein Repressionsausfall von Genen, die Proteine für die Saccharose Verwertung (Nehlin und Ronne, 1990; Lutfiyya und Johnston, 1996) oder den Galaktose Metabolismus (Nehlin *et al.*, 1991) kodieren. Die Expression dieser Gene in *C. albicans* ist unbeeinflusst von *CaMIG1* (Zaragoza *et al.*, 2000), was den Schluss zulässt, dass möglicherweise weitere Analoge existieren. Kürzlich konnte auch *CaCAT8* isoliert

werden, welches den Defekt einer $\Delta cat8$ Deletion in *S. cerevisiae* (kein Wachstum auf nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquellen) funktionell komplementieren kann (S. Dicken, unveröffentlicht). Diese Befunde lassen darauf schließen, dass es Ähnlichkeiten in der Regulation der Gluconeogenese und des Glyoxylat-Zyklus zwischen *C. albicans* und *S. cerevisiae* gibt. Die Tatsache, dass *CaCAT1* ein essentielles Gen ist, deutet außerdem auf die Möglichkeit hin, dass die von Cat1p regulierten Stoffwechselwege, wie etwa die Gluconeogenese oder der Glyoxylat-Zyklus, generell essentielle Stoffwechselwege in *C. albicans* darstellen.

1.6 Essentielle Gene von *C. albicans* als mögliche Wirkorte antimykotischer Stoffe

Die Identifizierung und Charakterisierung potentieller Wirkorte für neue Antimykotika ist eine wichtige Phase bei der Neuentwicklung von Medikamenten. Hier bieten sich solche Strukturen und Stoffwechselwege an, die in *C. albicans* essentiell für das vegetative Wachstum sind und von denen man keine Homologe in höheren Eukaryonten findet oder diese stark abweichend sind. Dies vermeidet mögliche toxische Nebenwirkungen beim Wirt.

Es gibt mehrere Möglichkeiten, essentielle Gene von *C. albicans* zu identifizieren, d.h. primär zunächst einmal die Sequenzinformationen zu erhalten, als Grundlage zu weiteren Untersuchungen. Hier macht sich bezahlt, dass der Modellorganismus *S. cerevisiae* bereits komplett sequenziert wurde und die Sequenz des Genoms in verschiedenen Datenbanken verfügbar ist (Dujon, 1996; Goffeau *et al.*, 1996; Hieter *et al.*, 1996; Johnston, 1996). Außerdem ist die Funktionsanalyse vieler Gene bereits in einem fortgeschrittenen Stadium, so dass man alle essentiellen Gene von *S. cerevisiae* kennt (*Saccharomyces* Genome Database, Stanford). Essentielle Gene kodieren häufig für Proteine/Enzyme grundlegender Stoffwechselwege oder Strukturen, die in Pilzen stark konserviert sind. Alle hier beschriebenen Möglichkeiten, essentielle Gene von *C. albicans* (aber auch anderer Organismen) zu isolieren, basieren immer auf der Annahme, dass zu einem essentiellen Gen von *S. cerevisiae* (oder einem anderen Pilz) ein homologes essentielles Gen in *C. albicans* existiert. Eine Strategie essentielle Gene von *C. albicans* zu identifizieren und zu isolieren ist die Hybridisierung mit heterologen Sonden. Diese Methode wurde z.B. für die Isolierung von *CaACT1* (kodiert für Aktin; Losberger und Ernst, 1989) oder *TUB2* (kodiert für β -Tubulin; Smith *et al.*, 1988) angewendet. Eine andere Möglichkeit Gene von *C. albicans* zu isolieren, die auch auf Sequenzähnlichkeit zwischen homologen Genen basiert, ist der Einsatz der Polymerase-Ketten-Reaktion mit degenerierten Primern, welche an konservierte Stellen binden. Mit Hilfe dieser Methode wurden z.B. *DLH1* (Diener und Fink, 1996) oder *CaVPS34* (Eck *et al.*, 2000)

isoliert. Eine dritte Methode, die weniger auf Sequenzähnlichkeit als vielmehr auf Funktionsähnlichkeit basiert, ist die Methode der funktionellen Komplementation. Während Proteinsequenzen und noch viel stärker DNS Sequenzen homologer Gene/Proteine oftmals sehr unterschiedlich und wenig konserviert sind, ist die Struktur und Funktion homologer Proteine weitaus stärker konserviert. Die Tatsache, dass Gene von *C. albicans* in *S. cerevisiae* zumeist normal exprimiert werden, ermöglicht die Isolierung von *C. albicans* Genen durch Komplementation von *S. cerevisiae* Deletionsphänotypen. Diese ist die am häufigsten eingesetzte Methode, um *C. albicans* Gene zu identifizieren und führte u.a. zur Isolierung von *HIS4* (Altboum *et al.*, 1990), *URA3* (Gillum *et al.*, 1984), *CHR1*, *CSR1* (Kim *et al.*, 2000), *FCR1* (Talibi und Raymond, 1999). Diese Methode setzt jedoch voraus, dass die *S. cerevisiae* Deletionsstämme noch lebensfähig sind und die Mutanten einen Phänotyp besitzen, der zur Selektion eingesetzt werden kann. Bei essentiellen Genen ist dies nicht durchführbar, da ein Deletionsstamm nicht lebensfähig ist, weshalb mit konditional letalen Stämmen gearbeitet werden muss. Diese Stämme wachsen unter permissiven Bedingungen wildtypartig und eine *C. albicans* Genbank kann eingebracht werden. Wechselt man nun zu restriktiven Bedingungen, so sterben alle Zellen, bis auf die, welche durch die genetische Information von *C. albicans* den Defekt ausgleichen können. Diese konditionale Letalität kann auf unterschiedlichen Mechanismen beruhen. Eine in der Literatur häufig zu findende konditionale Letalität beruht auf einer Punktmutation in einem essentiellen Gen (in der Regel Missense-Mutationen). Die Mutation führt zur Expression eines veränderten Proteins, das unter permissiven Bedingungen zwar funktionell ist, unter restriktiven Bedingungen (z.B. erhöhter Temperatur) jedoch nicht mehr. Die Strategie der funktionellen Komplementation von konditional letalen (z.B. temperaturempfindlichen) Punktmutanten setzt oftmals lange und häufig schwierige Vorarbeiten für die Herstellung dieser Stämme voraus. Sie wurde z.B. für die Klonierung von *POL3* (Nolan und Rosamond, 1996) oder *CDC25* (Goldberg *et al.*, 1993) von *C. albicans* eingesetzt. Eine andere Möglichkeit konditional letale Stämme herzustellen besteht darin, essentielle Gene unter die Kontrolle regulierbarer Promotoren zu stellen (Belli *et al.*, 1998) und nach Transformation einer *C. albicans* Genbank die Expression des endogenen essentiellen Gens zu reprimieren. Der Nachteil dieser Methode ist, dass Promotoren immer eine Basalaktivität besitzen und diese trotz Repression zu einer Restexpression des Gens führt. Oftmals genügt diese stark verminderte Expression, um noch genügend essentielles Protein für die Zelle bereit zu stellen, so dass der Stamm trotz Repression wachsen kann.

Herstellung konditional letaler *S. cerevisiae* Stämme durch das Cre/loxP System

Da die Methode der funktionellen Komplementation von *S. cerevisiae* Mutanten die erfolgreichste ist und mit ihr auch homologe Gene/Proteine anderer Organismen mit sehr geringe Sequenzübereinstimmung isoliert werden können, sollte diese Methode eingesetzt werden, um essentielle Gene von *C. albicans* zu isolieren. Da dies jedoch nur in Verbindung mit konditional letalen Stämmen durchgeführt werden kann, die Herstellung solcher Stämme jedoch schwierig und oftmals erfolglos ist, sollte eine neue Methode entwickelt werden, mit der einfach und insbesondere effizient konditional letale Stämme hergestellt werden können. Diese Methode basiert im wesentlichen auf :

- dem induzierten Entfernen eines essentiellen Gens von *S. cerevisiae* aus dem Genom durch eine Cre/loxP-vermittelte sequenzspezifische Rekombination und der anschließenden funktionellen Komplementation mit einem *C. albicans* homologen Gen
- der Selektion von Zellen, die das essentielle *S. cerevisiae* Gen nach erfolgter Rekombination verloren haben

Sequenzspezifische Rekombinationen sind in Eukaryonten (z.B. FLP Rekombinase der Hefe 2 μ Plasmide) und Prokaryonten (z.B. Integrase des Bacteriophagen λ zur Integration ins *E. coli* Genom) bekannt. Sie bedürfen immer spezifischer DNS Sequenzen, welche von einer Rekombinase (Integrase) erkannt wird. Die Recombinase katalysiert nun die Neuverknüpfung von DNS Sequenzen und damit verbunden eine Rekombination des genetischen Materials. Die Cre Rekombinase des Bacteriophagen P1 ist ein relativ kleines Protein von 38 kDa. Sie vermittelt die sequenzspezifische Rekombination zwischen zwei 34 Basenpaar großen sogenannten loxP Sequenzen (Abb. 1.3). Diese loxP Sequenzen bestehen aus einer zentralen 8 bp großen Sequenz mit je einer flankierenden 13 bp großen inversen Repetition, welche als Cre Bindestellen dienen.

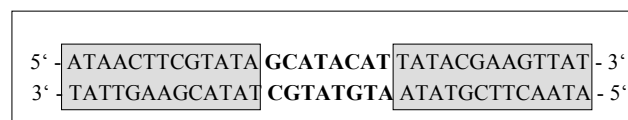


Abb. 1.3 : Die 34 Basenpaare der loxP Sequenz. Die inversen Repetitionen sind grau hinterlegt.

Liegen zwei loxP Sequenzen auf dem gleichen DNS Strang in gleicher Orientierung, so führt die Cre-vermittelte Rekombination zum Verlust der zwischen den loxP Sequenzen liegenden Basenpaaren (Abb. 1.4). Das Ergebnis ist eine genomische loxP Sequenz sowie eine loxP

Sequenz auf einem zirkulären Produkt. Da dieses zirkuläre Produkt normalerweise keine autonom replizierende Sequenz und auch keine Centromerregion enthält, verbleibt es in der Zelle und wird in folgenden Zellteilungen weder dupliziert noch an die Tochterzelle weitergegeben. Wie Abbildung 1.4 zeigt, ist dieser Prozess umkehrbar und kann auch genutzt werden, um DNS ins Genom zu integrieren.

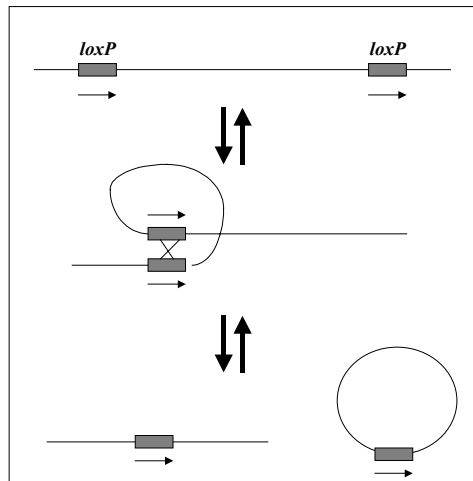


Abb. 1.4 : Ergebnisse Cre/loxP-vermittelter Rekombinationen.

Die Cre Rekombinase wird in *S. cerevisiae* bereits für die Wiedergewinnung von Selektionsmarkern nach Gendeletionen eingesetzt (Güldener *et al.*, 1996). Hierbei wird eine Selektionsmarke, die von *loxP* Sequenzen flankiert ist und zusätzlich an den Enden homologe Bereiche für die homologe Rekombination trägt, in die Hefe transformiert. Nach erfolgreicher Deletion kann durch Expression der Cre Rekombinase die Marke aus dem Genom rekombinieren und sie kann für weitere Deletionen eingesetzt werden. Auch bei der Herstellung von sogenannten Knock-out Mäusen wird die Cre Rekombinase eingesetzt, um Deletionen in embryonalen Stammstellen von Mäusen zu erzeugen (LePage *et al.*, 2000).

1.7 Aufgabenstellung

Opportunistische Pilzinfektionen stellen ein wachsendes Problem dar. Da Pilze eukaryontische Organismen sind und viele grundlegende Prozesse in allen Eukaryonten konserviert sind, haben antimykotische Stoffe zumeist starke Nebenwirkungen, so dass sie nicht zu therapeutischen Zwecken eingesetzt werden können. Alle gängigen Antimykotika wirken auf die Ergosterin-Synthese bzw. stören Membraneigenschaften durch Anlagerung an Ergosterin. Auftretende Resistenzen gegen diese Medikamente machen die Neuentwicklung antimykotisch wirksamer Verbindungen nötig. Interessante Wirkorte für solche neuen Substanzen sind insbesondere essentielle Stoffwechselwege und Strukturen von Pilzen, die sich deutlich von denen höherer Eukaryonten unterscheiden oder hier gar nicht existieren. Im Rahmen dieser Doktorarbeit sollte die Gluconeogenese bzw. der Glyoxylat-Zyklus des humanpathogenen Modellorganismus *C. albicans* näher charakterisiert werden. Diese Stoffwechselwege sind in der Hefe *S. cerevisiae* ausführlich beschrieben, jedoch liegen kaum Informationen von *C. albicans* vor. Sie sind von besonderem Interesse, weil der Glyoxylat-Zyklus im Menschen nicht existiert und die Enzyme der Gluconeogenese des Menschen sich deutlich von denen der Hefe *S. cerevisiae* unterscheiden. Außerdem gibt es Hinweise, dass die Verwertung alternativer Kohlenstoffquellen für *C. albicans* eine wichtigere Rolle spielt als dies für *S. cerevisiae* der Fall ist. Auch wenn diese Stoffwechselwege nicht von generell essentieller Funktion sind, so sind Situationen vorstellbar, in denen das Fehlen bzw. die Inhibierung dieser Stoffwechselwege die Vitalität und Virulenz der *C. albicans* Zelle mindern. Somit könnten diese Stoffwechselwege mögliche Wirkorte für Antimykotika darstellen. Außerdem sollte untersucht werden, ob die Erkenntnisse, die man in *S. cerevisiae* über diese Stoffwechselwege erlangt hat (z.B. Regulation), auf *C. albicans* übertragen werden können.

Außerdem sollte eine Methode entwickelt werden, die es ermöglicht, essentielle Gene von *C. albicans* zu isolieren und zu charakterisieren. Diese Methode basiert auf dem Prinzip der funktionellen Komplementation in *S. cerevisiae*. Essentielle Gene/Proteine sind häufig an fundamental wichtigen Prozessen in der Zelle beteiligt, die in Eukaryonten konserviert sind. Alle essentiellen Gene von *S. cerevisiae* sind identifiziert und konditional letale Stämme könnten nun als Werkzeuge dienen, die homologen Gene anderer Organismen zu isolieren. Als Testkandidat für die Etablierung dieser Methode diene *YLR186w* der Hefe *S. cerevisiae*. Die Funktion dieses Gens ist weitgehend unbekannt und sollte deshalb näher charakterisiert werden.

2. Material und Methoden

2.1 Verwendete Organismen

Saccharomyces cerevisiae und *Candida albicans* Stämme

Stamm	Organismus	Genotyp
CEN.PK2*	<i>S. cerevisiae</i>	<i>MATa/α leu2-3,112/leu2-3,112 ura3-52/ura3-52 trp1-289/trp1-289 his3-delta1/his3-delta1 MAL2-8^c/MAL2-8^c SUC2/SUC2</i>
CEN.PK2-1C*	<i>S. cerevisiae</i>	<i>MATa leu2-3,112 ura3-52 trp1-289 his3-Δ1 MAL2-8^c SUC2</i>
CEN.PK2-1D*	<i>S. cerevisiae</i>	<i>MATα ura3-52 his3-Δ1 leu2-3,112 trp1-289 MAL2-8^c SUC2</i>
CEN.PK192-1D*	<i>S. cerevisiae</i>	<i>MATa leu2-3,112 ura3-52 trp1-289 his3-Δ1 MAL2-8^c SUC2 Δpck1::loxP-KanR-loxP</i>
CEN.PK200-4D*	<i>S. cerevisiae</i>	<i>MATa leu2-3,112 ura3-52 trp1-289 his3-Δ1 MAL2-8^c SUC2 Δicl1::loxP-KanR-loxP</i>
CEN.PK201-3B*	<i>S. cerevisiae</i>	<i>MATa leu2-3,112 ura3-52 trp1-289 his3-Δ1 MAL2-8^c SUC2 Δfbp1::loxP-KanR-loxP</i>
CEN.PK202-2C*	<i>S. cerevisiae</i>	<i>MATa leu2-3,112 ura3-52 trp1-289 his3-Δ1 MAL2-8^c SUC2 Δmls1::loxP-KanR-loxP</i>
CEN.PK130-7B*	<i>S. cerevisiae</i>	<i>MATα leu2-3,112 ura3-52 trp1-289 his3-Δ1 Δcat1::HIS3 MAL2-8^c SUC2</i>
CEN.PK143 - 1B*	<i>S. cerevisiae</i>	<i>MATa leu2-3,112 ura3-52 trp1-289 his3-Δ1 MAL2-8^c SUC2 Δcat8::loxP-KanR-loxP</i>
CEN.SR679*	<i>S. cerevisiae</i>	<i>MATa/α leu2-3,112/leu2-3,112 ura3-52/ura3-52 trp1-289/trp1-289 his3-delta1/his3-delta1 MAL2-8^c/MAL2-8^c SUC2/SUC2 NEP1/Δnep1:: loxP-KanR-loxP</i>
PJ69-4a	<i>S. cerevisiae</i>	<i>MATa leu2-3,112 ura3-52 trp1-901 his3-200 gal4Δ gal80Δ LYS2::GAL1-HIS3 ade2::GAL2-ADE2 met2::GAL7-lacZ</i>
WDAM001(HE)	<i>S. cerevisiae</i>	<i>MAT a/α; ura3-1/ura3-1 his3-11/his3-11 leu2-3_112/leu2-3_112 trp1Δ2/trp1Δ2 ade2-1/ade2-1 can1-100/can1-100 Δydl148c(65,2415)::loxP-kanMX4-loxP/YDL148c</i>
SDE1*	<i>S. cerevisiae</i>	<i>MATa leu2-3,112 ura3-52 trp1-289 his3-Δ1 MAL2-8^c SUC2 Δnep1:: loxP-KanR-loxP + pDE42</i>
SDE2*	<i>S. cerevisiae</i>	<i>MATα leu2-3,112 ura3-52 trp1-289 his3-Δ1 MAL2-8^c SUC2 Δnep1:: loxP-KanR-loxP + pDE42</i>
SDE3*	<i>S. cerevisiae</i>	<i>MATα leu2-3,112 ura3-52 trp1-289 his3-Δ1 MAL2-8^c SUC2 Δnep1:: loxP-KanR-loxP + pDE49</i>
SDE4*	<i>S. cerevisiae</i>	<i>MATα leu2-3,112 ura3-52 trp1-289 his3-Δ1 MAL2-8^c SUC2 nep1-ts1</i>
SDE5*	<i>S. cerevisiae</i>	<i>MATα leu2-3,112 ura3-52 trp1-289 his3-Δ1 MAL2-8^c SUC2 nep1-ts2</i>
SDE6*	<i>S. cerevisiae</i>	<i>MATα leu2-3,112 ura3-52 trp1-289 his3-Δ1 MAL2-8^c SUC2 nep1-ts3</i>
SDE7*	<i>S. cerevisiae</i>	<i>MATα leu2-3,112 ura3-52 trp1-289 his3-Δ1 MAL2-8^c SUC2 nep1-ts4</i>
SDE8*	<i>S. cerevisiae</i>	<i>MATa/α leu2-3,112/leu2-3,112 ura3-52/ura3-52 trp1-289/trp1-289 his3-delta1/his3-delta1 MAL2-8^c SUC2 NEP1/Δnep1:: TEFProm-loxP-URA3-NEP1-loxP- kan^r -TEFTerm</i>
SDE8-1A*	<i>S. cerevisiae</i>	<i>MATα leu2-3,112 ura3-52 trp1-289 his3-Δ1 MAL2-8^c SUC2 Δnep1::TEFProm-loxP-URA3-NEP1-loxP- kan^r -TEFTerm</i>
SC5314	<i>C. albicans</i>	Klinisches Isolat

CAI-4	<i>C. albicans</i>	$\Delta ura3::imm434/\Delta ura3::imm434$
CAE-1	<i>C. albicans</i>	$FBP1/\Delta fbp1::URA3 \Delta ura3::imm434/\Delta ura3::imm434$
CAE-2	<i>C. albicans</i>	$FBP1/\Delta fbp1::hisG \Delta ura3::imm434/\Delta ura3::imm434$
CAE-3	<i>C. albicans</i>	$\Delta fbp1::URA3/\Delta fbp1::hisG \Delta ura3::imm434/\Delta ura3::imm434$
CAE-4	<i>C. albicans</i>	$RP10/rp10::MET3-FBP1-URA3 \Delta fbp1::hisG/\Delta fbp1::URA3 \Delta ura3::imm434/\Delta ura3::imm434$

Alle oben mit " * " gekennzeichneten *S. cerevisiae* Stämme sind isogen zu dem Stamm CEN.PK2 (Entian und Kötter, 1998).

Bedeutung der Gensymbole:

MATa und *MAT α* beziehen sich auf den Paarungstyp. Die Marker *ura3*, *leu2*, *his3*, *met2*, *ade2* und *trp1* verursachen entsprechende Aminosäuren- bzw. Basenauxotrophien. Punktmutationen (z.B. *nep1-ts1*) sind mit der jeweiligen Allelbezeichnung, Deletionsmutationen (z.B. *Anep1::loxP-KanR-loxP*) mit dem verwendeten Markergen dargestellt. *LYS2::GAL1-HIS3* bezeichnet die Insertion einer *GAL1-HIS3* Fusion in den chromosomalen *LYS2* Locus.

***Escherichia coli* Stamm**

DH5 α : *F j80d/lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF) U169 deoR recA1 endA1
hsdR17(*r_K⁻ m_K⁺*) supE44 thi1 gyrA96 relA1*

F weist auf das Fehlen des F-Episoms hin. Die partielle Deletion *lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF)* erlaubt eine α -Komplementation mit der β -Galaktosidase des Wirts. Der Stamm zeigt konstitutive Expression von Genen, die an der Desoxyribosynthese beteiligt sind (*deoR*). Die Rekombination ist defizient (*recA1*) und eine Endonucleasemutation (*endA1*) ist vorhanden. Der Stamm ist weiterhin Restriktions-negativ sowie Modifikations-positiv [*hsdR17(r_K⁻ m_K⁺)*]. Die Markerbezeichnung *supE44* bezieht sich auf einen Amber-Suppressor, *thi1* führt zu Thiaminauxotrophie, *gyrA96* ist eine Mutation in der DNS-Gyrase und durch die Mutation *relA1* ist der Stringent-Faktor eliminiert worden.

2.2 Verwendete Plasmide

pDE2: Amplifikation von *ScURA3* mit Primer 218/219 und chromosomaler Wildtyp DNS als Matrize; schneiden des PCR-Produkts mit *XbaI/NheI* und klonieren in den *XbaI* geöffneten und dephosphorylierten Vektor pUG6.

pDE15: PCR mit Primer 22/23 und chromosomaler Wildtyp DNS als Matrize; schneiden des PCR-Produkts mit *NotI/BamHI* und klonieren in den ebenfalls mit *NotI/BamHI* geöffneten Vektor pDE59.

pDE32 (GBT9-NEP1): PCR mit Primer 55/56 und chromosomaler Wildtyp DNS als Matrize; schneiden des PCR-Produkts mit *BamHI/PstI* und klonieren in den ebenfalls mit *BamHI/PstI* geöffneten Vektor pGBT9.

pDE33 (GAD424-NEP1): PCR mit Primer 55/56 und chromosomaler Wildtyp DNS als Matrize; schneiden des PCR-Produkts mit *BamHI/PstI* und klonieren in den ebenfalls mit *BamHI/PstI* geöffneten Vektor pGAD424.

pDE34 (GBT9-TUB1): PCR mit Primer 68/69 und Wildtyp cDNS als Matrize (freundlicherweise durch B.Krems zur Verfügung gestellt); schneiden des PCR-Produkts mit *BamHI/PstI* und klonieren in den ebenfalls mit *BamHI/PstI* geöffneten Vektor pGBT9.

pDE35 (GAD424-TUB1): PCR mit Primer 68/69 und Wildtyp cDNS als Matrize (freundlicherweise durch B.Krems zur Verfügung gestellt); schneiden des PCR-Produkts mit *BamHI/PstI* und klonieren in den ebenfalls mit *BamHI/PstI* geöffneten Vektor pGAD424.

pDE36 (GBT9-TUB2): PCR mit Primer 124/125 und chromosomaler Wildtyp DNS als Matrize; schneiden des PCR-Produkts mit *PstI* und klonieren in den ebenfalls mit *PstI* geöffneten und dephosphorylierten Vektor pGBT9.

pDE37 (GAD424-TUB2) PCR mit Primer 124/125 und chromosomaler Wildtyp DNS als Matrize; schneiden des PCR-Produkts mit *PstI* und klonieren in den ebenfalls mit *PstI* geöffneten und dephosphorylierten Vektor pGAD424.

pDE38 (GBT9-YDL148c): PCR mit Primer 66/67 und chromosomaler Wildtyp DNS als Matrize; schneiden des PCR-Produkts mit *BamHI/PstI* und klonieren in den ebenfalls mit *BamHI/PstI* geöffneten Vektor pGBT9.

pDE39 (GAD424-YDL148c): PCR mit Primer 66/67 und chromosomaler Wildtyp DNS als Matrize; schneiden des PCR-Produkts mit *BamHI/PstI* und klonieren in den ebenfalls mit *BamHI/PstI* geöffneten Vektor pGAD424

pDE41 (GAD424-YPRI44c): PCR mit Primer 122/123 und chromosomaler Wildtyp DNS als Matrize; schneiden des PCR-Produkts mit *Sall/PstI* und klonieren in den ebenfalls mit

SalI/PstI geöffneten Vektor pGAD424.

pDE42 (GFP-*NEPI*): PCR mit Primer 53/54 und chromosomaler Wildtyp DNS als Matrize; schneiden des PCR-Produkts mit *BamHI/ClaI* und klonieren in den ebenfalls mit *BamHI/ClaI* geöffneten Vektor pUG34.

pDE43 (*GALI-GFP-NEPI*): PCR mit Primer 64/65 und pDE42 als Matrize; schneiden des PCR-Produkts mit *NotI/SacI* und klonieren in den ebenfalls mit *NotI/SacI* geöffneten Vektor pYES2.0.

pDE45 (GFP-*YDL148c*): PCR mit Primer 109/110 und chromosomaler Wildtyp DNS als Matrize; schneiden des PCR-Produkts mit *BamHI/SalI* und klonieren in den ebenfalls mit *BamHI/SalI* geöffneten Vektor pUG34.

pDE46 (GFP-*CaNEPI*): PCR mit Primer 92/93 und chromosomaler *C. albicans* DNS von Stamm SC5314 als Matrize; schneiden des PCR-Produkts mit *BamHI/SalI* und klonieren in den ebenfalls mit *BamHI/SalI* geöffneten Vektor pUG34.

pDE47 (GFP-C2F): pDE48 schneiden mit *BamHI/ClaI* und klonieren eines 724 bp großen Fragments in den mit *BamHI/ClaI* geöffneten Vektor pUG34.

pDE48 (pRS413-C2F): PCR mit Primer 62/63 und einer humanen cDNS Genbank gewonnen aus Nierenzellen (CLONTECH, Palo Alto, USA) als Matrize; schneiden des PCR-Produkts mit *BamHI* und klonieren in den mit *BamHI/EcoRV* geöffneten Vektor pRS413.

pDE49 (*GALI-C2F*): pDE48 schneiden mit *BamHI/XhoI* und klonieren eines 750 bp großen Fragments in den ebenfalls mit *BamHI/XhoI* geöffneten Vektor pYES2.0.

pDE50 (*GALI-NEPI*): PCR mit Primer 118/61 und chromosomaler Wildtyp DNS als Matrize; schneiden des PCR-Produkts mit *BamHI/NotI* und klonieren in den ebenfalls mit *BamHI/NotI* geöffneten Vektor pYES2.0.

pDE51 (2 μ COG-*NEPI*): 2 μ Genbankplasmid (ATCC 37323) mit gesamtem offenen Leserahmen sowie >1000 bp 5' Bereich und ca. 500 bp 3' Bereich von *YLR186w* (*NEPI*); isoliert durch Split-Marker-Selektion.

pDE54: PCR mit Primer 6/7 und pDE2 als Matrize; schneiden des PCR-Produkts mit *EcoRI/SalI* und klonieren in den ebenfalls mit *EcoRI/SalI* geöffneten Vektor pBlueskriptIIKS+.

pDE55: PCR mit Primer 4/5 und pUG6 als Matrize; schneiden des PCR-Produkts mit *EcoRI/SacI* und klonieren in den ebenfalls mit *EcoRI/SacI* geöffneten Vektor pDE54.

pDE56: PCR mit Primer 3/8 und pUG6 als Matrize; schneiden des PCR-Produkts mit *XhoI/SalI* und klonieren in den mit *XhoI* geöffneten und dephosphorylierten Vektor pDE55.

pDE57: pPK179 schneiden mit *EcoRI/StuI* und klonieren des *LEU2* enthaltenden Fragments in den ebenfalls mit *EcoRI/StuI* geöffneten Vektor pDE56.

pDE59: PCR mit Primer 90/91 und pBlueskriptIIKS+ als Matrize; klonieren des PCR-Produkts in den mit *EcoRI* geöffneten und mittels Klenow-Fragment aufgefüllten Vektor pDE56.

pDE74: YRp7 Genbankplasmid mit *CaNEP1* (*CaYLR186*); isoliert durch Split-Marker-Selektion.

pDE75: 3,5 kb großes *XbaI* Fragment von pDE74 mit *CaNEP1* (*CaYLR186*) kloniert in den mit *XbaI* geöffneten und dephosphorylierten Vektor pRS313.

pDE77: Isoliertes Plasmid mit *CgNEP1* (*CgYLR186*) aus einer genomischen *C. glabrata* Genbank in dem 2 μ Vektor pRS426. Die Genbank entstand durch partiellen Verdau genomischer *C. glabrata* DNS mit *Sau3A* und Ligation von Fragmenten der Größe 3 - 15 kb in den *BamHI* geschnittenen und dephosphorylierten Vektor pRS426 (S.Dicken, unveröffentlicht). Das Plasmid wurde freundlicherweise von S. Dicken zur Verfügung gestellt.

pDE93 (CENCOG-*NEP1*): pDE51 schneiden mit *BglII/SacI* und klonieren des 1341 bp großen Fragments (offener Leserahmen *NEP1* mit 332 bp Promotor- und 251 bp Terminator-region) in den mit *BamHI/SacI* geöffneten Vektor pRS315.

pDE96: PCR mit Primern M1/M2 und pDE93 als Matrize; schneiden des PCR-Produkts mit *ClaI/SacI* und klonieren in den mit *ClaI/SacI* geöffneten Vektor pRS413.

pDE97 (*MET3-CaFBP1*): PCR mit Primer 172/173 und pCaFBP1 als Matrize; schneiden des PCR-Produkts mit *PstI* und klonieren in das ebenfalls mit *PstI* geöffnete und dephosphorylierte Plasmid pCaEXP.

pDE111 (CENCOG-*nep1-ts2*): temperaturempfindliches *nep1-ts2*-Allel in pRS413; isoliert aus *NEP1* Mutantenbibliothek (siehe unten).

pDE112 (CENCOG-*nep1-ts1*): temperaturempfindliches *nep1-ts1*-Allel in pRS413; isoliert aus *NEP1* Mutantenbibliothek (siehe unten).

pDE113 (CENCOG-*nep1-ts3*): temperaturempfindliches *nep1-ts3*-Allel in pRS413; isoliert aus *NEP1* Mutantenbibliothek (siehe unten).

pDE114 (CENCOG-*nep1-ts4*): temperaturempfindliches *nep1-ts4*-Allel in pRS413; isoliert aus *NEP1* Mutantenbibliothek (siehe unten).

PDE120: 2 μ Genbankplasmid (ATCC 37323) mit *RPL37B* (teilweise), *PLM2* und *SAM2*; isoliert als Multicopy-Suppressor des temperaturempfindlichen Phänotyps von *nep1-ts1*.

PDE121: 2 μ Genbankplasmid (ATCC 37323) mit *RPL37B* (komplett), *PLM2* und *SAM2* isoliert als Multicopy-Suppressor des temperaturempfindlichen Phänotyps von *nep1-ts1*.

pDE123 (GFP-*nep1-ts1*): PCR mit Primer 53/54 und pDE112 als Matrize; schneiden des PCR-Produkts mit *BamHI/ClaI* und klonieren in den ebenfalls mit *BamHI/ClaI* geöffneten Vektor pUG34.

pCaMLS1: 4,2 kb großes *NcoI/XbaI* Fragment (3,7 kb genomische *C. albicans* DNS und 0,5 kb YRp7 Vektor Sequenz) mit *CaMLS1* kloniert in den ebenfalls mit *NcoI/XbaI* geöffneten Vektor pSAL.

pCaICL1: 3,2 kb großes *NsiI/SalI* genomisches *C. albicans* Fragment mit *CaICL1* kloniert in den mit *PstI/SalI* geöffneten Vektor pRS315.

pCaFBP1: YEplac195 Genbankplasmid mit 3,3 kb großem *C. albicans* genomischen Fragment auf dem *CaFBP1* liegt.

pCaPCK1: YRp7 Genbankplasmid mit ca. 10 kb großem *C. albicans* genomischen Fragment auf dem *CaPCK1* liegt.

pSUB1: Schneiden von pDE120 mit *HindIII* und Religation des 13,4 kb großen Restvektors.

pSUB2: Klonierung eines 1919 bp großen *HindIII* Fragments von pDE120 in den ebenfalls mit *HindIII* geöffneten 2 μ Hefevektor pRS425.

pSUB3: Klonierung eines 2627 bp großen *XhoI/ClaI* Fragments von pDE120 in den ebenfalls mit *XhoI/ClaI* geöffneten 2 μ Hefevektor pRS423.

pPK179: *CEN6/ARS4* Hefevektor mit *LEU2* als Selektionsmarke und der Cre-Rekombinase hinter einem *GAL1* Promotor; freundlicherweise von P. Kötter zur Verfügung gestellt.

pUG6: Plasmid mit der *loxP-kanMX-loxP* Kasette zur PCR-vermittelten Gendeletion in *S. cerevisiae* (Güldener *et al.*, 1996).

pUG34: *E. coli/S. cerevisiae* Shuttle-Vektor für die Herstellung N-terminaler GFP-Fusionen mit *CEN6/ARSH4* und *HIS3* als Selektionsmarke (Hegemann, pers. Mitteilung).

pSAL: *E. coli/S. cerevisiae* Shuttle-Vektor mit *CEN6/ARSH4* und *LEU2* als Selektionsmarke; freundlicherweise von P. Kötter zur Verfügung gestellt.

pGBT9: 2 μ Plasmid für Zwei-Hybrid Analysen; enthält *TRP1* als Selektionsmarke und die DNS-Bindedomäne des *GAL4* Regulatorgens (CLONTECH, Palo Alto, USA).

pGAD424: 2 μ Plasmid für Zwei-Hybrid Analysen; enthält *LEU2* als Selektionsmarke und die Aktivator-domäne des *GAL4* Regulatorgens (CLONTECH, Palo Alto, USA).

pBlueskriptIIKS+: Phagemid Vektor (Stratagene, Amsterdam).

pRS313: *E. coli/S. cerevisiae* Shuttle-Vektor mit *CEN6/ARS4* und *HIS3* als Selektionsmarke (Sikorsky und Hieter, 1989).

pRS315: *E. coli/S. cerevisiae* Shuttle-Vektor mit *CEN6/ARS4* und *LEU2* als Selektionsmarke (Sikorsky und Hieter, 1989).

pRS413: *E. coli/S. cerevisiae* Shuttle-Vektor mit *CEN6/ARS4* und *HIS3* als Selektionsmarke (Sikorsky und Hieter, 1989).

PRS423: *E. coli/S. cerevisiae* Shuttle-Vektor mit 2 μ Sequenz und *HIS3* als Selektionsmarke (Christianson *et al.*, 1992).

pRS425: *E. coli/S. cerevisiae* Shuttle-Vektor mit 2 μ Sequenz und *LEU2* als Selektionsmarke (Christianson *et al.*, 1992).

YEp13: *E. coli/S. cerevisiae* Shuttle-Vektor mit 2 μ Sequenz und *LEU2* als Selektionsmarke (Broach *et al.*, 1979).

pYES2.0: *E. coli/S. cerevisiae* Shuttle-Vektor mit 2 μ Sequenz und *URA3* als Selektionsmarke sowie dem *GALI* Promotor für die regulierbare, Kohlenstoffquellen-abhängige Expression von Genen (Invitrogen, Groningen).

pCaEXP: Plasmid mit dem *CaMET3* Promotor und *CaURA3* als Selektionsmarke zur Integration und regulierten Expression von Genen in *C. albicans* (Care *et al.*, 1999).

2.3 Nährmedien und Dauerkulturen

Hefemedien

Zur Anzucht der Stämme wurden Vollmedien auf YEP-Basis (1% Hefeextrakt, 2% Bactopecton) verwendet. In Flüssigmedien dienten 4% Glucose (YEPD), 3% Galaktose (YEPGal), 3% Ethanol (YEPE), 2% Acetat (YEPAc), 2% Glycerin (YEPGlyc), 4% Glucose + 3% Ethanol (YEPD/E) oder 3% Ethanol + 2% Glycerin (YEPE/Glyc) als Kohlenstoffquellen. Dabei wurde Ethanol nach der Sterilisation zugegeben. Für Plattenmedien wurde zusätzlich 1,5% Agar zugegeben. Bis auf Glucose, das hier 2%ig vorlag, wurden die gleichen Kohlenstoffquellen verwendet.

Synthetische Selektivmedien enthielten als Grundkomponenten 0,67% Yeast Nitrogen Base, 0,5% Ammoniumsulfat sowie 10 mg/l Adenin; je 20 mg/l Arginin, Histidin, Methionin, Tryptophan und Uracil; je 30 mg/l Isoleucin, Leucin, Threonin, Tyrosin, Valin und 50 mg/l Phenylalanin. Als Kohlenstoffquellen wurden den Flüssigmedien 4% Glucose (SCD), 3% Galaktose (SCGal), 2% Ethanol (SCE), 2% Natriumacetat (SCAc) oder 2% Glycerin (SCGlyc) zugesetzt. Dabei wurde Ethanol nach der Sterilisation zugegeben. In Plattenmedien

wurden 2% Glucose und 2% Galaktose verwendet. Als Selektivmedien für die Identifizierung und selektive Anzucht von entsprechend transformierten Hefezellen dienten SCD-ura, SCD-his, SCD-leu, SCD-trp, SCD-ura-leu, SCD-ura-his, SCD-his-leu und SCD-leu-trp oder die entsprechenden SCGal-Medien, denen die genannten Aminosäuren bzw. Basen fehlten.

Synthetische Selektivmedien für *C. albicans* enthielten zusätzlich 100 µg/ml Uridin.

Sporulationsmedien enthielten 1 % Kaliumacetat und 1,5 % Agar.

G418 (GibcoBRL, Karlsruhe) und Thiabendazol (Sigma-Aldrich, Steinheim) wurden nach dem Autoklavieren zum Medium gegeben. Zur Induktion von Paarungsprojektionen ("Shmoos") wurde α -Paarungstypfaktor (Sigma, St.Louis, USA) ins Medium gegeben (Endkonzentration 10 µg/ml). Die Zellzyklusarretierung erfolgte durch Inkubation mit Hydroxyharnstoff (Merck, Darmstadt) für 4 h bei 30°C (Endkonzentration 0,1 M). S-Adenosylmethionin-Platten wurden durch Ausplattieren von 250 µl S-Adenosylmethionin (20mg/ml) (USB, Brunchburg, USA) auf feste Medien hergestellt. Zur Keimschlauchinduktion von *C. albicans* wurde fötales Rinderserum (GibcoBRL, Karlsruhe) zu Flüssigkulturen gegeben (Endkonzentration 10%).

Bakterienmedien

LB-Flüssigmedium (1% Bactopecton; 0,5% Hefeextrakt; 0,5% NaCl) wurde als Lösung aus einer fertigen Mischung der Firma GIBCO hergestellt.

TB-Flüssigmedium wurde durch Mischen von Base Broth (12 g Bactotrypton; 24 g Hefeextrakt; 4 ml Glycerin; H₂O ad 900ml) und KP-Puffer (0,17 M KH₂PO₄; 0,72 M K₂HPO₄) im Verhältnis 10:1 nach dem Autoklavieren hergestellt.

Zur selektiven Anzucht entsprechend transformierter Bakterienzellen wurden jeweils 40 mg/l Ampicillin aus einer sterilen Stammlösung (2 mg/ml) hinzugefügt (LB_{Amp} bzw. TB_{Amp}).

Alle Plattenmedien enthielten 1,5% Agar. Alle Medien wurden bei 121°C und 1 atm für 20 Minuten sterilisiert.

Dauerkulturen

E. coli- und *S. cerevisiae*-Dauerkulturen wurden durch Zugabe von 80 µl DMSO zu 920 µl einer frischen stationären Kultur angelegt und bei -70°C gelagert.

2.4 Zellanzucht, Zellernte und Rohextraktgewinnung

Für Enzymtests wurden 5 ml Röhrenkulturen verwendet, die aus stationären Vorkulturen angeimpft und bis zur logarithmischen Wachstumsphase unter Schütteln bei 30°C inkubiert wurden.

Für Derepressionsexperimente wurden auf Glucose vorgezogene, logarithmisch wachsende Kulturen durch Zentrifugation (5 min; 3.000 Upm) sedimentiert, im gleichen Volumen Derepressionsmedium mit Ethanol, Acetat oder Glycerin als Kohlenstoffquelle aufgenommen und über Nacht bei 30°C geschüttelt.

Zur Zellernte wurden die Kulturen zentrifugiert (3 min, 5.000 Upm) und einmal mit kaltem KP-Puffer (0,1 M KH₂PO₄/K₂HPO₄; pH 6,5) gewaschen. Die Zellsedimente wurden bis zum Zellaufschluss bei -20°C gelagert.

Die Rohextraktgewinnung erfolgte durch Zellaufschluss mit Glasperlen (Ciriacy, 1975). Dazu wurden die Zellen bei 4°C mit Glasperlen (0,5 mm Durchmesser) 90 Sekunden intensiv geschüttelt. Nach Zugabe von 1 ml kaltem KP-Puffer wurden Zelltrümmer durch Zentrifugation (10 min, 5.000 Upm, 4°C) sedimentiert und der Überstand für Proteinbestimmungen und Enzymtests verwendet.

2.5 Keimschlauchinduktion bei *C. albicans*

C. albicans Stämme wurden bei 30°C über Nacht in SCD Medium angezogen. Die Zellen wurden mit sterilem H₂O gewaschen und frisches Keimschlauchinduktionsmedium (SC Medien mit unterschiedlichen Kohlenstoffquellen und 10% Serum) so beimpft, dass die Zelldichte nicht 5 X 10⁶ Zellen/ ml überstieg. Diese Kulturen wurden für 2 h bei 37°C inkubiert und anschließend die Keimschlauchinduktion mikroskopisch ausgewertet.

2.6 Proteinbestimmungen und Enzymtests

Zur Proteinbestimmung nach der Mikrobiuret-Methode (Zamenhoff, 1957) wurden 0,1 ml Rohextrakt mit 1 ml KP-Puffer und 0,5 ml Mikrobiuret-Lösung (1500 ml 10 M NaOH + 400 ml 1%ige Cu₂SO₄) vermischt. Nach 10 Minuten wurde die Extinktion gegen einen Puffer-Leerwert in Doppelbestimmung bei 290 nm gemessen. Die Proteinkonzentration wurde mit Hilfe einer mit BSA ermittelten Eichgerade bestimmt.

Alle Enzymtests wurden bei 30°C durchgeführt. Die Berechnung der spezifischen Aktivitäten erfolgte mit folgender Gleichung:

	spez. Aktivität	:	Substratumsatz pro Zeiteinheit pro mg Protein angegeben in U Enzym/mg Protein (1 U = 1 μMol Substratumsatz pro Minute)
spez. Aktivität =	$\frac{F \cdot V_T}{V_P \cdot e \cdot C_P \cdot d}$	·	dE/dt
	F	:	Verdünnungsfaktor
	V _T	:	Testvolumen
	V _P	:	Probenvolumen
	e	:	Extinktionskoeffizient der beobachteten Substanz bei der jeweiligen Messwellenlänge
	C _P	:	Proteinkonzentration in mg/ml
	dE/dt	:	Extinktionsänderung pro Zeiteinheit
	d	:	Schichtdicke in cm

Fructose-1,6-bisphosphatase (FBPase)

Der Test wurde nach Gancedo und Gancedo (1971) durchgeführt. FBPase hydrolysiert Fructose-1,6-bisphosphat zu Fructose-6-phosphat, welches durch Phosphoglucose-Isomerase (PGI) zu Glucose-6-phosphat umgesetzt wird. In einer weiteren enzymatischen Reaktion wird das Glucose-6-phosphat durch Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (G-6-PDH) zu 6-

Phospho-gluconolakton oxidiert, wobei NADP zu NADPH reduziert wird. Die Konzentrationszunahme des NADPH wird photometrisch bei 340 nm verfolgt.

Zum Test wurden 1 ml Testmix (50 mM Imidazol/HCl; 100 mM KCl; 10 mM MgCl₂; 0,1 mM EDTA; 0,3 mM NADP; 0,7 U/ml PGI; 0,7 U/ml G-6-PDH; pH 7,0), dem zuvor die Hilfsenzyme frisch zugesetzt wurden, mit 0,1 ml Rohextrakt gemischt und auf 30°C temperiert. Nachdem keine Extinktionsveränderung mehr zu messen war, wurde der Test durch Zugabe von 0,1 ml Fructose-1,6-bisphosphat-Lösung (12 mM) gestartet und die Extinktionszunahme gegen einen Pufferleerwert bei 340 nm verfolgt.

Phosphoenolpyruvat Carboxykinase (PEPCK)

Der Test wurde nach Hansen *et al.* (1976) durchgeführt. Das Testprinzip beruht darauf, dass die PEPCK Phosphoenolpyruvat und Carbonat zu Oxalacetat umsetzt, welches durch Malat Dehydrogenase zu Malat reduziert wird. Die dabei stattfindende NADH-Oxidation wird photometrisch bei 366 nm verfolgt. Zum Test wurde 1 ml Testmix (100 mM Imidazol/HCl; 50 mM Kaliumhydrogencarbonat; 1,25 mM ADP; 2 mM MnCl₂; 2 mM Glutathion; 0,45 mM NADH; 1,4 U/ml Malat Dehydrogenase; pH 7,0), dem zuvor das Hilfsenzym Malat Dehydrogenase frisch zugesetzt worden war, mit 0,1 ml Rohextrakt versetzt. Diese Mischung wurde auf 30°C temperiert. Nach Abklingen des Blindlaufs wurde der Test durch Zugabe von 0,1 ml Phosphoenolpyruvat-Lösung (25 mM) gestartet und die Extinktionsabnahme bei 366 nm gegen einen Pufferleerwert verfolgt.

Isocitrat Lyase

Der Test wurde nach Dixon und Kornberg (1959) durchgeführt. Isocitrat Lyase spaltet Isocitrat in Succinat und Glyoxylat. Letzteres wird im Test mit Phenylhydrazin zum entsprechenden Phenylhydrazon umgesetzt, welches photometrisch bei 324 nm detektiert wird. Zum Test wurde 1 ml Testmix (50 mM Imidazol/HCl; 5 mM MgCl₂; 3,25 mM Phenylhydrazin; 2 mM Cystein; pH 6,8) mit 0,1 ml Rohextrakt versetzt und der Ansatz auf 30°C temperiert. Der Test wurde dann durch Zugabe von 0,1 ml D/L-Isocitrat-Lösung (42 mM) gestartet. Verfolgt wurde die Extinktionszunahme bei 324 nm gegen einen Pufferleerwert.

Malat Synthase

Die Aktivität der Malat Synthase wurde nach Dixon und Kornberg (1959) bestimmt. Malat Synthase setzt Glyoxylat und Acetyl-CoA zu Malat um. Im Test wird die Abnahme von Acetyl-CoA photometrisch bei 232 nm verfolgt. Im Test wurden 1 ml Testmix (50 mM Tris/HCl; 5 mM MgCl₂; pH 7,1) mit 30 µl Acetyl-CoA-Lösung (4,8 mM) und 20 µl Rohextrakt versetzt und diese Mischung auf 30°C temperiert. Nach Abklingen des Blindlaufs wurde die Reaktion durch Zugabe von 0,1 ml Glyoxylat-Lösung (50 mM) gestartet. Verfolgt wurde die Extinktionsabnahme bei 232 nm gegen einen Pufferleerwert.

β-Galaktosidase

Die Enzymmessung wurde modifiziert nach Guarente (1983) durchgeführt. Das Hilfssubstrat *o*NPG (*o*-Nitrophenyl-β-D-galaktopyranosid) wird durch β-Galaktosidase hydrolysiert, wobei *o*-Nitrophenol frei wird, welches im Alkalischen als gelbes Phenolat vorliegt. Zur Messung wurden 1 ml Z-Puffer (60 mM Na₂HPO₄; 40 mM NaH₂PO₄; 10 mM KCl; 1 mM MgSO₄; pH 7,0) mit 0,1 ml 0,5 M β-Mercaptoethanol und 0,1 ml Rohextrakt versetzt und auf 30°C temperiert. Der Teststart erfolgte durch Zugabe von 0,2 ml *o*NPG-Lösung (4 mg/ml). Die Reaktion wurde durch Zugabe von 0,5 ml 1 M Na₂CO₃-Lösung gestoppt und die Extinktion gegen einen Pufferleerwert in Doppelbestimmung bei 420 nm gemessen. (Die Unit-Definition unterscheidet sich bei der β-Galaktosidase um den Faktor 1000 von den bei anderen Enzymen üblichen Angaben; 1U β-Galactosidase hydrolysiert 1 nMol *o*NPG pro Minute).

2.7 Klassisch genetische Techniken

Konstruktion diploider Hefestämme

Zur Konstruktion diploider Hefestämme wurden, sofern möglich, haploide Kreuzungspartner verwendet, die sich in einigen Auxotrophieeigenschaften komplementierten. Die Zellen beider Paarungstypen wurden durch einen kreuzförmigen Ausstrich auf YEPD-Agarmedium vermischt und nach Inkubation über Nacht bei 30°C auf synthetisches Medium replikaplatziert, dessen Aminosäure- bzw. Basensupplementation eine Selektion der diploiden Zellen erlaubte. Für Kreuzungen, bei denen keine Selektion der Diploiden über Auxotrophiemarker möglich war, wurden die Zellen beider Paarungstypen auf YEPD-

Agarmedium vermischt, bei 30°C inkubiert und nach 3-4 Stunden die charakteristisch geformten Zygoten mit Hilfe eines Mikromanipulators (Singer, Roadwater, England) vereinzelt.

Sporulation und Tetradenanalyse

Zur Sporulation wurden diploide Stämme bis zur stationären Wachstumsphase in 5 ml YEPD-Medium angezogen und auf Sporulationsagar aufgebracht. Nach 2 Tagen Inkubation bei 30°C wurde mit einer Impföse das Zellmaterial abgenommen und in 100 µl Zymolyase-Lösung (1,25 mg/ml Zymolyase 20T in 0,5 M Sorbit) zum Anlösen der Ascushüllen resuspendiert (5 min; 20°C). Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 0,8 ml sterilem H₂O gestoppt und die jeweils 4 Sporen eines Ascus mit Hilfe eines Mikromanipulators auf YEPD- bzw. YEPGal-Agarmedium vereinzelt. Nach mehrtägiger Inkubation bei 30°C erfolgte die phänotypische und genotypische Charakterisierung der einzelnen Segreganten.

2.8 Integration von DNS ins Hefegenom

***S. cerevisiae* Integrationen**

Zur Integration von DNS-Sequenzen an definierte Orte im Genom wurde die zu integrierende Sequenz durch PCR amplifiziert. Dabei wurden Oligonukleotide verwendet, die über 40 bp homolog zu chromosomalen DNS-Bereichen des gewünschten Integrationslokus waren. Über jeweils 20 weitere Basenpaare erfolgte die Amplifikation der zu integrierenden Sequenz. Das durch PCR erhaltene DNS Fragment wurde anschließend in den gewünschten Hefestamm transformiert. Die korrekte Integration über homologe Rekombination der DNS Sequenzen wurde mittels PCR bestätigt. Bei diploiden Stämmen wurde die Sporulation induziert und eine Tetradenanalyse durchgeführt, um den Phänotyp der jeweiligen Integration zu untersuchen.

***C. albicans* Integrationen**

Für die Deletion von *C. albicans* *CaFBP1* wurde das *CaURA3* Gen als Selektionsmarke in CAI4 verwendet. Dazu wurden *CaURA3* von pCUB6 mit Oligonukleotiden amplifiziert (126/127), die über 60 bp homolog zum chromosomalen *CaFBP1* waren. Über jeweils 20

weitere Basenpaare erfolgte die Amplifikation der zu integrierenden Selektionsmarke. Nach Transformation von ca. 30 µg PCR-Produkt und Selektion auf Uracil-Prototrophie wurde die korrekte Integration über homologe Rekombination in CAE1 durch analytische PCR bestätigt. Um *CaURA3* in einer weiteren Transformationsrunde einzusetzen, wurde eine *hisG* Sequenz von pCUB6 mit den Oligonukleotiden 120/121 amplifiziert, die die gleichen homologen 60 bp enthielten, wie die zuvor eingesetzten Oligonukleotide zur Integration von *CaURA3*. Das PCR-Produkt wurde in CAE1 transformiert und die Transformanten auf 5FOA plattiert. Für die Deletion des zweiten Allels von *CaFBP1* (CAE3) wurde ein 5FOA resistenter Stamm verwendet, bei dem kein *CaURA3* mehr nachzuweisen war. In diesen Stamm (CAE2) wurde das gleiche PCR-Produkt transformiert, das für die Deletion des ersten Allels verwendet wurde.

Für die Integration von *MET3-CaFBP1* in CAE3 wurden ca. 50 µg pDE97 mit *StuI* linearisiert und in CAE3 transformiert.

2.9 Isolierung von Plasmid-DNS aus *E. coli*

Schnelle Plasmidisolierung

Die Isolierung erfolgte nach Birnboim und Doly (1979) und diente der Identifizierung von Plasmidkonstruktionen durch anschließenden Restriktionsverdau. Dazu wurden 1,5 ml einer stationären LB_{Amp}-Kultur durch Zentrifugation (1 min; 13.000 Upm) geerntet und die sedimentierten Zellen in 0,1 ml TED-Puffer (25 mM Tris/HCl pH 8; 10 mM EDTA; 50 mM Glucose) resuspendiert. Anschließend wurden 0,2 ml Lysismix (0,2 M NaOH; 1% SDS) und 150 µl kaltes Kaliumacetat (3 M pH 4,8) zugesetzt und 5 Minuten auf Eis inkubiert. Nach einer weiteren Zentrifugation (10 min; 13.000 Upm) wurde der DNS-haltige Überstand abgenommen und die DNS durch Zugabe von 1 ml kaltem 96%igem Ethanol gefällt. Die DNS wurde durch Zentrifugation (10 min; 13.000 Upm) sedimentiert und mit 1 ml 70%igem Ethanol gewaschen. Die Plasmid-DNS wurde im Vakuum getrocknet und in 40 µl H₂O aufgenommen, von denen maximal 4 µl pro Restriktionsverdau eingesetzt wurden.

Schnelle Plasmidisolierung in Mikrotiterplatten

Diese Methode wurde für die Untersuchung einer großen Anzahl von Transformanten zur Identifizierung rekombinanter Plasmide verwendet. Dazu wurden 20 ml TB-Medium mit 1 ml

1 M NaNO₃ und 400 µl Ampicillin-Lösung (2 mg/ml) versetzt. Von dieser Mischung wurden 150 µl in jedes Segment einer Mikrotiterplatte gefüllt. Anschließend wurde jedes Segment mit einer Einzelkolonie einer Transformationsplatte angeimpft. Nach 18 Stunden Inkubation unter Schütteln bei 37°C wurden die Kulturen auf LB_{Amp}-Platten überstempelt und die restlichen Zellen durch Zentrifugation (10 min; 3.000 Upm) geerntet. Die Sedimente wurden in 25 µl TED-Puffer resuspendiert und nach Zugabe von 50 µl Lysismix 5 Minuten geschüttelt. Danach erfolgte die Zugabe von 50 µl 3 M Kaliumacetat pH 4,8. Nach einer weiteren Zentrifugation (10 min; 3.000 Upm) wurde der DNS-haltige Überstand in eine frische Mikrotiterplatte überführt und durch Zugabe von 150 µl Isopropanol pro Segment für 10 Minuten bei -20°C gefällt. Die DNS wurde durch Zentrifugation (10 min; 3.000 Upm) sedimentiert, zweimal mit je 125 µl 70%igem Ethanol gewaschen und im Vakuum getrocknet. Die DNS wurde direkt für Restriktionsverdau eingesetzt, wobei bei Bedarf RNase A (DNase-frei) bis zu einer Endkonzentration von 20 µg/ml zugesetzt wurde.

Plasmidisolierung zur DNS-Sequenzierung, ("TB-Methode")

Diese Methode wurde modifiziert nach einer Anleitung der Firma Applied Biosystems durchgeführt. Es wurden 1,5 ml einer stationären TB_{Amp}-Kultur durch Zentrifugation (1 min; 13.000 Upm) geerntet und in 0,2 ml TED-Puffer resuspendiert. Nach anschließender Zugabe von 0,3 ml Lysismix und kurzer Durchmischung wurden dem Ansatz 0,3 ml kaltes Kaliumacetat (3 M; pH 4,8) zugesetzt und nochmals kurz durchmischt. Durch eine anschließende Zentrifugation (10 min; 13.000 Upm) wurde der DNS-haltige Überstand gewonnen, dem RNase A (DNase-frei) zu einer Endkonzentration von 20 µg/ml zugesetzt wurde. Nach 20 Minuten Inkubation bei 37°C erfolgten eine einmalige Extraktion mit 200 µl Phenol und 200 µl Chloroform und zwei weitere mit je 400 µl Chloroform. Danach wurde die DNS durch Zugabe des gleichen Volumens Isopropanol zur wässrigen Phase gefällt, durch Zentrifugation (10 min; 13.000 Upm) sedimentiert und mit 0,5 ml 70%igem Ethanol (p.a) gewaschen. Das gewaschene Sediment wurde im Vakuum getrocknet und in 40 µl H₂O aufgenommen. Die Menge bzw. Qualität der DNS wurde durch Agarose-Gelelektrophorese von 1 µl der Präparation abgeschätzt. Die gewonnene Plasmid-DNS wurde direkt zur Transformation eingesetzt. Zur Sequenzierung wurde die DNS zuvor 1 Stunde gegen H₂O dialysiert.

2.10 DNS-Isolierungen aus Hefe

Isolierung von chromosomaler DNS aus Hefezellen

Die Gewinnung chromosomaler DNS aus Hefe erfolgte nach Winston *et al.* (1983). Dazu wurden auf YEPD gewachsene stationäre 100 ml Kulturen geerntet (5 min; 3.000 Upm) und die sedimentierten Zellen in 3,2 ml SE-Puffer (0,9 M Sorbit; 0,1 M EDTA; pH 7,5) aufgenommen. Durch Zugabe von 3,2 µl β-Mercaptoethanol und 0,6 ml Zymolyase 20T-Lösung (5 mg/ml in H₂O) wurde die Bildung von Sphäroplasten induziert. Nach einstündiger Inkubation bei 37°C wurden die Sphäroplasten abzentrifugiert (5 min; 5.000 Upm) und in 3,2 ml TE-Puffer (10 mM Tris/HCl; 1 mM EDTA; pH 8) resuspendiert. Die Lyse der Sphäroplasten erfolgte nach Zugabe von 320 µl 0,5 M EDTA, 160 µl 10%iger SDS-Lösung, 160 µl 2 M Tris und 10 µl DEPC für 30 Minuten bei 65°C. Anschließend wurden dem Ansatz 0,8 ml Kaliumacetat-Lösung (5 M) zugesetzt und die gesamte Mischung für 60 Minuten auf 0°C gekühlt. Ausgefällene Proteine und Zelltrümmer wurden durch anschließende Zentrifugation (30 min; 15.000 Upm) sedimentiert. Der DNS-haltige Überstand wurde mit 12 ml 96%igem Ethanol gefällt. Nach Sedimentation (10 min; 10.000 Upm) der DNS und Trocknung im Vakuum wurde die DNS in 3 ml TE-Puffer aufgenommen. Es schloss sich eine weitere Zentrifugation zur Abtrennung unlöslicher Bestandteile an (15 min; 10.000 Upm). Zur Entfernung von RNS wurden dem Überstand 150 µl Pankreas RNase (1 mg/ml in H₂O) zugesetzt und die Reaktion für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte eine Fällung der DNS mit 3 ml Isopropanol. Die DNS wurde mit zugeschmolzenen Pasteurpipetten aufgewickelt und in TE-Puffer resuspendiert. Die Ausbeute wurde photometrisch bei 260 und 280 nm bestimmt.

Isolierung von Plasmid-DNS aus Hefe

Zur Isolierung von Plasmid-DNS aus Hefe nach Hoffman und Winston (1987) wurden die jeweiligen Stämme über Nacht selektiv in Flüssigmedium angezogen. Die Zellen von 1,5 ml der Kultur wurden durch Zentrifugation (5 min; 10.000 Upm) geerntet und das Zellsediment in 0,2 ml Aufschlußpuffer (10 mM Tris/HCl pH 8; 100 mM NaCl; 1 mM EDTA; 2% Triton; 1% SDS) resuspendiert. Nach Zugabe von je 0,1 ml Phenol und Chloroform sowie 0,3 g Glasperlen erfolgte der Zellaufschluss durch intensives Schütteln für 2 Minuten. Nach einer

weiteren Zentrifugation (5 min; 10.000 Upm) wurden jeweils 2 µl des wässrigen Überstandes zur Transformation von *E. coli* eingesetzt.

2.11 Isolierung von RNS aus Hefe für Northern-Hybridisierungen

Alle Puffer und Lösungen wurden autoklaviert und alle anderen Materialien mehrfach sterilisiert. Zur Anzucht der Stämme dienten YEP-Medien mit unterschiedlichen Kohlenstoffquellen. Über Nacht gewachsene Zellen einer 100 ml Kultur wurden durch Zentrifugation (1 min; 4.000 Upm; 4°C) geerntet und die Zellsedimente bis zur Weiterverarbeitung bei -70°C gelagert. Die Proben wurden unter Zugabe von 2 ml REB-Puffer (20 mM EDTA; 100 mM Tris/Cl; 140 mM LiCl; 30 mM Iodacetat; pH 7,5) aufgetaut. Die Suspension wurde zu einer Mischung aus 3 ml Phenol, 1,25 ml SDS (10%), 4 ml Chloroform, 2,75 ml REB-Puffer gegeben, gut gemischt und für 20 min bei 65°C inkubiert. Anschließend wurde das Gemisch für 10 min in Eiswasser inkubiert. Nach Zentrifugation (5 min; 3400 Upm; 4°C) wurde der Überstand zu 1,5 ml Phenol gegeben, gut geschüttelt und erneut zentrifugiert (5 min; 3400 Upm; 4°C). Danach erfolgte zweimal hintereinander eine Extraktion mit je 2 ml Chloroform. Schließlich wurden 4 ml des letzten Überstandes mit 8,5 ml Ethanol versetzt und die RNS für 3 h bei -20°C gefällt. Die präzipitierte RNS wurde durch Zentrifugation (15 min; 13.000 Upm; 4°C) sedimentiert und in 400 µl H₂O aufgenommen. 360 µl davon wurden in 1 ml Ethanol mit 40 µl 4 M Natriumacetat gegeben und bei -20°C gelagert. Die verbliebenen 40 µl RNS-Lösung wurden zur Bestimmung der Konzentration sowie der Reinheit der Proben verwendet (photometrisch bei 260 nm und 280 nm).

2.12 Transformationstechniken

Transformation von *E. coli*

Zur Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen wurde eine 100 ml LB-Kultur (OD₆₀₀ zwischen 0,4 und 0,6) durch Zentrifugation (10 min; 3.000 Upm; 4°C) geerntet. Nach Aufnahme der Zellen in 20 ml RF1 (100 mM RbCl; 50 mM MnCl₂; 30 mM Kaliumacetat; 10 mM CaCl₂; 15% Glycerin; pH 5,8) wurde 20 Minuten auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen nochmals durch Zentrifugation sedimentiert und in 4 ml RF2 (10 mM MOPS; 10 mM RbCl;

75 mM CaCl₂; 15% Glycerin; pH 6,8) aufgenommen. Diese Suspension kompetenter *E. coli*-Zellen wurde in 150 µl-Alliquots bei -70°C gelagert.

Zur Transformation wurden 150 µl kompetente Zellen auf Eis langsam aufgetaut und anschließend zur DNS-Lösung (Ligationsansatz bzw. DNS aus Plasmidisolierung) gegeben. Dieser Ansatz wurde 30 Minuten auf Eis inkubiert, anschließend für 45 Sekunden auf 42°C in einem Wasserbad erhitzt und wiederum 5 Minuten auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 1 ml LB-Medium erfolgte eine Inkubation für 1 Stunde bei 37°C. Danach wurden die Zellen sedimentiert und in 0,1 ml LB-Medium auf Selektivmedium (LB_{Amp}) ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Transformation von Hefen

Hefezellen wurden mit Hilfe der Lithiumacetat-Methode (Schiestl und Gietz, 1989) transformiert. Die Zellen einer 5 ml bzw. 100 ml Kultur (YEPD oder SC-Selektivmedien) wurden durch Zentrifugation (5 min; 5000 Upm) geerntet, einmal mit sterilem Wasser und einmal mit 1 x TE/Lithiumacetat-Lösung (10 mM Tris/HCl; 1 mM EDTA pH 7,5; 0,1 M LiAc pH 7,5) gewaschen. Das Zellsediment wurde in diesem Puffer resuspendiert und 100 µl dieser Zellsuspension mit der zu transformierenden DNS und denaturierter Heringssperm-DNS (Carrier-DNS (10 mg/ml)) gemischt. Nach Zugabe von 350 µl 40 % PEG/1 x TE/LiAc (50 %iges Polyethylenglycol; 10 mM Tris/HCl pH 7,5; 1 mM EDTA; pH 7,5/0,1 M Lithiumacetat pH 7,5) zu diesem Transformationsansatz erfolgte eine 45 minütige Inkubation bei 30°C. Es folgte der Zusatz von 50 µl DMSO und ein 10 minütiger Hitzeschock im 42°C Wasserbad. Die Zellen wurden abzentrifugiert (2 min, 3000 Upm) und auf entsprechende Selektivmedien (SC-Medien) ausplattiert.

2.13 Enzymatische DNS-Modifikationen

Restriktionsschneideansätze und Ligation

In einem Restriktionsschneideansatz wurde ca. 1 µg DNS und höchstens 1 Unit/µg DNS des verwendeten Restriktionsenzym eingesetzt. Alle Reaktionen wurden in den von den Enzymherstellern empfohlenen Puffern durchgeführt, die als 10x Puffer zum Verdauansatz gegeben wurden. Die Schneideansätze wurden mit H₂O auf das für einen Verdau in 1x Puffer

notwendige Volumen aufgefüllt. Nach dem Zusatz des entsprechenden Restriktionsenzym wurde der Ansatz für ca. 3 Stunden bei 37°C inkubiert und anschließend durch Zugabe von Stop-Lösung (7 M Harnstoff; 40% Glycerin; 50 mM EDTA; 10 mM Tris/HCl pH 8; 0,1% Bromphenolblau) beendet.

Ligationsansätze enthielten neben den DNS-Fragmenten 20 mM Tris/HCl pH 7,6; 10 mM MgCl₂; 10 mM Dithiothreitol und 0,6 mM ATP. Bei der Verknüpfung von überstehenden Enden wurden ca. 0,2 Units, bei der von glatten Enden 1 Unit T4 DNS-Ligase eingesetzt. Alle Ligationen wurden über Nacht inkubiert (glatte Enden 4°C, überstehende Enden 22°C).

Phosphatase-Behandlung

Die Dephosphorylierung von 5'-Enden von DNS-Fragmenten wurde mit Shrimp Alkaline Phosphatase durchgeführt. In dem Reaktionsansatz lagen neben der linearisierten DNS 20 mM Tris/HCl pH 8 und 10 mM MgCl₂ vor. Es wurden ca. 5 Units Phosphatase eingesetzt und 20 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Phosphatase wurde anschließend inaktiviert (15 min; 65°C).

Auffüllen 5'-überstehender Enden ("Fill in"-Reaktion)

5'-überstehende Enden von DNS-Fragmenten wurden mit dem Klenow-Fragment der DNS-Polymerase aus *E.coli* aufgefüllt. In dem Reaktionsansatz nach Maniatis *et al.* (1982) lagen neben dem DNS-Fragment 50 mM Tris/HCL pH 7,8; 5 mM MgCl₂; 20 mM Dithiothreitol; 1 mM ATP sowie jeweils 0,2 mM dATP, dGTP, dCTP, dTTP vor. Nach Zusatz von 2 Units Klenow-Polymerase wurde der Reaktionsansatz für 30 Minuten bei Zimmertemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Klenow-Polymerase inaktiviert (65°C; 5 min).

Radioaktive Markierung von PCR-Fragmenten

Mindestens 0,5 µg PCR-Fragment wurde mit einem "Ready to go"-Mix der Firma Pharmacia (Biotech) radioaktiv markiert. Dazu wurde die entsprechende Menge DNS denaturiert, auf Eis abgeschreckt und zu dem in H₂O gelösten Markierungsansatz (max. Gesamtvolumen 50 µl) gegeben. Durch Zugabe von 1 µl [α -³²P]-dCTP (Amersham, 3.000 Ci/mmol) wurde die Sonde für 30 bis 60 min bei Zimmertemperatur radioaktiv markiert. Nicht eingebaute Nukleotide

wurden durch Gelfiltration mit einer Sephadex G-25 Säule (Boehringer, Mannheim) (Zentrifugationsschritte 4 min; 2.500 g) von den markierten DNS-Fragmenten getrennt. Die Radioaktivität [cpm/ μ l] wurde in einem Scintillationszähler (Wallac1409, Wallac Oy, Turku, Finnland) ermittelt und die Sonde zur Northern-Hybridisierung eingesetzt.

2.14 Polymerase Ketten Reaktion (“Polymerase Chain Reaction“; PCR)

Mit Hilfe der PCR-Technik wurden DNS-Fragmente amplifiziert bzw. *in vitro* verändert. Pro Reaktion wurden ca. 0,2 μ g Matrizen-DNS, je 30 pmol der beiden Primer, 5 μ l Nukleotidmix (je 2 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 5 μ l 10 x Amplifikationspuffer (GIBCO, Paisley, UK), 2 μ l MgCl₂-Lösung (50 mM MgCl₂, GIBCO, Paisley, UK) und H₂O zu einem Endvolumen von 50 μ l gemischt und mit Mineralöl überschichtet. Nach Denaturierung für 5 min bei 95°C wurde 1 U *Taq*-Polymerase (GIBCO, Paisley, UK) zugegeben ("hot-start"). Die Zahl der Zyklen und die Temperaturabfolge richtete sich dabei nach der Länge des zu erwartenden PCR-Fragments und der DNS-Matrize (Bsp.: 35 Zyklen, 30 sec 95°C, 30 sec 50°C und 2 min 72°C; Hybaid-Thermocycler, MWG Biotech). Für die Amplifikation längerer PCR-Produkte (>5 kb) wurde die rTH DNS Polymerase eingesetzt (Roche, Brunchburg, USA). Die Aufreinigung der PCR-Fragmente erfolgte mit Hilfe des PCR-Aufreinigungskits QIAquick™ der Firma QIAGEN® (Valencia, CA 91355, USA) laut Anleitung.

2.15 DNS-Sequenzierung

Angewendet wurde die von Applied Biosystems entwickelte Methode mit farbstoffmarkierten Didesoxynukleotiden und *Taq*-DNS Polymerase nach dem Sanger-Sequenzierprinzip (Sanger *et al.*, 1977). In einem Reaktionsansatz wurden 0,2 bis 0,5 μ g DNS-Matrize, ca. 10 pmol Primer, 4 μ l “Dye-Terminator“-Mix (Applied Biosystems) und H₂O in einem Gesamtvolumen von 10 μ l gemischt. Die Polymerasereaktion erfolgte auf einem Thermocycler (Perkin Elmer), wobei 25 Reaktionszyklen durchgeführt wurden. Ein Zyklus bestand dabei aus folgenden Parametern:

- 1) 15 Sekunden 96°C (DNS-Denaturierung)
- 2) 15 Sekunden 50°C (Primerhybridisierung)
- 3) 4 Minuten 60°C (Polymerasereaktion)

Die Sequenzierungsansätze wurden anschließend mit H₂O auf 20 μ l aufgefüllt und mit 2 μ l Natriumacetat (3 M; pH 4,8) und 50 μ l 96%igem Ethanol für 10 Minuten auf Eis gefällt. Nach

Zentrifugation (15 min; 13.000 Upm) wurden die sedimentierten Proben mit 0,25 ml 70%igem Ethanol gewaschen und anschließend im Vakuum getrocknet. Nach Resuspension in 1 µl Auftragspuffer (Perkin Elmer)/Formamid (1:5) und Denaturierung für 90 Sekunden bei 90°C wurden die Sequenzierproben auf Eis gekühlt und 0,5 µl auf ein Sequenziergel aufgetragen.

Die Sequenzen von *CaICL1*, *CaFBP1*, *CaMLS1*, *CaYLR186* und *CgYLR186* sind unter den Zugangsnummern AF222905, AF222906, AF222907, AF222909 und AY034788 in der GenBank Datenbank (National Center for Biotechnology Information, Bethesda/Maryland) hinterlegt.

2.16 Elektrophoretische Techniken

Agarose-Gelelektrophorese für DNS-Fragmente

Zur Auftrennung von DNS-Fragmenten von 0,5 bis 10 kb wurde eine Flachbettelektrophorese durchgeführt. Als Laufpuffer diente TBE-Puffer (89 mM Tris; 89 mM Borsäure; 2 mM EDTA; pH 8,3). Die Agarosegele wurden mit einer Konzentration von 0,7% Agarose in TBE-Puffer hergestellt. Zur Elektrophorese wurden Restriktionsschneideansätze oder isolierte Plasmid-DNS mit 1/10 Volumen Stop-Lösung (7 M Harnstoff; 40% Glycerin; 50 mM EDTA; 10 mM Tris/HCl pH 8; 0,1% Bromphenolblau) versetzt und direkt in die Geltaschen pipettiert. Die Auftrennung erfolgte bei einer Feldstärke von 1-5 V/cm. Die DNS-Fragmentgrößen wurden nach Färbung mit Ethidiumbromid (10 µg/ml) auf einem Transilluminator bei 302 nm anhand von *EcoRI/HindIII*-geschnittener Lambda-DNS ermittelt.

Agarose-Gelelektrophorese zur RNS-Auftrennung

Die Auftrennung von RNS wurde nach Sambrook *et al.* (1989) durchgeführt. Die Auftrennung von gesamt Hefe-RNS erfolgte in einem 1,5%igen Agarosegel. Zur Präparation des Gels wurden 3 g Agarose mit 20 ml 10x MOPS-Puffer (200 mM MOPS; 50 mM Natriumacetat; 10 mM EDTA; pH 7) und 150 ml H₂O versetzt und aufgeköcht. Nachdem der Ansatz auf 60°C abgekühlt war, wurden 30 ml Formaldehyd (37%) zugesetzt, gemischt und das Gel in eine Flachbett-Gelkammer gegossen. Als Laufpuffer diente 1x

MOPS-Puffer. Je Spur wurden 50 µg RNS eingesetzt, die vor dem Gellauf mit RNS-Probenpuffer (40% Formamid [deionisiert]; 10% 10x MOPS-Puffer; 15% Formaldehyd [37%]; 3% gesättigte Bromphenolblau/ Xylen-Cyanol-Lösung in H₂O; 12% H₂O; 20% Glycerin [97%]) im Verhältnis 1:4 gemischt, für 5 Minuten bei 65°C denaturiert und anschließend auf Eis abgekühlt wurden. Die Auftrennung erfolgte bei 100 Volt, bis die Bromphenolblau-Bande ca. 3/4 der zur Verfügung stehenden Laufstrecke zurückgelegt hatte. Nach dem Gellauf wurden die Gele direkt für Northern-Hybridisierungen eingesetzt.

2.17 "Northern"-Blot

RNS-Transfer

Für Northern-Hybridisierungen wurde zunächst die in einem Agarosegel aufgetrennte RNS aus dem Gel auf eine Nylonmembran (Hybond-N+; Fa. Amersham) transferiert. Für den Transfer wurde eine Flachbett-Gelkammer verwendet, deren Pufferkammern mit 20x SSC-Puffer (1,5 M NaCl; 150mM Natriumcitrat; pH 7) gefüllt wurden. In die so vorbereitete Apparatur wurde ein in 20x SSC-Puffer getränktes "Whatman" 3MM Papier gelegt, welches der Größe der Gelkammer entsprach und an beiden Seiten in die Pufferkammern reichte. Auf dieses Papier wurde dann das Gel und darauf eine in 20x SSC-Puffer getränkte Nylonmembran aufgelegt. Die Ränder des Gels wurden anschließend so mit Parafilm abgedeckt, dass nur über das Gel Kontakt zum Pufferreservoir bestand. Auf diese Anordnung wurden weitere 3 in 20x SSC-Puffer getränkte Whatman 3MM Papiere aufgelegt und sichergestellt, dass keine Luftblasen zwischen den einzelnen Schichten eingeschlossen waren. Abschließend wurde ein Stapel trockener Papierhandtücher und ein etwa 500 g schweres Gewicht aufgelegt. Nach dem Transfer wurde die Membran getrocknet (20 min; 37°C) und die RNS auf der Membran durch Bestrahlung mit 254 nm (20 min) fixiert. Die so vorbereiteten Membranen wurden für die Hybridisierung mit radioaktiv markierten DNS-Fragmenten eingesetzt.

"Northern"-Hybridisierung

Um unspezifische Bindungen der radioaktiv markierten DNS-Sonden auf den vorbereiteten Membranen zu vermeiden, wurden diese vor der eigentlichen Hybridisierungsreaktion zunächst unter ständiger Bewegung mit Prähybridisierungsmix (0,5 M NaH₂PO₄/Na₂HPO₄;

7% SDS; pH 7,2) vorinkubiert (120 min; 42°C). Anschließend wurden die bei 95°C (5 min) denaturierten und auf Eis abgekühlten, radioaktiv markierten DNS-Sonden (ca. 10⁶ cpm) zu dem Prähybridisierungsansatz zugegeben und die gesamte Reaktion für mindestens weitere 5 Stunden bei 42°C inkubiert. Zur Entfernung nicht hybridisierter Sonden wurden die Membranen anschließend für 5, 10 und 60 Minuten mit Wasch-Lösung (0,25 SSC; 0,1% SDS) bei 42°C gewaschen. Auf die Membranen wurden Röntgenfilme (Kodak X-Omat) zusammen mit Verstärkerfolie (Dupont) aufgelegt und diese Anordnung für 6-48 Stunden bei -70°C inkubiert. Die Röntgenfilme wurden anschließend entwickelt und fixiert.

2.18 Herstellung temperaturempfindlicher (ts) Allele von *NEP1*

pDE93 diente als Matrize für eine mutagene PCR mit der Primerkombination M1/M2. Reaktions-Mix: ca. 1-2 ng Matrizen-DNS, 5µl dTTP (10 mM), 5µl dCTP (10mM), 5µl dGTP (2 mM), 5µl dATP (2 mM), 7 µl MgCl₂ (50 mM), 1,3 µl MnCl₂ (20 mM), je 1 µl der beiden Primer (30 µM), 5 µl 10 x Amplifikationspuffer (GIBCO, Paisley, UK) und H₂O zu einem Endvolumen von 50 µl. Nach Denaturierung für 5 min bei 95°C wurde 1 U *Taq*-Polymerase (GIBCO, Paisley, UK) zugegeben ("hot-start"). Zyklen- und Temperaturabfolge: 35 Zyklen, 30 sec 94°C, 30 sec 50°C, 2 min 72°C.

Das erhaltene 1.560 bp große Fragment wurde mit den Restriktionsendonukleasen *ClaI/SacI* geschnitten und das resultierende 1370 bp große Fragment in den ebenfalls mit *ClaI/SacI* geöffneten Vektor pRS413 (*CEN6/ARS4* Plasmid mit *HIS3* als Selektionsmarke) ligiert. Nach Transformation des Ligationsansatzes in *E. coli* DH5α wuchsen etwa 20.000 Klone, die abgeschwemmt wurden und deren Plasmid-DNS präpariert wurde. Diese *NEP1* Mutantenbibliothek in pRS413 wurde in *S. cerevisiae* SDE3 (*Δnep1::loxP-KanR-loxP* mit *GALI-C2F* auf pDE49) transformiert, Transformanten auf SCD ohne Histidin plattiert und für 6 Tage bei Zimmertemperatur (22°C) inkubiert. Die ca. 100.000 erhaltenen Klone wurden mit SCD Medium abgeschwemmt und je ca. 500 Zellen auf 12 YEPD Platten ausplattiert. Nach 6 Tagen Inkubation bei Zimmertemperatur wurden die Klone auf YEPD replikaplattiert und für 2 Tage bei 37°C inkubiert. Von Klonen, die bei 37°C kaum noch wuchsen, wurden Plasmide isoliert (pDE111-pDE114). Diese Plasmide dienten als Matrizen in PCR-Reaktionen mit der Primerkombination 158/159, um das jeweils mutierte *NEP1* Allel zu amplifizieren. Die 937 bp großen PCR-Produkte wurden in SDE3 (*Δnep1* mit *GALI-C2F* auf pDE49) transformiert, auf YEPD plattiert und für 5 Tage bei Zimmertemperatur inkubiert. Da in SDE3 lediglich der offene Leserahmen von *NEP1* deletiert ist, das transformierte PCR-

Produkt aber noch zusätzlich 87 bp Promotor und 91 bp Terminatorregion des Gens enthält, kann das mutierte *NEPI* Allel durch homologe Rekombination an seinen nativen Genort integrieren. Aufgrund der reprimierten C2F Expression von SDE3 auf Glucose-haltigen Platten kann dieser Stamm nicht auf YEED wachsen, somit bilden nur Transformanten Klone, die das mutierte *NEPI* Allel integriert haben. Die Transformanten wurden auf Temperaturempfindlichkeit bei 37°C und verlorene G418 Resistenz getestet. Durch analytische PCR wurde die korrekte Integration der *nep1-ts* Allele bei G418- und temperaturempfindlichen Klonen bestätigt.

2.19 Zwei-Hybrid System

Um das Dimerisierungsvermögen oder Interaktionen zwischen verschiedenen Proteinen zu untersuchen, wurden der jeweilige Leserahmen N-terminal mit der DNS-Bindedomäne und der Aktivator-domäne des *GAL4* Regulatorgens fusioniert. Zur Klonierung wurden die Vektoren pGBT9 bzw. pGAD424 verwendet, die Teile des sogenannten Zwei-Hybrid Systems sind (Matchmaker™, CLONTECH, Palo Alto, USA). Fusionsplasmide, der Ausgangsvektor und Kombinationen wurden in den Hefestamm PJ69-4a (James *et al.*, 1996) transformiert und auf Wachstum auf Selektivmedien untersucht. Von ausgewählten Kombinationen wurde β -Galaktosidaseaktivitäten in Rohextrakten nach über Nacht Anzucht bestimmt. Außerdem wurden pDE32 und pDE38 in PJ69-4a als Köder eingesetzt, um eine chromosomale Hefe DNS Genbank in pGAD424 (CLONTECH, Palo Alto, USA) nach bisher unbekanntem, wechselwirkenden Proteinen zu durchsuchen.

2.20 GFP-Fusionen und Bestimmung der Proteinlokalisierung (Green fluorescent protein)

Um die Lokalisation eines Proteins *in vivo*, d.h. innerhalb ganzer, lebender Zellen zu bestimmen, bediente man sich eines Fusionsproteins aus dem zu untersuchenden Protein und dem grün fluoreszierenden Protein aus der Tiefsee-Qualle *Aequorea victoria* (Cormier *et al.*, 1974; Morise *et al.*, 1974; Niedenthal *et al.*, 1996). Hierbei wurde das yEGFP ("yeast enhanced green fluorescence protein") eingesetzt, eine Variante des grün fluoreszierenden Proteins, bei dem die Verwendung der Basen-Triplets auf die der Hefe optimiert wurde, um eine maximale Expressionsrate in *S. cerevisiae* zu erreichen (Cormack *et al.*, 1997). Die

Fluoreszenz dieses Proteins erfolgt ohne Zugabe jeglicher Co-Faktoren. Es wurden Fusionen hergestellt, die den GFP-Anteil am N-Terminus des zu untersuchenden Proteins trugen. Dazu bediente man sich des Plasmids pUG34 (Hegemann, pers. Mitteilung). Nach Anzucht der transformierten Zellen in Selektivmedium wurden die Zellen zur Betrachtung direkt auf einen Objektträger gegeben oder fixiert (3,7% Formaldehyd) und mit DAPI gegengefärbt. Die maximale Anregungswellenlänge dieser Variante des grün fluoreszierenden Proteins liegt bei 488 nm, das Emissionsmaximum bei 511 nm. Lebende oder fixierte Zellen wurden an einem Fluoreszenzmikroskop (Axioskop, Carl Zeiss, Oberkochen) untersucht (Zeiss Filtersatz #487709).

2.21 FACS-Analysen von Hefezellen

Die Zellkultur wurde mit Tris/Acetat-Puffer (0,2 M TRIS, pH 7,5 mit Acetat) auf eine OD von 1-2 eingestellt. 1 ml dieser Verdünnung wurde durch Zentrifugation (5 min; 5.000 Upm) geerntet, mit 1 ml Tris/Acetat-Puffer gewaschen und wieder durch Zentrifugation sedimentiert. Die Zellen wurden durch Zugabe von 1 ml 70% Ethanol/0,2 M TRIS/Acetat-Puffer für 30 min bei 4°C fixiert. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation (5 min; 5.000 Upm) geerntet, in 1 ml Tris/Acetat-Puffer gewaschen, erneut durch Zentrifugation geerntet und in 500 µl Tris/Acetat-Puffer resuspendiert. 200 µl der Zellsuspension wurden mit 12 µl RNase-Lösung (10 mg/ml) versetzt und für 2 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 800 µl Tris/Acetat-Puffer zugegeben, gemischt und durch Zentrifugation (5 min; 5.000 Upm) geerntet. Das Sediment wurde erneut mit 1 ml Tris/Acetat-Puffer gewaschen und durch Zentrifugation (5 min; 5.000 Upm) geerntet. Abschließend wurden die Zellen in 1 ml Tris/Acetat-Puffer aufgenommen, der 0,1 mg/ml Propidiumiodid enthielt. Diese Suspension wurde in FACS-Gefäße übertragen und die Fluoreszenz von 10.000 einzelnen Zellen am FACS-Gerät (FACSCalibur, Becton Dickinson, Erembodegem-Aalst, Belgien) bei 488 nm bestimmt. Die Fluoreszenzintensität wurde in 1024 Kanäle unterteilt. Mittels des Programms CELLQuest (Becton Dickinson, Erembodegem-Aalst, Belgien) wurde eine Grafik erstellt, die die Anzahl der Zellen pro Intensitätskanal in einem Histogramm zeigt.

2.22 Färbungen und Fluoreszenzmikroskopie

Polymerisiertes Aktin wurde mit TRITC-(Tetramethylrhodamin-5(6)-isothiocyanat) markiertem Phalloidin (Molecular Probes Inc., Eugene, OR) nach Adams und Pringle (1991)

nachgewiesen. Die Inkubationszeit des TRITC-markierten Phalloidins betrug 3 Stunden. Zum Beobachten der Zellen wurden diese in 10 mM DABCO (1,4-Diazabicyclo(2,2,2)octan), welches zu gleichen Teilen in destilliertem H₂O und Glycerin gelöst war, suspendiert. Der verwendete PBS-Puffer (phosphate-buffered saline) setzte sich zusammen aus (Ansatz für 20x PBS): 160 g NaCl, 4 g KCl, 22,8 g Na₂HPO₄ und 4 g KH₂PO₄ auf 1 l destilliertes H₂O. Für die fluoreszenzmikroskopische Betrachtung wurde ein TRITC-Filtersatz (Zeiss Filtersatz #487715) verwendet.

DNS wurde mit 1 µg DAPI (4,6-Diamidino-2-phenylindole)/ml H₂O (Sigma) sichtbar gemacht. Die Hefezellen wurden zuvor mit Ethanol, Endkonzentration 70%, für 30 Minuten bei 4°C fixiert.

Mikrotubuli wurden nach einem Protokoll von Pringle *et al.* (1989) nachgewiesen. Die Zellwand wurde durch zehnmündige Inkubation in 10 mg Zymolyase /ml PBS-Puffer abgebaut. Die Zellen wurden außerdem vor Zugabe des Antikörpers für sechs Minuten mit Methanol und 30 Sekunden mit Aceton (-20°C) behandelt. Der monoklonale Ratten-Antikörper gegen Hefe α-Tubulin YOL 1/34 stammte von Sera lab (England) und wurde 1: 16 verdünnt. Die Zellen wurden zunächst 1 h mit dem 1. Antikörper inkubiert und anschließend für 2 h unter Lichtausschluss mit einem TRITC-markierten Kaninchen-Anti-Ratte Zweitantikörper (Sigma Bio Sciences, ST. Louis, USA), der 1:32 verdünnt wurde. DABCO und PBS-Puffer-Lösungen waren die gleichen wie bei der Aktinfärbung. Zur Betrachtung der Mikrotubuli wurde ein TRITC-Filtersatz (Zeiss Filtersatz #487715) verwendet.

Organell/Struktur	Farbstoff	Anregungswellenlänge in nm	Emissionswellenlänge in nm	Filtersatz (Zeiss)
Polymerisiertes Aktin	TRITC-konjugiertes Phalloidin	540	580	487715
Zellkerne	DAPI	340-365	450-488	487701
Mikrotubuli	TRITC-konjugiertes Anti-Ratten-IgG	540-552	580	487715

Übersicht der verwendeten Farbstoffe, Anregungs- und Emissionswellenlängen.

2.23 Oligonukleotidtablelle

Oligonukleotidname	Sequenz
3	AGT TAT TAG GTC TCG AGA TCT GTT TAG CTT
4	TAT TAA GGG TTC TCG AGA GCT CGT TTT CGA
5	CCC CCC CCG AAT TCA TAA CTT CGT ATA ATG TAT GCT ATA CGA AGT TAT TGG GTA AGG AAA AGA CTC ACG TTT CG
6	GCA AGC TAA ACA GAATTC TAG AAG CGG ATG
7	CGT ACG CTG CAG GTC GAC ATG CTT AAT ATA ACT TC
8	GAA ACG TGA GTC TTT TGT CGA CCA TGG TTG TTT ATG TTC GG
22	CTT ACA ACG CGG CCG CCA AGG CTA AG
23	CCG TTC AGG ATC CGA ATT AGG
24	TTT GTT TAT ATC ATA TTG AAA TTT TGT TCA CCG TTC AGG GTT CGA CAC TGG ATG GCG GCG
25	TGG TTA TCC AGC TGC TAA GAC CAG ATC TTA CAA CTG GGG TTT TAG CTT GCC TTG TCC CCG
53	ATG GTC GAA GGA TCC AGA GTT AGA G
54	TTA TAC AAA ATC GAT GCC AAG TAG
55	CAA AGA GGA TGC ATA GTA GAC TTA AAC
56	AATCGT GGA TCC TGG TCG AAG ATT CCA GAG
59	TAA ATT TTG CCA TGG CGC TGA AGA TGC TTG GAA TAT TTT AAT GTC TAA AGG TGA AGA ATT ATT CAC
60	GAA TTA ATC GCT AAC TCG ATT GTT TCT ATA TCG TAT ATT GGC ATA GGC CAC TAG TGG ATC TG
61	ATA CAA AGA GGC GGC CGC GTA GAC TTA AAC
62	TGA TGG ATC CAT GCC TCG TGA ACG AAG CGG
63	CTA CTA CTG TCA AAT GAC CCC CC
64	GGT ATC GCG GCC GCG TAG ACT TAA ACA C
65	CCC ATC CGA GCT CTA GAA TGT C
66	TAA AAG GGA GGA TCC AAT ACA TGG
67	CAT AAA TAC TGC AGT TGT CTC TG
68	TTG GGG GCT GCA GTG AAC CTT AAA ATT CC

69 CTT ACA ACT GGA TCC AAA CAA TGA G
76 CGC TCC CCT CAC AGA CGC G
79 GGA TGT ATG GGC TAA ATG TAC G
90 GAA AAA CCG GCT AGC AGG GCG ATG GCC CAC
91 TAC CGC CTT TGA GAG ATC TGA TAC CGC TCG
92 TGC ATC GTC GAC AAT TTT CTA AAA AAC AG
93 TAT TAG GAT CCA TGT CTG AAT TGA AAA ACG G
109 CAT AGA TCT CTC GAG TTG TCT C
110 TTC CCG GGG ATC CCA ATA CAT GG
113 CAG TTG TCT CTG AGG ATC CTA ATA AG
114 GGA AGA TCA AAT CCA TGG CCG GTT C
115 GAT AAG CTT GAT CCT CTA GAA TTC
118 AAC CCG TAG GAT CCT AGG TCA TGG
120 TAT CCG CCA TTC GGG CGA ACC AGG GTT GGG CGC ACC
AAG AAG TAT AAA AAT TCT GGG GTA AGA TCT TCC AGT
GGT GCA TG
121 TGC ATG ATG GTG TGC TAC AAA AAA AAA AAA AAA GTC
GAC AAT ATT TTA TTT TTT TTT GTT GAT CCC TGT TCC AGT
CAA TC
122 AAT CGA TGA CTC TGC AGA TAT AAA TG
123 AGA AAC GTC GAC AGA ATA TGG TAT TGC TT
124 CTT CAA TCC TGC AGA AGA AGA AAG G
125 CAA AAT CTG CAG AAA GTA ATA TAA TGA G
126 TAT CCG CCA TTC GGG CGA ACC AGG GTT GGG CGC ACC
AAG AAG TAT AAA AAT TCT GGG GTA CTC ATG TTT GAC
AGC TTA TC
127 TGC ATG ATG GTG TGC TAC AAA AAA AAA AAA AAA GTC
GAC AAT ATT TTA TTT TTT TTT GTT CGG TCG GAC AGT GCT
CCG AG
158 CAT CAT TCG TTA TAG GGA G
159 GAG GTG CAG TCG AAT TAA TC
172 AAA CAA CTG CAG AAC ATG AGT GGC CCA GTT AAT TC
173 GAG TGG CTG CAG AGG ACT TTA TGG TAT GGG AAA C
206 GAG GGT ACT CCT TCA TTC G

209	GAG TCT TGA AGC TGA TGC TG
218	CAG CTT GTC TAG AAG CGG ATG CCG GG
219	GTT TAG TAT GCT AGC ATT TAC TTA TAA TAC
M1	ACG ACD TTG TAA AAC GAC GGC CAG
M2	AGC GGA TAA CAA TTT CAC ACA GG

3. Ergebnisse

3.1 Isolierung von *FBP1*, *PCK1*, *ICL1* und *MLS1* aus *C. albicans*

Über die Gluconeogenese und den Glyoxylat-Zyklus des humanpathogenen Modellorganismus *C. albicans* liegen wenig Informationen vor. Um mehr darüber zu erfahren, sollten zunächst die Gene für die Enzyme dieser Stoffwechselwege durch funktionelle Komplementation in *S. cerevisiae* Deletionsstämmen identifiziert werden. Dazu wurde eine genomische DNS-Bank (in Hefe Vektor YRp7) von *C. albicans* in die Deletionsstämme CEN.PK192-1D ($\Delta pck1$), CEN.PK200-4D ($\Delta icl1$) und CEN.PK202-2C ($\Delta mls1$) transformiert und Transformanten isoliert, die wieder die Fähigkeit besaßen, auf SCE Platten zu wachsen. Aus diesen Transformanten wurden Plasmide isoliert und die genomischen *C. albicans* Fragmente durch Restriktionsschneideansätze mit verschiedenen Restriktionsendonukleasen kartiert. Das rekombinante Plasmid, welches die *ScICL1* Deletion komplementierte, enthielt ein 9 kb großes genomisches *C. albicans* Fragment. Für weitere Analysen (z.B. Sequenzierung) wurde das *ScICL1* komplementierende Insert in YRp7 mit *NsiI/SalI* geschnitten und ein 3,2 kb großes resultierendes Fragment (2,9 kb *C. albicans* genomische DNS und 0,3 kb Vektor Sequenz) in den *S. cerevisiae/E. coli* Shuttle-Vektor pRS315 kloniert, der zuvor mit *PstI/SalI* geöffnet wurde. Dieses Plasmid war in der Lage $\Delta icl1$ zu komplementieren und wurde pCaICL1 benannt. Das Genbankplasmid, welches die *ScMLS1* Deletion komplementierte, enthielt ein 11 kb großes genomisches *C. albicans* Fragment. pCaMLS1 entstand durch schneiden des $\Delta mls1$ komplementierenden Plasmids mit *NcoI/XbaI* und Subklonierung eines 4,2 kb großen Fragments (3,7 kb *C. albicans* genomische DNS und 0,5 kb Vektor Sequenz) in den gleichfalls mit *NcoI/XbaI* geöffneten Vektor pSAL (ein *CEN6/ARSH4* Vektor mit *LEU2* als Selektionsmarke). Die *ScPCK1* Deletion wurde durch ein Genbankplasmid komplementiert (pCaPCK1), das ein 10 kb großes genomisches *C. albicans* Fragment enthielt.

Die gleiche *C. albicans* DNS-Bank wurde in CEN.PK201-3B ($\Delta fbp1$) transformiert, es konnte jedoch keine Transformante gefunden werden, die in der Lage war, die *ScFBP1* Deletion zu komplementieren. Deshalb wurde in den Stamm CEN.PK201-3B ($\Delta fbp1$) eine genomische *C. albicans* DNS-Bank in dem episomalen Vektor Yeplac195 transformiert. So gelang es ein Plasmid zu isolieren (pCaFBP1), das die *ScFBP1* Deletion komplementierte und ein 3,3 kb großes *C. albicans* genomisches Fragment enthielt. Die Wachstumsphänotypen aller *S. cerevisiae* Deletionsstämmen sowie der zugehörigen komplementierenden Transformanten sind in Abbildung 3.1 gezeigt.

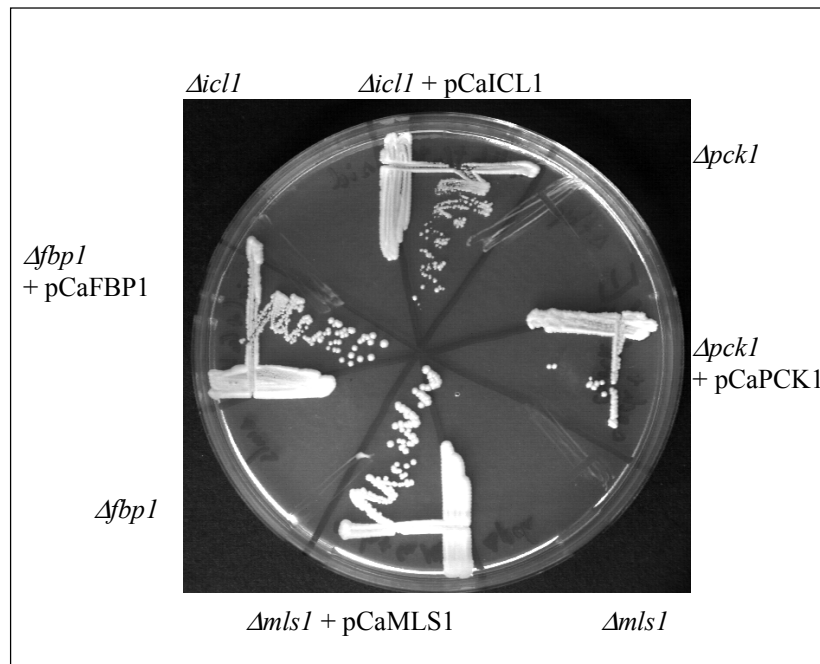


Abb. 3.1 : Funktionelle Komplementation von *S. cerevisiae* Deletionsmutanten mit *C. albicans* Gluconeogenese und Glyoxylat-Zyklus Genen. CEN.PK192-1D ($\Delta pck1$), CEN.PK200-4D, ($\Delta icl1$), CEN.PK201-3B($\Delta fbp1$) und CEN.PK202-2C($\Delta mly1$) ohne bzw. mit komplementierenden Plasmiden pCaPCK1, pCaICL1, pCaFBP1 und pCaMLS1 auf SCE Platten (3% Ethanol). Die Aufnahmen entstanden nach 5 Tagen Inkubation bei 30°C.

3.2 Sequenzanalyse der *C. albicans* Gluconeogenese und Glyoxylat-Zyklus Gene

Die Nukleotidsequenz des 3,3 kb großen genomischen *C. albicans* Insert in pCaFBP1 enthält zwei offene Leserahmen. Einer davon ist 960 bp groß und kodiert für ein Protein von 320 Aminosäuren, welches hohe Homologie zu Fructose-1,6-bisphosphatasen anderer Organismen aufweist (Tab. 3.1). Stark exprimierte Gene bevorzugen gewisse Kodone für die Kodierung von Aminosäuren. Dies lässt alleine anhand der Sequenz und der damit verbundenen Kodonnutzung eine recht gute Vorhersage der Transkriptionsrate des Gens zu. Der CAI ("Codon Adaption Index") ist ein Maß für die Kodonnutzung und nimmt Werte zwischen null und eins an, wobei höhere Werte eine eingeschränkere Kodonnutzung anzeigen und somit aller Wahrscheinlichkeit nach stärker transkribierte Gene darstellen (Sharp und Li, 1987). Der CAI von *CaFBP1* beträgt 0,308 und liegt somit deutlich höher als der von *ScFBP1* (0,18). In den 960 bp von *CaFBP1* befindet sich eine CTG Sequenz an Aminosäureposition 250, welche in *C. albicans* nicht wie in *S. cerevisiae* für ein Leucin, sondern für ein Serin kodiert (Santos und Tuite, 1995) (siehe Einleitung). In *S. cerevisiae* befindet sich an der entsprechenden Aminosäureposition ein Isoleucinrest. Für ScFbp1p konnte kürzlich gezeigt werden, dass für

die rasche Glucoseinaktivierung ein N-terminales Prolin essentiell für die Ubiquitinierung an Lysinrest 44 ist, und damit für den schnellen Abbau des Proteins durch das Proteasom (Schule *et al.*, 2000). In der Sequenz von CaFbp1p fehlt dieser N-terminale Prolinrest, was darauf schließen lässt, dass entweder keine Glucoseinaktivierung in *C. albicans* existiert oder dieser Prozess nicht konserviert ist. pCaFBP1 enthält außerdem 1365 bp Promotorbereich von *CaFBP1*. In dieser Sequenz befindet sich der unvollständige zweite offene Leserahmen von pCaFBP1, dessen übersetzte Aminosäuresequenz hohe Ähnlichkeit zu Sec61 Proteinen verschiedener Spezies aufweist (Daten nicht gezeigt). Bei *SEC61* von *S. cerevisiae* handelt es sich um ein essentielles Gen, welches für eine Untereinheit des ER Proteintranslokations-Komplexes kodiert (Panzner *et al.*, 1995). *ScSEC61* liegt im Genom von *S. cerevisiae* interessanterweise benachbart zu und in der gleichen Leserichtung wie *ScFBP1*, getrennt durch einen 265 bp großen nicht-kodierenden Bereich. Im Genom von *C. albicans* liegt *CaFBP1* in entgegengesetzter Leserichtung zu *CaSEC61*, getrennt durch eine 694 bp lange nicht-kodierende Sequenz.

Die genomische DNS von *C. albicans* in pCaICL1 (2.920 bp) enthält einen offenen Leserahmen, der für ein mögliches Protein von 550 Aminosäuren kodiert. Eine BLASTp Analyse zeigt, dass der Leserahmen sehr homolog zu Isocitrat Lyasen anderer Organismen ist und er somit für CaIcl1p kodiert (Tab. 3.1). Auch hier ist der CAI des *Candida* Gens (0,652) deutlich höher als der von *ScICL1* (0,251). In der Sequenz von CaIcl1p findet man eine konservierte Icl1p Signatursequenz (KKCGHM) von Aminosäure 208-213 (Atomi *et al.*, 1990) sowie eine C-terminale (Aminosäure 548-550) peroxisomale Lokalisierungssequenz (AKA; De Hoop und Ab, 1992). pCaICL1 enthält insgesamt 1033 bp Promotorsequenz von *CaICL1*.

Die Sequenzierung der genomischen *C. albicans* DNS in pCaMLS1 ergab ein Fragment von 3.709 bp. Innerhalb dieser Sequenz findet man zwei offene Leserahmen, wobei der größere für ein Protein kodiert, das hohe Homologie zu bekannten Malat Synthasen besitzt und daher *CaMLS1* benannt wurde (Tab. 3.1). CaMls1p enthält eine konservierte Malat Synthase Signatursequenz von Aminosäure 274-289 (Bruinenberg *et al.*, 1990). Der CAI von *CaMLS1* ist 0,574 und liegt damit ebenfalls deutlich höher als der von *ScMLS1* (0,222). Eine BLASTp Analyse mit der vorhergesagten Aminosäuresequenz des zweiten offenen Leserahmens ergab keine Ähnlichkeiten zu bisher bekannten Proteinen. pCaMLS1 enthält 768 bp 5' regulatorischer Sequenz von *CaMLS1*.

Das rekombinante Plasmid, welches die *ScPCK1* Deletion komplementierte (pCaPCK1), enthielt ein Insert von 10 kb. Da die Sequenz von *CaPCK1* bereits bekannt war (Leuker *et al.*, 1997) wurde dessen Anwesenheit in pCaPCK1 durch schneiden mit Restriktionsendonukleasen und anschließendem Nachweis spezifischer Fragmentmuster bestätigt (Daten nicht gezeigt). pCaPCK1 enthält mindestens 866 bp Promotorbereich von *CaPCK1*. CaPck1p zeigt hohe Homologien zu ATP-abhängigen Phosphoenolpyruvat Carboxykinasen anderer Pilze, jedoch nur eine geringe Ähnlichkeit zur GTP-abhängigen, mitochondrialen und cytosolischen Pck des Menschen, was darauf schließen lässt, dass es sich bei CaPck1p auch um ein ATP-abhängiges Protein handelt (Leuker *et al.*, 1997).

ScFbp1p und ScPck1p sind cytosolische Proteine (Haarasilta und Taskinen, 1977), wohingegen ScMls1p in den Peroxisomen nachgewiesen werden konnte (Brocard *et al.*, 1996). Für ScIcl1p ist bisher keine Lokalisation beschrieben, wenngleich es wahrscheinlich ein cytosolisches Protein ist (Bojunga *et al.*, 1998; Dennis *et al.*, 1999). Da CaFbp1p und CaPck1p keinerlei Sequenzen tragen, die zu einer besonderen Lokalisierung innerhalb der Zelle führen, sollten diese Proteine, wenn sie in *S. cerevisiae* exprimiert werden, cytosolisch sein. CaIcl1p enthält eine "microbody" Lokalisierungssequenz von Aminosäure 548-550 (De Hoop und Ab, 1992) und könnte deshalb in *S. cerevisiae* in den Peroxisomen zu finden sein. CaMls1p trägt, im Gegensatz zu dem C-terminalen -SKL Motiv von ScMls1p, keine peroxisomale Lokalisierungssequenz. Da eine peroxisomale Lokalisierung von ScMls1p für einen funktionierenden Glyoxylat-Zyklus nicht zwingend erforderlich ist (Brocard *et al.*, 1996), ist CaMls1p in *S. cerevisiae* möglicherweise ein cytosolisches Protein.

	CaIcl1p	CaMls1p	CaPck1p	CaFbp1p
<i>Candida tropicalis</i>	94 %	94 %	--	--
<i>Yarrowia lipolytica</i>	71 %	--	--	--
<i>Emericellus nidulans</i>	67 %	57 %	--	--
<i>Kluyveromyces lactis</i>	--	--	70 %	--
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	--	--	--	65 %
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	67 %	55 %	69 %	64 %
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	--	--	--	65 %
<i>Neurospora crassa</i>	63 %	56 %	--	--
<i>Coprinus cinereus</i>	59 %	--	--	--
Human	---	---	13 % mt / 15 % ct	48 %
<i>Escherichia coli</i>	32 %	46 %	43 %	45 %

Tab. 3.1 : Homologie der *C. albicans* Gluconeogenese und Glyoxylat-Zyklus Enzyme zu denen anderer Organismen in % Identität. mt = mitochondrial, ct = cytosolisch

3.3 Gluconeogenese und Glyoxylat-Zyklus Enzymaktivitäten in *C. albicans*.

Anhand von Enzymtests sollte untersucht werden, ob in *C. albicans* ein ähnlicher Regulationsmechanismus für die Kohlenstoffquellen-abhängige Aktivität der gluconeogenischen und Glyoxylat-Zyklus Enzyme existiert, wie man dies von *S. cerevisiae* kennt. Die Bestimmung der Enzymaktivitäten in Rohextrakten von Wildtyp-Zellen zeigte, dass wie in *S. cerevisiae* auch in *C. albicans* keine Enzymaktivitäten von Fbp1p, Pck1p, Icl1p und Mls1p nach Anzucht in YEPD vorhanden sind. Nach Inkubation in YEPE konnten jedoch Enzymaktivitäten gemessen werden (Abb. 3.2). Das Fehlen der Enzymaktivitäten in YEPD ist, wie in *S. cerevisiae*, auf die Glucoserepression zurückzuführen, was durch Enzymmessungen von *C. albicans* SC5314 Rohextrakten nach Anzucht in einem YEPD/E Mischmedium gezeigt wurde (Abb. 3.3).

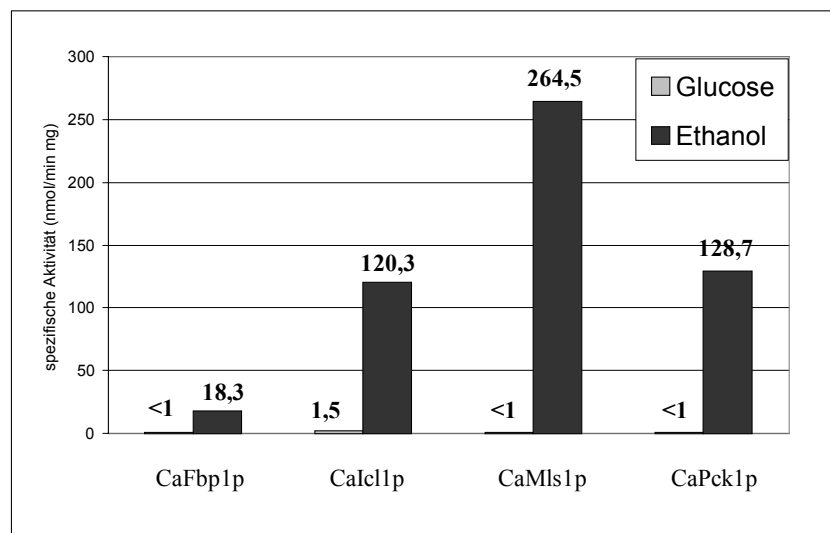


Abb. 3.2 : Aktivitäten der Gluconeogenese und Glyoxylat-Zyklus Enzyme in Rohextrakten von *C. albicans* SC5314. Der Stamm SC5314 wurde unter Glucose reprimierten (YEPD) Bedingungen angezogen, geerntet und aufgeschlossen bzw. über Nacht umgesetzt auf dereprimierende (YEPE) Bedingungen, geerntet und aufgeschlossen. Die Enzymaktivitäten der Fructose-1,6-bisphosphatase, Isocitrat Lyase, Malat Synthase und Phosphoenolpyruvat Carboxykinase wurden in den Rohextrakten bestimmt (siehe Material und Methoden).

Für Fbp1p und Icl1p wurde weiter untersucht, ob die Enzymaktivität von der Art der nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquelle abhängt (Abb 3.3).

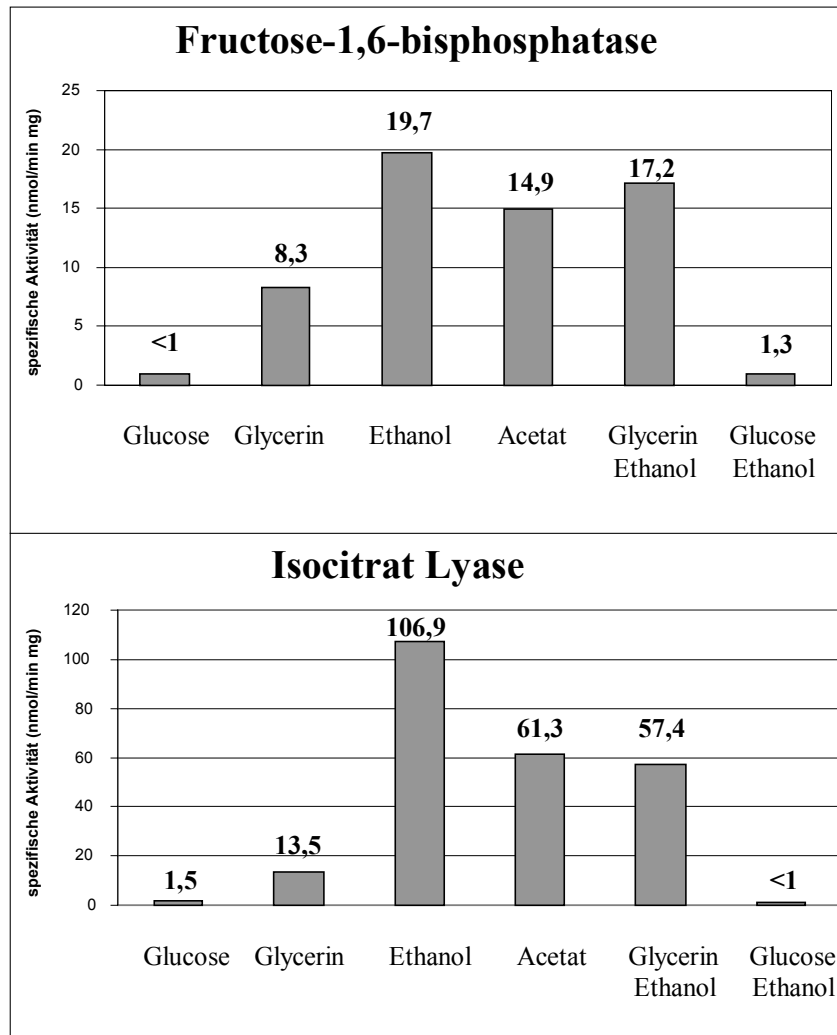


Abb. 3.3 : Spezifische Aktivitäten der Enzyme Fbp1p und Icl1p in Rohextrakten von *C. albicans* SC5314, angezogen in YEP Medium mit unterschiedlichen Kohlenstoffquellen.

Die Enzymaktivitäten waren in YEPGlyc angezogenen Zellen geringer als in YEPE oder YEPAc angezogenen Zellen (Abb. 3.3). Dies traf insbesondere für die Icl1p Aktivität zu, die in Ethanol angezogenen Zellen 10fach höher war als in Glycerin angezogenen Zellen. Um zu untersuchen, ob es sich hierbei um eine Repression der Enzymaktivität durch Glycerin oder eine Aktivierung durch Ethanol handelt, wurden die Enzymaktivitäten nach Anzucht in einem Mischmedium mit Glycerin und Ethanol als Kohlenstoffquelle (YEPE/Glyc) bestimmt. Die Fbp1p Aktivität war hier vergleichbar mit der Aktivität nach Anzucht in YEPE, was darauf schließen lässt, dass Ethanol einen induzierenden Einfluss auf die Aktivität dieses Enzyms hat (Ethanolinduktion). Die Icl1p Aktivität in dem Mischmedium lag deutlich höher als die nach Anzucht in Glycerin, jedoch nicht so hoch wie bei Wachstum auf Ethanol. Dies lässt darauf schließen, auch die Icl1p Aktivität durch Ethanol induziert wird.

3.4 Regulation der Gluconeogenese und des Glyoxylat-Zyklus von *C. albicans*

Nach Transformation der *C. albicans* Gluconeogenese und Glyoxylat-Zyklus Gene in die entsprechenden Deletionsmutanten von *S. cerevisiae* konnten die Stämme wieder auf nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquellen (z.B. Ethanol) wachsen. Wurden diese Transformanten auf Glucose angezogen und die Enzymaktivitäten in den Rohextrakten bestimmt, so war keine bzw. minimale Enzymaktivität der *C. albicans* Enzyme in *S. cerevisiae* messbar. Wurden die Transformanten aber in Glucose angezogen und über Nacht in ein Ethanol-haltiges Medium umgesetzt, so wurde die Enzymaktivität der *C. albicans* Enzyme in *S. cerevisiae* induziert (Abb. 3.4). Die Kohlenstoffquellen-abhängige Aktivität der *C. albicans* Enzyme in *S. cerevisiae* deutet darauf hin, dass diese auch dem Glucose Repressionssystem von *S. cerevisiae* unterliegen. Um dies zu bestätigen, wurde die Abhängigkeit der *C. albicans* Enzymaktivitäten in *S. cerevisiae* in Abhängigkeit zum wichtigsten regulatorischen Element für die Genexpression der Glyoxylat-Zyklus und Gluconeogenese Gene in *S. cerevisiae*, dem Cat8p Transkriptionsaktivator, bestimmt. *CAT8* kodiert für ein Protein der Cys₆-Zink-Cluster Familie, dessen Funktion spezifisch für die UAS/CSRE-vermittelte Aktivierung der Gluconeogenese und Glyoxylat-Zyklus Gene benötigt wird. In einem *S. cerevisiae* $\Delta cat8$ Stamm erfolgt keine Transkription der Gluconeogenese Gene, folglich fehlen die Enzymaktivitäten der Genprodukte auf nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquellen. Dieser Stamm kann nicht auf nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquellen wachsen, da keine essentiellen Glucosephosphate gebildet werden können. Nach Transformation der *C. albicans* Gluconeogenese und Glyoxylat-Zyklus Gene in *S. cerevisiae* CEN.PK143-1B ($\Delta cat8$) konnten keine bzw. minimale Enzymaktivitäten für CaFbp1p, CaMls1p und CaIcl1p nach Anzucht auf Glucose beobachtet werden. Auch nach Umsetzen der Stämme in ein Medium mit nicht-fermentierbarer Kohlenstoffquelle waren keine signifikanten Aktivitäten dieser Enzyme messbar. Dieses Ergebnis zeigt, dass die Expression von CaFbp1, CaMls1p und CaIcl1p von einem funktionsfähigen Cat8p Transkriptionsaktivator abhängt und lässt darauf schließen, dass ein homologes *CAT8* Gen in *C. albicans* existiert. Dieses Gen wurde inzwischen durch funktionelle Komplementation identifiziert und charakterisiert (S. Dicken unveröffentlicht). *CaPCK1* in *S. cerevisiae* $\Delta cat8$ verhält sich anders als die bisher beschriebenen *C. albicans* Gene und führte in *S. cerevisiae* CEN.PK143-1B ($\Delta cat8$) zu einer deutlichen Phosphoenolpyruvat Carboxykinase Aktivität nach umsetzen auf Ethanol-haltiges Medium (Abb. 3.4).

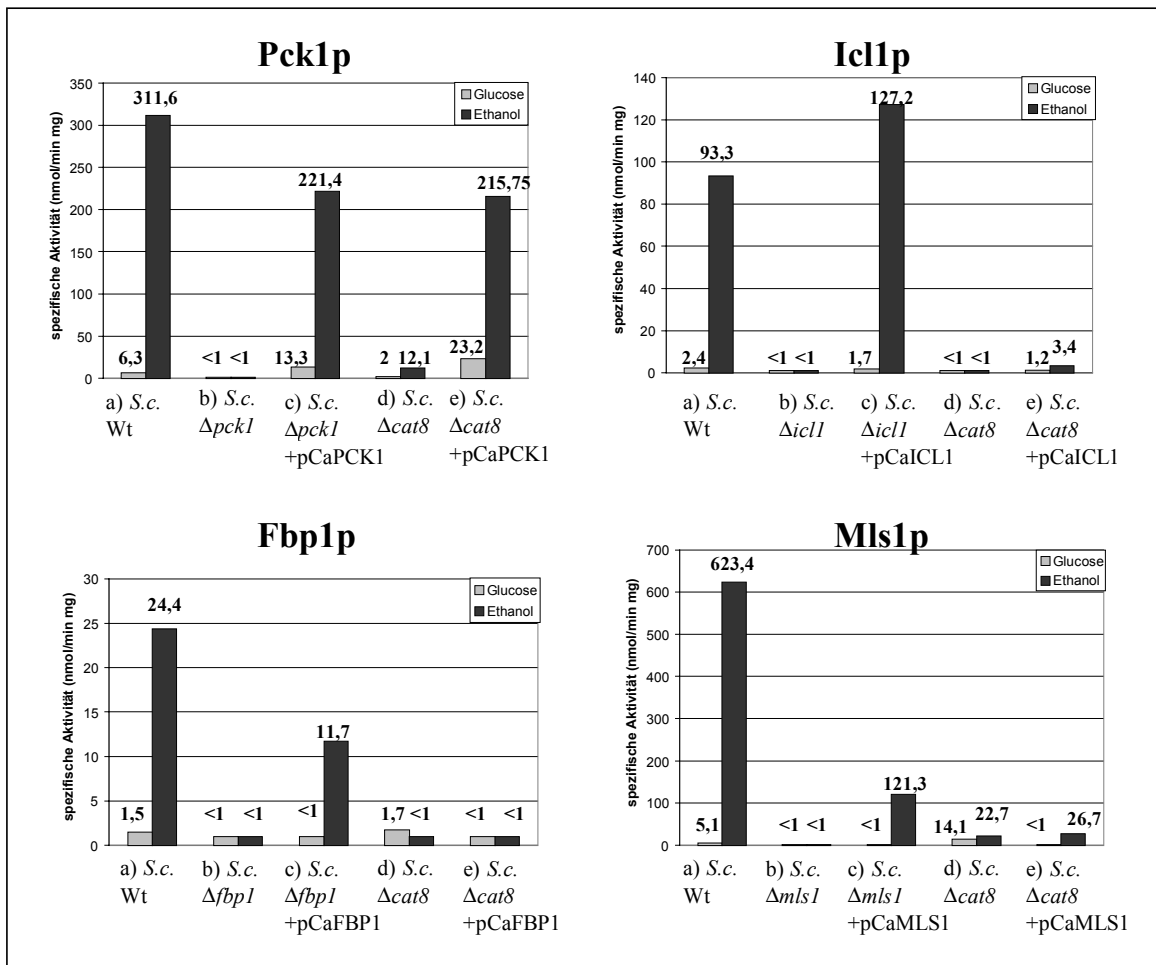


Abb. 3.4 : Enzymaktivitäten nach heterologer Genexpression der *C. albicans* Gluconeogenese und Glyoxylat-Zyklus Gene in verschiedenen *S. cerevisiae* Stämmen. Enzymaktivitäten von Pck1p, Icl1p, Fbp1p und Mls1p unter Glucose reprimierenden und dereprimierenden Bedingungen in Rohextrakten von: a) *S. cerevisiae* Wildtyp, b) *S. cerevisiae*, bei dem das für die jeweilige Enzymaktivität verantwortliche Gen im Wildtyp deletiert wurde (CEN.PK192-1D $\Rightarrow \Delta pck1$, CEN.PK200-4D $\Rightarrow \Delta icl1$, CEN.PK201-3B $\Rightarrow \Delta fbp1$, CEN.PK202-2C $\Rightarrow \Delta mls1$), c) der Deletionsstamm aus b) mit dem entsprechenden *C. albicans* Gluconeogenese bzw. Glyoxylat-Zyklus Gen auf pCaICL1, pCaPCK1, pCaFBP1 oder pCaMLS1, d) *S. cerevisiae* $\Delta cat8$ (CEN.PK143-1B) und e) *S. cerevisiae* $\Delta cat8$ (CEN.PK143-1B) mit dem *C. albicans* Gluconeogenese bzw. Glyoxylat-Zyklus Gen.

Funktionelles Cat8p muss in *S. cerevisiae* posttranslational phosphoryliert werden (Randez-Gil *et al.*, 1997). Diese Phosphorylierung ist Cat1p-Kinase-abhängig, ein weiteres wichtiges Element der Glucose-Derepression der Gluconeogenese und Glyoxylat-Zyklus Gene. Die Cat1p (auch als Snf1p oder Ccr1p bezeichnet) -Proteinkinase wird für die Derepression von Genen für die Nutzung alternativer Kohlenstoffquellen benötigt (Ciriacy, 1977; Zimmermann *et al.*, 1977; Carlson *et al.*, 1981). Neben der Aktivierung von Cat8p phosphoryliert Cat1p die

Repressoren Mig1p und Mig2p. Daraufhin verlassen diese ihre Bindestellen in den Promotoren und sie werden aus dem Zellkern transportiert, wodurch ihre reprimierende Funktion aufgehoben wird (Lutfiyya *et al.*, 1998). Um zu untersuchen ob *CaPCK1*, dessen Expression unabhängig von Cat8p ist, durch das Cat1p Kinase System reguliert wird, wurde pCaPCK1 in *S. cerevisiae* CEN.PK130-7B ($\Delta cat1$) transformiert. In diesem Stamm konnte keine Pck1p Aktivität gemessen werden, weder unter reprimierenden noch unter dereprimierenden Bedingungen. Dies lässt auf eine Cat1p Abhängigkeit von CaPck1p in *S. cerevisiae* schließen.

In den Promotoren der *C. albicans* Gluconeogenese und Glyoxylat-Zyklus Gene liegen mehrere mögliche UAS/CSRE ("upstream activating sequence / carbon source-responsive element") Konsensussequenzen (Abb. 3.5, Tab. 3.2). Lediglich der Promotor von *CaMLS1* besitzt kein solches Motiv, obwohl die Enzymaktivität von CaMls1p Cat8p-abhängig ist. Die Cat8p-abhängige Transkription dieses Genes ist daher UAS-unabhängig. Außerdem findet man in allen *Candida* Genen Konsensusmotive für eine Mig1p Bindestelle (Abb. 3.5, Tab. 3.3). Der Promotor von *CaMLS1* enthält außerdem eine sogenannte "Peroxisomen Box" (-354 bis -346), die in vielen Genen von peroxisomal lokalisierten Proteinen vorhanden ist (Konsensussequenz: CGGNNNTNA; Filipits *et al.*, 1993).

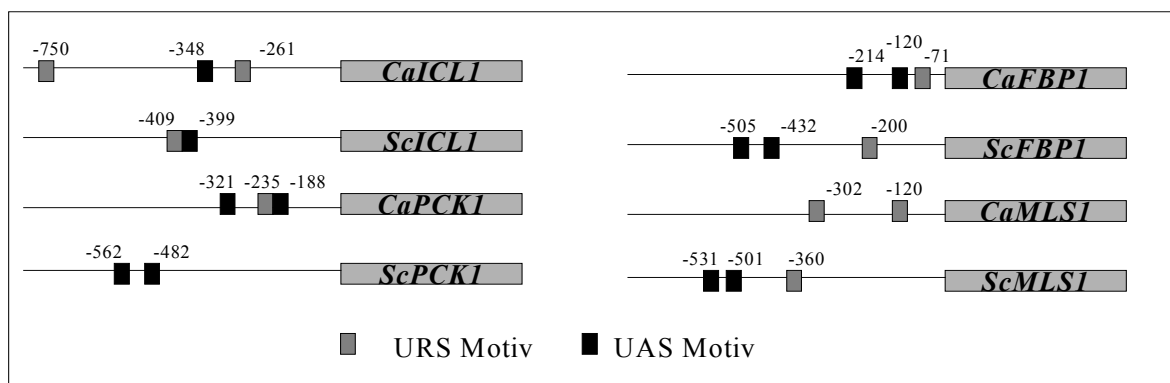


Abb. 3.5 : Verteilung möglicher UAS und URS Sequenzmotive in den Promotoren der Gluconeogenese und Glyoxylat-Zyklus Gene von *S. cerevisiae* und *C. albicans*.

Genname	Sequenz	Lokalisierung
<i>CaICL1</i>	<u>CGGATAGATGGA</u>	-337 - -348
<i>CaPCK1</i>	<u>CGGGGGAACGGA</u>	-310 - -321
<i>CaPCK1</i>	<u>CGGGACAAGGGA</u>	-188 - -177
<i>CaFBP1</i>	<u>CGGCACTTTGGA</u>	-214 - -204
<i>CaFBP1</i>	<u>CGGATAAAAGGA</u>	-109 - -120

Tab. 3.2 : Sequenz und Lage möglicher UAS-Elemente in den Promotoren von *C. albicans* Gluconeogenese und Glyoxylat-Zyklus Genen.

Genname	Sequenz	Lokalisierung
<i>CaFBP1</i>	ATAAAAATTCTGGGGTA	-71 - -55
<i>CaICL1</i>	AAAAAAAAATCTGGGGAA	-261 - -245
<i>CaMLS1</i>	AAAATAAATCTGGGGTA	-302 - -286
<i>CaMLS1</i>	TGCAAAAAAAGGGGGAA	-106 - -120
<i>CaPCK1</i>	CCAAAAAATCTGGGGTA	-219 - -235
<i>CaICL1</i>	TAAATTATCCTGGGGTC	-734 - -750

Tab. 3.3 : Sequenz und Lage möglicher URS-Elemente in den Promotoren von *C. albicans* Gluconeogenese und Glyoxylat-Zyklus Genen.

3.5 Kohlenstoffquellen-abhängige Transkription von *CaFBP1* in *C. albicans* SC5314

Die Existenz zahlreicher regulatorischer Motive in den Promotoren und der Ausfall der Enzymaktivitäten von CaFbp1, CaIcl1p und CaMls1p in einem *S. cerevisiae* $\Delta cat8$ Stamm zeigt, dass die Regulation dieser Enzyme in *S. cerevisiae* auch auf Ebene der Transkription stattfindet, so wie es für die gluconeogenischen und Glyoxylat-Zyklus Gene von *S. cerevisiae* beschrieben ist. Dies deutet darauf hin, dass ein vergleichbares regulatorisches System in *C. albicans* existiert. Um exemplarisch zu zeigen, dass die Regulation der Gluconeogenese und Glyoxylat-Zyklus Gene auch in *C. albicans* hauptsächlich auf Ebene der Transkription erfolgt, wurde eine Northern Analyse mit *CaFBP1* als Sonde durchgeführt. Es wurde gegen RNS-Präparationen von Stamm SC5314 (Wildtyp) nach Anzucht in YEPD, YEPE und

YEPGlyc hybridisiert (Abb. 3.6). YEPD angezogene Zellen enthielten keine *CaFBP1* mRNS, wohingegen in der RNS Präparation der YEPE angezogene Zellen deutlich *CaFBP1* mRNS nachgewiesen werden kann. In den YEPGlyc angezogenen Zellen konnte nur ein sehr schwaches Signal für *CaFBP1* nachgewiesen werden. Somit ist die unterschiedliche Enzymaktivität von CaFbp1p nach Anzucht in YEPE und YEPGlyc (Abb. 3.3) auf eine schwächere Genexpression von *CaFBP1* in YEPGlyc zurückzuführen. In *S. cerevisiae* kennt man solche Unterschiede im Expressionsverhalten von *ScFBP1* in Abhängigkeit der nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquelle nicht.

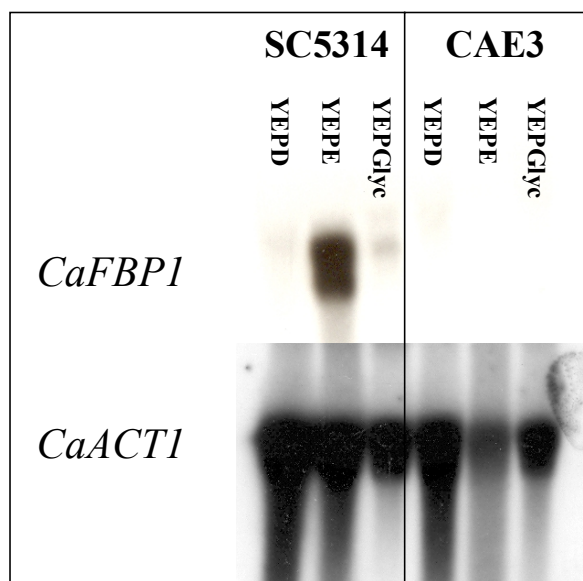


Abb. 3.6 : Northern-Analyse von *CaFBP1* in SC5314 und CAE3 ($\Delta fbp1/\Delta fbp1$). Aus SC5314 wurde nach Anzucht in YEPD, YEPE und YEPGlyc die Gesamt-RNS präpariert, aus CAE3 ($\Delta fbp1/\Delta fbp1$) nach Anzucht in YEPD und nach Umsetzung über Nacht in YEPE bzw. YEPGlyc. Je 50 μ g Gesamt-RNS wurden für die Analyse eingesetzt, gegen die *CaACT1* Sonde und anschließend gegen die *CaFBP1* Sonde hybridisiert.

3.6 Deletion und regulierte Expression von *CaFBP1*

Um die physiologische Rolle der Gluconeogenese in *C. albicans* näher zu untersuchen, wurde exemplarisch *CaFBP1* deletiert. Die gängigste Deletionsstrategie in *C. albicans* beruht auf der Klonierung homologer Flanken des zu deletierenden Gens an die 5' und 3' Enden der URA-blaster Kasette und der anschließenden homologen Rekombination dieses Fragments an den Genort des zu deletierenden Gens (Fonzi und Irwin, 1993). Eine Schwäche dieser Strategie liegt darin, dass die URA-blaster Kasette sehr groß (4,5 kb) ist, und so eine ausreichende Amplifikation mittels PCR für die homologe Rekombination mit kurzen homologen Flanken

(Wach *et al.*, 1994) kaum möglich ist (bzw. nur mit besonderen Polymerasen). Deshalb wurde auf eine Deletion mit der URA-blaster Kassette verzichtet und für die Deletion des ersten *CaFBP1* Allels lediglich *CaURA3* amplifiziert (Primerkombination 126/127), welches 60 bp kurze homologe 3' und 5' Flanken von *CaFBP1* für die homologe Rekombination enthielt (*fbp1-CaURA3-fbp1* Kassette). Der, nach Transformation der *fbp1-CaURA3-fbp1* Kassette entstandene, Uracil-prototrophe Stamm trägt den Namen CAE1. Um *CaURA3* erneut als Marker verwenden zu können, wurde nun die *CaURA3* Marke deletiert, wobei Transformanten durch Wachstum auf 5FOA selektiert wurden. Zur Deletion wurde hierbei eine *hisG* Sequenz aus dem URA-blaster amplifiziert (Fonzi und Irwin, 1993), mit je 60 bp flankierender homologer Sequenz zu *CaURA3*. Von den 500 erhaltenen 5FOA resistenten Kolonien wurde eine (CAE2) für die zweite Transformationsrunde mit der *fbp1-CaURA3-fbp1* Kassette ausgewählt, bei der kein *CaURA3* mittels analytischer PCR nachgewiesen werden konnte. Nach Transformation der *fbp1-CaURA3-fbp1* Kassette in CAE2 entstanden etwa 200 Uracil-prototrophe Kolonien. Um nach Kolonien zu suchen, bei denen auch das zweite Allel von *CaFBP1* deletiert war, wurden alle Transformanten auf SCGlycerin replikaplatziert, da ein Stamm ohne Fbp1p nicht in der Lage sein sollte auf nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquellen zu wachsen. Zwei Transformanten (CAE3) wuchsen auf SCGlycerin Platten nicht, so dass in diesen möglicherweise beide *CaFBP1* Allele deletiert waren. Um dies zu bestätigen, wurde zunächst die Fbp1p Enzymaktivität dieser Stämme unter reprimierenden als auch dereprimierenden Bedingungen bestimmt. Es zeigte sich, dass unter beiden Bedingungen keine Enzymaktivität für CaFbp1p zu messen war (Abb. 3.7). Da es sich trotzdem um falsch-positive Klone handeln konnte, bei denen z.B. ein regulatorisches Element der Gluconeogenese mutiert ist und somit ein genereller Verlust der Gluconeogenese und Glyoxylat-Zyklus Enzymaktivitäten vorliegt, wurde zusätzlich die Icl1p Aktivität unter dereprimierenden Bedingungen bestimmt. Abbildung 3.7 zeigt, dass in CAE3 ein spezifischer Ausfall der Fbp1p Aktivität und sogar eine Hyperaktivierung von Icl1p unter dereprimierenden Bedingungen im Vergleich zum Wildtyp vorlag. Besonders deutlich war dies nach Umsetzen des Stammes auf YEPGlyc zu sehen.

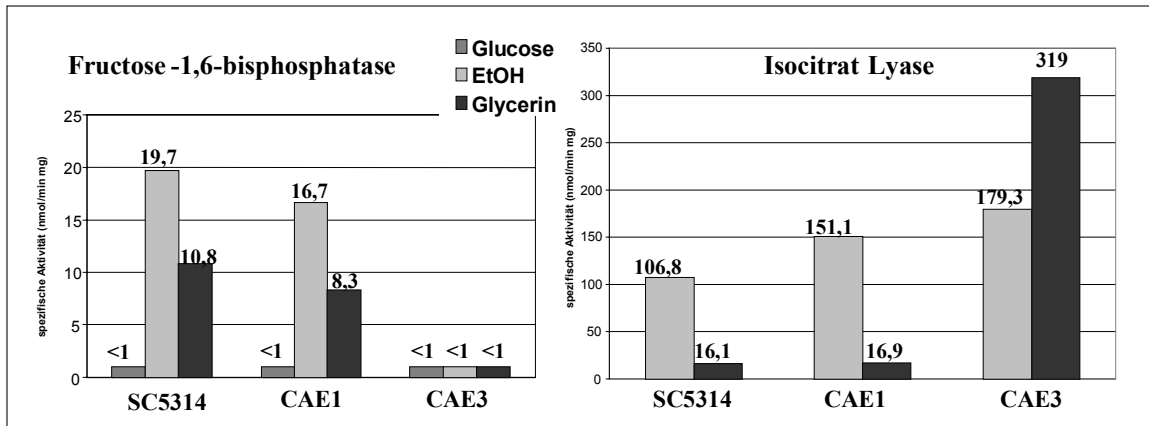


Abb. 3.7 : Enzymaktivitäten der Fructose- 1,6-bisphosphatase und Isocitratlyase in Rohextrakten von SC5314, CAE1 ($\Delta fbp1/FBP1$) und CAE3 ($\Delta fbp1/\Delta fbp1$) nach Anzucht in YEPD und anschließendem Umsetzen über Nacht in YEPE bzw. YEPGlyc.

Um die Deletion von *CaFBP1* in CAE3 zusätzlich zu bestätigen, wurde *CaFBP1* hinter den regulierbaren *MET3* Promotor in Plasmid pCAEXP kloniert (Care *et al.*, 1999; Abb. 3.8).

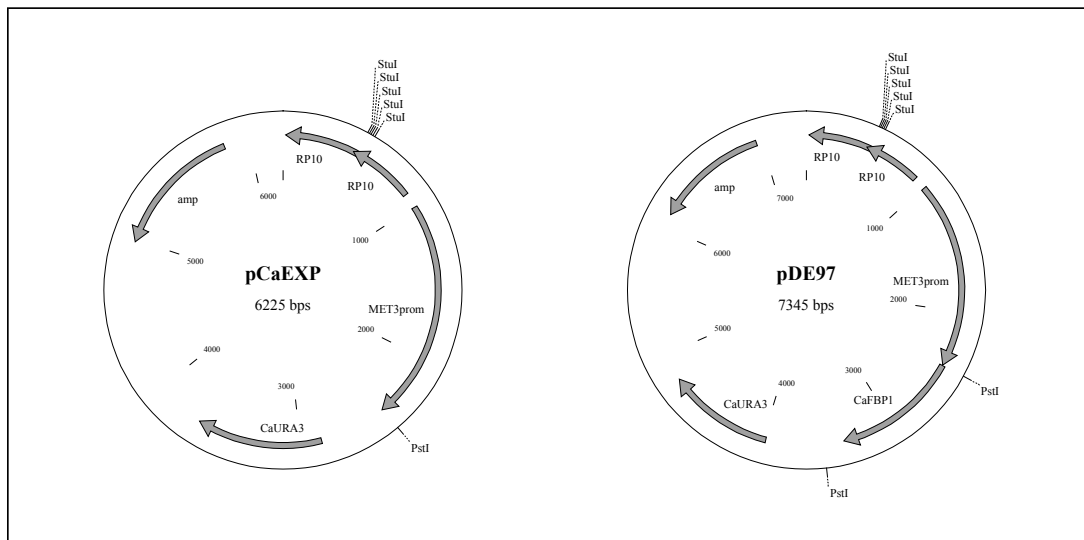


Abb. 3.8 : Vektoren pCAEXP und pDE97 für die regulierte Expression von *CaFBP1*.

Der *MET3* Promotor von *C. albicans* ist bei Überschuss an Methionin und Cystein im Medium stark reprimiert (Care *et al.*, 1999). pDE97 enthält außerdem *RP10*, das in *C. albicans* für ein ribosomales Protein kodiert und mehrfach im Genom vorkommt. Dies hat den Vorteil, dass nach Linearisieren des Plasmids durch Schneiden in *RP10* und anschließender Transformation, Integrationsereignisse in den chromosomalen *RP10* Genort wahrscheinlicher werden. Das *StuI* linearisierte Plasmid pDE97 wurde in CAE3 transformiert

und Transformanten auf SCGlyc ohne Methionin plattiert. Alle getesteten auf SCGlyc gewachsenen Transformanten wuchsen auch auf synthetischem Minimalmedium (SM), SCD mit 2,5 mM Cystein/Methionin, SCE und SCAC Platten, jedoch nicht auf SCGlyc mit 2,5 mM Cystein/Methionin Platten (Abb. 3.9). Somit ist gezeigt, dass CAE3 kein funktionsfähiges Fbp1p mehr besitzt und daher nicht mehr auf nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquellen wachsen kann. Dieser Defekt wird durch Einbringen des *MET3-CaFBP1* Konstrukts in Abhängigkeit der Aminosäurezusammensetzung des Mediums komplementiert.

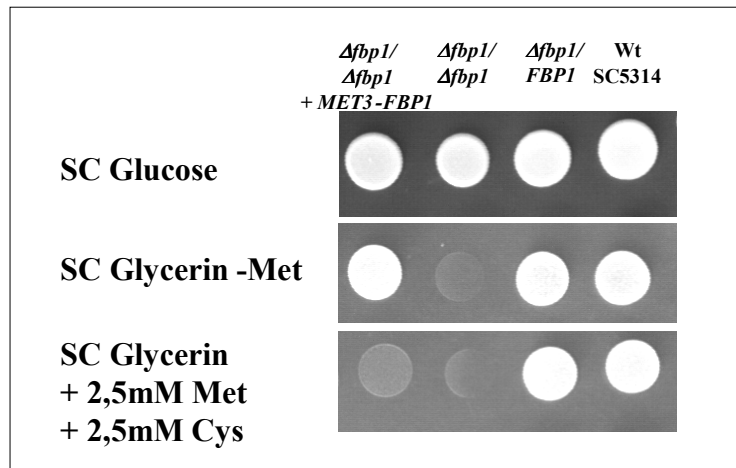


Abb. 3.9 : Regulierte Expression von *CaFBP1* in *C. albicans*. YEPD über Nacht Kulturen von CAE4 ($\Delta fbp1/\Delta fbp1$ +*MET3-FBP1*), CAE3 ($\Delta fbp1/\Delta fbp1$), CAE1 ($\Delta fbp1/FBP1$) und SC5314 (Wildtyp) wurden auf eine optische Dichte von 0,5 verdünnt und je 10 μ l auf SC Glucose, SC Glycerin ohne Methionin oder SC Glycerin mit 2,5 mM Methionin und Cystein aufgetropft. Die Aufnahmen entstanden nach 3 Tagen Inkubation bei 30°C.

3.7 Zellaggregation von *C. albicans* unter Kohlenstoffmangel

Hungert eine *C. albicans* Kultur (z.B. aufgrund von Kohlenstoffmangel), beobachtet man eine Ausflockung der Zellen. Abbildung 3.10 zeigt den Hungerphänotyp von Stamm SC5314 (Wildtyp), der in SC Medium ohne Kohlenstoffquelle umgesetzt wurde. Die Zellen bilden große Aggregate, die auch durch starkes schütteln nicht voneinander getrennt werden können. Diese Aggregation ist reversibel und kann durch Zugabe einer Kohlenstoffquelle aufgehoben werden. Der gleiche Hungerphänotyp kann bei CAE3 beobachtet werden, wenn der Stamm in ein Medium mit nicht-fermentierbarer Kohlenstoffquelle umgesetzt wird (Abb. 3.10). Dies bedeutet, dass der Hungerphänotyp vermutlich durch das Fehlen von Zuckerphosphaten hervorgerufen wird, da alle anderen kurzkettigeren Metabolite in einem *FBP1* Deletionsstamm ausreichend vorhanden sein sollten.

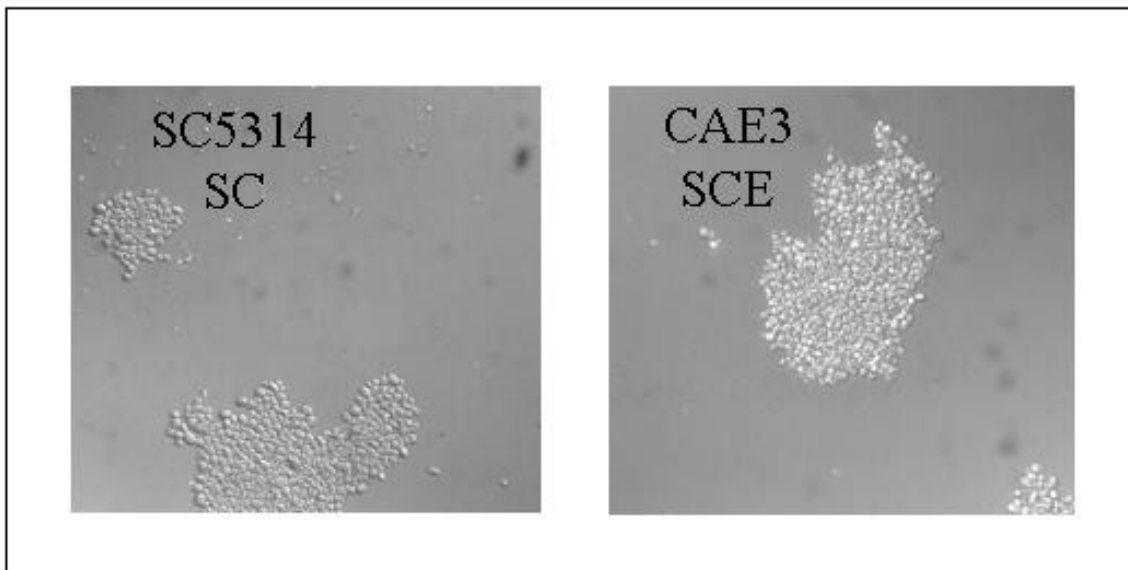


Abb. 3.10 : Mikroskopische Analyse von Hungerphänotypen. Der *C. albicans* Stamm SC5314 (Wildtyp) wurde über Nacht in SCD Medium bei 30°C angezogen und anschließend für weiter 12 h in SC Medium ohne Kohlenstoffquelle bei 30°C inkubiert. Die Anzucht von CAE3 ($\Delta fbp1/\Delta fbp1$) erfolgte ebenfalls über Nacht in SCD. Anschließend wurde der Stamm für 12 h in SCE Medium bei 30°C inkubiert.

3.8 Induktion des morphologischen Wechsels in *C. albicans* CAE3 ($\Delta fbp1/\Delta fbp1$)

Für den morphologischen Wechsel von der Hefe zum filamentösen Pilz sind aus medizinischer Sicht die Induktion durch Blutserum und die Induktion nach Phagozytose durch Makrophagen und Neutrophile die wohl wichtigsten Induktionsfaktoren. In manchen Situationen sollte Wachstum von *C. albicans* eine funktionierende Gluconeogenese bzw. einen Glyoxylat-Zyklus für die Bereitstellung von Glucosephosphaten für die Zellwandsynthese benötigen. Eine solche Situation könnte nach Phagozytose durch Makrophagen entstehen. Nach Einschluss in einen Makrophagen sinkt die Konzentration an Glucose in der Umgebung der Hefezelle sicher schnell. Die Gluconeogenese würde eine Möglichkeit bieten noch verbliebene nicht-fermentierbare Kohlenstoffquellen für die Zellwandsynthese zu nutzen, um nach Makrophagenphagozytose filamentös zu wachsen. Wenn die Gluconeogenese eine solch bedeutende Rolle spielt, dann sollte ein *C. albicans* Stamm, der nicht mehr zur Gluconeogenese befähigt ist (z.B. $\Delta fbp1/\Delta fbp1$), seine Fähigkeit eingebüßt haben Keimschläuche unter Glucosemangel zu bilden. Um diese Frage zu beantworten, wurden die *C. albicans* Stämme SC5314 und CAE3 ($\Delta fbp1/\Delta fbp1$) darauf untersucht, ob sie fähig sind in einem synthetischen komplett Medium bei pH 6,3 in Abhängigkeit von der Kohlenstoffquelle Keimschläuche zu bilden. Die Keimschlauchinduktion sollte durch einen Temperaturwechsel von 30°C zu 37°C erfolgen. Auf diese Art gelang es jedoch nicht, in

synthetischen Minimalmedium mit nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquellen Keimschläuche zu induzieren (Tab. 3.4). Dies zeigt wie wichtig Glucose bzw. ein fermentierbarer Zucker für die Keimschlauchinduktion ist. Um den Einfluss der Gluconeogenese auf die Keimschlauchinduktion unter Glucose-limitierten Bedingungen zu untersuchen, wurden den Keimschlauchinduktionsmedien zusätzlich 10% Serum zugefügt. Dadurch enthielten alle Testmedien eine geringe Glucosekonzentration von 0,5 mM (gemessen mittels Glucoseteststäbchen der Firma Roche, Mannheim). Die Medien waren nun nicht völlig frei von Glucose und entsprachen einer Glucose-limitierten Umgebung, wie sie die *C. albicans* Zelle nach Endozytose durch Makrophagen möglicherweise vorfindet.

In den Medien mit Serum kam es, mit Ausnahme der Ethanol Kulturen, überall zur Flockenbildung und Keimschlauchinduktion. Auch in SC Medien ohne Kohlenstoffquelle konnte filamentöses Wachstum induziert werden. Zwar waren die Keimschläuche in Medien mit nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquellen kleiner als in Medien mit Glucose, doch konnte kein Unterschied zwischen den Stämmen SC5314 und CAE3 festgestellt werden (Abb. 3.11 und Tab. 3.4). Somit spielt die FBPase und damit die Gluconeogenese keine Rolle bei der Keimschlauchinduktion und dem filamentösen Wachstum unter Glucose-limitierten Bedingungen in *C. albicans*.

Medium	SC	SCD	SCAc	SCGlyc	SCE
Stamm SC5314 (Wildtyp)	-	++	+/-	-	-
CAE3 (<i>Δfbp1/Δfbp1</i>)	-	++	+/-	-	-

Medium	SC 10% Serum	SCD 10% Serum	SCAc 10% Serum	SCGlyc 10% Serum	SCE 10% Serum
Stamm SC5314 (Wildtyp)	++	+++	++	++	-
CAE3 (<i>Δfbp1/Δfbp1</i>)	++	+++	++	++	-

Tab. 3.4 : Keimschlauchbildung von SC5314 (Wildtyp) und CAE3 (*Δfbp1/Δfbp1*) in verschiedenen SC Medien. Die Stämme wurden bei 30°C in SCD angezogen, mit Wasser gewaschen und in die oben aufgeführten Medien überführt. Die Auswertung erfolgte nach 2 h Inkubation bei 37°C. - ≡ keine Keimschläuche; +/- ≡ gelegentlich Keimschläuche sichtbar; ++ ≡ Keimschlauchbildung bei der Mehrzahl der Zellen deutlich sichtbar; +++ ≡ Keimschlauchbildung bei allen Zellen mit z.T. sehr langen Hyphen.

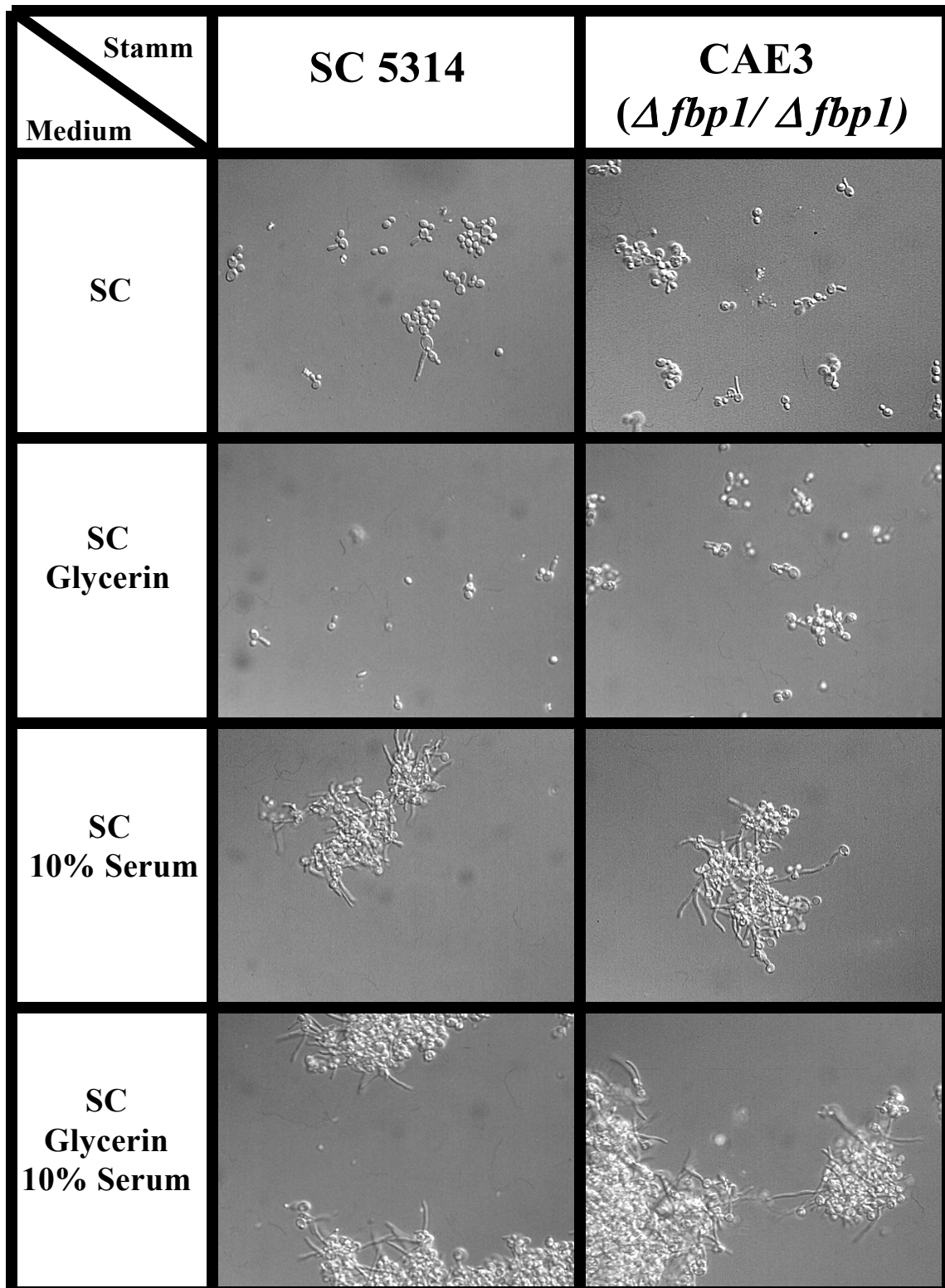


Abb. 3.11 : Wachstumsphänotypen von SC5314 (Wildtyp) und CAE3 ($\Delta fbp1/\Delta fbp1$) nach Induktion des hyphalen Wachstums unter Glucose-limitierten Bedingungen. Die Stämme wurden in SCD bei 30°C angezogen, gewaschen und in Medien, die 10 % Serum enthielten, umgesetzt. Die Durchlichtaufnahmen entstanden nach 2h Inkubation bei 37°C mit 100facher Vergrößerung.

3.9 Split-Marker-Selektion zur Klonierung heterologer essentieller Gene

Mögliche Ansatzstellen für die medikamentöse Behandlung von Candidosen stellen insbesondere essentielle Gene/Proteine von *Candida sp.* dar. Um Screeningprozeduren nach Chemikalien durchführen zu können, die spezifisch gegen diese essentiellen Gene/Proteine wirken, müssen genau diese Gene/Proteine von *Candida sp.* zunächst einmal identifiziert und charakterisiert werden. Einen großen Vorteil bietet hierbei die weit fortgeschrittene Funktionsanalyse aller Gene von *S. cerevisiae*. So kennt man bereits alle essentielle Gene von *S. cerevisiae*, die unbedingt notwendig für das vegetative Wachstum sind. Mit Hilfe dieser Informationen, der leichten genetischen Handhabung von *S. cerevisiae* und der Tatsache, dass der überwiegende Teil aller *C. albicans* Gene in *S. cerevisiae* funktionell exprimiert wird, wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit die Split-Marker-Selektion entwickelt.

Die Klonierung der Gluconeogenese und Glyoxylat-Zyklus Gene von *C. albicans* gelang durch funktionelle Komplementation von *S. cerevisiae* Deletionsmutanten. Diese Strategie ist nicht ohne weiteres auf essentielle Gene zu übertragen, da diese nicht deletiert werden können. Deshalb müssen konditional letale Stämme hergestellt werden. Das System der Split-Marker-Selektion beruht auf der Idee einen Stamm so zu präparieren, dass in diesem auf ein Signal die Deletion eines endogenen essentiellen Gens erfolgt. Dieses Signal wird erst dann gegeben, wenn bereits eine genomische *C. albicans* Genbank in den Stamm eingebracht wurde. Es handelt sich hier also um einen konditionalen Deletionsstamm. Die Deletion des essentiellen Gens soll durch eine sequenzspezifische Rekombination erfolgen, vermittelt durch die Cre-Rekombinase, welche das essentielle Gen mittels flankierender *loxP* Sequenzen herausschneidet und lediglich eine *loxP* Sequenz im Genom verbleibt (Abb. 3.12).

Das Einführen einer Marke, welche auf erfolgreich rekombinierte Zellen selektiert, ist unerlässlich, da die Rekombination zwischen zwei *loxP* Sequenzen nach Expression der Cre-Rekombinase nur in etwa 95% aller Zellen erfolgt (Daten nicht gezeigt). Dies würde in einem Screening zu einer unüberschaubaren Menge "falsch-positiver" Klone führen, die noch das essentielle Gen von *S. cerevisiae* enthielten. Eine Möglichkeit bestünde durch zusätzliches Einbringen einer Marke (z.B. *URA3*), auf deren Verlust nach bei Cre-vermittelter Rekombination selektiert werden kann (5FOA Resistenz) (Abb. 3.12 B). Solche Selektionen sind anfällig falsch-positive Klone zu erzeugen, da die Zelle durch den Verlust einer Funktion einen Vorteil erhält (siehe Einleitung). Daher ist eine Selektion zu bevorzugen, welche der

Zelle nach erfolgter Rekombination völlig neue Eigenschaften durch den Gewinn einer Funktion verleiht. Einen solchen Funktionsgewinn würde die Zelle durch geteilte Markergene (Split-Marker) erhalten. Jeder Teil des Markers alleine führt nicht zum Funktionsgewinn. Nach Cre-vermittelter Rekombination wird der Marker zusammengesetzt und verleiht der Zelle neue Fähigkeiten (Abb. 3.12 C).

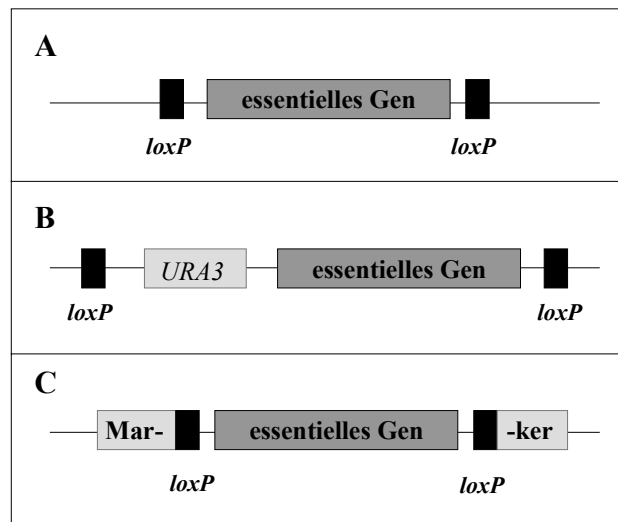


Abb. 3.12: Prinzip konditional letaler Stämme durch flankieren essentieller Gene mit *loxP* Sequenzen. A) stellt das Grundprinzip dar, B) und C) sind Verbesserungen, wobei auf die Cre/*loxP*-vermittelte Rekombination selektiert werden kann.

In Abbildung 3.13 ist das Schema der Klonierung eines essentiellen Gens von *C. albicans* dargestellt. Zur Verifikation der selektierten Klone werden diese auf 5FOA Platten replikaplattiert. Hier wachsen nur Klone, die *URA3* nach Cre-induzierter Rekombination verloren haben, was zur Resistenz gegen 5FOA führt. Der Einsatz von chromosomalen *C. albicans* Genbanken auf hoch instabilen Plasmiden erlaubt eine weitere Verifikation von erhaltenen Klonen durch Replikaplattieren auf SCD-trp (Selektionsmarke von YRp7). Hoch instabile Plasmide (z.B. YRp7) besitzen lediglich eine autonom replizierende Sequenz (*ARS1*), jedoch keine Centromersequenz. Dadurch wird das Plasmid in der Mitose nicht korrekt zwischen Mutter- und Tochterzelle verteilt. Die Folge ist, dass das Plasmid ohne Selektionsdruck rasch verloren geht. Sollte bei einem Klon das endogene essentielle Gen deletiert worden sein, so ist dieser auf das instabile Genbankplasmid mit dem essentiellen Gen von *C. albicans* angewiesen. Dieser Selektionsdruck führt dazu, dass solche Klone immer das Plasmid enthalten, wohingegen ein YRp7 Plasmid in falsch-positiven Klonen rasch verloren geht.

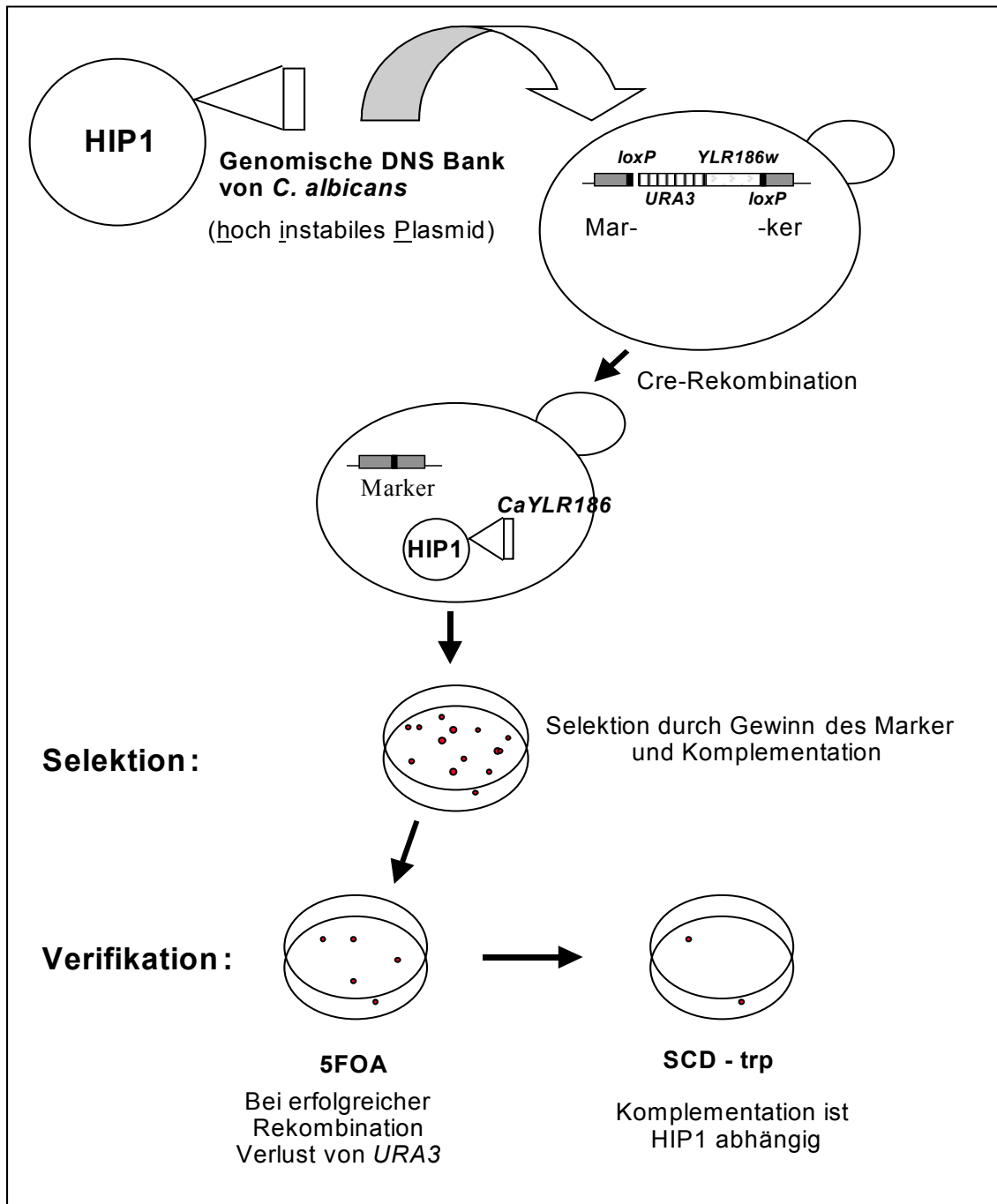


Abb. 3.13 : Schema der Klonierung essentieller Gene von *C. albicans* (anhand des Beispiels *YLR186w*) durch funktionelle Komplementation in *S. cerevisiae* durch die Split-Marker-Selektion.

3.10 Konstruktion der Split-Marker-Kassette

Um das beschriebene Split-Marker-System zu verwirklichen, wurde zunächst ein Vektor konstruiert, der die Split-Marker-Kassette enthielt. In diese Kassette können essentielle Gene von *S. cerevisiae* kloniert werden (in Abb. 3.14 anhand des Beispiels *YLR186w* gezeigt). Anschließend kann die Kassette, inklusive des essentiellen Gens, durch PCR amplifiziert werden und durch homologe Rekombination das chromosomale essentielle Gen durch die Kassette ersetzt werden. In dieser Kassette existieren zwei Marken, die auf das Rekombinationsereignis zwischen den *loxP* Sequenzen selektieren. Dies ist *URA3*, welches nach erfolgreicher Rekombination verloren geht, worauf mit 5FOA selektiert werden kann. *URA3* hat aber noch eine zweite Funktion. Da die Split-Marker-Kassette später an Stelle des eigentlichen essentiellen Gens ins Genom von *S. cerevisiae* integriert werden soll, wird *URA3* als Selektionsmarke für diesen Integrationsprozess benötigt.

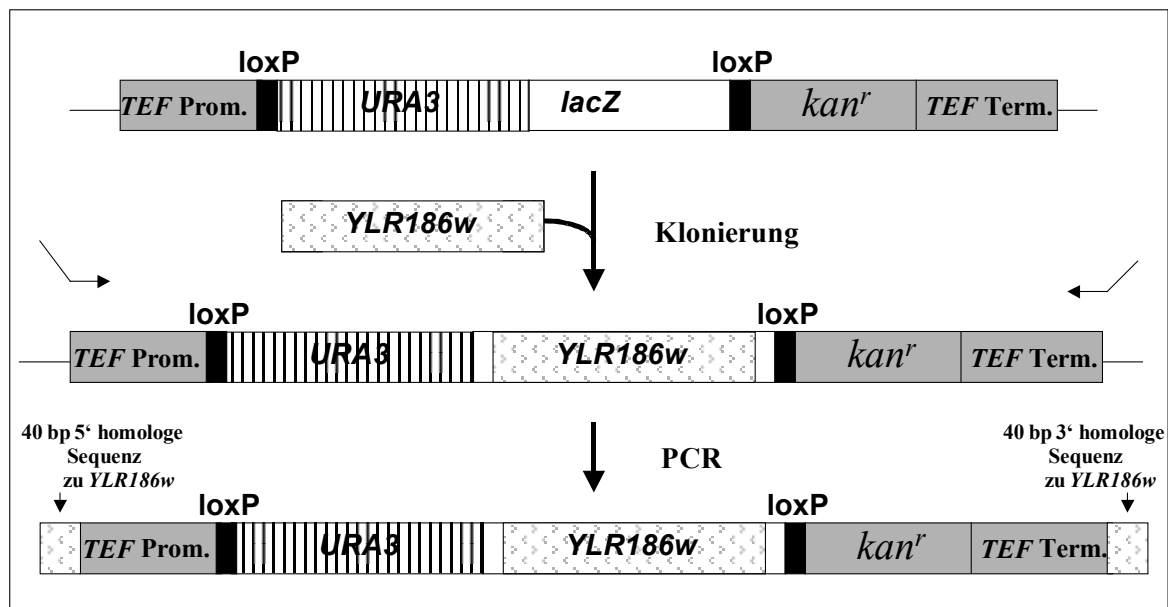


Abb. 3.14 : Schema der Split-Marker-Kassette. Die Kassette besteht aus dem Promotor (*TEF Prom.*) und Terminator (*TEF Term.*) des Translationselongationsfaktor 1 α von *Ashbya gossypii*, *kan^r* von *Escherichia coli* Tn903, *URA3* von *Saccharomyces cerevisiae*, *lacZ* von *Escherichia coli* und *loxP* Sequenzen des Bakteriophagen P1. Das essentielle Gen (z.B. *YLR186w*) wird in die Split-Marker-Kassette kloniert und die gesamte Kassette durch PCR amplifiziert, für die Integration ins Hefegenom mittels Rekombination über kurze homologe Flanken.

Als zweiter Selektionsmarker dient *kan^r*, wobei der heterologe *TEF*-Promotor (vom Translationselongationsfaktor 1 α aus *Ashbya gossypii*), der die Expression dieses Gens antreiben soll, durch die gesamte *loxP-URA3-lacZ-loxP* Kassette vom Strukturgen getrennt

ist. Erst nach Cre/*loxP*-vermittelter Rekombination soll der Promotor an das Strukturgen herangeführt werden, so dass das Gen exprimiert wird. Der *TEF*-Promotor ist in *S. cerevisiae* funktionell und führt zu einer starken Genexpression (Steiner und Philippsen, 1994). Das *kan^r* Gen stammt ursprünglich aus dem Transposon Tn903 von *E. coli* und verleiht Resistenz gegen das Aminoglycosid Geneticin (G418) (Jimenez und Davies, 1980). Eine Kombination von *TEF*-Promotor und *kan^r* Strukturgen wird in *S. cerevisiae* bereits seit längerem als Teil einer dominanten Marker Kasette (KanMX) für Gendelektionen eingesetzt (Güldener *et al.*, 1996, Wach *et al.*, 1994). Als Terminator enthält das *kan^r* Gen in der Split-Marker-Kasette den Terminator des Translationselongationsfaktor 1 α aus *A. gossypii*. Letztendlich enthält die Split-Marker-Kasette noch Teile des *lacZ* Gens von *E. coli* für die α -Komplementation (Ullmann *et al.*, 1967), welche die Klonierung von essentiellen Genen in die Kasette erleichtern soll.

Die einzelnen Konstruktionsschritte der Split-Marker-Kasette sind in Abbildung 3.15 gezeigt. Ein PCR-Fragment (F1), welches durch die Amplifikation mit den Primern 6/7 und der Matrize pDE2 entstand, enthielt eine *loxP* Sequenz und das *URA3* Gen von *S. cerevisiae*. Durch Schneiden mit *SalI/EcoRI* und Klonieren des Fragments in den gleichfalls mit *SalI/EcoRI* geöffneten bakteriellen Vektor pBluescriptIIKS+ entstand das Zwischenprodukt pDE54. Dieses Plasmid wurde mit *EcoRI/SacI* geöffnet und ein PCR-Produkt (F2; erhalten durch Amplifikation mit Primer 4/5 und Matrize pUG6) einligiert, welches eine *loxP* Sequenz, das *kan^r* Gen sowie den *TEF*-Terminator enthält. Dieses Zwischenprodukt trägt den Namen pDE55. Das PCR-Produkt F3 wurde mit *SalI/XhoI* geschnitten und in den *XhoI* geschnitten Vektor pDE55 kloniert. F3 enthielt, durch die PCR-Amplifikation mit Primerkombination 3/8 und Matrize pUG6, den *TEF*-Promotor. Dieser neue Vektor (pDE56) wurde mit *EcoRI* geöffnet, die überstehenden Enden mit Klenow Fragment aufgefüllt und ein *lacZ* enthaltendes Fragment (F4) einligiert, welches durch Amplifizieren mit den Primern 90/91 und der Matrize pBluescriptIIKS+ entstand. Dieser Vektor (pDE59) enthielt eine vollständige Split-Marker-Kasette, wie sie in Abb. 3.14 schematisch dargestellt ist.

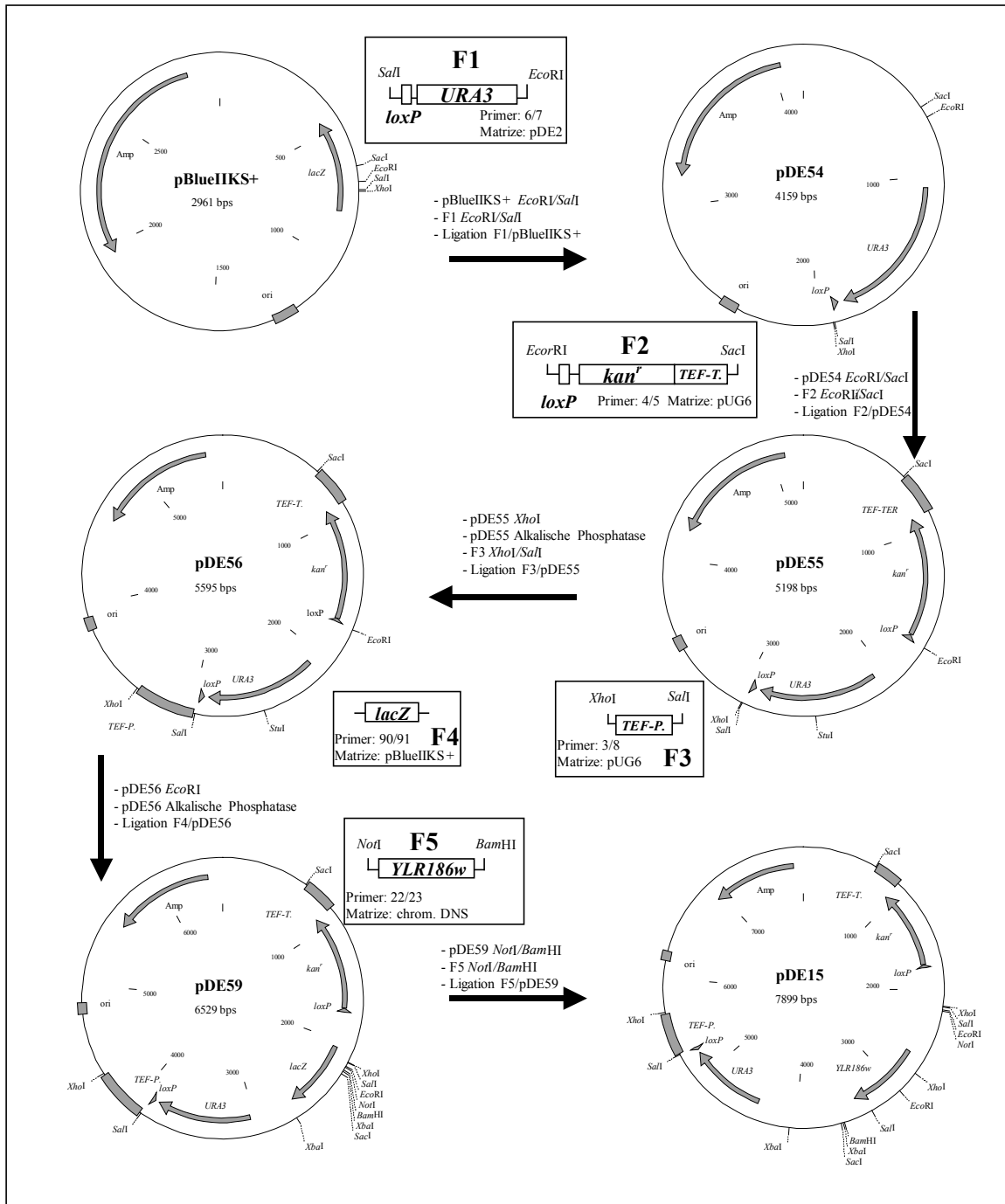


Abb. 3.15 : Schematische Darstellung der Konstruktion der Split-Marker-Kassette sowie Klonierung des essentiellen Gens *YLR186w* in die Split-Marker-Kassette.

3.11 Stamm SDE8-1A als Testkandidat für die Split-Marker-Selektion

Um mit der Split-Marker-Selektion zu arbeiten, musste zunächst ein Stamm konstruiert werden, bei dem ein essentielles Gen durch das gleiche essentielle Gen in der Split-Marker-

Kassette ersetzt wurde. Das Screening-Verfahren sollte anhand des Gens *YLR186w* ausgearbeitet werden. Die Kriterien, die zur Auswahl dieses Gens führten, waren:

- a) das Gen ist essentiell für das vegetative Wachstum der Hefe *S. cerevisiae*
- b) das Gen ist klein

Der offene Leserahmen von *YLR186w* umfasst lediglich 756 bp, was für ein Protein von 252 Aminosäuren kodiert. Die geringe Größe hatte den Vorteil, dass die Klonierung des Gens in die Split-Marker-Kassette unproblematisch sein sollte. Da die Split-Marker-Kassette bereits ohne essentielles Gen 3635 bp groß ist, erreicht die Kassette bei größeren essentiellen Genen sehr schnell Dimensionen, die eine einfache Amplifikation mittels PCR erschweren. Dies ist jedoch eine Voraussetzung, um die Kassette über homologe Rekombination mit kurzen homologen Flanken ins Genom zu integrieren. Da die entfernt verwandte Hefe *S. pombe* ein homologes Gen zu *YLR186w* besitzt (*MR1*), das essentiell für das vegetative Wachstum ist, konnte man bei der Etablierung der Methode relativ sicher sein, dass auch in der zu *S. cerevisiae* näher verwandten Hefe *C. albicans* ein homologes Gen existiert. Zu dem Zeitpunkt als dieses Gen ausgewählt wurde befanden sich noch keine Sequenzen von homologen Genen/Proteinen von Säugern in den Datenbanken, was das Gen zusätzlich interessant machte.

Zur Funktion von *YLR186w* standen lediglich Informationen von dem *S. pombe* Homologen *mra1* zur Verfügung (Hakuno *et al.*, 1996). Dieses Gen wurde ursprünglich als Multicopy-Suppressor des Paarungsdefekts einer rezessiven *ras1-S40* Punktmutante identifiziert ("multicopy suppresser of ras1"). Ras G-Proteine sind Schalter für Signal-Transduktionswege (Barbacid, 1990). *ras1* in *S. pombe* ist an zwei Signal-Transduktionswegen beteiligt. Zum einen ist das die byr2p/byr1p/spk1p MAP Kinase Kaskade, welche die Expression von Genen, die an der Paarung beteiligt sind, reguliert (Wang *et al.*, 1991; Xu *et al.*, 1994). Zum anderen ist ras1p über seine Interaktion mit scd1p (ein GEF von cdc42sp) an der Organisation des Zytoskeletts beteiligt. Cdc42 ist ein stark konserviertes eukaryontisches Protein, das zur Superfamilie der GTPasen gehört, die wichtig für die Etablierung der Zellpolarität sind. In *S. cerevisiae* ist Cdc42p beteiligt an der Auswahl der Knospungsstelle, der Knospententwicklung, am polarisierten Wachstum (z.B. Paarungsprojektion) und der Zytokinese (Adams *et al.*, 1990; Johnson and Pringle, 1990; Ziman *et al.*, 1991; Miller and Johnson, 1997; Chant, 1999; Johnson, 1999).

Überexprimiertes *mra1p* kann auch den ineffizienten Paarungsphänotyp eines Δzfs Stammes supprimieren. Von *zfs1p* glaubt man, dass es im Pheromon-Signal-Transduktionsweg involviert ist, da ein Deletionsstamm kaum zur Paarung befähigt ist, dieser Phänotyp jedoch teilweise durch Überexpression von bekannten Komponenten des Pheromon-Signal-Weges (*gpa1*, *ras1*, *byr1* oder *byr2*) supprimiert werden kann. Da die Überexpression von *zfs1* außerdem die ungesteuerte Septum Bildung in der *S. pombe cdc16-116* Mutante bei restriktiver Temperatur unterdrückt und ein $\Delta zfs1$ Stamm nicht mehr befähigt ist die Septierung in am Spindel-Checkpoint arretierten Zellen zu unterdrücken, scheint *zfs1* auch die Septierung zu unterdrücken.

Letztendlich kann die Überexpression von *mra1* auch das schlechte Paarungsverhalten eines Stammes supprimieren, der *gap1* überexprimiert. Gap1p ist das GTPase-aktivierende Protein von *ras1p*, das dessen Aktivität herunterreguliert (Imai *et al.*, 1991).

Für die Herstellung des Split-Marker-Stamms (SDE8) wurde der offene Leserahmen, 460 bp Promotor sowie 165 bp Terminator des essentiellen Gens *YLR186w* mittels PCR mit den Primern 22/23 amplifiziert. Als Matrize diente chromosomale DNS von *S. cerevisiae* CEN.PK2 (Wildtyp). Das PCR-Produkt wurde mit *NotI/BamHI* geschnitten und in die gleichfalls mit *NotI/BamHI* geöffnete Split-Marker-Kassette von pDE59 kloniert (Abb.3.14 und 3.15). Der resultierende Vektor pDE15 diente als Matrize für die Amplifikation der Kassette mit der Primerkombination 24/25. Die Sequenz der Primer wurde so gewählt, das 20 bp am 5' bzw. 3' Ende der Split-Marker-Kassette binden, die restlichen 40 bp der Primer waren homolog zu chromosomalen Sequenzen 5' bzw. 3' des kodierenden Bereichs von *YLR186w*. So kann die Kassette durch homologe Rekombination integriert werden, wobei das endogene *YLR186w* ersetzt wird (Abb. 3.14). Die Amplifikation der Kassette erfolgte mit einer High Fidelity Polymerase. Das PCR-Produkt (etwa 10 µg) wurde gefällt, in 15µl Wasser aufgenommen und in den diploiden Wildtypstamm CEN.PK2 transformiert. So wurden 36 Uracil-prototrophe Transformanten erhalten, die zunächst auf Resistenz gegen Geneticin getestet wurden. Wären die Klone bereits vor der Cre-vermittelte Rekombination resistent, wäre der Stamm unbrauchbar. Dazu wurden die Transformanten auf YEPD + G418 replikaplattiert, wobei sich zeigte, dass die Transformanten nicht G418 resistent waren.

Dies sollte zu keiner Beeinträchtigung der Aktivität des Enzyms führen, da bereits bekannt war, dass der N-Terminus nicht wichtig für die Phosphotransferase-Funktion des Enzyms ist und sogar eine Deletion der ersten 19 Aminosäuren toleriert wird (Chen und Fukuhara, 1988). Die korrekte Integration der Split-Marker-Kassette wurde in SDE8 mittels analytischer PCR bestätigt. In diesen Stamm wurde Plasmid pPK179 transformiert. Dieses *CEN6/ARS4* Plasmid enthält das Gen für die Cre-Rekombinase hinter einem *GALI* Promotor und *LEU2* als Selektionsmarke. Der *GALI* Promotor ist ein regulierbarer Promotor, der durch Glucose reprimiert wird und durch Galaktose induziert wird (Johnston, 1987). So ist es möglich mit Hilfe der Kohlenstoffquelle die Cre-Rekombination in SDE8 zu induzieren.

SDE8 mit pPK179 wurde a) in SCD ohne Leucin und b) in SCGal ohne Leucin angezogen und je ca. 300 Zellen auf YEPD plattiert. Die Platten wurden 2 Tage bei 30°C inkubiert und anschließend auf YEPD + G418 sowie SCD ohne Uracil replikaplattiert (Abb. 3.17). Bei den SCD angezogenen Zellen (d.h. mit reprimierter Cre-Rekombinase) waren alle Kolonien fähig auf SCD ohne Uracil zu wachsen, jedoch zeigte sich auch Wachstum auf der YEPD G418 Platte, ein zunächst unerwartetes Ergebnis. Dies kann jedoch dadurch erklärt werden, dass im Zentrum der auf YEPD gewachsenen Klone die Glucose relativ schnell verbraucht ist, so dass die Zellen hier nicht mehr der Glucoserepression unterliegen. Zwar ist der *GALI*-Promotor der Cre-Rekombinase auf pPK179 noch nicht voll induziert, so erlaubt diese Umgebung dennoch eine leichte Expression der Cre-Rekombinase und die Cre-vermittelte Rekombination erfolgt in einem Teil der Zellen in der Kolonie. Wurden die Zellen auf SCGal angezogen, so war nur noch ein geringer Teil der YEPD plattierten Klone fähig auf SCD ohne Uracil zu wachsen, jedoch nahezu alle waren G418 resistent. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Cre-vermittelte Rekombination in SDE8 funktioniert und der Stamm nach Rekombination G418 resistent wird.

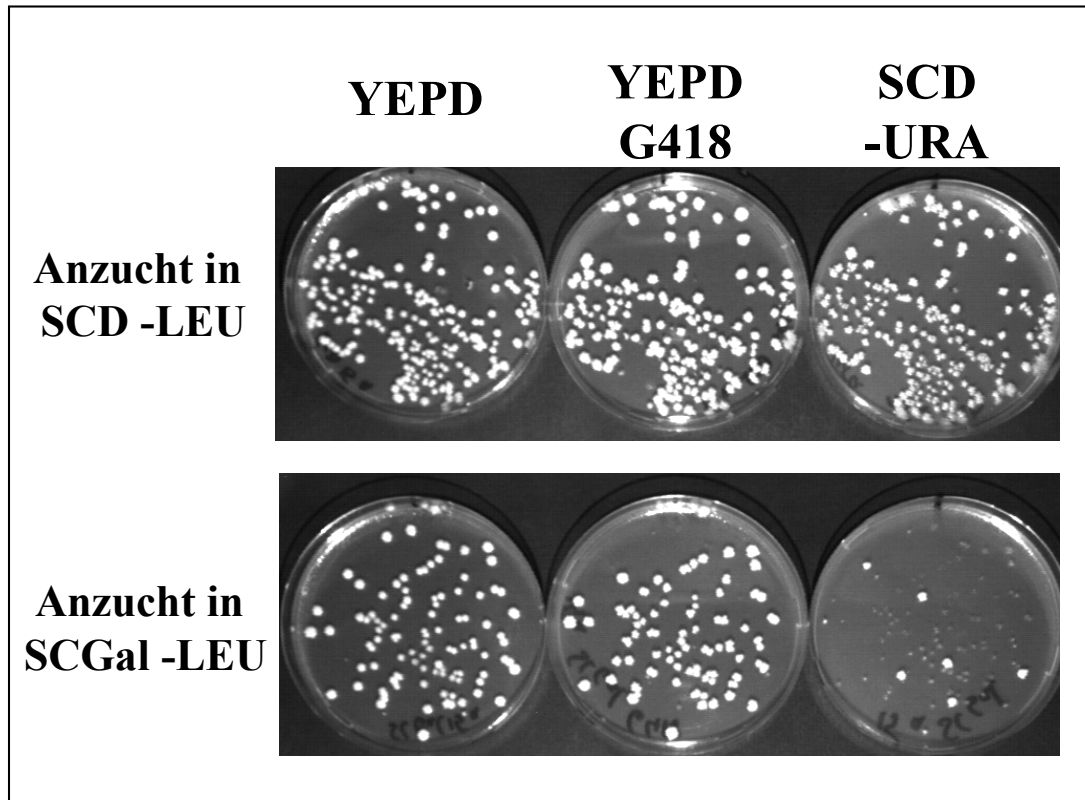


Abb. 3.17 : *URA3* Verlust von SDE8 durch Cre-vermittelte Rekombination. SDE8 mit pPK179 wurde in SCD -leu (Repression der Cre-Rekombinase) oder SCGal -leu (Induktion der Cre-Rekombinase) angezogen, auf YEPD plattiert und auf YEPD + G418 sowie SCD -ura replikaplattiert.

Als nächstes wurde die Sporulation von SDE8 durch Plattierung auf 1% Kaliumacetat induziert und entstandene Tetraden analysiert. Alle Segreganten einer Tetrade bildeten Kolonien, was zeigt, dass *YLR186w* in der Split-Marker-Kassette funktionell ist. Die Aufspaltung der Split-Marker-Kassette erfolgte im Verhältnis 2:2, womit gezeigt war, dass die Kassette nur einmal ins Genom integrierte. Eine haploide Segregante (SDE8-1A), welche die Split-Marker-Kassette enthielt, wurde für weitere Analysen ausgewählt. Zwar wurde im diploiden Stamm SDE8 bereits gezeigt, dass die beiden Marken funktionell sind und eine Rekombination induziert werden konnte, trotzdem sollte dies auch in dem haploiden Stamm untersucht werden. Hier hätte die Cre-vermittelte Rekombination zur Folge, dass die Zelle sich selbst tötet. Dazu wurde pPK179 in SDE8-1A transformiert und Transformanten in a) SCD ohne Leucin oder b) SCGal ohne Leucin angezogen. Von diesen über Nacht Kulturen wurden je 50 einzelne Zellen mit Hilfe des Mikromanipulators auf YEPD-Platten abgelegt. Als Kontrolle wurde mit SDE8-1A ohne pPK179 ebenso verfahren (Abb. 3.18).

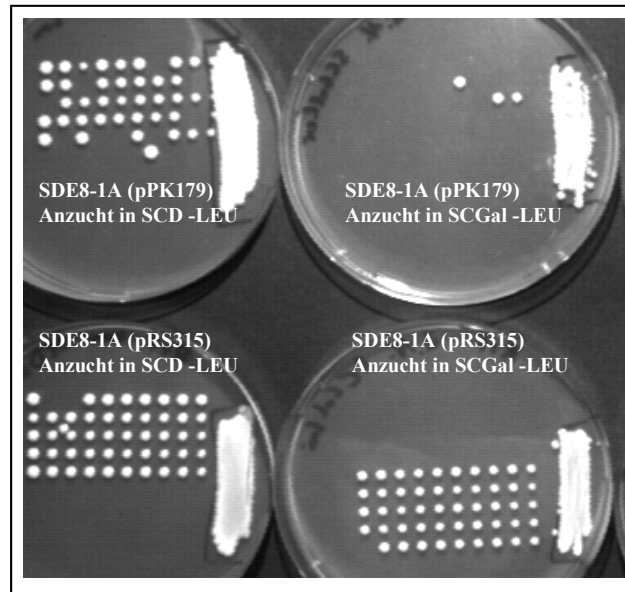


Abb. 3.18 : Wachstumsphänotyp von SDE8-1A nach Induktion der Cre-Rekombinase. Die Stämme SDE8-1A mit pPK179 und SDE8-1A mit pRS315 (Kontrolle) wurden über Nacht in SCD -leu (Repression der Cre-Rekombinase) oder SCGal -leu (Induktion der Cre-Rekombinase) angezogen und einzelne Zellen dieser Kulturen wurden mit Hilfe des Mikromanipulators auf YEPD-Platten gelegt. Die Aufnahme entstand nach 3 Tagen Inkubation bei 30°C.

Obwohl SDE8-1A mit pPK179 problemlos in SCGal wächst und kein signifikanter Unterschied im Vergleich zum Wachstum in SCD zu sehen ist (Daten nicht gezeigt), ist der größte Teil der Zellen dieser Kultur Tod (>90%) (Abb. 3.18). Damit war gezeigt, dass die Rekombination auch im haploiden Stamm induziert werden kann, selbst wenn die Zellen sich damit töten.

3.12 Isolierung des Gens *CaYLR186* von *C. albicans* durch Split-Marker-Selektion

Nachdem alle wichtigen Eigenschaften von Stamm SDE8-1A mit pPK179 überprüft waren und die Erwartungen erfüllt wurden, war dieser Stamm Rezipient für eine genomische *C. albicans* Genbank. Hierbei handelt es sich um eine Genbank in dem Hefevektor YRp7, der die Selektionsmarke *TRP1* enthält. Nach 3 Tagen Inkubation wurden ca. 20.000 Transformanten abgeschwemmt. Mit dieser Zellsuspension wurden 100 ml SCGal ohne Tryptophan (Selektion auf Genbankplasmide) und ohne Leucin (Selektion auf pPK179) mit einer OD₆₀₀ von 0,5 beimpft. Diese Kultur wurde 2 Tage bei 30°C inkubiert und anschließend 6 YEPD G418 Platten mit je 10⁷ Zellen plattiert. Da die Zellen erst nach Rekombination der Split-Marker-Kassette resistent gegen G418 werden, sollten hier lediglich rekombinierte Zellen Kolonien bilden können. Nach diesem Selektionsschritt bildeten sich ca. 50 Klone pro Platte, welche anschließend auf 5FOA (Analyse der Klone auf Verlust von *URA3*) und SCD

ohne Tryptophan (Analyse der Klone auf Genbankplasmide) replikaplattiert wurden. So blieben letztendlich 5 Klone übrig, die G418 und 5FOA resistent waren und gleichzeitig ein Genbankplasmid enthielten.

Um nachzuweisen, dass in diesen Klonen die Split-Marker-Kassette rekombinierte, das essentielle Gen *YLR186w* aus dem Genom deletiert wurde und deshalb alle beobachteten Wachstumsphänotypen auftraten, wurde exemplarisch in einem Klon der Genort um *YLR186w* mittels analytischer PCR untersucht. Hierzu wurde von diesem Klon, dem Stamm CEN.PK2-1C (Wildtyp) sowie SDE8-1A chromosomale DNS isoliert und diese als Matrize für analytische PCR-Reaktionen eingesetzt (Abb. 3.19). Das Ergebnis dieser analytischen PCR bestätigte, dass in den isolierten Klonen aus dem Split-Marker-Screening tatsächlich die Rekombination erfolgte.

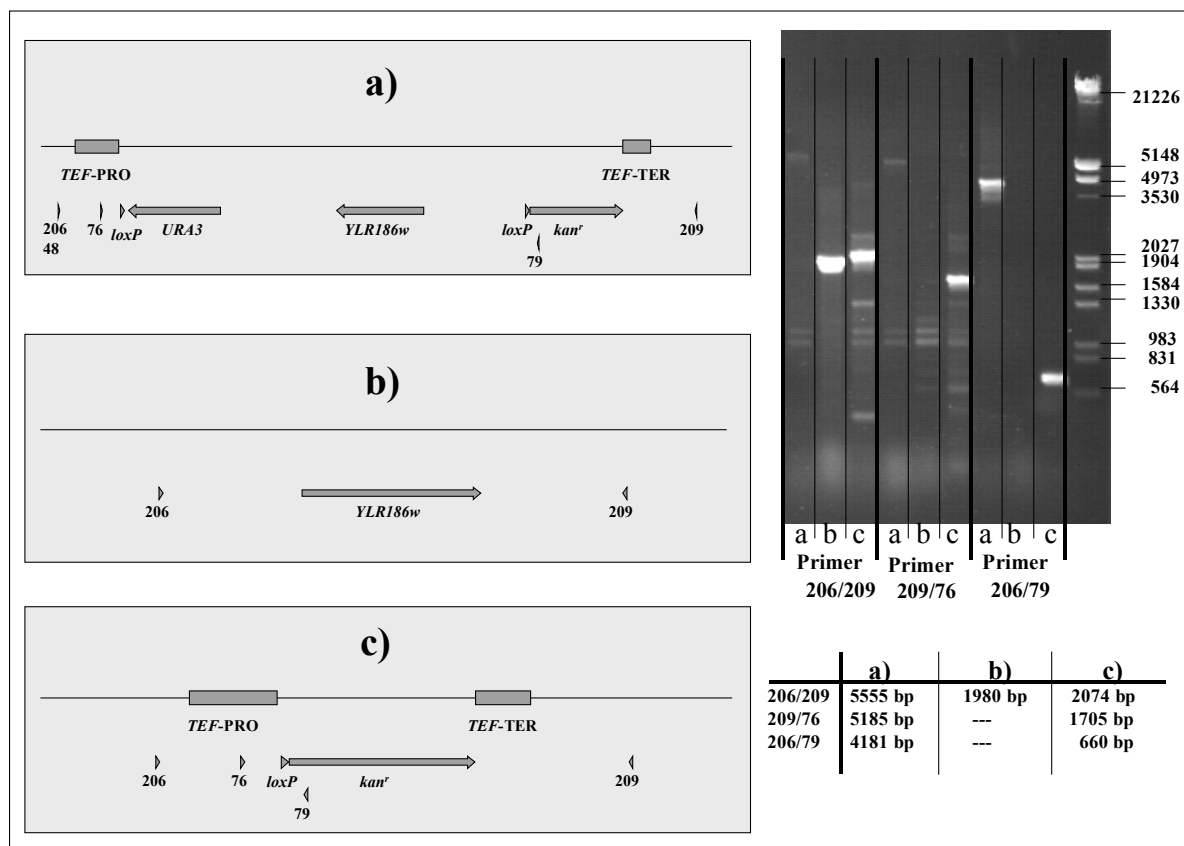


Abb. 3.19 : Chromosomale Umgebung von *YLR186w* in den Stämmen a) SDE8-1A, b) CEN.PK2-1C (Wildtyp) und c) SDE8-1A nach Cre-vermittelter Rekombination (Klon aus Split-Marker-Selektion) sowie Bestätigung dieser durch analytische PCR. In der Tabelle rechts unten stehen die vorhergesagten Fragmente bei PCR mit chromosomaler DNS der Stämme a), b) und c) als Matrize und entsprechender Primerkombination, darüber die tatsächlich erhaltenen PCR-Produkte im Gelbild. 5 μ l der analytischen PCR-Reaktion wurden auf ein 0,7 %iges Agarose aufgetragen und nach dem Gellauf mit Ethidiumbromid gefärbt. Als Standard diente *EcoRI/HindIII* geschnittene λ -DNS.

Aus diesen Klonen wurde das YRp7 Genbankplasmid isoliert und kartiert. Dabei stellte sich heraus, dass alle Klone das gleiche Plasmid (pDE74) enthielten, mit einem *C albicans* genomischen Fragment von etwa 10,7 kb (Abb. 3.20).

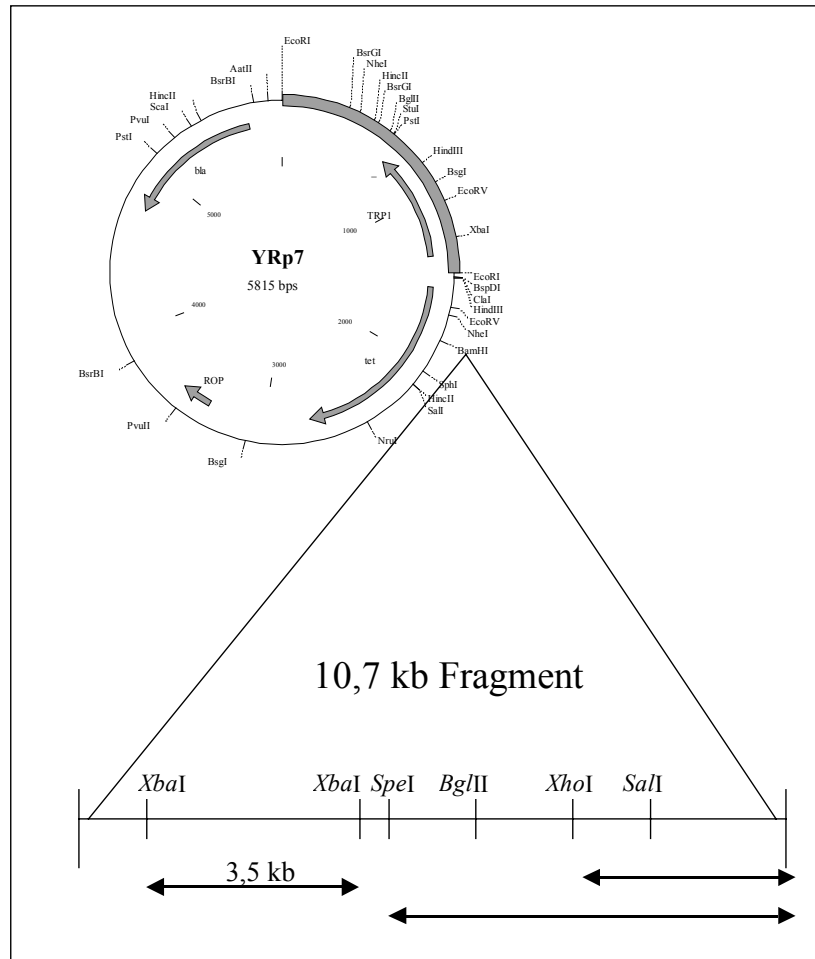


Abb. 3.20 : *Δylr186w* komplementierendes Genbankplasmid pDE74. Pfeile im unteren Abschnitt deuten Fragmente an, welche in pRS313 subkloniert wurden.

Um den Bereich von pDE74 zu identifizieren, der den letalen Phänotyp von *Δylr186w* komplementieren konnte, wurden Subklone von pDE74 in pRS313 kloniert und diese Subklone in einen der isolierten SDE8-1A Klone mit pDE74 transformiert. Hier konnte man sich wieder die Instabilität des YRp7 Vektors zu nutze machen, da sobald einer der Subklone die *YLR186w* Deletion in SDE8-1A komplementieren konnte, kein Selektionsdruck mehr auf den Erhalt von pDE74 herrschte und dieses schnell verloren ging (Abb. 3.21).

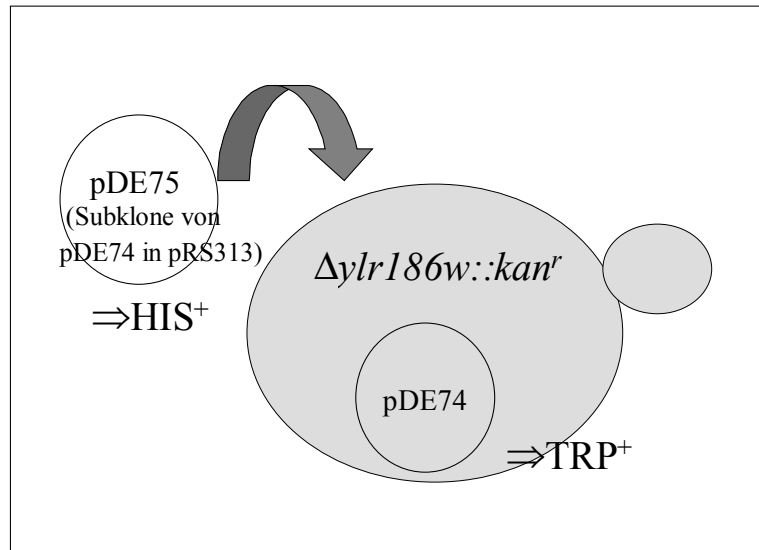


Abb. 3.21 : Strategie zur Identifizierung von $\Delta ylr186w$ komplementierenden Subklonen. In $pRS313$ ($HIS3$ als Selektionsmarke $\Rightarrow HIS^+$) subklonierte Fragmente von $pDE74$ wurden in Split-Marker-Screen isolierte Klone mit $pDE74$ ($TRP1$ als Selektionsmarke $\Rightarrow TRP^+$) transformiert und die Transformanten daraufhin untersucht, ob eine Tryptophanauxotrophie vorlag.

So wurde gezeigt, dass $pDE75$ fähig war, Split-Marker-Screen isolierten Klonen wieder zur Tryptophanauxotrophie zu verhelfen. Das 3,5 kb große genomische *C. albicans* Fragment von $pDE75$ wurde sequenziert und einer blastx Analyse am NCBI unterzogen (Altschul *et al.*, 1990), bei der die Nukleotidsequenz in alle 6 möglichen Leseraster in Proteinsequenzen übersetzt wird und mit vorhandenen Proteinsequenzen in den Datenbanken verglichen wird. In dem 3,5 kb *XbaI* Fragment war ein offener Leserahmen, der signifikante Ähnlichkeit zu *YLR186w* aus *S. cerevisiae* aufwies und somit das homologe Gen *CaYLR186* von *C. albicans* darstellt.

Nach dem Verfahren der Split-Marker-Selektion wurde auch ein Plasmid ($pDE51$) aus einer *S. cerevisiae* 2μ Genbank mit der Selektionsmarke *LEU2* (ATCC 37323) isoliert, welches *ScYLR186w* enthielt.

3.13 Sequenzanalyse von ScYlr186p sowie Sequenzvergleich mit homologen Proteinen

Die Expression von *YLR186w* zeigt kein besonderes Repressions- bzw. Induktionsverhalten in allen bisher durchgeführten und öffentlich zugänglichen Chip-Analysen, bei denen das Expressionsverhalten aller *S. cerevisiae* Gene unter bestimmten Umweltbedingungen untersucht wurde (z.B. DeRisi *et al.*, 1997, Roth *et al.*, 1998, Chu *et al.*, 1998, Spellmann *et al.*, 1998, Roberts *et al.*, 2000). Der CAI von *YLR186w* aus *S. cerevisiae* beträgt 0,206. Es handelt sich somit um ein moderat exprimiertes Gen, was durch experimentelle HDA ("high-density oligonucleotide array") Analysen belegt wird (Holstege *et al.*, 1998), wo 3,1 mRNS-Moleküle pro Zelle gemessen wurden.

Untersucht man die Aminosäuresequenz von ScYlr186p findet man keine bekannten, konservierten Motive oder Domänen, welche einen Hinweis auf die Funktion des Proteins geben.

Im Laufe dieser Arbeit zeigte sich, dass *YLR186w* nicht nur in Pilzen, sondern auch im Genom aller höheren eukaryontischen Organismen zu finden ist (Abb. 3.22, Tab. 3.5). So existiert auch ein homologes Protein (C2F) im Menschen, über dessen Funktion jedoch auch keine experimentellen Daten vorliegen. Gefunden wurde das menschliche Gen mit Hilfe von Analyseprogrammen, welche das menschliche Genom auf mögliche Protein-kodierende Sequenzen untersuchen (Ansari-Lari *et al.*, 1997). Die Expression von C2F kann über sogenannte "expressed sequence tags" in sehr vielen Geweben nachgewiesen werden, so z.B. im Blut, Knochen, Gehirn, Ösophagus, Magen, Colon, Uterus, Prostata, Auge, Lungen, Ovarien, Placenta, Nieren, Leber, Herz und Haut (UniGene Report zu Hs.12045 am NCBI).

Ein Sequenzvergleich eukaryontischer Ylr186p Proteine zeigt, dass lediglich die N-terminalen Bereiche der Proteine nicht konserviert sind. Dieser Bereich ist bei *S. pombe* länger als bei allen anderen Homologen (*S. cerevisiae*: 39 Aminosäuren nicht konservierter N-terminaler Bereich; *S. pombe*: 147 Aminosäuren nicht konservierter N-terminaler Bereich).

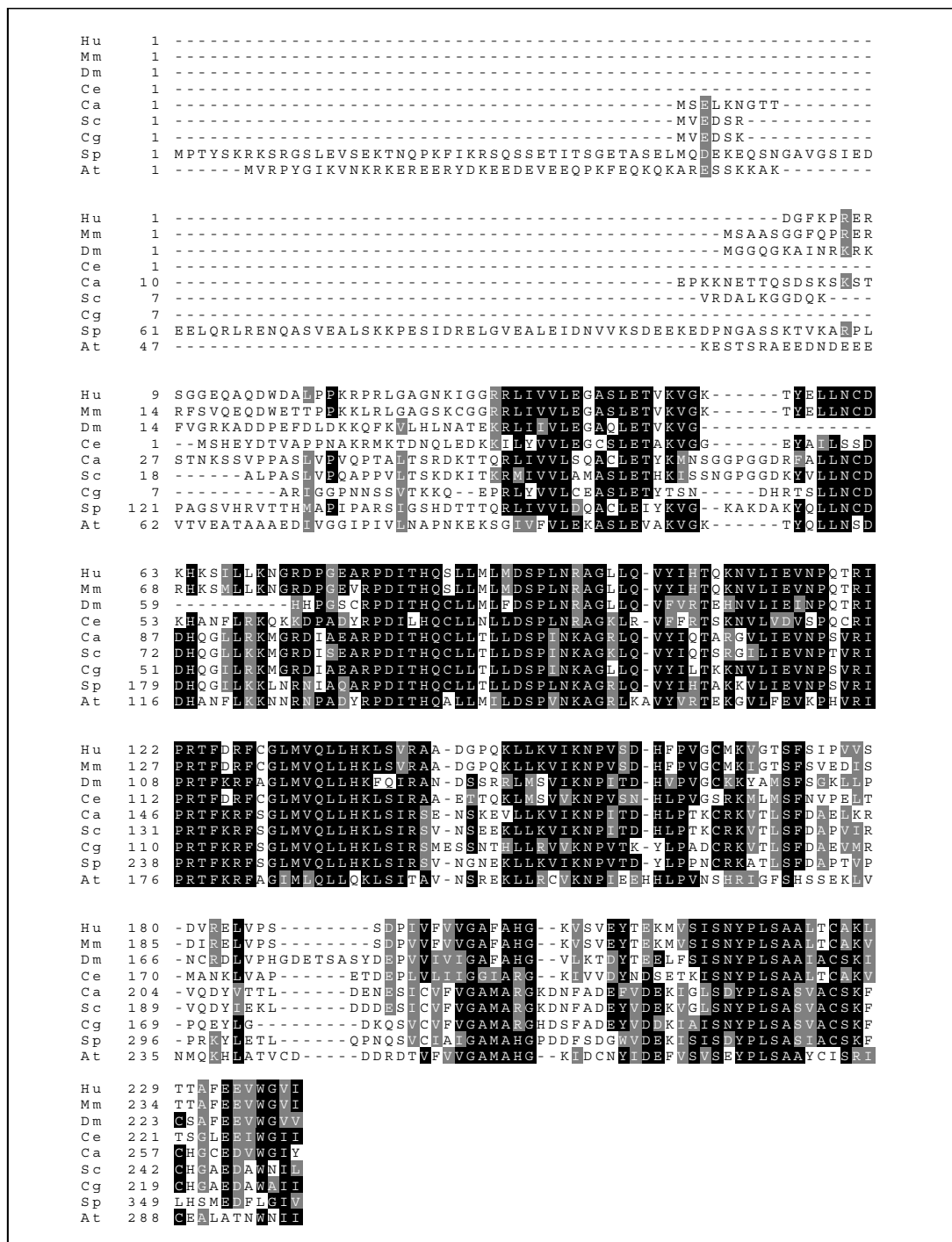


Abb. 3.22 : Sequenzvergleich eukaryontischer Ylr186p Proteine. Die CLUSTAL W Analyse wurde am Server des EBI (European Bioinformatics Institute) durchgeführt, wobei nur Proteine berücksichtigt wurden, für die in der GenBank Datenbank (National Center for Biotechnology Information, Bethesda/Maryland) vollständige Sequenzen annotiert sind. Das CLUSTAL W Ergebnis wurde anschließend mit Hilfe des Programms BOXSHADE 3.21 am Server des European Molecular Biology Network in oben gezeigte Grafik umgesetzt. Schwarz hinterlegte Buchstaben kennzeichnen identische Aminosäuren, grau hinterlegte Buchstaben kennzeichnen konservierte Aminosäuren. Hu = *Homo sapiens*, Mm = *Mus musculus*, Dm = *Drosophila melanogaster*, Ce = *Caenorhabditis elegans*, Ca = *Candida albicans*, Sc = *Saccharomyces cerevisiae*, Cg = *Candida glabrata*, Sp = *Schizosaccharomyces pombe*, At = *Arabidopsis thaliana*.

Man findet außerdem sequenzähnliche Proteine in der Gruppe der Archaea, nicht jedoch bei Eubakterien (Abb. 3.23).

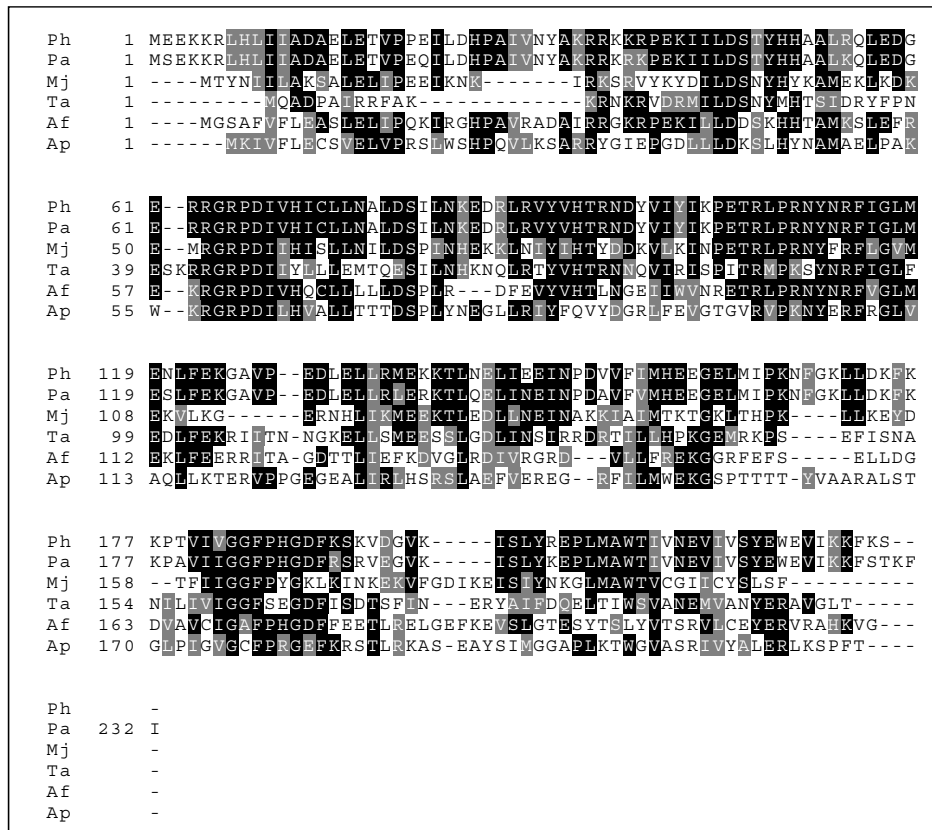


Abb. 3.23 : Sequenzvergleich archaealer Ylr186p. Die CLUSTAL W Analyse wurde am Server des EBI (European Bioinformatics Institute) durchgeführt, wobei nur Proteine berücksichtigt wurden, für die in der GenBank Datenbank (National Center for Biotechnology Information, Bethesda/Maryland) vollständige Sequenzen annotiert sind. Das CLUSTAL W Ergebnis wurde anschließend mit Hilfe des Programms BOXSHADE 3.21 am Server des European Molecular Biology Network in oben gezeigte Grafik umgesetzt; Schwarz hinterlegte Buchstaben kennzeichnen identische Aminosäuren, grau hinterlegte Buchstaben kennzeichnen konservierte Aminosäuren. Ph = *Pyrococcus horikoshii*, Pa = *Pyrococcus abyssi*, Mj = *Methanococcus jannashii*, Ta = *Thermoplasma acidophilum*, Af = *Archaeoglobus fulgidus*, Ap = *Aeropyrum pernix*.

Da die Sequenzidentitäten der putativen Ylr186p Proteine aus Archaea zu den eukaryontischen Proteinen relativ gering sind (Tabelle 3.5), wurde untersucht, ob die Sekundärstruktur dieser Proteine möglicherweise konservierter ist. Dazu wurde für je ein Protein stellvertretend aus dem Reich der Archaea und der Eukaryonten die wahrscheinliche

Sekundärstruktur mittels des Programms JPred (Cuff und Barton, 2000) vorhergesagt (Abb. 3.24). Es zeigte sich, dass die Sekundärstrukturen sehr ähnlich zwischen eukaryontischen und archaealen Ylr186p Proteinen sind, was nahelegt, dass es sich wirklich um homologe Proteine handelt. Bei dieser Sekundärstrukturvorhersage zeigt sich wieder, dass der N-terminale Bereich dieser Proteine nicht konserviert ist. Ab Aminosäure 70 von *S. cerevisiae* bzw. 50 von *P. horikoshii* sind die vorhergesagten Sekundärstrukturen nahezu gleich. So findet man beispielsweise C-terminal in beiden Sequenzen eine vorhergesagte α -Helix, wohingegen auf Aminosäureebene keine Ähnlichkeit zu sehen ist.

<i>S. cerevisiae</i>	1	MVEDSRVRDALKGGDQKALPASLVPQAPPVLTSKDKITKRMIVLAMASLETHKISSNGPGGDKYVLLNCDHQQGLLKKM
<i>P. horikoshii</i>	1	MEEKKRLHLI IADAELETVPPEILLDHPAIVNYAKRRKKR PEKILLDSTYHHAALRQL
Konsensus	1	* * * . . . * . . * * * * . . .
JPred <i>S.c.</i>	1	-----EEEEEE-----EEEEEE-----EEEE-----HHHHH--
JPred <i>P.h.</i>	1	-----EEEE--HHHHHHHH--HHHHHH--E-----HHHHHHHH
<i>S. cerevisiae</i>	81	GRDISEARPDITHQCLLITLLDSPINKAGKLQVYIQTSRGILIEVNPTVRI PRTFKRFSGLMVQLLHKLSIRSVNSEEKLL
<i>P. horikoshii</i>	58	EDGERRGRPDIVHICLLNALDSIINKEEDRLRVYVHTRNDYVVIKPKETRLPRNRYNRFIGLMENLFEKG AVPEDLELL
Konsensus	81	.*** * ** * ** .** * ** * . * . * * . ** * ** * * * * . * * . **
JPred <i>S.c.</i>	81	-----HHHHHHHH--HHH--EEEEEE-----EEEE-----HHHHHHHHHH--EEE-----EEEE
JPred <i>P.h.</i>	58	-----HHHHHHHHHH--HHH--EEEEEE-----EEEE-----E-----HHHHHHHHHH--HHH
<i>S. cerevisiae</i>	161	KVIKNPITDHLPTKCRKVITLSFDAP VIRVQDYIEKLDDDESICVFGAMARGKDNFADEYVDEKVGLSNYPLSASVAC
<i>P. horikoshii</i>	135	RMEKKTINELIEEINPDVVFIMHEEGELMIPKNFGKLLDKFKKPTVIVGGFPHG DFKSKVDGKVISLYREPLMAWITV
Konsensus	161	. * . . . * ** * * . * * * * * * * .
JPred <i>S.c.</i>	161	EEEE-----EEEEEE--E-----EEEEEE-----EEEE-----EEE-----HHHHH
JPred <i>P.h.</i>	135	HHHHHHHHHH--EEEEEE-----HHHHHH--EEEE-----EE-----EEEEEE-----EEEEH
<i>S. cerevisiae</i>	239	SKFCHGAEDAWNIL
<i>P. horikoshii</i>	213	NEVIVSYE WEVIKKFKS
Konsensus	241	* * . .
JPred <i>S.c.</i>	139	HHHHHHHH-----
JPred <i>P.h.</i>	213	HHHHHHH HHH-----

Abb. 3.24 : Sequenzvergleich sowie Vorhersage der Sekundärstrukturen von Ylr186p aus *S. cerevisiae* und dem homologen Protein aus *P. horikoshii*. Die Sekundärstrukturen wurden mittels dem Programm JPred auf dem Server des EBI (European Bioinformatics Institute) vorhergesagt. Zeichenerklärung in der Konsensussequenz: (*) = identische Aminosäuren, (.) = konservativer Aminosäureaustausch. Zeichenerklärung in JPred-Analyse: (-) keine Struktur, (H) = α -Helix, (E) = β -Faltblatt.

Die Sequenzidentitäten der Ylr186p Proteine sind in der Tabelle 3.5 aufgeführt. In Abbildung 3.25 ist ein phylogenetischer Stammbaum der Ylr186p Proteine dargestellt, der nahezu

identisch zu einem rRNS-basierenden Stammbaum ist. Eine interessante Ausnahme bildet Ylr186p von *C. albicans*, das zu dem Homologen aus *S. cerevisiae* eine höhere Identität aufweist als das *C. glabrata* Homologe, obwohl *C. glabrata* in verwandtschaftlich näherer Beziehung zu *S. cerevisiae* steht.

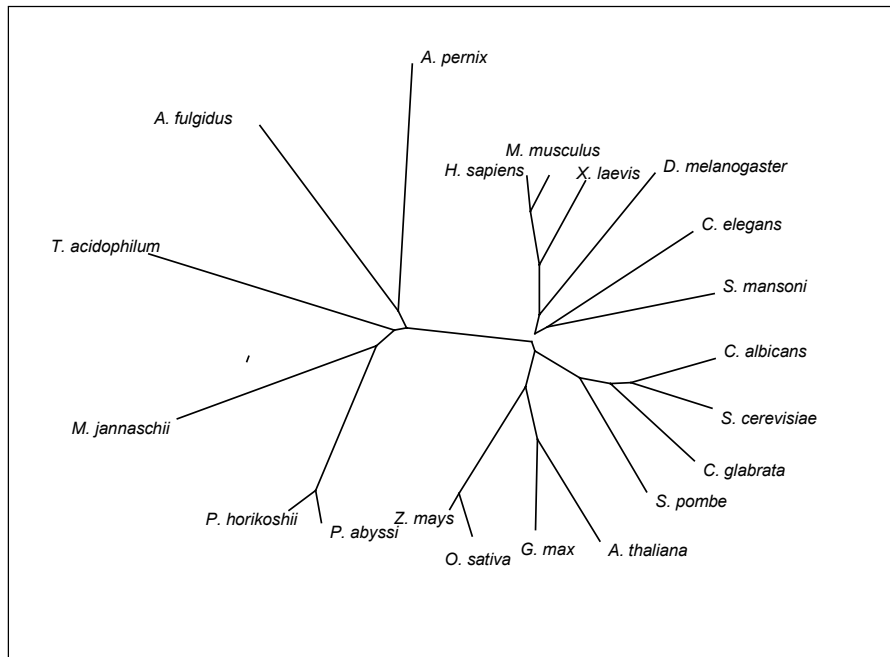


Abb. 3.25 : Stammbaum der Ylr186p Proteine. Ein multiples Sequenzalignment von annotierten Ylr186p Proteinen sowie mehreren in Proteinsequenzen übersetzte ESTs ("Expressed Sequence Tag") wurde mit CLUSTAL W durchgeführt und das erhaltene Tree-Datenfile mit Hilfe des Programms TREEVIEW in ein Dendrogramm umgesetzt. *P. abyssi* = *Pyrococcus abyssi*, *P. horikoshii* = *Pyrococcus horikoshii*, *M. jannaschii* = *Methanococcus jannaschii*, *T. acidophilum* = *Thermoplasma acidophilum*, *A. fulgidus* = *Archaeoglobus fulgidus*, *A. pernix* = *Aeropyrum pernix*, *H. sapiens* = *Homo sapiens*, *M. musculus* = *Mus musculus*, *X. laevis* = *Xenopus laevis*, *D. melanogaster* = *Drosophila melanogaster*, *C. elegans* = *Caenorhabditis elegans*, *S. mansoni* = *Schistosoma mansoni*, *C. albicans* = *Candida albicans*, *S. cerevisiae* = *Saccharomyces cerevisiae*, *C. glabrata* = *Candida glabrata*, *S. pombe* = *Schizosaccharomyces pombe*, *A. thaliana* = *Arabidopsis thaliana*, *G. max* = *Glycine max*, *O. sativa* = *Oryza sativa*, *Z. mays* = *Zea mays*.

	<i>S. cerevisiae</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>S. pombe</i>	Human	<i>M. musculus</i>	<i>D. melanogaster</i>	<i>C. elegans</i>	<i>A. thaliana</i>	<i>A. fulgidus</i>	<i>P. horikoshii</i>	<i>P. abyssi</i>	<i>M. jannaschii</i>	<i>A. pernix</i>	<i>T. acidophilum</i>
<i>S. cerevisiae</i>	100	75	68	58	51	45	41	42	43	21	21	20	19	18	15
<i>C. albicans</i>	75	100	69	59	48	44	42	41	39	18	19	20	16	17	16
<i>C. glabrata</i>	68	69	100	64	45	44	41	41	38	15	20	20	20	15	17
<i>S. pombe</i>	58	59	64	100	50	46	42	41	39	17	25	25	17	18	20
Human	51	48	45	50	100	89	52	53	42	21	23	23	20	18	20
<i>M. musculus</i>	45	44	44	46	89	100	53	52	45	21	24	23	20	18	17
<i>D. melanogaster</i>	41	42	41	42	52	53	100	46	39	25	22	21	21	11	20
<i>C. elegans</i>	42	41	41	41	53	52	46	100	46	15	26	25	22	16	18
<i>A. thaliana</i>	43	39	38	39	42	45	39	46	100	21	23	22	20	14	14
<i>A. fulgidus</i>	21	18	15	17	21	21	25	15	21	100	36	40	31	33	27
<i>P. horikoshii</i>	21	19	20	25	23	24	22	26	23	36	100	90	43	27	40
<i>P. abyssi</i>	20	20	20	25	23	23	21	25	22	40	90	100	43	25	39
<i>M. jannaschii</i>	19	16	20	17	20	20	21	22	20	31	43	43	100	27	25
<i>A. pernix</i>	18	17	15	18	18	18	11	16	14	33	27	25	27	100	24
<i>T. acidophilum</i>	15	16	17	20	20	17	20	18	14	27	40	39	25	24	100

Tab. 3.5 : Sequenzidentitäten eukaryontischer und archaealer Ylr186p Proteine zueinander in Prozent Identität. Die dunkelgrau hinterlegten Flächen zeigen Identitäten der eukaryontischen Homologen zueinander, die hellgrau hinterlegten Flächen zeigen Identitäten der archaealen Homologen zueinander und Flächen ohne schattierten Hintergrund zeigen Identitäten von eukaryontischen zu archaealen Homologen.

Bis zum heutigen Zeitpunkt liegen die kompletten Sequenzinformationen zu 7 archaealen Genomen (*Halobacterium sp. NRC-1*, *Aeropyrum pernix K1*, *Archaeoglobus fulgidus*, *Methanobacterium thermoautotrophicum*, *Methanococcus jannaschii*, *Pyrococcus abyssi*, *Pyrococcus horikoshii*) am NCBI vor. Führt man eine tblastn Analyse mit der Sequenz von Hefe Ylr186p gegen diese Genome durch, findet man keine homologen Vertreter bei *Halobacterium sp. NRC-1* (Halobacteriales) und *Methanobacterium thermoautotrophicum* (Methanobacteriales). Auch wenn eine tblastn Analyse mit einem der archaealen Ylr186p Proteine durchgeführt wird, findet man im Genom dieser beiden Organismen keine homologen Gene/Proteine. Dies ist ungewöhnlich, da das Protein auch in der Gruppe der Archaea sehr konserviert zu sein scheint und sowohl bei Euryarchaeoten als auch bei

Crenarchaeoten vorkommt. Die Frage, ob die Gruppe der Halobacteriales und der Methanobacteriales grundsätzlich keine homologen Vertreter dieses Proteins besitzen oder ob die beiden Organismen Ausnahmen darstellen, bleibt offen, bis mehr Genome von Vertretern dieser Gruppen komplett sequenziert vorliegen.

Die Tatsache, dass das Protein im gesamten Reich der Eukaryonten, als auch bei vielen Archaea vorhanden ist, zeigt, dass seine Funktion sehr stark konserviert ist. Die Funktion des Proteins scheint somit in allen Organismen sehr wichtig zu sein, so wichtig, dass kein Eukaryont dieses Gen (bzw. dessen Funktion) im Laufe der Evolution verloren, bzw. durch andere Gene/Mechanismen ersetzt hat. So besitzt auch der Mensch ein homologes Protein (C2F), dessen Sequenzidentität zu CaYlr186p 48% beträgt bzw. 51% zu ScYlr186p.

3.14 Funktionelle Komplementation von *Δylr186w* mit homologen Genen anderer Organismen

Es stellte sich die Frage, ob die biologische Funktion der Ylr186p Proteine in den unterschiedlichen Organismen so stark konserviert ist, dass beispielsweise das menschliche C2F die Funktion von ScYlr186p in *S. cerevisiae* übernehmen kann. Wie bereits durch die Split-Marker-Selektion gezeigt, kann *YLR186* von *C. albicans* *Δylr186w* in *S. cerevisiae* funktionell komplementieren. So war zu erwarten, dass das homologe Gen von *C. glabrata* dies ebenfalls kann. *CgYLR186* wurde bei der systematischen Sequenzierung von *C. glabrata* Genbankplasmiden (genomische *C. glabrata* Genbank in pRS423) gefunden (S. Dicken nicht veröffentlicht). Durch Transformation von pDE77 (*CgYLR186* in pRS423) in *S. cerevisiae* CEN.SR679 (*YLR186w/Δylr186w*) und anschließender Tetradenanalyse wurde bestätigt, dass *CgYLR186* den letalen Phänotyp von *Δylr186w* komplementieren kann. *CgYLR186* ließ einen haploiden *S. cerevisiae* *Δylr186w* Stamm wieder wachsen, kann also die Funktion von ScYlr186p übernehmen. Die Funktion dieses Proteins scheint somit innerhalb der Gruppe der Pilze konserviert zu sein. Als nächstes sollte überprüft werden, ob auch das menschliche Homologe so stark konserviert ist, dass es die Funktion von ScYlr186p in *S. cerevisiae* übernehmen kann. Dazu wurde die humane cDNS von C2F in den Hefe 2 μ Vektor pYES2.0 kloniert. Hier erfolgt die Expression von C2F über den regulierbaren *GALI*-Promotor der Hefe, der bei Wachstum auf Glucose reprimiert ist und bei Wachstum auf Galaktose induziert ist (Johnston, 1987). Das resultierende Plasmid (pDE49) wurde in *S. cerevisiae* CEN.SR679 (*YLR186w/Δylr186w*) transformiert und Transformanten einer Tetradenanalyse unterzogen. Die Segreganten wurden auf YEPGal Platten vereinzelt, um den *GALI*-Promotor und damit

die Expression des humanen C2F Proteins zu induzieren. Gelegentlich wuchsen mehr als zwei Segreganten, wobei sich nach Replikaplattieren auf YEPD G418 zeigte, dass sich darunter Klone befanden, die die *YLR186w* Deletion trugen und das Plasmid pDE49 enthielten (Stamm: SDE3). Wurden solche G418 resistente Klone auf YEPD-Platten vereinzelt, auf denen die Expression von C2F durch den *GALI*-Promotor reprimiert ist, war lediglich ein Restwachstum festzustellen, es bildeten sich keine Einzelkolonien mehr. Strich man sie dagegen auf YEPGal aus (hier ist die Expression von C2F induziert), wuchsen sie wildtypartig (Abb.3.26). Dies zeigt, dass C2F die Funktion von Ylr186p in *S. cerevisiae* übernehmen kann.

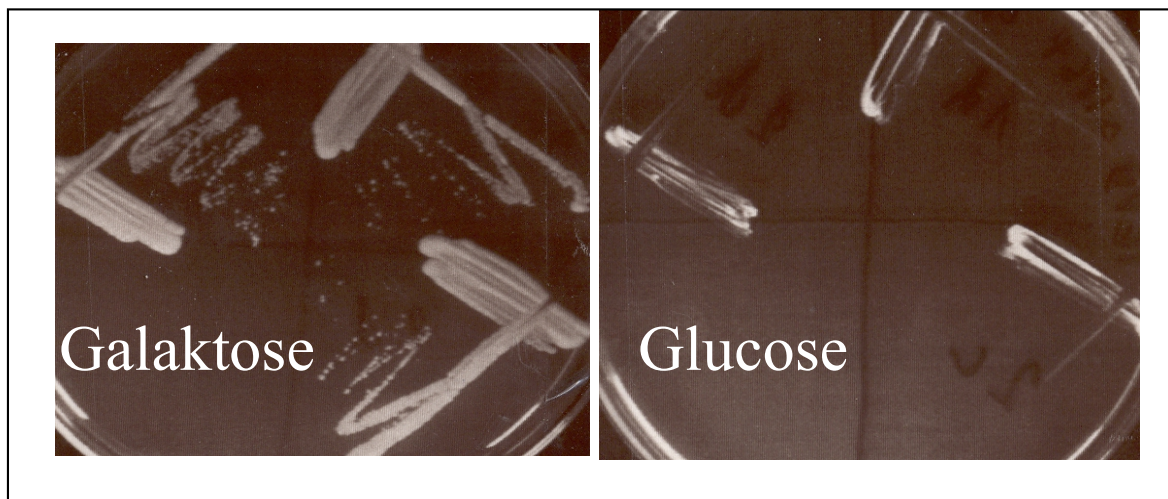


Abb. 3.26 : Kohlenstoffquellen-abhängiger Wachstumsphänotyp von SDE3 ($\Delta ylr186w$ mit pDE49). Links sind drei Segreganten $\Delta ylr186w$ mit pDE49 aus der Tetradenanalyse von *S. cerevisiae* CEN.SR679 (*YLR186w*/ $\Delta ylr186w$) mit pDE49 auf YEP Galaktose vereinzelt, rechts die gleichen Klone vereinzelt auf YEPD. Die Aufnahmen entstanden nach 2 Tagen Inkubation bei 30°C.

Da das menschliche C2F als auch CaYlr186p und CgYlr186p den letalen Phänotyp von $\Delta ylr186w$ in *S. cerevisiae* komplementieren können, bietet dies die Möglichkeit einen biologischen *in vivo* Test mit *S. cerevisiae* für die Suche nach Substanzen aufzubauen, die spezifisch gegen das *Candida* Protein, jedoch nicht gegen das menschliche Homologe gerichtet sind.

3.15 Phänotypische Analyse von *Δyfr186w* in *S. cerevisiae*

Die Expression des essentiellen Gens C2F in SDE3 wird auf Glucose-haltigen Medien soweit gedrosselt, dass das Protein nicht mehr bzw. in so geringer Konzentration in der Zelle gebildet wird, so dass der Stamm nicht mehr wachsen kann. Dies ermöglichte eine genauere Analyse der Phänotypen, die genau dann auftreten, wenn das essentielle Protein nicht mehr in genügender Menge in der Zelle vorliegt.

Dazu wurde der *S. cerevisiae* Stamm SDE3 (*Δyfr186w* mit pDE49) in YEPGal Flüssigmedium angezogen, auf YEPD und YEPGal Platten ausgestrichen und die Zellmorphologie nach 3 Tagen Inkubation bei 30°C analysiert (Abb. 3.27). Wurde die Expression von C2F reprimiert (auf YEPD Platten), führte dies zur Elongation und Deformierung der Zellen. Das typisch unipolare Knospungsmuster haploider Zellen ging verloren, wobei die Knospen z.T. stark elongiert waren, was auf einen Defekt im Wechsel vom polaren zum isotropen Wachstum der Knospe hinweist. Weiterhin wurde deutlich, dass die Abschnürung der Tochterzellen von der Mutterzelle nicht mehr erfolgte und dieser Separierungsdefekt zu längeren, teilweise verzweigten Ketten elongierter Zellen führte. Solche elongierten Knospen beobachtet man beispielsweise bei einem Stamm, der die Punktmutation V44A in dem essentiellen Gen *CDC42* enthält oder bei Totaldeletion des Gens *CLAA* (Richman *et al.*, 1999). Beide Gene sind wichtig für das polarisierte Zellwachstum. Mutationen in diesen Genen führen zu stark elongierten Knospen/Zellen aufgrund eines Defekts im Wechsel vom apikalen zum isotropen Wachstum der Knospe. Erhöhte Konzentrationen an NaCl supprimieren bei diesen Mutanten partiell den morphologischen Defekt. Dieser Effekt war auch bei Stamm SDE3 (*Δyfr186w* mit pDE49) mit 0,3 M NaCl zu erzielen. Zwar verhalf es dem Stamm nicht zum Wachstum auf Glucose-haltigen Platten, jedoch war die Morphologie der Zellen wieder wildtypartig (Abb. 3.27). Gleiche Ergebnisse erzielte man in Flüssigkultur, jedoch bedurfte es einer längeren Inkubationszeit unter reprimierenden Bedingungen. Hier wurde der *S. cerevisiae* Stamm SDE3 (*Δyfr186w* mit pDE49) über Nacht in YEPGal angezogen und anschließend 100 µl dieser Kultur in je 100 ml Flüssigkultur YEPD sowie 100 ml YEPGal als Kontrolle überführt. Beide Kulturen wuchsen ohne erkennbaren Wachstumsphänotyp bis in die stationäre Phase. Auch morphologisch sah man keinen Unterschied zwischen den Kulturen. Überführte man von diesen stationären Kulturen noch einmal 100 µl in frische 100 ml YEPD sowie YEPGal Medien, so beobachtete man nach über

Nacht Inkubation, dass die YEPD Kultur kaum wuchs und hier die ersten morphologischen Veränderungen auftraten.

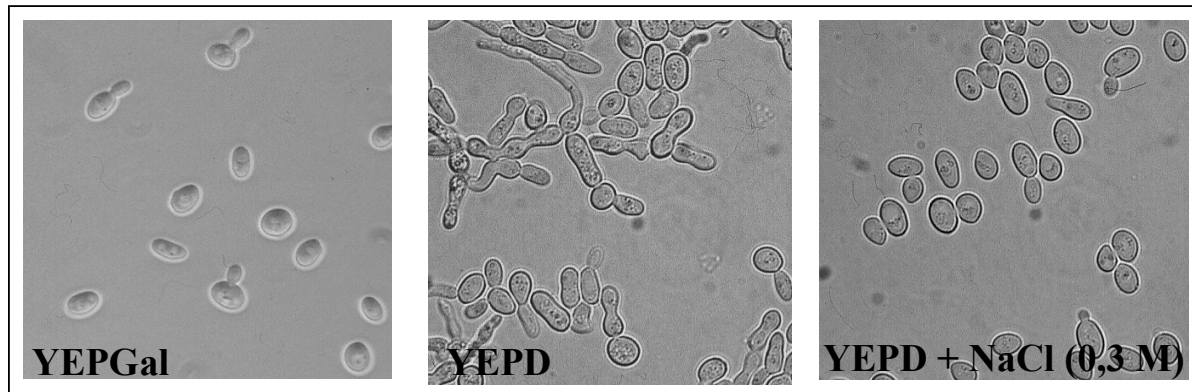


Abb. 3.27 : Zellmorphologie des *S. cerevisiae* Stammes SDE3 ($\Delta ylr186w$ mit pDE49) auf unterschiedlichen Plattenmedien. Die Durchlichtaufnahmen entstanden nach 3 Tagen Inkubation bei 30°C mit stärkster Vergrößerung (1000X).

Noch bevor Veränderungen der Zellmorphologie und elongierte Knospen zu beobachten waren, zeigten sich Zellseparierungsdefekte; es waren Mutterzellen mit mehreren Knospen zu sehen. Durch Färbung der Zellen mit DAPI konnte gezeigt werden, dass die Mitose in diesen Zellen noch vollendet wurde, d.h. Mutter sowie Tochterzellen besaßen einen Zellkern, das Abschnüren der Tochterzelle unterblieb jedoch (Abb. 3.28).

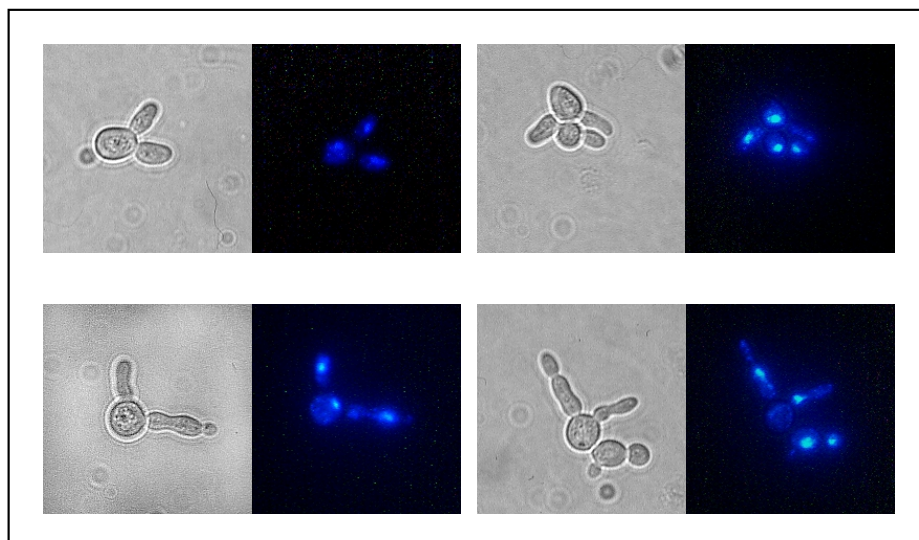


Abb. 3.28 : Morphologische Veränderungen von *S. cerevisiae* Stamm SDE3 ($\Delta ylr186w$ mit pDE49) nach Anzucht in YEPD. Links Durchlichtaufnahmen, rechts die dazugehörige Färbung des Zellkerns mit 4',6-Diamino-2-Phenyl-Indol-Dihydrochlorid (DAPI) bei 1000facher Vergrößerung.

Stark elongierte Knospen deuten auf einen Defekt im Wechsel vom polaren Wachstum zum isotrop-flächenhaften Wachstum einer Knospe hin. Um dies zu bestätigen, wurde eine Aktinfärbung durchgeführt. Aktinflecken kann man in der Hefe *S. cerevisiae* durch TRITC (Tetramethylrhodamin-5(6)-isothiocyanat) -konjugiertes Phalloidin anfärben. Aktinflecken treten auf, wo polarisiertes Zellwachstums stattfindet (Adams und Pringle, 1984; Kilmartin und Adams, 1984). Hier findet man auch Plasmamembraneinstülpungen (Mulholland *et al.*, 1994), welche möglicherweise die Orte darstellen, wo Zellwandmaterial abgelagert wird. Aktin depolarisiert bevor es an den Knospenhals zwischen Mutter- und Tochterzelle lokalisiert. Dieser charakteristische Wechsel vom apikalen zum isotrop-flächenhaften Wachstum der Knospe während des G2/M Übergangs benötigt die Aktivierung des Clb2p/Cdc28p Kinase Komplexes (Lew und Reed, 1993; McMillan *et al.*, 1998). Mutanten (z.B. *cdc42^{V44A}*, *Δcla4*), bei denen der apikal-isotrope Wachstumswechsel verspätet erfolgt, zeigen polarisierte Aktinflecken in den Spitzen elongierter Knospen (Richman *et al.*, 1999). Für die Aktinfärbung wurden die Stämme SDE3 (*Δy1r186w* mit pDE49) und CEN.PK2-1C (Wildtyp) in YEPGal angezogen und 100 µl in 100 ml YEPD Medien überführt. Diese Kultur wurde über Nacht bei 30°C inkubiert und erneut wurden 100 µl der Kulturen in frische 100 ml YEPD Medien überführt und über Nacht inkubiert. Die Zellen dieser Kulturen wurden geerntet und ihr Aktinzytoskelett angefärbt (siehe Material und Methoden). CEN.PK2-1C zeigte unter dem Fluoreszenzmikroskop typische Lokalisierungen von Aktinflecken in den einzelnen Wachstumsphasen, z.B. typisch intensiv gefärbte kleine Knospen (Abb.3.29 a-b). Bei Stamm SDE3 (*Δy1r186w* mit pDE49) bestätigte sich ein Defekt im apikal-isotropen Wachstumswechsel der Knospen. In den elongierten Knospen waren in den Knospenspitzen Aktinanhäufungen (Flecken) zu beobachten, die belegen, dass die Knospen immer noch apikal wuchsen und der Wechsel zum isotropen Wachstum nicht vollzogen war (Abb. 3.29 c-f).

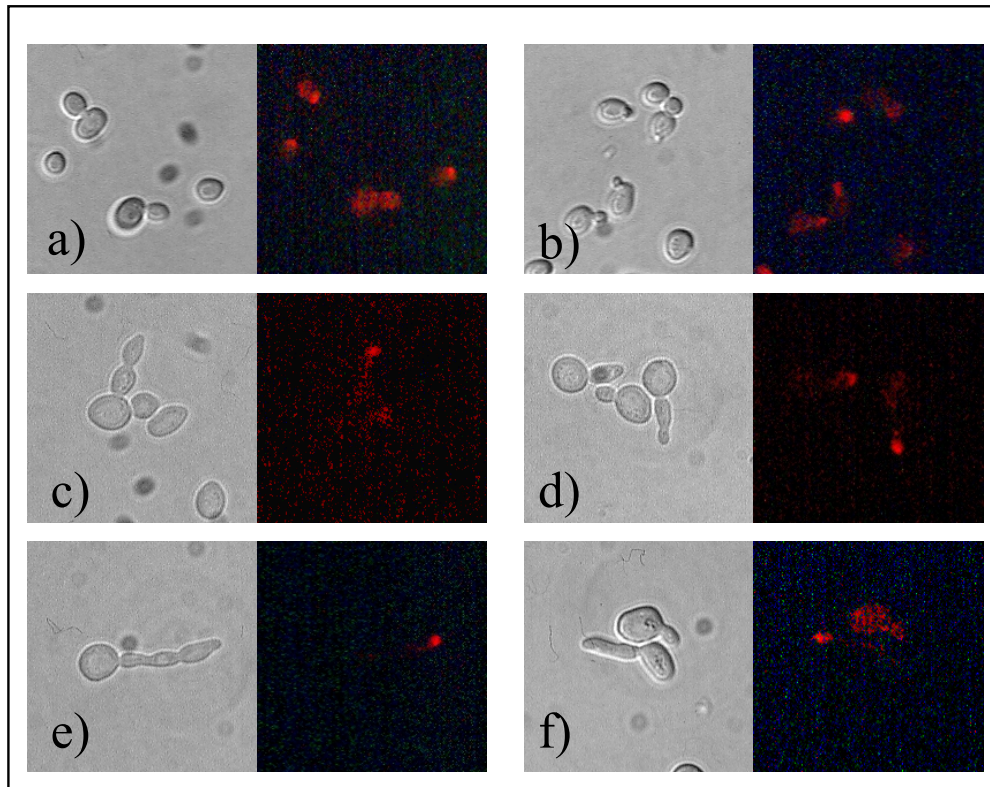


Abb. 3.29 : Färbung des Aktinzytoskelett von *S. cerevisiae* Stamm CEN.PK2-1C (Wildtyp) und Stamm SDE3 ($\Delta ylr186w$ mit pDE49) nach Anzucht in YEPD. Links Durchlichtaufnahmen, rechts die dazugehörige Färbung des Aktinzytoskeletts mit TRITC-konjugiertem Phalloidin bei stärkster Vergrößerung (1000X); a) und b) Stamm CEN.PK2-1C (Wildtyp), c)-f) Stamm SDE3 ($\Delta ylr186w$ mit pDE49) nach Anzucht in YEPD.

Die Mutterzelle als auch die stark elongierte Knospe/Tochterzelle besaßen einen Zellkern (Abb. 3.28). Das lässt darauf schließen, dass die Kernteilung trotz elongierter Knospe vollständig erfolgte. Auch die Anfärbung der Mikrotubuli zeigte knospende mitotische Zellen vor Initiation der Anaphase (Abb. 3.30 c) sowie telophasische Zellen (Abb. 3.30 d), die trotz extrem elongierter Knospe die mitotischen Phasen bis hier durchlaufen hatten. Färbungen metaphasischer sowie telophasischer Zellen des Wildtyps CEN.PK2-1C sind in Abbildung 3.30 a) und b) zu sehen. Bei SDE3 ($\Delta ylr186w$ mit pDE49) fand man zusätzlich sehr abnorme Mikrotubuli- bzw. Kernfärbungen. So konnten Zellen beobachtet werden, die trotz elongierter Knospe die Mitose weiter durchlaufen haben müssen, aber möglicherweise nicht mehr in der Lage waren, die Spindel am Ende der Telophase abzubauen (Abb.3.30 e). So scheint ein Zellschlauch aus drei Zellen entstanden zu sein, bei dem die Zellkerne durch Mikrotubulistränge miteinander verbunden sind.

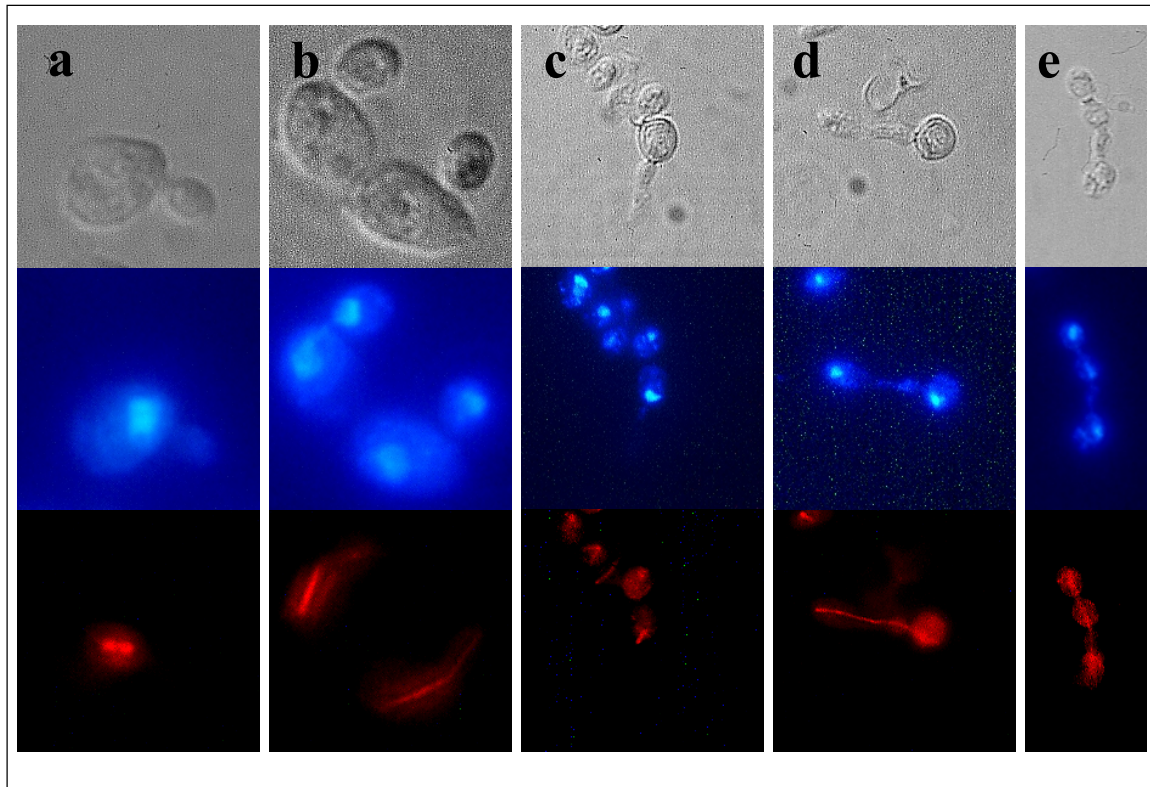


Abb. 3.30 : Mikrotubuli- und Kernfärbung von *S. cerevisiae* Stamm CEN.PK2-1C (Wildtyp) (a-b) und Stamm SDE3 ($\Delta ylr186w$ mit pDE49) nach Anzucht in YEPD (c-e). Oben Durchlichtaufnahmen, darunter die dazugehörige Kernfärbung mit DAPI sowie die Mikrotubulifärbung mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers gegen Hefe α -Tubulin (YOL 1/34) und eines TRITC-markierten Zweitantikörpers.

Da die Phänotypen, welche die Zellmorphologie betreffen, erst dann auftreten, wenn die Zelle kaum noch wächst, stellte sich die Frage, ob die Zelle das Fehlen des essentiellen Proteins Ylr186p nicht bereits vor Eintreten der morphologischen Veränderungen sensiert und darauf reagiert, z.B. durch Arretierung der Zelle an einem Checkpoint während des Zellzyklus. Um dies zu untersuchen, wurden die Stämme SDE3 ($\Delta ylr186w$ mit pDE49) und CEN.PK2-1C (Wildtyp) wieder in 5 ml YEPGal vorkultiviert. Aus den Vorkulturen wurde je ein 100 ml YEPD Kolben sowie ein YEPGal Kolben so beimpft, dass eine optische Dichte von 0,5 bei 600 nm vorlag. Die Zellen wurden 3 h bei 30°C inkubiert und anschließend einer FACS ("Fluorescence Activated Cell Sorter") Analyse unterzogen (siehe Material und Methoden). Die Zellen der Kulturen zeigten nach dieser Behandlung keine morphologischen Auffälligkeiten (Daten nicht gezeigt). Abbildung 3.31 zeigt das Ergebnis der FACS-Analyse, wobei CEN.PK2-1C mit Galaktose und Glucose als Kohlenstoffquelle als auch Stamm SDE3 mit Galaktose als Kohlenstoffquelle typische FACS Profile logarithmisch wachsender

Hefekulturen bei 30°C aufweisen. Es sind zwei Fluoreszenzspitzen zu erkennen, eine kleinere Spitze, welche Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus repräsentiert und eine höhere Spitze mit etwa doppelt so starker Fluoreszenz. Diese zweite Intensitätsspitze entsteht durch stärkere Fluoreszenzsignale von Zellen der S-Phase, der G2-Phase und mitotischen Zellen, weil bei ihnen die DNS bereits dupliziert wurde und deshalb mehr DNS in der einzelnen Zelle vorliegt, an das der Fluoreszenzfarbstoff binden kann. SDE3 umgesetzt auf Glucose zeigt eine Akkumulation von Zellen mit geringerem DNS Gehalt, was für einen Arrest der Zellen in der G1-Wachstumsphase spricht. Somit ist nachgewiesen, dass die Zelle das Fehlen von Ylr186p lange vor Auftreten der morphologischen Veränderungen sensiert und sie in der G1-Phase arretiert.

Da der morphologische Defekt von $\Delta ylr186w$ durch Zugabe von 0,3 M NaCl supprimiert werden kann, der letale Phänotyp jedoch nicht, scheint der morphologische Defekt nicht die primäre Ursache für den letalen Phänotyp von $\Delta ylr186w$ zu sein. $\Delta ylr186w$ arretiert in der G1-Wachstumsphase und ist verspätet im apikal-isotropen Wachstumswechsel. Die beobachteten morphologischen Abnormalitäten könnten deshalb sekundäre Phänotypen darstellen als Folge der Zellarretierung an Zellzykluskontrollstellen.

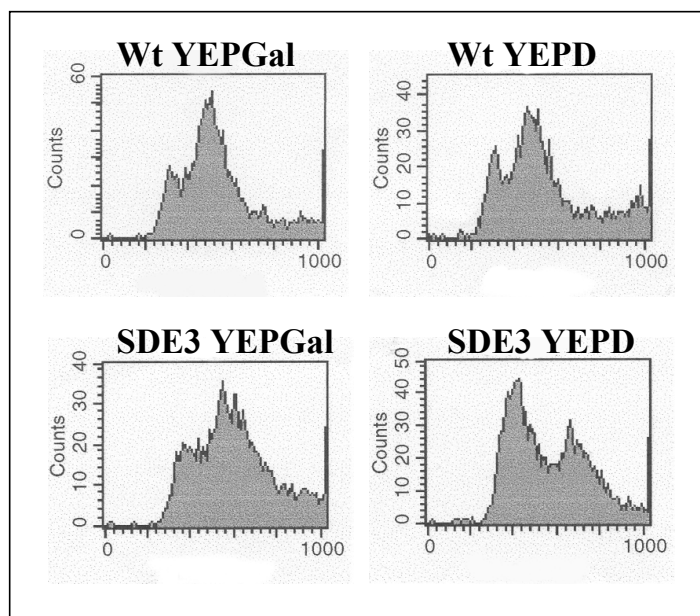


Abb. 3.31 : FACS-Analyse von SDE3 ($\Delta ylr186w$ mit pDE49) und CEN.PK2-1C (Wildtyp) nach Anzucht in YEPD oder YEPGal. Die Fluoreszenz von 10.000 einzelnen Propidiumiodid gefärbten Zellen wurde im FACS Gerät bestimmt und in Histogrammen die Stärke der Fluoreszenz (Abszisse) gegen die Anzahl der Zellen (Ordinate) aufgetragen. Auf der Abszisse (Stärke der Fluoreszenz unterteilt in 1024 Kanäle) lassen sich zwei Verteilungsspitzen erkennen, welche Zellen der G1-Phase (noch nicht replizierte DNS = 1C) und Zellen nach Replikation der DNS darstellen (S-Phase, G2-Phase, Mitose = 2C).

3.16 Cre-induzierter Verlust von *YLR186w*

Erzeugung extragener Suppressoren der *YLR186w* Deletion

Durch die Split-Marker-Kassette ist es möglich, das essentielle Gen *YLR186w* aus einer vegetativ wachsenden Zelle zu entfernen. Dies bietet die Möglichkeit den konditional letalen Stamm zunächst zu mutagenisieren und anschließend das essentielle Gen aus dem Genom zu entfernen. So können Suppressoren von letalen Phänotypen erzeugt werden, die ein wichtiges Werkzeug bei der Funktionsanalyse dieser Gene darstellen. Sie können in der Hefe genetisch charakterisiert werden und oftmals kann auch die Mutation identifiziert werden, die zu dem Suppressionsphänotyp führt. Die Split-Marker-Kassette wurde zur Herstellung solcher Suppressoren von $\Delta ylr186w$ genutzt, wobei es nicht nötig war den Stamm zu mutagenisieren, da die Zellen nach Verlust von *YLR186w* ein gewisses Restwachstum zeigten und nach längerer Inkubation spontan Suppressoren auftraten, die besser wuchsen. Dazu wurde die Rekombination und damit der Verlust des essentiellen Gens *YLR186w* induziert und die Zellen auf YEPD plattiert. Nach mehreren Tagen Inkubation bei 30°C bildeten sich Minikolonien von $\Delta ylr186w$ Zellen (Abb. 3.32). Solche Minikolonien wurden mit sterilen Plastikimpfösen erneut auf YEPD Platten vereinzelt. Nach ca. einer Woche Inkubation bei 30°C bildeten sich in diesem Ausstrich besser wachsende Suppressorkolonien.

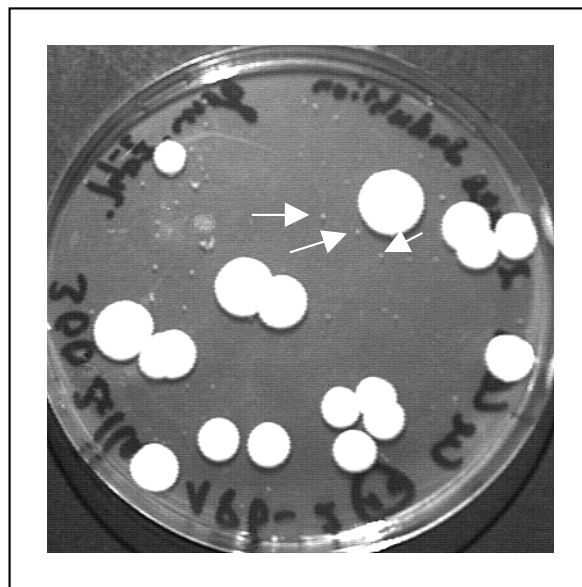


Abb. 3.32 : Minikoloniebildung nach Cre-vermittelter Rekombination des essentiellen *YLR186w* Gens aus SDE8-1A. Nach Anzucht in YEPGal wurden etwa 100 Zellen auf YEPD plattiert und für 10 Tage bei 30°C inkubiert. Zwischen den großen Kolonien, bei denen die Split-Marker-Kassette nicht herausgeschnitten wurde, bildeten sich zahlreiche Minikolonien (siehe Pfeile).

Genetische Analyse extragenen Suppressoren von *Δylr186w*

Zwei dieser extragenen Suppressoren (SA und SB) wurden für die Funktionsanalyse von *YLR186w* weiter untersucht. Das mikroskopische Bild von SA und SB zeigt nur gelegentlich deformierte Zellen, man fand nicht mehr die morphologischen Abnormalitäten wie man sie von *Δylr186w* mit pDE49 unter reprimierenden Bedingungen kennt (Daten nicht gezeigt). Zunächst sollte geklärt werden, ob der Suppressionsphänotyp durch eine Mutation oder mehrere Mutationen hervorgerufen wird. Dazu wurden die Suppressoren (SA und SB) gegen den Wildtyp CEN.PK2-1C gekreuzt und die entstandenen diploiden Stämme einer Tetradenanalyse unterzogen (Abb. 3.33). Bei der Tetradenanalyse von SA X CEN.PK2-1C (Wildtyp) erhielt man folgendes Aufspaltungsverhältnis der Phänotypen:

21 große Kolonien: 8 Minikolonien: 11 keine Kolonien

Die Verteilung der erhaltenen Phänotypen wich nur wenig von der idealen Verteilung ab, die zu erwarten wäre, wenn die Suppression durch eine Mutation hervorgerufen wird, die nicht gekoppelt zu *YLR186w* vorliegt (ideales Phänotypenverhältnis: 2 : 1 : 1).

Das gleiche Bild zeigte sich bei der Tetradenanalyse von SB X CEN.PK2-1C (Wildtyp). Die Phänotypen spalteten hier:

22 große Kolonien: 9 Minikolonien: 9 keine Kolonien

Interessanterweise traten in beiden Analysen Tetraden auf, deren vier Segreganten vier große Kolonien bildeten und wildtypartig wuchsen. Durch replikaplattieren auf YEPD + G418 zeigte sich, dass die Deletion von *Δylr186w* hier verloren gegangen war, da alle 4 Segreganten Geneticin empfindlich waren. Es ist wahrscheinlich, dass die Deletion durch eine mitotische Rekombination (Genkonversion) durch das Wildtyp Allel *YLR186w* ersetzt wurde. Diese Ereignisse treten im Genom insbesondere in der Nähe ribosomaler DNS auf (Szostak und Wu, 1980, Gangloff *et al.*, 1996), genau dort, wo *YLR186w* lokalisiert ist. Bei näherer Betrachtung der 3. Tetrade von SB X CEN.PK2-1C (Wildtyp) erkennt man, dass die Segreganten 3A und 3B etwas größer als 3C und 3D sind. Dies deutete an, dass die Suppressormutation B möglicherweise zu einem Wachstumsdefekt im Wildtyp führt.

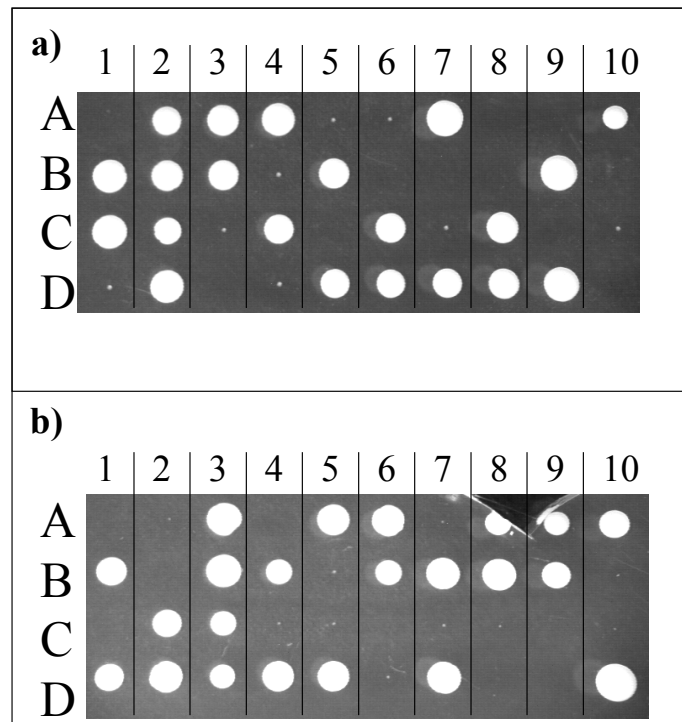


Abb. 3.33 : Ergebnis der Kreuzung von SA und SB gegen CEN.PK2-1C (Wildtyp) mit anschließender Tetradenanalyse. a) Tetradenanalyse von SA X CEN.PK2-1C (Wildtyp) und b) Tetradenanalyse von SB X CEN.PK2-1C (Wildtyp) nach 3 Tagen Inkubation bei 30°C.

Um zu bestätigen, dass in den etwas langsamer wachsenden Klonen die Suppressormutation vorlag, wurde die etwas kleinere Segregante 3C erneut gegen den Suppressor B gekreuzt. Eine anschließende Tetradenanalyse zeigte, dass in der Segregante 3C die Suppressormutation enthalten war (Abb. 3.34), da nun 20 große und 20 Minikolonien entstanden, und somit die Suppressormutation in dem analysierten Stamm homozygot vorlag.

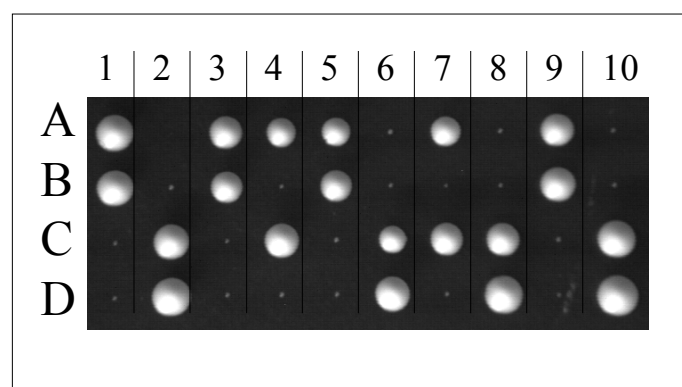


Abb. 3.34 : Kreuzung von Segregante 3C (aus Tetradenanalyse SB gegen CEN.PK2-1C, siehe Abb. 3.33 b) gegen SB und anschließende Tetradenanalyse. Die Aufnahmen entstanden nach 3 Tagen Inkubation bei 30°C.

Der Nachweis, dass die Suppressormutation B im Wildtyp zu einem leichten Wachstumsdefekt führt, gelang durch Kreuzung von Segregante 3C (aus Abbildung 3.33 b) gegen den Wildtyp CEN.PK2-1C und anschließender Tetradenanalyse (Abb. 3.35). Die Suppressormutation B war in der Hälfte der Segreganten vorhanden und führte dort zu Kolonien verminderter Größe. Durch Replikaplattieren der Analyseplatte auf YEPD mit 0,2 mg/ml Geneticin (G418) zeigte sich außerdem, dass eine erhöhte Resistenz gegen das Aminoglycosid Geneticin mit der Suppressormutation B cosegregierte.

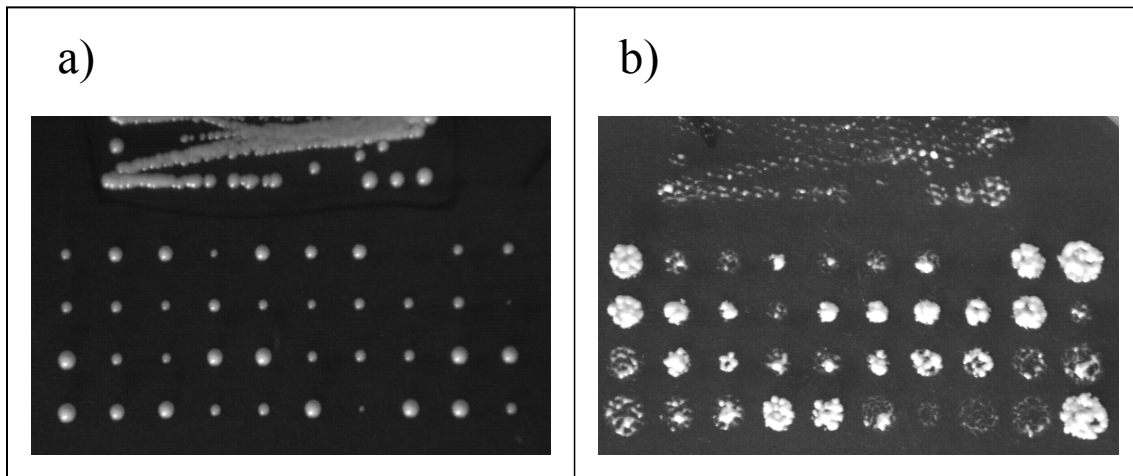


Abb. 3.35 : Ergebnis der Kreuzung von Segregante 3C (aus Tetradenanalyse SB gegen CEN.PK2-1C, siehe Abb. 3.33 b) gegen CEN.PK2-1C (Wildtyp) und anschließender Tetradenanalyse. a) Tetraden gezogen auf YEPD nach 2 Tagen Inkubation bei 30°C und b) replikaplattiert auf YEPD + 0,2 mg/ml G418.

Diese durch Suppressor B vermittelte Resistenz gegen G418 wurde genauer bestimmt, indem Suppressor B im Wildtyphintergrund (Segregante 3C aus Abb. 3.33) sowie Wildtyp CEN.PK2-1C auf YEPD Platten mit steigender Geneticin Konzentration ausgestrichen wurden (Abb. 3.36). Während die Suppressormutation Wachstum bis zu einer Konzentration von 0,1 mg/ml G418 erlaubte, konnte der Wildtyp bereits bei 0,05 mg/ml keine Kolonien mehr bilden.

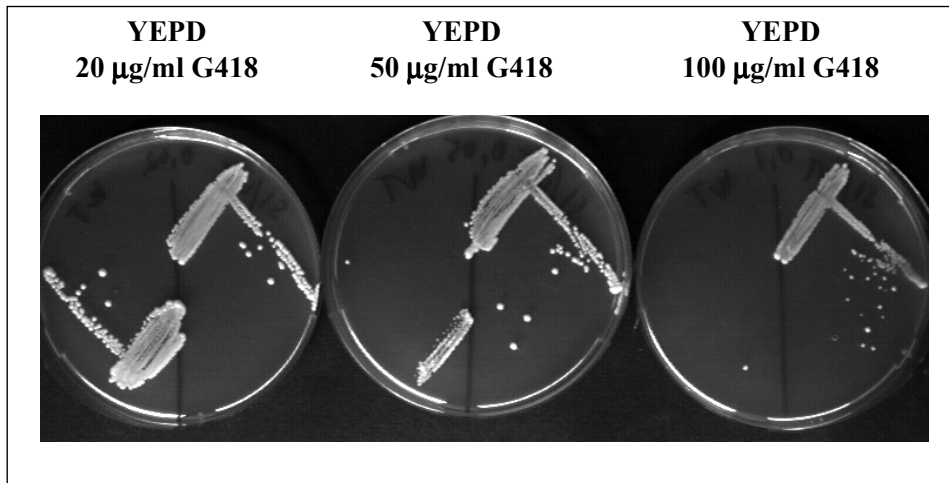


Abb. 3.36 : Suppressor B vermittelte G418-Resistenz. Links jeweils Suppressor B im Wildtyphintergrund (Segregante 3C aus Tetradenanalyse SB X CEN.PK2-1C, Abb. 3.33 b), rechts Wildtyp CEN.PK2-1C ausgestrichen auf YEPD Platten mit steigender G418 Konzentration nach 2 Tagen Inkubation bei 30°C.

Um zu prüfen, ob Suppressor A und Suppressor B Mutationen im gleichen Gen trugen, wurde Suppressor B im Wildtyp (Segregante 3C aus Abb. 3.33) gegen Suppressor A im *Δylr186w* Hintergrund gekreuzt und dieser Stamm einer Tetradenanalyse unterzogen. Hätten beide Suppressorstämme Mutationen im gleichen Gen, so hätte man lediglich zwei Wachstumsphänotypen in gleichem Verhältnis zueinander erwartet, zum einen große Wildtypkolonien, zum anderen *Δylr186w* Minikolonien mit der Suppressormutation. Zu beobachten waren jedoch mindestens 4 Wachstumsphänotypen (Abb. 3.37), womit bewiesen war, dass die beiden Suppressoren A und B Mutationen in unterschiedlichen Genen enthielten.

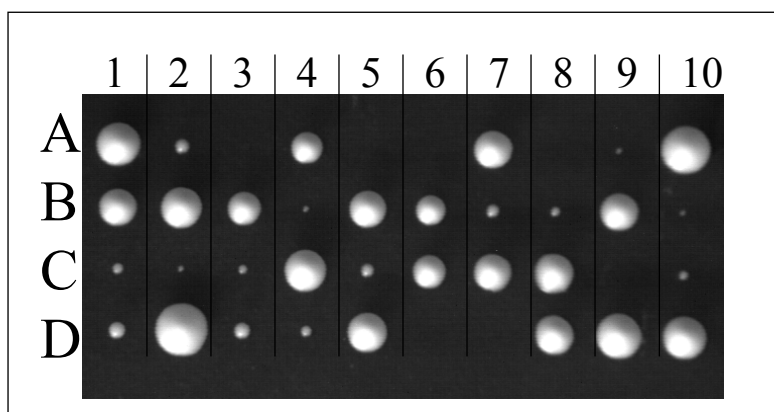


Abb. 3.37 : Ergebnis der Kreuzung von Suppressor B im Wildtyp (Segregante 3C aus Tetradenanalyse Suppressor B X CEN.PK2-1C, Abb. 3.33 b) gegen Suppressor A (*Δylr186w*) mit anschließender Tetradenanalyse. Die Aufnahmen entstanden nach 3 Tagen Inkubation bei 30°C.

Auch für Suppressor A wurde untersucht, ob die Mutation eine Auswirkung auf das Wachstum im Wildtyp hat. Zunächst wurde bestätigt, dass Segregante 8C aus der Tetradenanalyse Suppressor A in $\Delta ylr186w$ X Wildtyp CEN.PK2-1C (Abb. 3.33a) die Suppressor-mutation enthielt. Dazu wurde Segregante 8C gegen Suppressor A in $\Delta ylr186w$ gekreuzt und anschließend eine Tetradenanalyse durchgeführt. Es traten nur zwei Phänotypen im gleichen Verhältnis auf (Abb. 3.38), womit gezeigt war, dass die Suppressormutation A homozygot vorlag und somit in Segregante 8C vorhanden war.

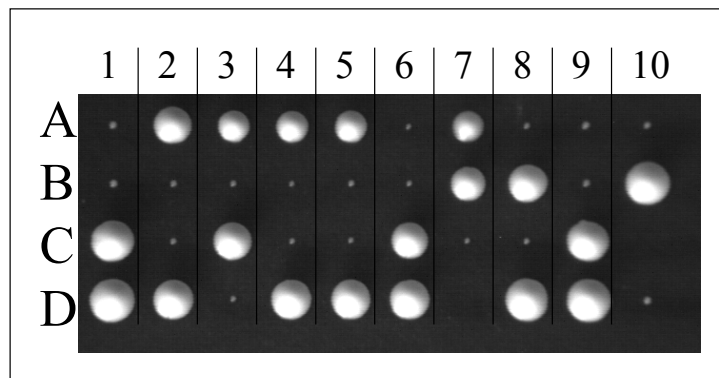


Abb. 3.38 : Ergebnis der Kreuzung von Segregante 8C (aus Tetradenanalyse Suppressor A in $\Delta ylr186w$ X Wildtyp CEN.PK2-1C, Abb. 3.33 a) gegen Suppressor A in $\Delta ylr186w$ und anschließender Tetradenanalyse. Die Aufnahmen entstanden nach 3 Tagen Inkubation bei 30°C.

Segregante 8C (Abb. 3.33 a) wurde nun gegen den Wildtyp CEN.PK2-1C gekreuzt und der resultierende Stamm einer Tetradenanalyse unterzogen. Hier war kein Wachstumsphänotyp zu beobachten (Abb. 3.39), alle Segreganten bildeten gleich große Kolonien. Auch führt die Suppressormutation nicht zur erhöhten Resistenz gegen G418.

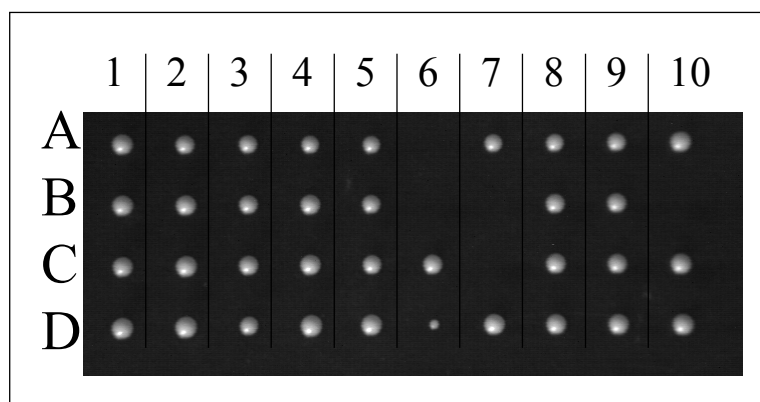


Abb. 3.39 : Ergebnis der Kreuzung von Segregante 8C (aus Tetradenanalyse Suppressor A in $\Delta ylr186w$ X Wildtyp CEN.PK2-1C, Abb. 3.33 a) gegen Wildtyp CEN.PK2-1C und anschließender Tetradenanalyse. Die Aufnahmen entstanden nach 2 Tagen Inkubation bei 30°C.

Als nächstes wurde untersucht, ob es sich bei den Suppressormutationen um dominante oder rezessive Mutationen handelte. Dazu wurden Suppressor A sowie Suppressor B in $\Delta ylr186w$ gegen SDE1 ($\Delta ylr186w$ mit pDE42, siehe Ergebnisteil 3.17) gekreuzt. pDE42 enthält die N-terminale Fusion des grün-fluoreszierenden Proteins an das essentielle Gen *YLR186w* von *S. cerevisiae*. Das Fusionsprotein ist funktionell, weshalb $\Delta ylr186w$ mit dem Plasmid pDE42 wieder wachsen kann. Die Kreuzungsprodukte wurden dünn in YEPD angeimpft und bis in die stationäre Wachstumsphase bei 30°C angezogen. Von dieser Kultur wurden je ca. 200 Zellen auf YEPD plattiert und bei 30°C für 3 Tage inkubiert. Bei dem diploiden Stamm, entstanden durch die Kreuzung von Suppressor A in $\Delta ylr186w$ X SDE1 ($\Delta ylr186w$ mit pDE42), waren neben großen Kolonien zahlreiche kleine Kolonien sichtbar (Abb. 3.40). Durch ausstreichen der kleinen Klone auf SCD ohne Histidin konnte gezeigt werden, dass das Plasmid pDE42 verloren wurde und das Wachstum der Klone folglich auf die Anwesenheit der heterozygoten Suppressormutation A zurückzuführen ist. Somit handelt es sich bei Suppressor A um eine dominante Mutation, die auch heterozygot supprimiert. Anders bei dem diploiden Stamm, der durch die Kreuzung von Suppressor B in $\Delta ylr186w$ X $\Delta ylr186w$ mit pDE42 entstand. Hier war nur die große Kolonieform zu sehen, was zeigte, dass der Verlust von pDE42 nicht toleriert wurde und somit die Suppressormutation B rezessiv ist.

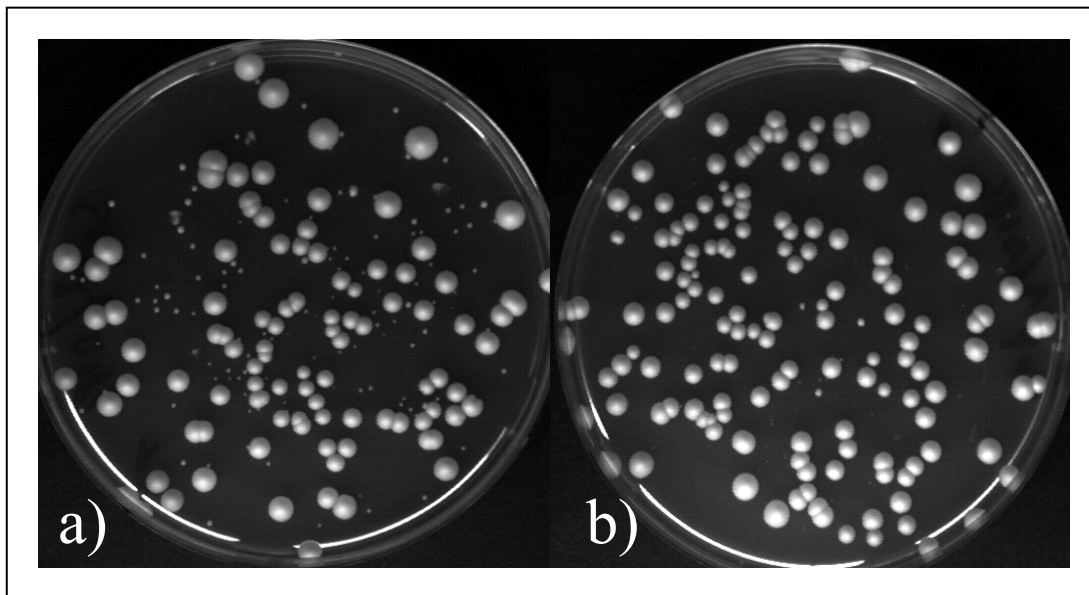


Abb. 3.40 : Analyse der Suppressormutationen A und B auf Dominanz/Rezessivität. Diploid homozygote Stämme für die Deletion von *YLR186w* mit dem komplementierenden Plasmid pDE42 und a) der heterozygoten Suppressormutation A sowie b) der heterozygoten Suppressormutation B im Hintergrund wurden in YEPD bis in die stationäre Phase angezogen und anschließend je ca. 200 Zellen auf YEPD plattiert. Die Aufnahmen entstanden nach 3 Tagen Inkubation bei 30°C.

In der Phänotypanalyse von Stamm SDE3 (*Δylr186w* mit pDE49) konnte bereits gezeigt werden, das NaCl einen Einfluss auf die Morphologie der Zelle unter reprimierenden Bedingungen hat. Der Einfluss von NaCl wurde auch auf die Suppressoren A und B untersucht (Abb.3.41). Beide Suppressoren im Deletionshintergrund wuchsen bei 0,3 M NaCl deutlich besser als die Suppressoren im Wildtyphintergrund oder der Wildtyp selbst. Auch waren die Kolonien deutlich größer als auf der Kontrollplatte ohne Salz. Hierbei handelte es sich nicht um einen osmotisch bedingten Effekt, da dieses verbesserte Wachstum nicht durch andere osmotisch aktive Substanzen (1 M KCl, 1,5 M Sorbit, 1,5 M Glycerin) herbeigeführt werden konnte (nicht gezeigt). Weiterhin wurden die Suppressoren auf Empfindlichkeit gegen Thiabendazol, Latrunculin A, Formamid, Coffein, Calcofluor, CaCl₂, Wachstum bei 37°C, 22°C und 16°C getestet, ohne dass besondere Auffälligkeiten im Wachstumsverhalten auftraten.

Leider gelang es nicht die Mutationen zu identifizieren, die zu den Suppressorphänotypen führten. Obwohl Suppressor B eine rezessive Mutation trägt, fehlt ein ausreichend deutlicher Funktionsverlust-Phänotyp, der durch ein Genbankplasmid komplementiert werden könnte.

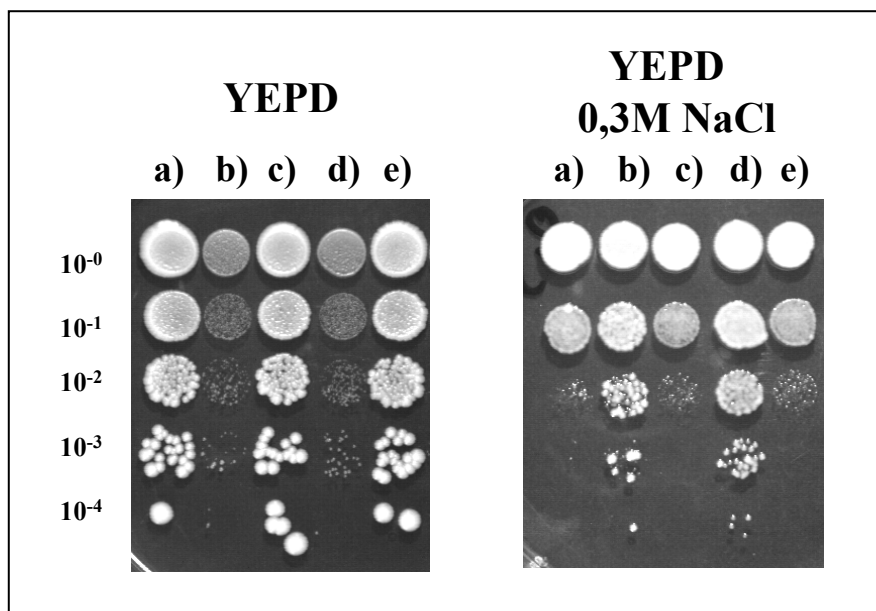


Abb. 3.41 : Wachstumsverhalten der Suppressoren A und B unter Salzstress. Die Stämme wurden über Nacht in YEPD angezogen und auf eine OD von 0,5 verdünnt. Je 10 µl einer seriellen Verdünnungsreihe (10^0 - 10^{-4}) wurden anschließend auf die Platten getropft und 4 Tage bei 30°C inkubiert. Auftragung: a) Suppressor B im Wildtyphintergrund, b) Suppressor B in *Δylr186w*, c) Suppressor A im Wildtyphintergrund, d) Suppressor A in *Δylr186w*, e) Wildtyp CEN.PK2-1C.

3.17 Zelluläre Lokalisation von ScYlr186p

Komplementation von $\Delta ylr186w$ durch GFP-Ylr186p

Um das Protein Ylr186p der Hefe *S. cerevisiae* weiter zu charakterisieren, wurde mit Hilfe einer GFP-Fusion die Lokalisation des Proteins in der Zelle bestimmt. Das Fusionsgen GFP-*YLR186w* auf pDE42 besitzt den *MET25*-Promotor (Abb. 3.48), dessen Expressionsstärke reguliert werden kann. Der Promotor wird durch die Verwendung Methionin-freier Medien induziert und durch die Zugabe von Methionin ins Medium auf eine Basalaktivität reprimiert (Mumberg *et al.*, 1994). Da GFP-Fusionsproteine gelegentlich fehllokalisieren und somit nicht mehr funktionell sind, wurde zunächst überprüft, ob das Fusionsprotein GFP-Ylr186p noch die Funktion von Ylr186p übernehmen kann. Dazu wurde pDE42 in CEN.SR679 (*YLR186w*/ $\Delta ylr186w::loxP$ -*KanR*-*loxP*) transformiert und dieser Stamm einer Tetradenanalyse unterzogen. Gelegentlich bildeten alle vier Segreganten einer Tetrade Kolonien, wobei zwei Segreganten etwas schlechter wuchsen. Nach replikaplattieren auf YEPD + G418 zeigte sich, dass die zwei schlechter wachsenden Segreganten der Tetrade resistent gegen G418 waren und somit die *YLR186w* Deletion trugen. Da solche Kolonien auch pDE42 enthielten (gezeigt durch Replikaplattieren auf SCD ohne Histidin), war bewiesen, dass das Fusionsprotein GFP-Ylr186p funktionell ist und somit eine Fehllokalisierung des Fusionsproteins GFP-Ylr186p in der Zelle unwahrscheinlich ist.

Struktur und Lokalisation von GFP-Ylr186p in unsynchronisierten Zellen

Stamm CEN.PK2 (Wildtyp) mit pDE42 und SDE1 ($\Delta ylr186w::loxP$ -*KanR*-*loxP* mit pDE42) wurden in selektivem SCD-his über Nacht angezogen und die Fluoreszenz der GFP-Fusionsproteine unter dem Fluoreszenzmikroskop verfolgt. Beide Stämme zeigten das gleiche mikroskopische Bild (Abb. 3.42). Neben einem größeren Fleck war ein Stab zu beobachten, dessen Morphologie in Abhängigkeit zur Zellzyklusphase stand. Bei nicht-knospenden Zellen (G1-Phase) erkannte man einen Fleck, aus dem der Stab in Richtung Zelloberfläche ragt (Abb. 3.42 und 4.2 b). Bei knospenden Zellen (G2, S-Phase, M-Phase) war wieder ein Fleck zu sehen, zudem ein kurzer Stab innerhalb dieses Flecks mit verdickten Enden (Abb. 3.42). Das mikroskopische Bild in knospenden Zellen gleicht dem von Mikrotubulifärbungen (Abb. 3.30 a), was darauf schließen lässt, dass GFP-Ylr186p ein Mikrotubuli-assoziiertes Protein ist. Bei der stabartigen Struktur in knospenden Zellen könnte es sich um die bipolare Spindel im Zellkern handeln, an deren Enden die Spindelpolkörper liegen (Abb. 3.30 a, Abb. 3.42). Der

Zellkern der Mutterzelle liegt häufig am Knospenhals und die Spindel ist zur Längsachse der knospenden Zelle ausgerichtet. Typisch für diese Phase der Mitose kurz vor einsetzen der Anaphase ist auch, dass die Spindel gelegentlich durch den Knospenhals von der Mutterzelle in die Knospe und wieder zurück schlüpft (Yeh *et al.*, 1995), was auch bei den Stämmen mit GFP-Ylr186p beobachtet werden konnte.

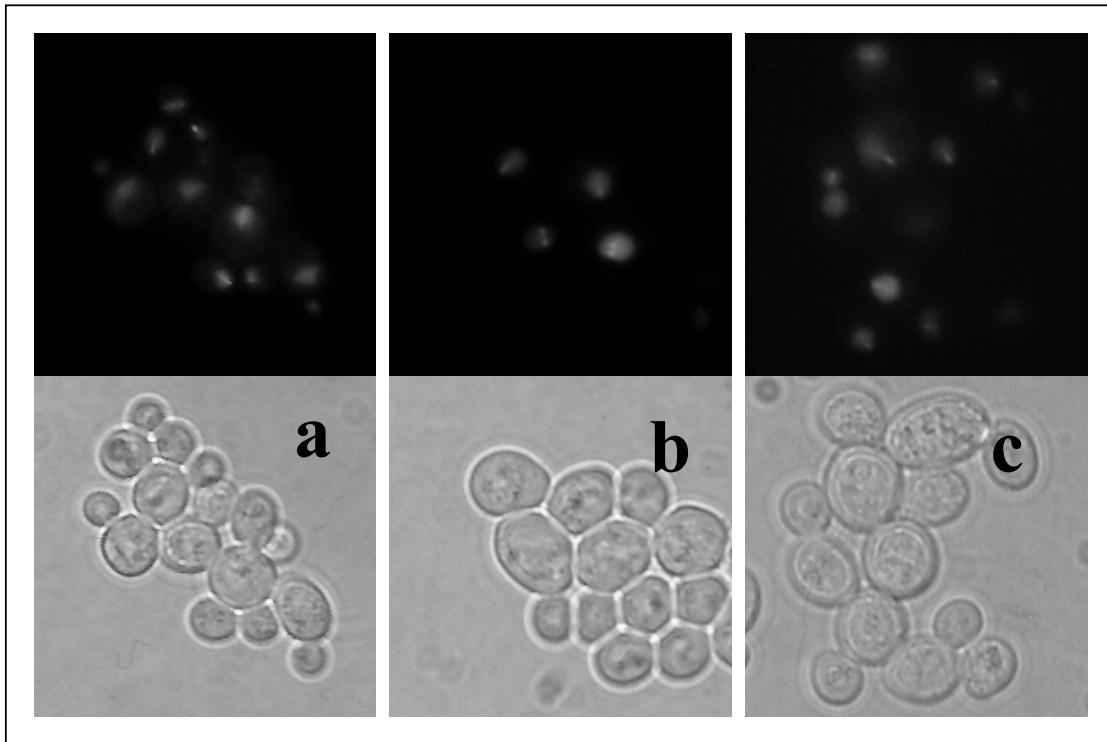


Abb. 3.42 : Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von GFP-Ylr186p. Die Zellen wurden über Nacht in selektivem Flüssigmedium angezogen und die Fluoreszenz in intakten Zellen untersucht (bei 1000facher Vergrößerung). a) SDE1 ($\Delta ylr186w::loxP-KanR-loxP$ mit pDE42), b) und c) CEN.PK2 (Wildtyp) mit pDE42.

Um die Identität der stabförmigen Struktur zu klären, sollten die Zellen gegengefärbt werden (Mikrotubuli-Färbung). Es zeigte sich jedoch, dass die Fluoreszenz des Stabes während der Fixierung der Zellen verloren ging. Der fluoreszierende Fleck blieb jedoch erhalten, so dass seine Identität durch Gegenfärbung der Zellen mit 4',6-Diamino-2-Phenyl-Indol-Dihydrochlorid (DAPI) geklärt werden konnte (Abb. 3.43). DAPI bindet an DNS und färbt so die Zellkerne an. GFP-Ylr186p colokalisiert mit der DAPI-Färbung, was zeigt, dass es sich bei dem Flecken um den Zellkern handelt. Das Gen der Hefe *S. cerevisiae* mit dem systematischen Namen *YLR186w* erhielt aufgrund der fluoreszenzmikroskopischen

Untersuchungen nun den Namen *NEP1* ("nuclear essential protein") und wird im weiteren Verlauf dieser Arbeit dementsprechend bezeichnet.

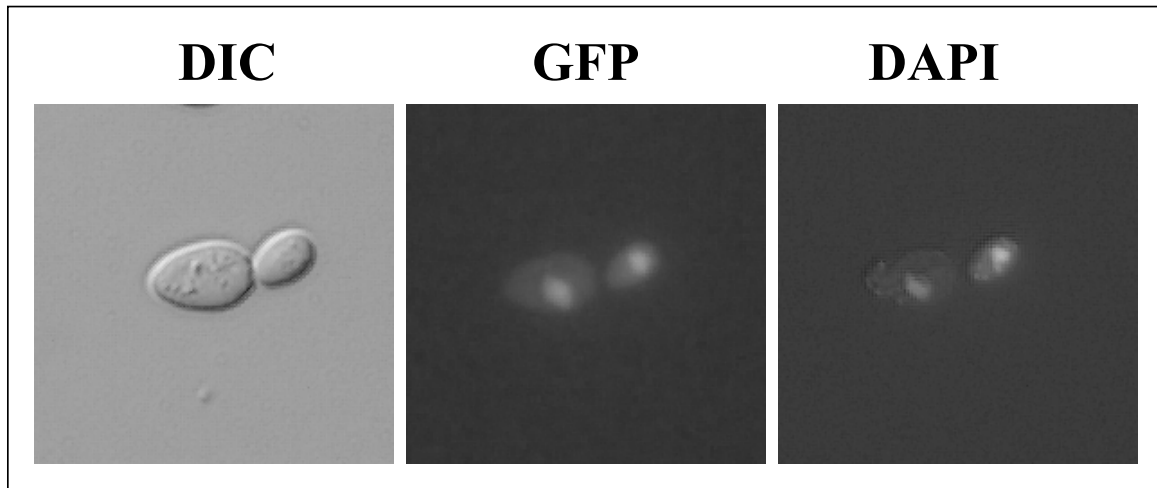


Abb. 3.43 : Lokalisation von GFP-Ylr186p im Zellkern durch Gegenfärbung mit DAPI. Logarithmisch wachsende Zellen des Stammes CEN.PK2 mit pDE42 wurden mit Formaldehyd fixiert und DAPI gefärbt. Die Aufnahmen entstanden bei stärkster Vergrößerung (1000X).

Zelluläre Lokalisation und Struktur von GFP-Nep1p nach Arretierung

Um zu zeigen, dass die stabförmige Struktur tatsächlich die Spindel ist und sich dementsprechend zellzyklusphasenabhängig verhält, wurden die Zellen in einer spezifischen Wachstumsphase arretiert und das mikroskopische Bild analysiert. Ist das mikroskopische Bild der GFP-Fusion abhängig von der Zellzyklusphase, sollte nun ein einheitliches Bild vorliegen. Durch Zugabe von Hydroxyharnstoff lässt sich die Ribonukleotid-Reduktase hemmen, so dass die DNS Synthese in der S-Phase nicht vollständig ablaufen kann und die Zellen mit einem ungeteilten Zellkern, einer kurzen Spindel und einer großen Knospe vor Einsetzen der Mitose arretieren (Pellmann *et al.*, 1995). Der so arretierte Stamm SDE1 zeigt eine einheitliche Morphologie der GFP-Struktur. Man erkennt immer einen kurzen, an den Enden verdickten Stab in dem grün fluoreszierenden Zellkern (Abb. 3.44). GFP-Nep1p verhält sich wie die Spindel und ist vermutlich an diese assoziiert.

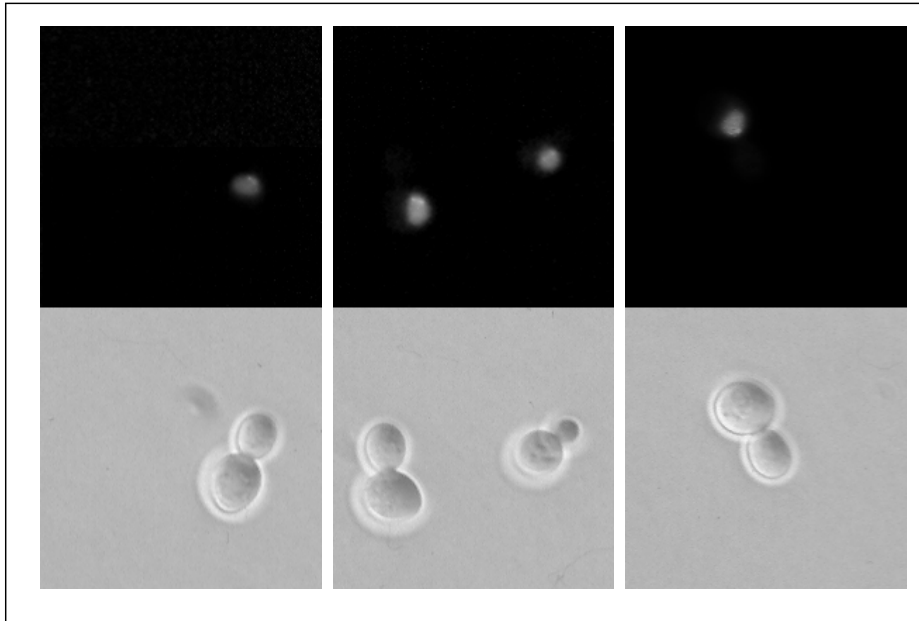


Abb. 3.44 : Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von SDE1 (*MAT α Δ nep1::loxP-KanR-loxP* mit pDE42) nach 4 h Arretierung einer logarithmischen Kultur mit 0,1 M Hydroxyharnstoff. Die Aufnahmen entstanden bei stärkster Vergrößerung (1000X).

Während GFP-Nep1p in knospenden Zellen an die nuklearen Mikrotubuli der Spindel und den Spindelpolkkörper assoziiert ist, gleicht die Lokalisation von Nep1p in nicht-knospenden Zellen nicht der von Mikrotubulifärbungen. In dieser Wachstumsphase der Zelle entspringen etwa 2-5 zytoplasmatische Mikrotubuli von einem noch nicht duplizierten Spindelpolkkörper (Abb. 4.2 a) (Carminati und Stearns, 1997). Das fluoreszenzmikroskopische Bild von GFP-Nep1p zeigt in dieser Wachstumsphase dagegen nur einen polaren Stab, der aus dem Zellkern entspringt und in Richtung Zelloberfläche verläuft, wobei die Fluoreszenzintensität des Stabes in Richtung Zelloberfläche zunimmt (Abb. 4.2 b).

Zelluläre Lokalisation von GFP-Nep1p während der Zygotenbildung

Als nächstes wurde die Struktur und Lokalisation von GFP-Nep1p während der Zygotenbildung untersucht. Dazu wurde der haploide Stamm SDE1 (*MAT α Δ nep1::loxP-KanR-loxP* mit pDE42) mit SDE2 (*MAT α Δ nep1::loxP-KanR-loxP* mit pDE42) gemischt und nach 4 h Inkubation bei 30°C mikroskopiert. Abbildung 3.45 a) und b) zeigen bereits fusionierte Zellen, bei denen die beiden Zellkerne durch Mikrotubuli miteinander verbunden sind und die Karyogamie kurz bevorsteht. Außerdem wurde in einer logarithmischen 5 ml Kultur (SCD ohne Histidin) von SDE1 die "Shmoo"-Bildung durch Zugabe von α -Paarungstypfaktor induziert (Abb. 3.45 c und d). Bei dem "Shmoo" handelt es sich um ein polarisiertes

Wachstum der Hefezelle in Richtung erhöhter Paarungstypfaktor Konzentration. Der Zellkern wandert an einem Mikrotubuli-Bündel, welches sich vom Spindelpolkkörper in der Kernmembran zur Spitze des Shmoos ausgebildet hat, in Richtung dieser Ausstülpung (Maddox *et al.*, 1999). Auch hier (sowie bei der Zygotenbildung) verhält sich GFP-Nep1p wie Mikrotubulibündel, womit gezeigt ist, dass Nep1p auch in dieser Zellzyklusphase vermutlich an Mikrotubuli assoziiert ist.

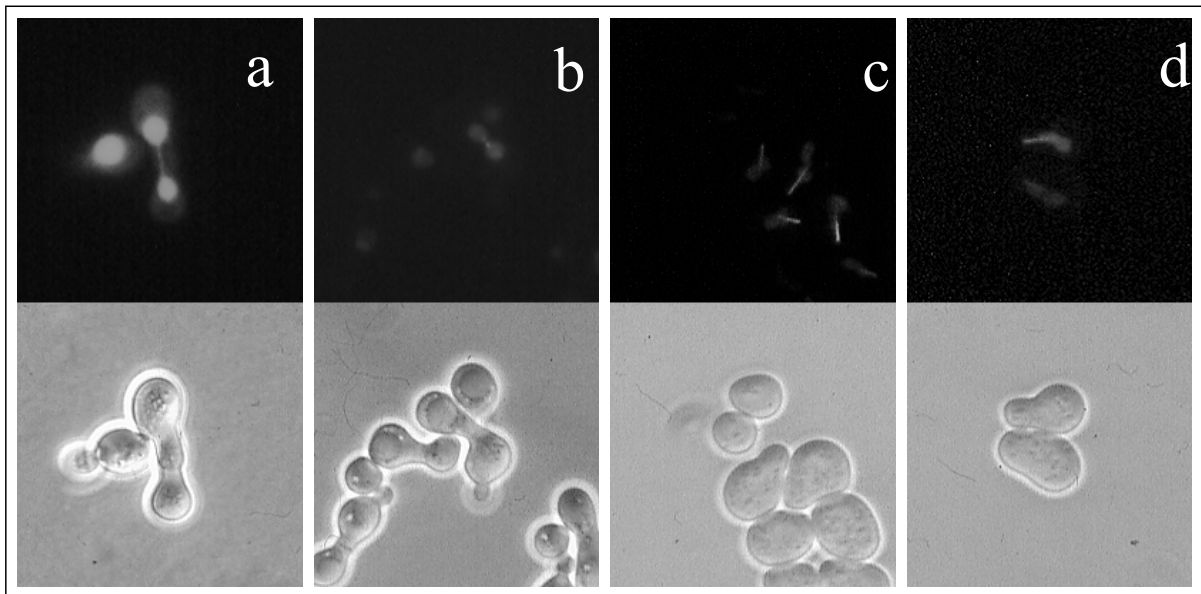


Abb. 3.45 : Struktur und Lokalisation von GFP-Nep1p während der Zygotenbildung. Die Aufnahmen entstanden bei 1000facher Vergrößerung. a) und b) SDE1 (*MATa Δnep1::loxP-KanR-loxP* mit pDE42) gepaart mit SDE2 (*MATα Δnep1::loxP-KanR-loxP* mit pDE42), c) und d) SDE1 (*MATa Δnep1::loxP-KanR-loxP* mit pDE42) nach 4 h Inkubation einer logarithmischen 5 ml SCD ohne Histidin Kultur mit α -Paarungstypfaktor (Endkonzentration 10 μ g/ml).

3.18 Thiabendazol-Empfindlichkeit bei erhöhter Expression von GFP-Nep1p

Viele Mikrotubuli-bindende Proteine stabilisieren oder destabilisieren polymerisierte Mikrotubulistränge. Deletion bzw. Überexpression dieser Proteine führen häufig zu Veränderungen in der Stabilität der Mikrotubuli, welche dadurch empfindlicher bzw. resistenter gegen die mikrotubulidestabilisierenden Chemikalien Benomyl oder Thiabendazol werden (Cottingham und Hoyt, 1997; Schwartz *et al.*, 1997; Feierbach *et al.*, 1999). Ein *S. cerevisiae* $\Delta nep1$ Stamm kann nicht untersucht werden, da das Gen essentiell ist. Da jedoch Stamm SDE1 (*Δnep1::loxP-KanR-loxP* mit pDE42) bereits etwas schlechter wächst als der haploide Wildtypstamm und dies möglicherweise durch Störungen der Mikrotubulstruktur bedingt ist,

bestand die Möglichkeit, dass dieser Wachstumsphänotyp durch Thiabendazol (TBZ) verstärkt werden kann. Deshalb wurden die Stämme SDE1 ($\Delta nep1::loxP-KanR-loxP$ mit pDE42) und CEN.PK2-1C (Wildtyp) auf Empfindlichkeit gegen das mikrotubuli-destabilisierende Reagenz Thiabendazol (TBZ) getestet. Serielle Verdünnungen der Stämme wurden auf SCD Platten und SCD ohne Methionin Platten (verstärkte Expression von GFP-Nep1p) mit steigender Konzentration an TBZ getropft (Abb. 3.46).

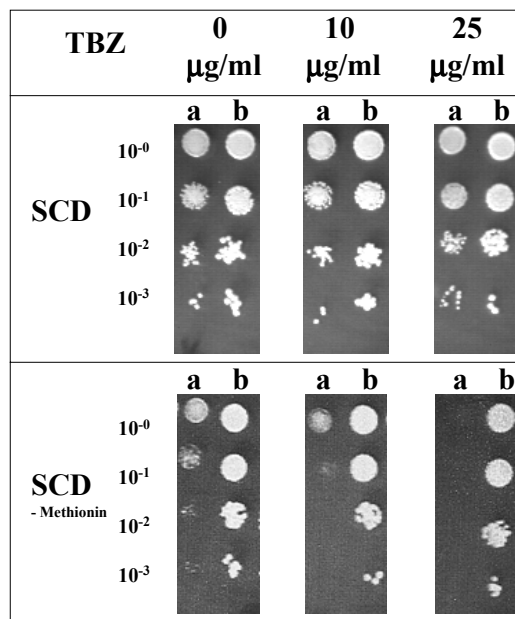


Abb. 3.46 : Phänotypanalyse von a) SDE1 ($\Delta nep1::loxP-KanR-loxP$ mit pDE42) und b) CEN.PK2-1C (Wildtyp) auf SCD Platten und SCD Platten ohne Methionin bei steigender Konzentration an Thiabendazol. 10 μl serieller Verdünnungen (10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}) wurden auf die entsprechenden Platten getropft und für 3 Tage bei 30°C inkubiert.

Die TBZ Konzentration hatte keinen Einfluss auf das Wachstumsverhalten von SDE1 auf SCD Platten. SDE1 als auch CEN.PK2-1C (Wildtyp) wuchsen nahezu gleich gut, unabhängig von der TBZ-Konzentration. Wurde jedoch die Expression von GFP-Nep1p stärker induziert (auf den SCD Platten ohne Methionin), wuchs SDE1 bereits ohne TBZ im Medium deutlich schlechter als der Wildtyp. Bei einer Konzentration von 25 $\mu\text{g/ml}$ TBZ stellte SDE1 das Wachstum völlig ein, das Wachstumsverhalten des Wildtyps blieb unbeeinflusst. Es handelte sich hierbei um einen dominanten Effekt, da die verstärkte Expression von GFP-Nep1p auch im Wildtyp zur erhöhten Empfindlichkeit gegen TBZ führte (Abb.3.47).

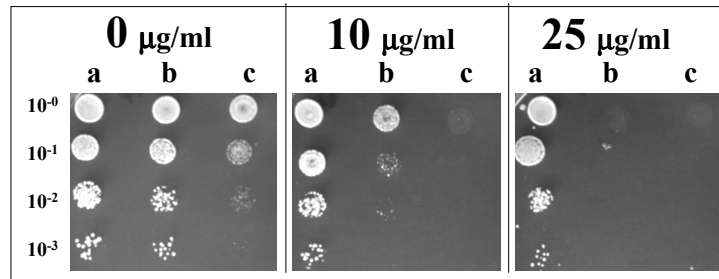


Abb. 3.47 : Phänotypanalyse von a) CEN.PK2-1C (Wildtyp) mit pUG34 (GFP-Vektor ohne Insert), b) CEN.PK2-1C (Wildtyp) mit pDE42 (GFP-Nep1p) und c) SDE1 ($\Delta nep1::loxP-KanR-loxP$ mit pDE42) auf SCD Platten ohne Histidin (Selektionsmarke auf die Plasmide) und ohne Methionin bei steigender Konzentration an Thiabendazol. 10 μ l serieller Verdünnungen (10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}) wurden auf die Platten getropft und für 2 Tage bei 30°C inkubiert.

Die beiden Wildtypstämme a) CEN.PK2-1C mit pUG34 und b) CEN.PK2-1C mit pDE42 (GFP-Nep1p) wuchsen auf SCD ohne Histidin/Methionin gleich gut. Jedoch bereits bei einer TBZ-Konzentration von 10 μ g/ml im Medium wuchs CEN.PK2-1C mit pDE42 (GFP-Nep1p) kaum noch und bei 25 μ g/ml TBZ gar nicht mehr. Der Referenzstamm CEN.PK2-1C mit pUG34 (ohne GFP-Nep1p) blieb dagegen unbeeinflusst von der TBZ-Konzentration (Abb. 3.47).

Um zu klären, ob die TBZ-Empfindlichkeit durch die Fusion des GFP's an Nep1p zustande kam, wurden Plasmide zur Überexpression von GFP-Nep1p als auch Nep1p konstruiert. Um gleichzeitig zu zeigen, dass die beobachteten Wachstumsphänotypen (und TBZ-Empfindlichkeit) von Stämmen mit GFP-Nep1p auf SCD Platten ohne Methionin unabhängig vom Methioninstoffwechsel sind, wurde als Promotor für die Überexpression der Proteine der *GALI* Promotor gewählt. Abbildung 3.48 zeigt die Überexpressionsplasmide pDE43 (*GALI-GFP-NEP1*) und pDE50 (*GALI-NEP1*).

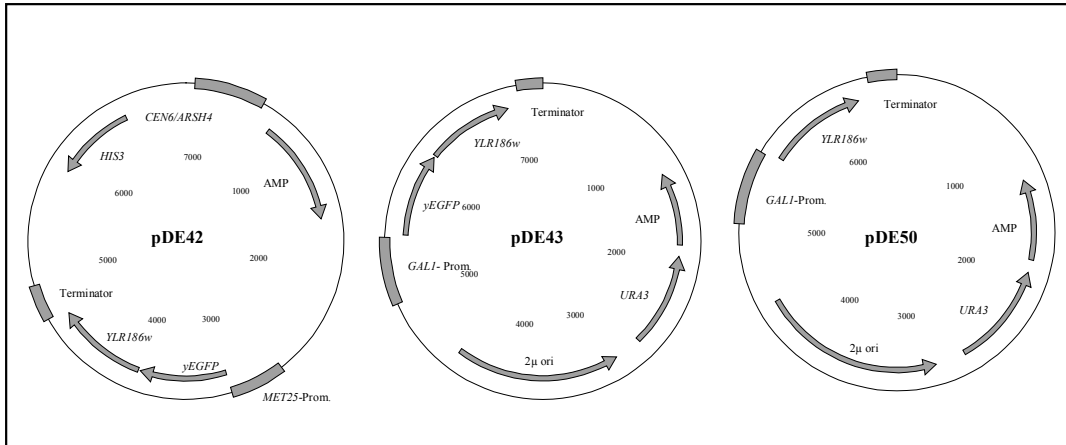


Abb. 3.48 : Plasmide zur Überexpression von GFP-Nep1p (GFP-Ylr186p) und Nep1p (Ylr186p) sowie pDE42. Erklärung der Abkürzungen: *GALI*-Prom. = *GALI*-Promotor, 2 μ ori = 2 micron "origin of replication", AMP = Ampicillin Resistenzmarker, Terminator = *CYC1*-Terminator von *S. cerevisiae*, *yEGFP* = "yeast enhanced green fluorescence protein", *MET25*-Prom. = *MET25*-Promotor

Beide Plasmide sowie pYES2.0 (Kontrolle) wurden in CEN.PK2-1C transformiert und Transformanten auf SCD Platten ohne Uracil sowie auf SCGal Platten ohne Uracil ausgestrichen (Abb. 3.49). Da die Gene *NEP1* bzw. *GFP-NEP1* auf den Expressionsplasmiden pDE43 und pDE50 einen *GALI* Promotor besitzen, werden sie auf den Glucoseplatten reprimiert. Alle ausgestrichenen Stämme wuchsen hier gleich gut. Auf Galaktose Platten wird die Genexpression durch den *GALI* Promotor stark induziert, es kommt zur verstärkten Bildung von Nep1p und GFP-Nep1p. Während die Überexpression von Nep1p keinen Einfluss auf das Wachstum hatte, wuchs der Stamm mit GFP-Nep1p kaum noch.

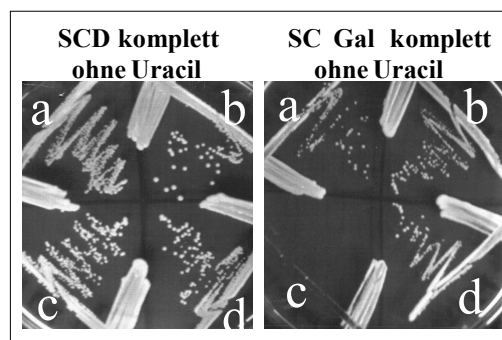


Abb. 3.49 : Überexpression von GFP-Nep1p und Nep1p in CEN.PK2-1C. Die Stämme a) und b) CEN.PK2-1C mit pYES2.0 (Referenz), c) CEN.PK2-1C mit pDE43 (GFP-Nep1p) und d) CEN.PK2-1C mit pDE50 (Nep1p) wurden auf SCD Platten ohne Uracil (Selektion auf Zellen mit Plasmid) sowie auf SCGal Platten ohne Uracil ausgestrichen und für 3 Tage bei 30°C inkubiert.

GFP-Nep1p wirkt in erhöhten Konzentrationen toxisch und beeinflusst die Mikrotubulistabilität. Die Überexpression von Nep1p alleine hat keinen Wachstumsphänotyp und führte zu keiner Veränderung der Empfindlichkeit/Resistenz gegenüber TBZ (Daten nicht gezeigt). Da nicht ausgeschlossen werden kann, dass das künstliche Fusionsprotein GFP-Nep1p, trotz Komplementieren des *Δnep1* Phänotyps, falsch in der Zelle lokalisiert und dadurch die beobachteten Wachstums- bzw. TBZ-Phänotypen auftraten, wurde untersucht, ob die toxische Wirkung bzw. TBZ-Empfindlichkeit bei erhöhter Konzentration von GFP-Nep1p durch die Überexpression von Nep1p aufgehoben werden kann. Ist dies der Fall, so bedeutet das, dass Nep1p mit GFP-Nep1p im Wettbewerb um die Bindestellen an den Mikrotubuli steht und durch die Überexpression von Nep1p weniger GFP-Nep1p dort binden kann. Dadurch wird die Mikrotubulstruktur weniger destabilisiert und die Zelle sollte folglich wieder resistenter gegen Mikrotubuli-destabilisierende Reagenzien werden. Dazu wurden folgende Plasmidkombinationen in CEN.PK2-1C transformiert:

- pDE42 (*MET25-GFP-NEP1*) und pDE50 (*GAL1-NEP1*) (Abb.3.50 a)
- pDE42 und pYES2.0 (leerer Hefe Expressionsvektor) (Abb. 3.50 b)
- pUG34 (GFP-Vektor ohne Insert) und pDE50 (Abb. 3.50 c)

Die Transformanten wurden auf SCD sowie SCGal Platten mit steigender Konzentration an TBZ aufgetropft (Abb. 3.50). Den SCD/SCGal Platten fehlten die Aminosäuren Uracil, Histidin und Methionin, um auf die beiden Plasmide in den Stämmen zu selektionieren und um die Expression von GFP-Nep1p (pDE42) zu induzieren. Die beiden Stämme, welche GFP-Nep1p (pDE42) exprimierten (a und b), zeigten auf SCD erhöhte Empfindlichkeit gegenüber TBZ, wohingegen Stamm c) ohne GFP-Nep1p keinerlei Empfindlichkeit zeigt. Auf diesen Platten ist die Transkription von *NEP1* auf pDE50 reprimiert. Es kam folglich in a) nicht zur Überexpression von Nep1p. Auf SCGal Platten zeigte lediglich Stamm b) (pDE42/pYES2.0) eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber TBZ. Auf diesen Platten führte pDE50 (a und c) zur Überexpression von Nep1p. Dies ermöglichte Stamm a) (pDE42/pDE50) trotz Expression von GFP-Nep1p das Überleben bei erhöhten Konzentrationen an TBZ. Somit hat die Überexpression von Nep1p die TBZ-Empfindlichkeit durch GFP-Nep1p aufgehoben. Dies Ergebnis belegt, dass nicht nur GFP-Nep1p, sondern auch Nep1p an Mikrotubuli assoziiert ist und somit das fluoreszenzmikroskopische Bild keine Fehllokalisierung von GFP-Nep1p darstellt.

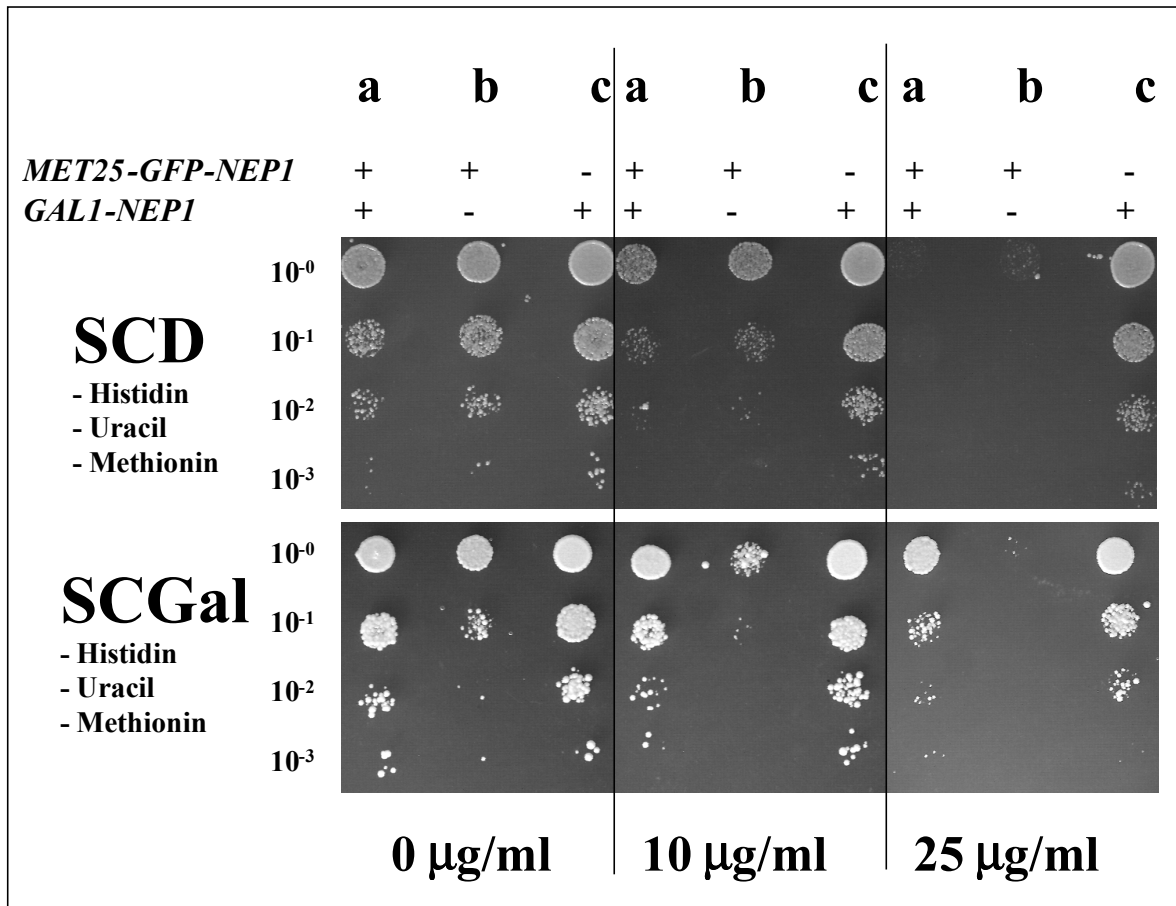


Abb. 3.50 : Phänotypanalyse der Empfindlichkeit gegen Thiabendazol bei Coüberexpression von GFP-Nep1p und Nep1p in CEN.PK2-1C. Serielle Verdünnungen der Stämme a) CEN.PK2-1C mit pDE42/pDE50, b) CEN.PK2-1C mit pDE42/pYES2.0 und c) CEN.PK2-1C mit pUG34/pDE50 wurden auf SCD ohne Histidin/Uracil/Methionin Platten sowie SCGal ohne Histidin/Uracil/Methionin Platten mit steigender Konzentration an TBZ (0 μg/ml, 10 μg/ml, 25 μg/ml) aufgetropft. Die Aufnahmen entstanden nach 2 Tagen (SCD Reihe) bzw. 4 Tagen (SCGal Reihe) Inkubation bei 30°C.

3.19 Zelluläre Lokalisation von CaNep1p und C2F in *Saccharomyces cerevisiae*

GFP-C2F komplementiert den letalen Phänotyp von $\Delta nep1$

Humanes C2F sowie CaNep1p können den letalen Phänotyp von $\Delta nep1$ in der Hefe *S. cerevisiae* komplementieren. Sollte die essentielle Funktion von Nep1p mit der Assoziation an Mikrotubuli in Zusammenhang stehen, sollten C2F und CaNep1p in *S. cerevisiae* auch an Mikrotubuli assoziiert sein. Um dies zu überprüfen, wurden Plasmide für die Expression von GFP-C2F (pDE47) sowie GFP-CaNep1p (pDE46) konstruiert. Um die Funktionalität der exprimierten Fusionsproteine zu überprüfen, wurde der konditional letale Stamm SDE3 ($\Delta nep1$ mit *GAL1*-C2F auf pDE49) mit pDE46 bzw. pDE47 sowie als Kontrollen pRS413

(Hefe/*E.coli* Shuttle-Vektor mit *CEN6/ARS4* und *HIS3* ohne Insert) und pDE96 (*ScNEP1* in pRS413) transformiert. Da in SDE3 das essentielle Gen *NEP1* deletiert ist und der Stamm stattdessen das humane C2F hinter einem *GALI*-Promotor auf Plasmid pDE49 besitzt, ist sein Wachstum Kohlenstoffquellen-abhängig, d.h. der Stamm wächst auf SCGal, jedoch nicht auf SCD Platten. Durch Einbringen der Plasmide pDE46 (Daten nicht gezeigt), pDE47 oder pDE96, jedoch nicht pRS413 war es dem Stamm wieder möglich auf SCD Platten zu wachsen (Abb. 3.51). Dies belegte, dass sowohl GFP-CaNep1p als auch GFP-C2F $\Delta nep1$ funktionell komplementieren können. Außerdem hatte die erhöhte Expression von GFP-C2F weder einen Einfluss auf das Wachstum von SDE3 noch auf dessen Empfindlichkeit gegenüber Thiabendazol.

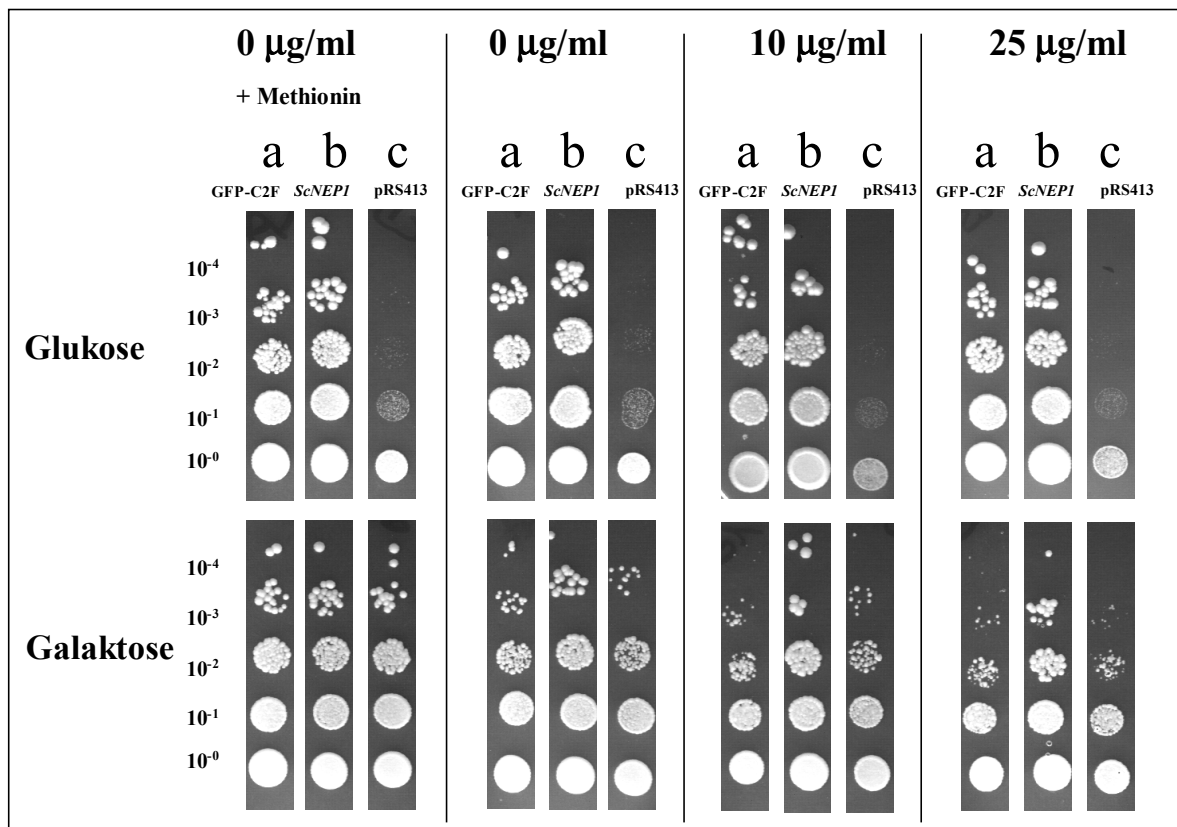


Abb. 3.51 : GFP-C2F Komplementationstest und Phänotypanalyse auf Empfindlichkeit gegen Thiabendazol. Die optische Dichte von 5 ml SCGal (ohne Uracil/Histidin) Kulturen der Stämme a) SDE3 mit pDE47 (GFP-C2F), b) SDE3 mit pDE96 (*ScNEP1*) und c) SDE3 mit pRS413 (leerer Vektor) wurde auf 0,5 eingestellt und je 10 µl serieller Verdünnungen auf folgende Medien getropft: SCD ohne Uracil/Histidin, SCD ohne Uracil/Histidin/Methionin, SCD ohne Uracil/Histidin/Methionin + 10 µg/ml TBZ, SCD ohne Uracil/Histidin/Methionin + 25 µg/ml TBZ, SCGal ohne Uracil/Histidin, SCGal ohne Uracil/Histidin/Methionin, SCGal ohne Uracil/Histidin/ Methionin + 10 µg/ml TBZ, SCGal ohne Uracil/Histidin/Methionin + 25 µg/ml TBZ. Die Aufnahmen entstanden nach 5 Tagen Inkubation bei 30°C.

GFP-C2F lokalisiert im Zellkern von *S. cerevisiae*

Der Grund für die fehlende Empfindlichkeit gegen TBZ bei erhöhter Expression von GFP-C2F zeigt sich unter dem Fluoreszenzmikroskop. Untersucht wurden der haploide Wildtyp CEN.PK2-1C, der diploide Wildtyp CEN.PK2 und SDE3 ($\Delta nep1$) mit pDE47 (GFP-C2F). In allen Stämmen war GFP-C2F im Zellkern lokalisiert (Abb.3.52 a-c). Im Gegensatz zu GFP-ScNep1p waren jedoch keine Mikrotubulistrukturen mehr zu sehen. Dieses Ergebnis zeigt, dass die Assoziation an das Mikrotubuli Zytoskelett für die essentielle Funktion von Nep1p nicht erforderlich ist.

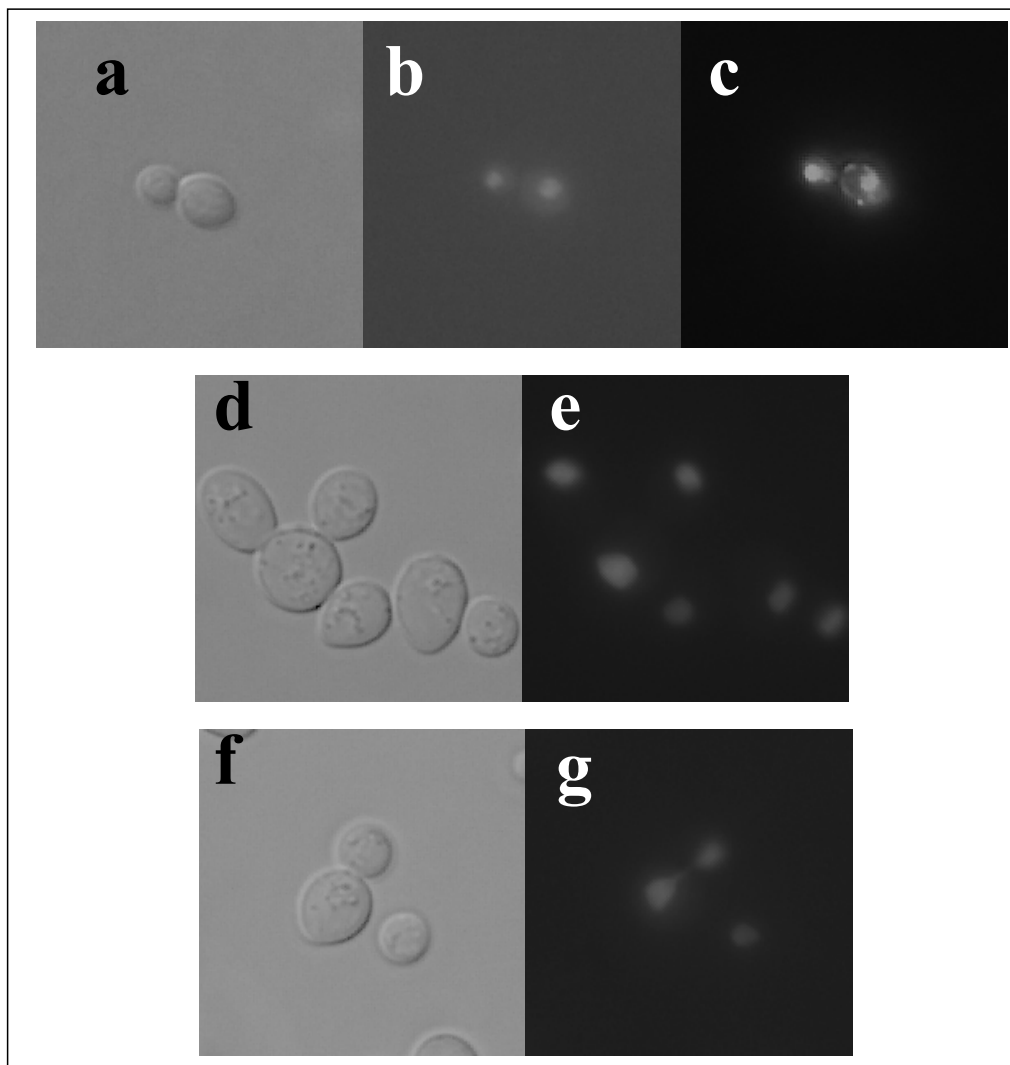


Abb. 3.52 : Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von GFP-C2F in *S. cerevisiae*. CEN.PK2 mit pDE47 (GFP-C2F) wurde über Nacht in selektivem Flüssigmedium angezogen und die Fluoreszenz in intakten Zellen untersucht (d - g) oder die Zellen wurden mit Formaldehyd fixiert und mit DAPI gefärbt (a = DIC, b = GFP-C2F, c = DAPI).

GFP-CaNep1p verhält sich ähnlich wie GFP-ScNep1p

Auch GFP-CaNep1p komplementiert den letalen Phänotyp von $\Delta nep1$ in *S. cerevisiae* (Daten nicht gezeigt) und ist im Zellkern lokalisiert (Abb. 3.53 a-f). Außerdem zeigen sich die gleiche Strukturen in knospenden (Abb. 3.53) und nicht-knospenden Zellen (i und j), die man bei fluorenszenzmikroskopischer Betrachtung von GFP-ScNep1p erkennt.

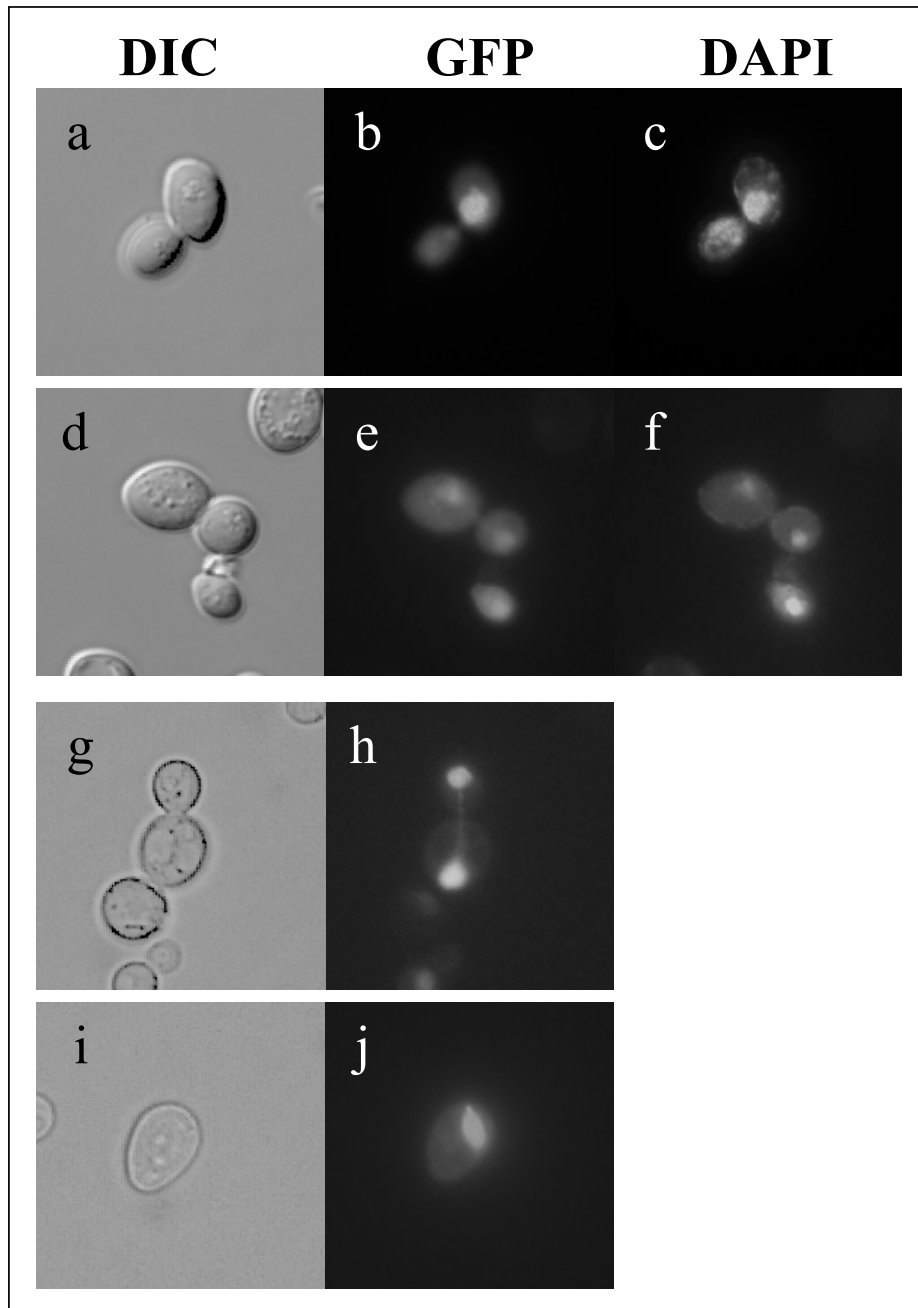


Abb. 3.53 : Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von GFP-CaNep1p in *S. cerevisiae*. CEN.PK2 mit pDE46 (GFP-CaNep1p) wurde über Nacht in selektivem Flüssigmedium angezogen und die Fluoreszenz in intakten Zellen untersucht (g-j) oder die Zellen wurden mit Formaldehyd fixiert und anschließend mit DAPI gegengefärbt (a und d = DIC, b und e = GFP-CaNep1p, c und f = DAPI).

Besonders verdeutlicht wurde dies durch time-lapse Aufnahmen in knospenden Zellen, bei denen wie bei GFP-ScNep1p eine Metaphasen-Spindel mit typischen Bewegungen zu sehen war (Abb. 3.54). Allerdings konnte diese Mikrotubuliassoziation nicht bei allen Zellen beobachtet werden.

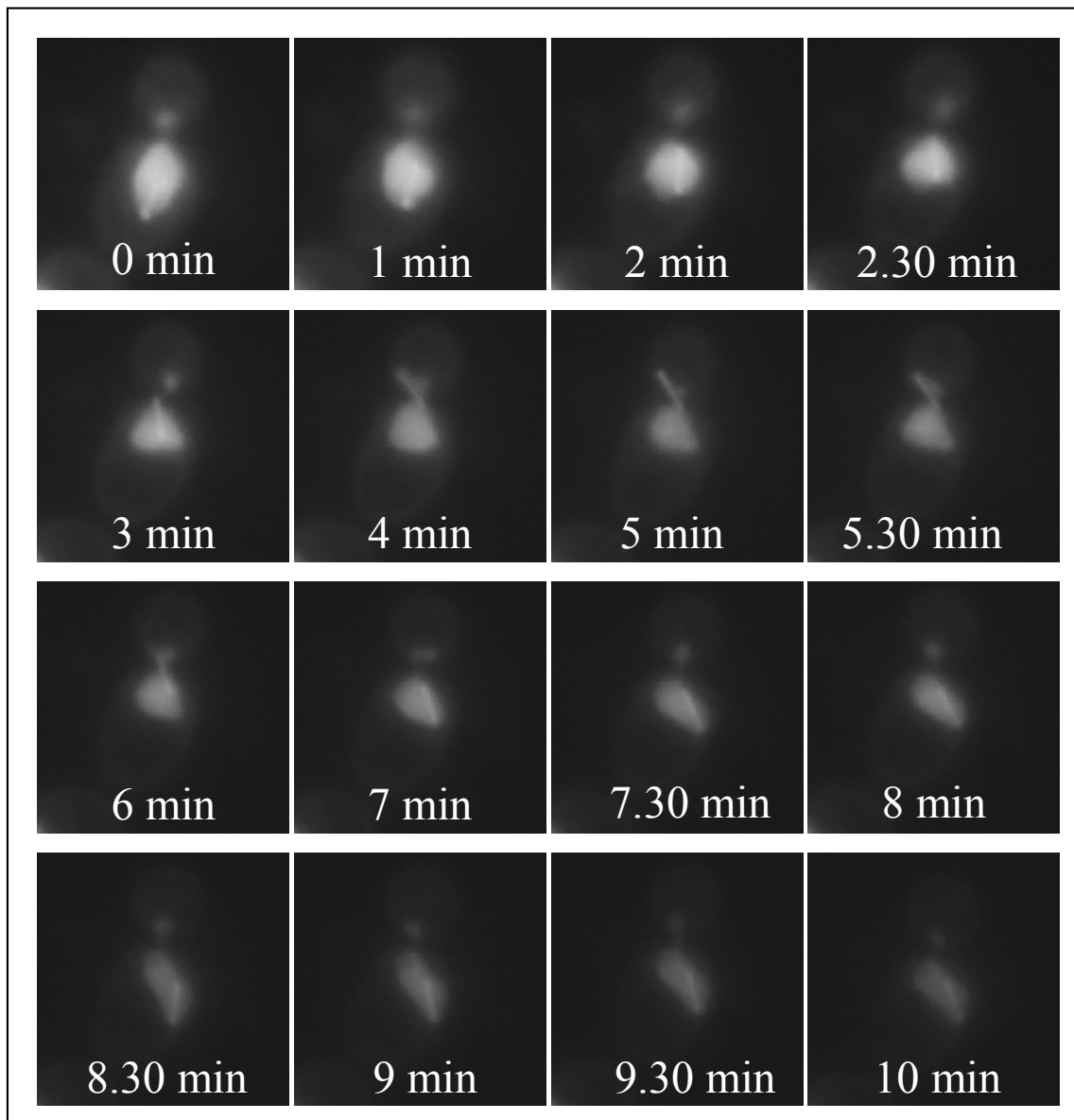


Abb. 3.54 : GFP-CaNep1p Oszillationen in knospenden *S. cerevisiae* Zellen. GFP-CaNep1p Bewegungen wurden im diploiden Wildtypestamm CEN.PK2 mit pDE46 (GFP-CaNep1p) untersucht. GFP-CaNep1p durchdringt den Knospenhals und wandert von der Mutterzelle in die Knospe und wieder zurück.

3.20 Zwei-Hybrid-Analysen

Um mehr über die Funktion des essentiellen Gens *NEP1* zu erfahren, wurde eine Zwei-Hybrid-Analyse zur Identifizierung wechselwirkender Proteine durchgeführt. Sollten hierdurch Proteine gefunden werden, deren Funktion bereits bekannt ist, ließen sich Rückschlüsse auf die Funktion von Nep1p ziehen. Dazu wurde der gesamte *NEP1* Leserahmen in die Zwei-Hybrid Vektoren pGAD424 und pGBT9 kloniert. Die resultierenden Plasmide pDE32 (GBT9-*NEP1*) und pDE33 (GAD424-*NEP1*) sind in der Lage $\Delta nep1$ in *S. cerevisiae* zu komplementieren. Die Tatsache, dass die Fusionsproteine funktionell sind, verringert die Gefahr der Isolierung von falsch wechselwirkenden Proteinen.

ScNep1p wechselwirkt mit sich selbst, zeigt aber keine Wechselwirkung mit Tubulin

Zunächst wurde untersucht, ob Nep1p mit sich selbst wechselwirkt und Dimere bzw. Multimere bildet. Die Untersuchungen wurden in dem Stamm PJ69-4a durchgeführt, der speziell für Zwei-Hybrid-Analysen konstruiert wurde (James et al., 1996). In diesem Stamm wurden die nativen Promotoren von *HIS3* und *ADE2* durch *GAL1* und *GAL2* Promotoren ersetzt. Desweiteren enthält der Stamm ein *lacZ* Gen mit einem *GAL7* Promotor. Wechselwirkungen können durch Wachstum auf SCD ohne Histidin, SCD ohne Adenin (wobei die Adenin-Prototrophie auf eine stärkere Wechselwirkung hinweist als die Histidin-Prototrophie) oder durch β -Galaktosidase-Aktivität nachgewiesen werden. PJ69-4a mit pDE32 (GBT9-*NEP1*) und pDE33 (GAD424-*NEP1*) wuchs auf SCD ohne Histidin, jedoch nicht auf SCD ohne Adenin, was auf eine schwache Wechselwirkung von Nep1p mit sich selbst hinweist (Abb. 3.55).

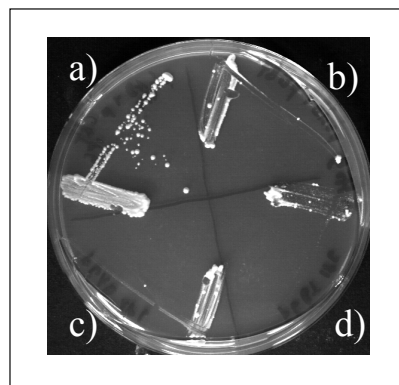


Abb. 3.55 : Zwei-Hybrid-Analyse Nep1p (pDE32) mit Nep1p (pDE33). a) PJ69-4a mit pDE32 und pDE33, b) Δ PJ69-4a mit pDE33 und pGBT9, c) PJ69-4a mit pDE32 und pGAD424, d) PJ69-4a mit pGAD424 und pGBT9 auf SCD ohne Histidin nach 3 Tagen Inkubation bei 30°C.

Da aus der Analyse von GFP-Nep1p bekannt war, dass das Protein an Mikrotubuli assoziiert ist, wurden α -Tubulin (Tub1p) und β -Tubulin (Tub2p) auf eine mögliche Wechselwirkung mit Nep1p im Zwei-Hybrid-System untersucht. Dazu wurde *TUB1* und *TUB2* in die Zwei-Hybrid Vektoren pGAD424 und pGBT9 kloniert und mögliche Wechselwirkungen mit Nep1p im Zwei-Hybrid-System untersucht (Tab. 3.6).

	pDE32 (GBT9- <i>NEP1</i>)	pDE34 (GBT9- <i>TUB1</i>)	pDE36 (GBT9- <i>TUB2</i>)
pDE33 (GAD424- <i>NEP1</i>)	+	-	-
pDE35 (GAD424- <i>TUB1</i>)	-	n. b.	+
pDE37 (GAD424- <i>TUB2</i>)	-	-	n. b.

Tab. 3.6 : Interaktionsstudie von Nep1p mit α -Tubulin (Tub1p) und β -Tubulin (Tub2p) im Zwei-Hybrid-System. Stamm PJ69-4a mit der in der Tabelle aufgeführten Plasmidkombination wurde auf SCD ohne Histidin Platten ausgestrichen. Die Auswertung erfolgte nach zwei Tagen Inkubation bei 30°C. Zeichenerklärung: + = Wachstum; - kein Wachstum; n. b. = nicht bestimmt

Es konnte keine direkte Wechselwirkung zwischen Mikrotubulimonomeren und Nep1p nachgewiesen werden, was dafür spricht, dass die Assoziation an die Spindel indirekt über andere Proteine erfolgt. Als Kontrolle sollte die Wechselwirkung zwischen α -Tubulin (Tub1p) und β -Tubulin (Tub2p) gezeigt werden (Schwartz *et al.*, 1997), die nur mit pDE35 (GAD424-*TUB1*) / pDE36 (GBT9-*TUB2*) gelang. Dies spricht dafür, dass eines der beiden Konstrukte pDE34 oder pDE37 kein funktionelles Tubulin erzeugt. Auf SCD Platten ohne Adenin wächst keiner der PJ69-4a Stämme mit den in der Tabelle aufgeführten Plasmidkombinationen.

Suche nach Nep1p interagierenden Proteinen

pDE32 (GBT9-*NEP1*) in Stamm PJ69-4a wurde als Köder eingesetzt, um mit Hilfe einer Zwei-Hybrid-Genbank (Matchmaker™, CLONTECH, Palo Alto, USA) Proteine zu identifizieren, die mit Nep1p interagieren. Die Genbank wurde in PJ69-4a mit pDE32 transformiert und Transformanten auf SCD ohne Adenin plattiert. Ein kleiner Teil des

Transformationsansatzes wurde auf SCD Medium ohne Leucin und ohne Tryptophan plattiert, wodurch die Anzahl der insgesamt erhaltenen Transformanten auf 1,1 Millionen geschätzt werden konnte. Nach 5 Tagen Inkubation bei 30°C hatten sich lediglich 2 Kolonien auf den Selektivplatten gebildet. Nach austreichen dieser Klone auf SCD ohne Histidin (das zweite Selektivmedium) zeigte sich, dass nur einer der Klone in der Lage war hier zu wachsen. Aus diesem Klon wurde das Genbankplasmid isoliert und in Stamm PJ69-4a sowie in Stamm PJ69-4a mit pDE32 retransformiert. Alle erhaltenen Transformanten, die pDE32 sowie das Genbankplasmid enthielten, waren wieder fähig auf Selektivmedien (SCD ohne Adenin sowie auf SCD ohne Histidin) zu wachsen, Klone, die nur das Genbankplasmid enthielten, jedoch nicht. Eine Retransformante mit dem Genbankplasmid und pDE32 wurde in frischem SCD Medium ohne Leucin und Tryptophan angezogen und die β -Galaktosidaseaktivität des Rohextraktes bestimmt. Die spezifische Aktivität lag mit 18,17 U/mg deutlich höher als die 8 U/mg der Referenz (PJ69-4a mit pDE32 und pGAD424). Somit wurde ein Genbankplasmid isoliert, das in der Lage war alle drei Reporter in Stamm PJ69-4a zu aktivieren. Die Sequenz des wechselwirkenden Fragments wurde durch Sequenzierung des Genbankplasmids bestimmt. Insgesamt ist das Fragment 485 bp groß und besteht seinerseits aus zwei aneinanderligierten, chromosomalen Fragmenten. Einem 300 bp Fragment, das unmittelbar an den Leserahmen der Gal4 Aktivierungsdomäne anschließt und für die Aminosäure 630 - 730 des essentiellen Gens *YDL148c* auf Chromosom 4 kodiert (Tuller *et al.*, 1999) und ein 185 bp großes Fragment von Chromosom 16, das darauf folgt. Das Gesamtfragment liegt so in dem Vektor, dass ein offener Leserahmen entsteht, bestehend aus der Gal4p-Aktivierungsdomäne, dem codierenden Bereich für Aminosäure 630-730 von *YDL148w* sowie 17 weiterer Aminosäuren kodiert durch Kodone aus dem 185 bp Fragment. Um zu bestätigen, dass die Wechselwirkung auch bei den vollständigen Proteinen existiert, wurde eine Zwei-Hybrid-Analyse mit diesen durchgeführt. Dazu wurde der offene Leserahmen *YDL148c* in pGAD424 kloniert (pDE39) und in Stamm PJ69-4a mit pGBT9 sowie Stamm PJ69-4a mit pDE32 (GBT9-*NEP1*) transformiert. pDE38 (*YDL148c* in pGBT9) wurde in Stamm PJ69-4a mit pGAD424 und Stamm PJ69-4a mit pDE33 (GAD424-*NEP1*) transformiert. Durch Ausstreichen auf Selektivmedien wurden die Stämme auf mögliche Protein-Protein Wechselwirkungen untersucht (Tab. 3.7, Abb. 3.56).

	pDE32 (GBT9- <i>NEP1</i>)	pDE38 (GBT9- <i>YDL148c</i>)	GBT9
pDE33 (GAD424- <i>NEP1</i>)	+	+	-
pDE39 (GAD424- <i>YDL148c</i>)	+	-	-
GAD424	-	-	-

Tab. 3.7 : Analyse der Interaktionen von Nep1p und Ydl148p im Zwei-Hybrid-System. Stamm PJ69-4a mit der in der Tabelle aufgeführten Plasmidkombination wurde auf SCD Platten ohne Histidin ausgestrichen. Die Auswertung erfolgte nach zwei Tagen Inkubation bei 30°C. Zeichenerklärung: + = Wachstum; - kein Wachstum.

Auf SCD ohne Adenin konnte keiner der Stämme wachsen. Die spezifische β -Galaktosidase Aktivität wurde für PJ69-4a mit pDE39 (*YDL148c* in pGAD424)/ pDE32 (*NEP1* in pGBT9) mit 15,7 U/mg und für PJ69-4a mit pDE39 (*YDL148c* in pGAD424)/ pGBT9 mit 8,8 U/mg bestimmt. Diese Ergebnisse belegen, dass das vollständige Protein Ydl148p mit Nep1p wechselwirkt, wenngleich die Wechselwirkung nicht so stark ist, wie mit dem aus dem Zwei-Hybrid-Screen isolierten 100 Aminosäuren Fragment.

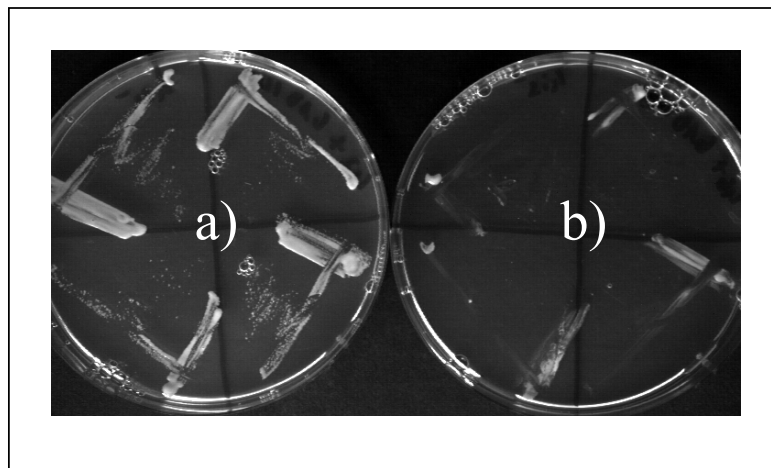


Abb. 3.56 : Zwei-Hybrid-Analyse zwischen den vollständigen Proteinen Nep1p und Ydl148p. a) PJ69-4a mit pDE39 (*YDL148c* in pGAD424)/ pDE32 (*NEP1* in pGBT9), b) PJ69-4a mit pDE39 (*YDL148c* in pGAD424)/ pGBT9 auf SCD Platten ohne Histidin nach 3 Tagen Inkubation bei 30°C.

Ydl148p ist 810 Aminosäuren groß und hat ein vorhergesagtes Molekulargewicht von 94,3 kDa. Es handelt sich wiederum um ein essentielles Gen von *S. cerevisiae*, dessen Funktion unbekannt ist (Tuller *et al.*, 1999). Eine blastp Analyse zeigt, dass Homologe des Proteins bei allen eukaryontischen Organismen zu finden sind (Abb. 3.57, Abb. 3.58, Tab. 3.8). In den Domänen der Archaea und Eubacteria findet man keine homologen Proteine.

	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. pombe</i>	<i>C. elegans</i>	<i>D. melanogaster</i>	<i>H. sapiens</i>	<i>A. thaliana</i>
<i>S. cerevisiae</i>	100	28	19	19	24	21
<i>S. pombe</i>	28	100	22	21	27	23
<i>C. elegans</i>	19	22	100	23	24	20
<i>D. melanogaster</i>	19	21	23	100	32	23
<i>H. sapiens</i>	24	27	24	32	100	26
<i>A. thaliana</i>	21	23	20	23	26	100

Tab. 3.8 : Homologie der eukaryontischen Ydl148p Proteine zueinander in Prozent Identität.

Schaut man sich die Aminosäurezusammensetzung des Hefeproteins genauer an, so fällt auf, dass mit 36,7 % überdurchschnittlich viele Aminosäuren eine Ladung tragen (Lysin, Arginin, Aspartat, Glutamat) (Abb. 3.58). Insbesondere in der N-terminalen und C-terminalen Region findet man geladene Aminosäuren, wohingegen im mittleren Bereich des Proteins (von Aminosäure 420 - 675) kaum geladene Aminosäuren vorliegen. Zwischen Aminosäure 292 - 365 existiert ein stark negativ geladener Bereich.

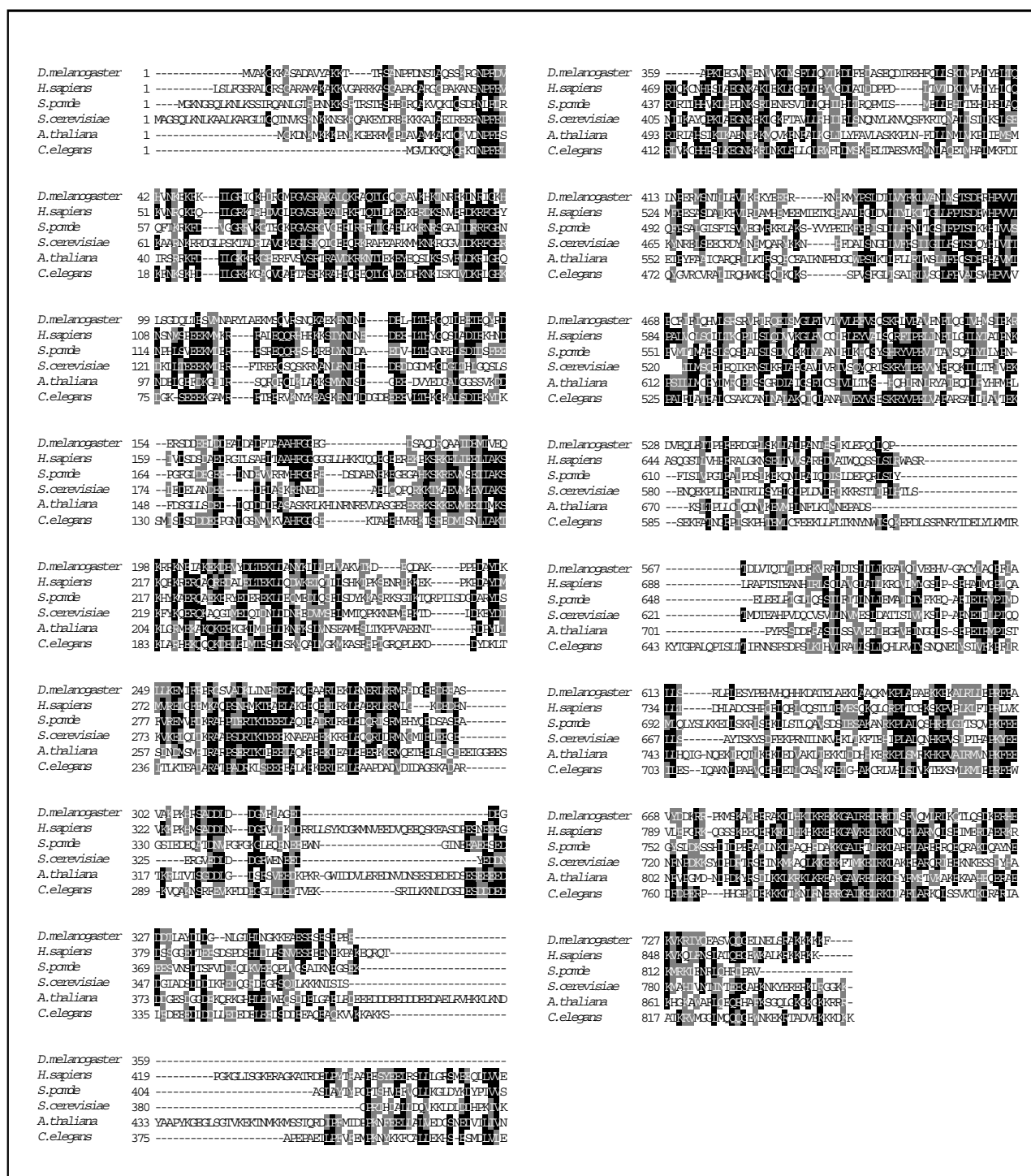


Abb. 3.57 : Sequenzvergleich eukaryontischer Ydl148p Proteine. Die CLUSTAL W Analyse wurde am Server des EBI (European Bioinformatics Institute) durchgeführt, wobei nur Proteine berücksichtigt wurden, für die in der GenBank Datenbank (National Center for Biotechnology Information, Bethesda/Maryland) vollständige Sequenzen annotiert sind. Das CLUSTAL W Ergebnis wurde anschließend mit Hilfe des Programms BOXSHADE 3.21 am Server des European Molecular Biology Network in oben gezeigte Grafik umgesetzt. Schwarz hinterlegte Buchstaben kennzeichnen identische Aminosäuren, grau hinterlegte Buchstaben kennzeichnen konservierte Aminosäuren. Abkürzungen: *H. sapiens* = *Homo sapiens*, *D. melanogaster* = *Drosophila melanogaster*, *C. elegans* = *Caenorhabditis elegans*, *S. cerevisiae* = *Saccharomyces cerevisiae*, *S. pombe* = *Schizosaccharomyces pombe*, *A. thaliana* = *Arabidopsis thaliana*

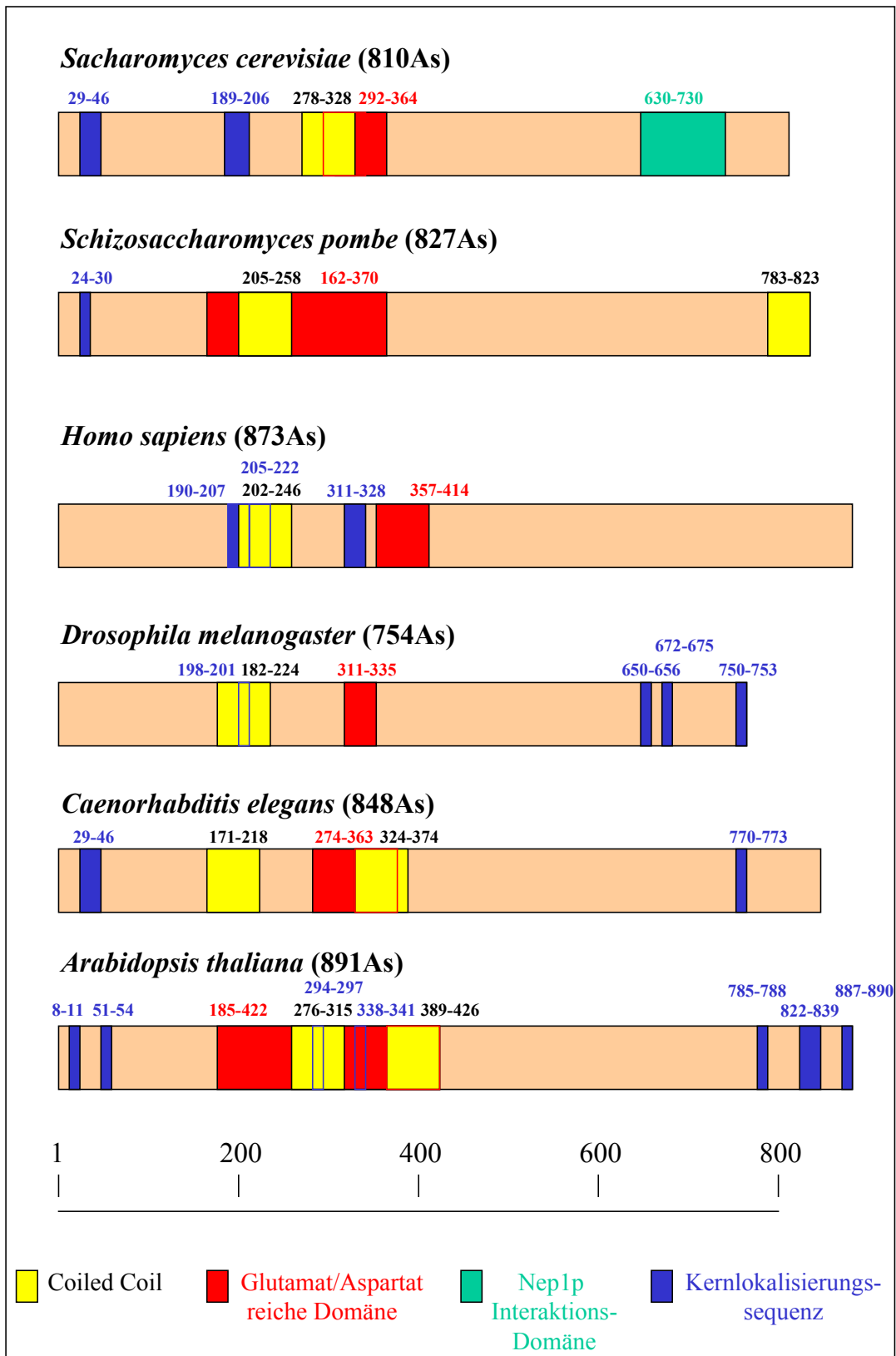


Abb. 3.58: Domänenstruktur und Sequenzmotive in Ydl148p Proteinen eukaryontischer Organismen.

Sucht man nach bekannten Sequenzmotiven, findet man zwei "Bipartite Nuclear Localization Signals" (Dingwall und Laskey, 1991) an Aminosäureposition 29 - 46 und 189 - 206, für die Lokalisierung im Zellkern. Von Aminosäure 278 - 328 befindet sich eine sogenannte Coiled Coil Domäne. Coiled Coils sind Oligomerisierungsmotive, die aus zwei oder mehr α -Helices bestehen, welche linksgängig umeinander gewunden sind. Die Doppelwendel ist die Folge einer repetitiven Sequenz von sieben Aminosäureresten (abcdefg)_n, wobei die Positionen a und d mit unpolaren Resten und die Positionen e und g vorwiegend mit geladenen bzw. polaren Resten besetzt sind. Coiled Coil Domänen wechselwirken mit anderen Coiled Coil Domänen und führen so zur Bildung von Homo- bzw. Heterodimeren. Die Protein-Protein Wechselwirkungsdomäne mit Nep1p liegt im Bereich von Aminosäure 630 - 730. Hier findet man keine weiteren bekannten Sequenzmotive, welche typisch für Protein-Protein Wechselwirkungen wären.

Die Sequenzanalyse von Ydl148p lässt aufgrund von vorhandenen Kernlokalisierungssequenzen vermuten, dass das Protein im Kern lokalisiert ist. Um dies zu bestätigen und somit zu zeigen, dass die Zwei-Hybrid-Wechselwirkung zwischen Nep1p und Ydl148c *in vivo* möglich ist, d.h. beide Proteine gleich lokalisieren, wurde ein Plasmid für die Expression und *in vivo* Lokalisation von GFP-Ydl148p konstruiert (pDE45). Das Plasmid wurde in Stamm WDAM001(HE) (*YDL148c/Δydl148c::loxP-KanR-loxP*) transformiert und eine Tetradenanalyse durchgeführt (Abb. 3.59). Segreganten die pDE45 enthielten (Histidin-prototrophe Klone), welches für GFP-Ydl148p kodiert, waren in der Lage trotz *YDL148c* Deletion (G418 resistente Zellen) zu wachsen. Das bedeutet, dass das GFP-Fusionsprotein funktionell ist und somit eine Fehllokalisierung unwahrscheinlich ist.

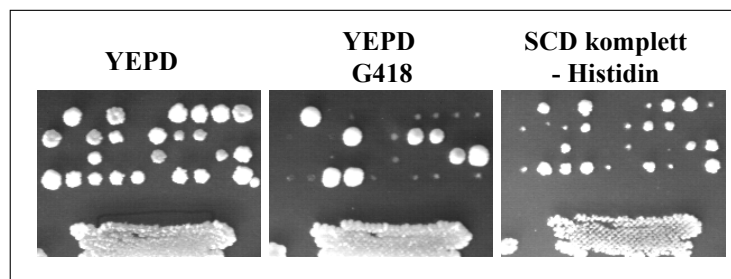


Abb. 3.59 : Tetradenanalyse von WDAM001(HE) (*YDL148c/Δydl148c::loxP-KanR-loxP*) mit pDE45. Tetraden wurden auf einer YEPD-Platte vereinzelt, für zwei Tage bei 30°C inkubiert und anschließend auf YEPD + G418 und SCD ohne Histidin replikatlattiert.

Das fluoreszenzmikroskopische Bild zeigte, dass sich die GFP-Fusion im Zellkern befand (Abb. 3.60 a-l). Hier war die GFP-Fusion nicht gleichmäßig verteilt, sondern markierte häufig einen Bereich im Zellkern intensiver. Etwa 1/4 - 1/2 des Kerns zeigte diese deutlich intensivere Färbung (Abb. 3.60 n). Der Nukleolus ist die einzig beschriebene Struktur im Zellkern, der etwa diese Größe und Struktur besitzt. Erst kürzlich wurde die Lokalisierung von Ydl148p im Nukleolus vermutet (Rout *et al.*, 2000). Die GFP-Fusion zeigte aber noch eine zweite sehr interessante Struktur in Zellen mit großen Knospen. Bei diesen Zellen handelt es sich wahrscheinlich um telophasische Stadien, da die Zellen noch zusammenhängen, die Kernteilung aber schon abgeschlossen ist. Die GFP-Fusion scheint in diesen Zellen die beiden Zellkerne durch einen dünnen Faden zu verbinden (Abb. 3.60 b,e und h). Möglicherweise markiert der Faden die telophasische Spindel, welche die zwei getrennten Zellkerne miteinander verbindet.

Ydl148p lokalisiert wie Nep1p im Zellkern, d.h. die mittels Zwei-Hybrid-Analyse nachgewiesene Wechselwirkung der beiden Proteine ist somit auch *in vivo* sehr wahrscheinlich. Während die Assoziation von Nep1p an Mikrotubuli insbesondere in der Metaphase beobachtet werden kann, ist dies für Ydl148p nicht der Fall. Trotzdem findet man eine Struktur, die möglicherweise darauf hindeutet, dass das Protein in der Telophase unter anderem an die Spindel assoziiert ist.

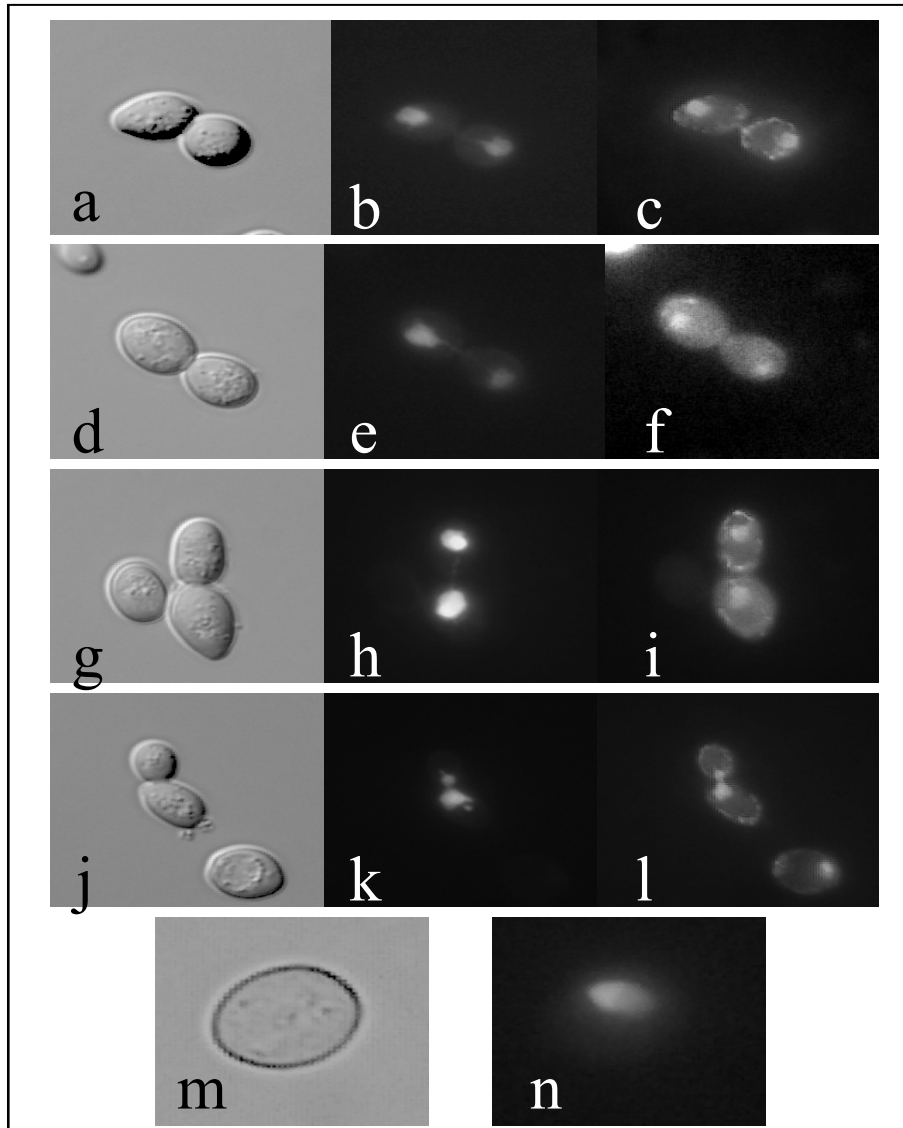


Abb. 3.60 : Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von GFP-Ydl148p. CEN.PK2 mit pDE45 (GFP-Ydl148p) wurde über Nacht in selektivem Flüssigmedium angezogen und die Fluoreszenz in intakten Zellen untersucht (m und n) oder die Zellen wurden Formaldehyd fixiert und mit DAPI gegengefärbt (b, e, h, k = GFP-Ydl148p, c, f, i, l = DAPI-Färbung).

Suche nach Ydl148p interagierenden Proteinen

Da über die Funktion von Ydl148p keine weiteren Informationen vorlagen und somit auch keine Rückschlüsse auf die Funktion von Nep1p gezogen werden konnten, sollte nun nach Proteinen gesucht werden, welche mit Ydl148p interagieren. Dazu wurde pDE38 (pGBT9 mit *YDL148c*) in PJ69-4a als Köder in einem weiteren Zwei-Hybrid-Screen eingesetzt. Von etwa 500.000 transformierten Zellen war nur ein Klon fähig auf SCD ohne Adenin und SCD ohne Histidin zu wachsen. Nach Isolierung des Genbankplasmids und Retransformation in PJ69-4a mit a) pGBT9 und b) pDE38 (pGBT9 mit *YDL148c*) konnte bestätigt werden, dass das

Genbankplasmid spezifisch mit Plasmid pDE38 zum Wachstum auf Selektivmedien führt. Nach Sequenzierung des Genbankplasmids zeigte sich, dass das Plasmid für ein Fusionsprotein zwischen der Gal4p Aktivierungsdomäne und den 108 C-terminalen Aminosäuren des offenen Leserahmens *YPR144c* kodiert. Der gesamte Leserahmen wurde in pGAD424 kloniert und das resultierende Plasmid pDE41 (pGAD424 mit *YPR144c*) in PJ69-4a mit a) pDE38 (pGBT9 mit *YDL148c*), b) pDE32 (pGBT9 mit *NEP1*) und c) pGBT9 transformiert. Nach Ausstreichen der Transformanten auf Selektivmedien wuchs lediglich PJ69-4a mit der Plasmidkombination pDE41 (pGAD424 mit *YPR144c*)/ pDE38 (pGBT9 mit *YDL148c*) auf SCD ohne Histidin. Somit war auch eine schwache Wechselwirkung zwischen den vollständigen Proteinen Ypr144p und Ydl148p gezeigt. Ypr144p ist ein nukleares Protein, dass dort in besonderen punktförmigen Strukturen lokalisiert (Rout *et al.*, 2000). Zu seiner Funktion liegen keine weiteren Daten vor.

3.21 Herstellung und Analyse temperaturempfindlicher (ts) *NEP1*-Allele in *S. cerevisiae*

C2F lokalisiert in *S. cerevisiae* im Zellkern, ist jedoch nicht an Mikrotubuli assoziiert, wie dies bei ScNep1p der Fall ist. Da GFP-C2f die essentielle Aufgabe von Nep1p übernehmen kann, scheint die Mikrotubulibindung keine Voraussetzung dafür zu sein. Um mehr über die essentielle Funktion (und damit der unter Eukaryonten konservierten Funktion) von Nep1p zu erfahren, wurden temperaturempfindliche Mutanten von *NEP1* hergestellt. Durch eine mutagene PCR von *NEP1* und anschließender Klonierung des PCR-Produkts in pRS413 wurde zunächst ein *NEP1*-Mutantenpool angefertigt. Diese *NEP1*-Mutantenbank wurde in SDE3 ($\Delta nep1::loxP-KanR-loxP$ + pDE49) transformiert, auf YEPD plattiert und bei 22°C inkubiert. Transformanten können auf YEPD-Platten nur Kolonien bilden, wenn sie ein funktionelles *NEP1* Gen aus der Mutantenbank besitzen, da in SDE3 *NEP1* deletiert ist und dieser Stamm durch pDE49 (*GALI-C2F*) nur auf Galaktose-haltigen Medien wächst. Angewachsene Klone wurden auf YEPD replikaplattiert und bei 37°C inkubiert. So konnten vier Klone identifiziert werden, die bei 22°C wuchsen, nicht jedoch bei 37°C. Die vier *nep1*-ts Allele wurden anstelle des Wildtyp Allels ins Genom integriert (siehe Material und Methoden). Die resultierenden Stämme (SDE4-SDE7) waren fähig bei 22°C Kolonien bilden, nicht jedoch bei 37°C. Durch Kreuzung der temperaturempfindlichen Mutantenstämme SDE4, SDE5, SDE6 und SDE7 mit dem Wildtyp CEN.PK2-1C und Überprüfung der diploiden Stämme auf Temperaturempfindlichkeit konnte gezeigt werden, dass alle vier Stämme rezessive Mutationen enthielten, da sie bei 37°C gleich gut wie der Wildtyp

CEN.PK2 wuchsen (Daten nicht gezeigt). Die mutierten *NEP1* Allele wurden sequenziert und die abgeleiteten Aminosäuresequenzen sind in Abbildung 3.61 gezeigt.

Nep1p (CEN.PK-1C)	1	MVEDSRVRDALKGGDQKALPASLVPQAPPVLT	SKDKITKRMI	VVLAMASLETHKISSNGP
Nep1p-ts1 (SDE4)	1	MVEDSRVRDALKGGDQKALPASLVPQAPP	A LTSKDKITKRMI	VVLAMASLETHKISSNGP
Nep1p-ts2 (SDE5)	1	MVEDSRVRDALKGGDQKALPASLVPQAPPVLT	SKDKITKRMI	VVLAMASLETHKISS D GP
Nep1p-ts3 (SDE6)	1	MVEDSRVRDALKGGDQKALPASLVPQAPPVLT	SKDKITKRMI	VVLAMASLETHKISSNGP
Nep1p-ts4 (SDE7)	1	MVEDSRVRDALKGGDQKALPASLVPQAPPVLT	SKDKITKRMI	VVLAMA A LETHKISSNGP
Nep1p (CEN.PK-1C)	61	GGDKYVLLNCDDHQGLLKKMGRDISEARPD	I	THQCLLTLLDSPINKAGKLQVYIQT
Nep1p-ts1 (SDE4)	61	GGDKYVLL D CDDHQGLLKKMGRDISEARPD	I NH	QCLLTLLDSPINKAGKLQVYIQT
Nep1p-ts2 (SDE5)	61	GGDKYVLLNCDDHQGLLKKMGRDISEARPD	I	THQCLLT I L
Nep1p-ts3 (SDE6)	61	GGDKYVLLNCDDHQGLLKKMGR V ISEARPD	I	THQCLLT S L
Nep1p-ts4 (SDE7)	61	GGDKYVLLNCDDHQGLLKKMGR V ISEARPD	I	THQCLLTLLDS T T
Nep1p (CEN.PK-1C)	121	LIEVNPTVRI	PRTFKRFSGLMVQLLHKLS	IRSVNSEEKLLKVIKNPITDHLPTKCRKVTL
Nep1p-ts1 (SDE4)	121	LIEVNPTVRI	PRTFKRFSGLMVQLLHKLS	IRSVNSEEKLLKVIKNPITDHLPTKCRKVTL
Nep1p-ts2 (SDE5)	121	LIEVNPTVRI	PRTFKRFSGLMVQLLHKLS	IRSVNSEEKLLKVIKNPITDHLPTKCRKVTL
Nep1p-ts3 (SDE6)	121	LIEVNPTVRI	PRTFKRFSGLMVQLLHKLS	IRSVNSEEKLLKVIKNPITDHLPTKCRKVTL
Nep1p-ts4 (SDE7)	121	LIEVNPTVRI	PRTFKRFSGLMVQLLHKLS	IRSVNSEEKLLKVIKNPITDHLPTKCRKVTL
Nep1p (CEN.PK-1C)	181	SFDAPVIRVQDYIEKLDDDESICV	FVGAMARGKDNFADEYVDEK	VGLSNYPLSASVACSK
Nep1p-ts1 (SDE4)	181	SFDAPVIRVQDYIEKLDDDESICV	FVGAMARGKDNFADEYV G E	KVGLSNYPLSASVACSK
Nep1p-ts2 (SDE5)	181	SFDAPVIRVQDYIEKLDDDESICV	FVGAMARGKDNFADEYVDEK	VGLSNYPLSASVACSK
Nep1p-ts3 (SDE6)	181	SFDAPVIRVQDYIEKLDDDESICV	L VGAMARGKDNFADEYVDEK	VGLSNYPLSAS G ACSK
Nep1p-ts4 (SDE7)	181	SFDAPVIRVQDYIEKLDDDESICV	FVGAMARGKDNFA G E	YVDEK VGLSNYPLSASVACSK
Nep1p (CEN.PK-1C)	241	FCHGAEDAWNIL		
Nep1p-ts1 (SDE4)	241	FCHGAEDAWNIL		
Nep1p-ts2 (SDE5)	241	FCHGAEDA R NIL		
Nep1p-ts3 (SDE6)	241	FCHGAEDAWNIL		
Nep1p-ts4 (SDE7)	241	FCHGAEDAWNIL		

Abb. 3.61 : Aminosäurevergleich der Proteinsequenzen von Nep1p des Wildtyps CEN-PK2-1C sowie der temperaturempfindlichen Stämme SDE4-SDE7.

Auffällig ist, dass die meisten Mutationen am N-Terminus des Proteins liegen, im Bereich von Aminosäure 119-204 ist dagegen kein Aminosäureaustausch zu beobachten. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass dieser Bereich besonders wichtig für die essentielle Funktion des Proteins ist und hier keine Änderung der Sequenz toleriert wird. Die weiteren Untersuchungen konzentrierten sich auf SDE4 (*nep1-ts1*), da dieser Stamm den deutlichsten Wachstums-phänotyp bei 37°C zeigte (Abb. 3.65). Abbildung 3.62 zeigt Wachstumskurven der Stämme SDE4 und CEN.PK-1C bei 22°C (Zimmertemperatur) und nach Temperaturwechsel von 22°C zu 37°C. Dazu wurden die Stämme als 5 ml YEPD Vorkulturen bei 22°C angezogen und daraus frische 100 ml YEPD Kolben so beimpft, dass die Kulturen nach über Nacht Inkubation bei 22°C noch in der logarithmischen Wachstumsphase waren. Am nächsten Morgen wurden die Kulturen zum Zeitpunkt t_0 geteilt und eine Hälfte der Kultur bei 22°C, die andere Hälfte bei 37°C inkubiert.

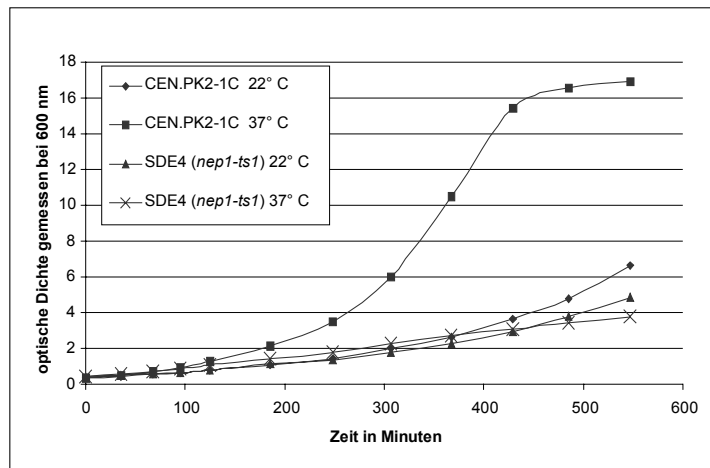


Abb. 3.62 : Wachstumskurven der Stämme SDE4 und CEN.PK-1C. Frühlogarithmische 100 ml YEPD Kulturen (Anzucht bei 22°C) der beiden Stämme wurden zum Zeitpunkt t_0 geteilt und bei 22°C bzw. 37°C inkubiert.

Die Wachstumskurve zeigt, dass SDE4 bei Zimmertemperatur logarithmisch wächst, jedoch bereits etwas langsamer als der Wildtyp, was an den Verdopplungszeiten (t_d) bei 22°C zu erkennen ist (t_d CEN.PK-1C: 131 min, t_d SDE4: 158 min). Werden die Kulturen bei 37°C inkubiert, wächst der Wildtyp schneller (t_d CEN.PK-1C: 76 min), SDE4 hingegen kaum noch. Zwar nimmt die optische Dichte von SDE4 bei 37°C leicht zu, jedoch ist sehr verlangsamtes Wachstum zu erkennen. Um zu überprüfen, ob dieses Restwachstum von SDE4 nach längerer Inkubation bei 37°C endet, wurde 1 ml der SDE4-Kultur bei 37°C entnommen und in frisches 100 ml YEPD Medium überführt. Nach Inkubation dieser Kultur bei 37°C über Nacht wurde eine OD_{600} von 0,89 gemessen, welche sich bei weiterer Inkubation bei 37°C nicht mehr änderte und somit das Restwachstum der Kultur eingestellt war. Abbildung 3.63 (a-c) zeigt das mikroskopische Bild dieser nicht mehr wachsenden Zellen bei 37°C. Die Zellen zeigten einen Defekt in der Zellseparierung und bildeten Zellaggregate. Noch viel deutlicher war dieser Phänotyp zu beobachten, wenn die Zellen für 2 Tage bei 37°C auf YEPD Platten inkubiert wurden (Abb. 3.63 d-f). Dieser finale Separierungsphänotyp von SDE4 (*nep1-ts1*) bei 37°C ist dem Phänotyp von SDE3 ($\Delta nep1::loxP-KanR-loxP$ mit *GALI-C2F* auf pDE49) auf Glucose sehr ähnlich. SDE4 bildet jedoch nicht die stark elongierten Knospen, wie dies bei SDE3 der Fall ist, und hat somit keinen Defekt im apikal-isotropen Wachstumswechsel der Knospe.

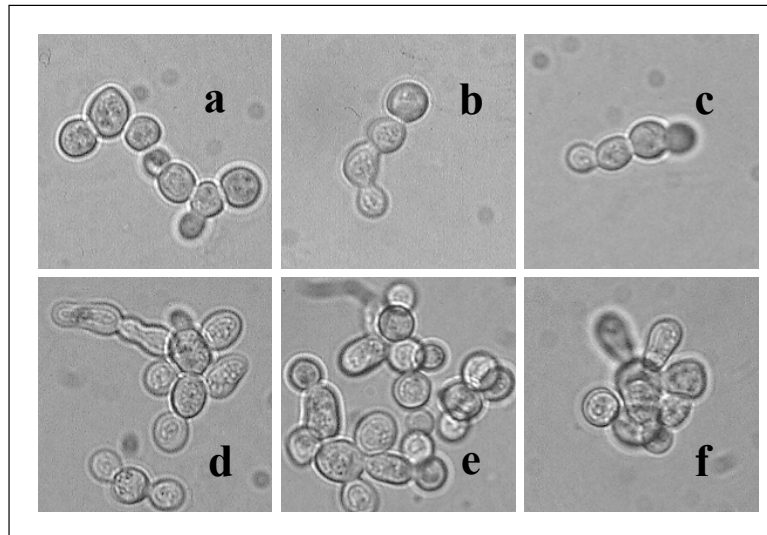


Abb. 3.63 : Phänotypen von SDE4 nach 2 Tagen Inkubation bei 37°C in YEPD Flüssigmedium (a-c) und auf YEPD Platten (d-f).

Zu den Zeitpunkten t_0 (vor Teilung der Kulturen), t_{60} und t_{300} der Wachstumskurve wurden außerdem Proben für eine FACS-Analyse entnommen. Die Zellen wurden mit Ethanol fixiert, mit Propidiumiodid gefärbt und eine FACS (Fluorescence Activated Cell Sorter)-Analyse durchgeführt, um zu untersuchen, ob eine Zellzyklusarretierung bei SDE4 zu erkennen ist (Abb. 3.64). Die SDE4 Zellen häuften sich bereits nach 1 Stunde Inkubation bei 37°C in der G1-Phase an. Diese Anhäufung wurde nach 5 Stunden Inkubation bei 37°C noch deutlicher, hier befand sich der überwiegende Teil der Zellen in der G1-Phase.

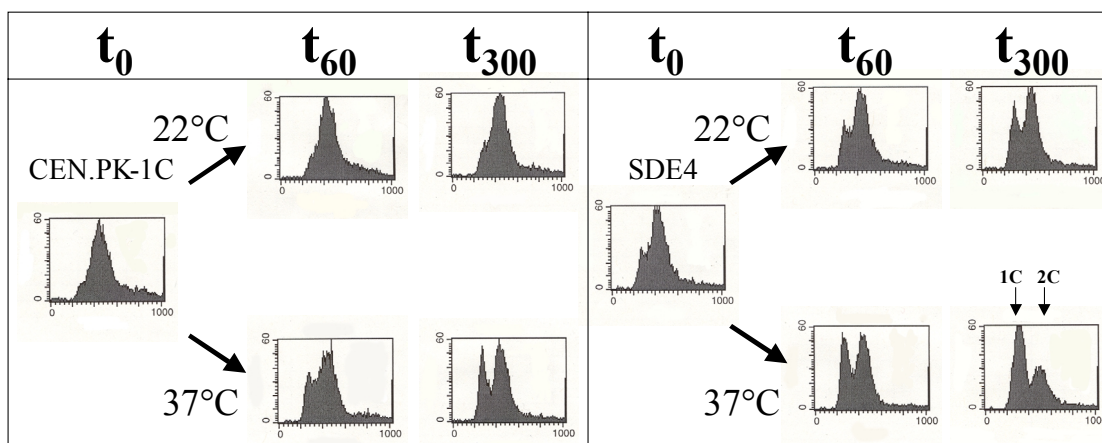


Abb. 3.64 : FACS-Analyse zur Bestimmung der Zellzyklusphase von CEN.PK-1C und SDE4. Die Fluoreszenz der mit Propidiumiodid gefärbten Zellen wurde im FACS Gerät bestimmt und in Histogrammen die Stärke der Fluoreszenz (Abszisse) gegen die Anzahl der Zellen (Ordinate) aufgetragen. Auf der Abszisse (Stärke der Fluoreszenz unterteilt in 1000 Kanäle) lassen sich zwei Verteilungsspitzen erkennen, welche Zellen der G1-Phase (noch nicht replizierte DNS = 1C) und Zellen nach Replikation der DNS darstellen (S-Phase, G2-Phase, Mitose = 2C).

3.22 Multicopy-Suppression von *nep1-ts1*

Der konditional letale Stamm SDE4 (*nep1-ts1*) wurde zur Suche nach Multicopy-Suppressoren eingesetzt, welche die Temperaturempfindlichkeit dieses Stammes supprimieren können. Dazu wurde SDE4 unter permissiven Bedingungen angezogen (22°C), mit einer *S. cerevisiae* 2 μ Genbank mit der Selektionsmarke *LEU2* (YEp13-Vektor, ATCC 37323) transformiert, auf SCD ohne Leucin plattiert und für 5 Tage bei 37°C inkubiert. Aus gewachsenen Klonen wurden Plasmide isoliert, in SDE4 retransformiert und untersucht, ob die Re-Transformanten bei 37°C wachsen können. Fünf Plasmide wurden mittels Restriktionsendonukleasen grob kartiert, bei denen bestätigt wurde, dass sie den *ts*-Phänotyp von SDE4 supprimieren konnten. Dabei stellte sich heraus, dass lediglich zwei unterschiedliche Plasmide vorhanden waren (pDE120 und pDE121).

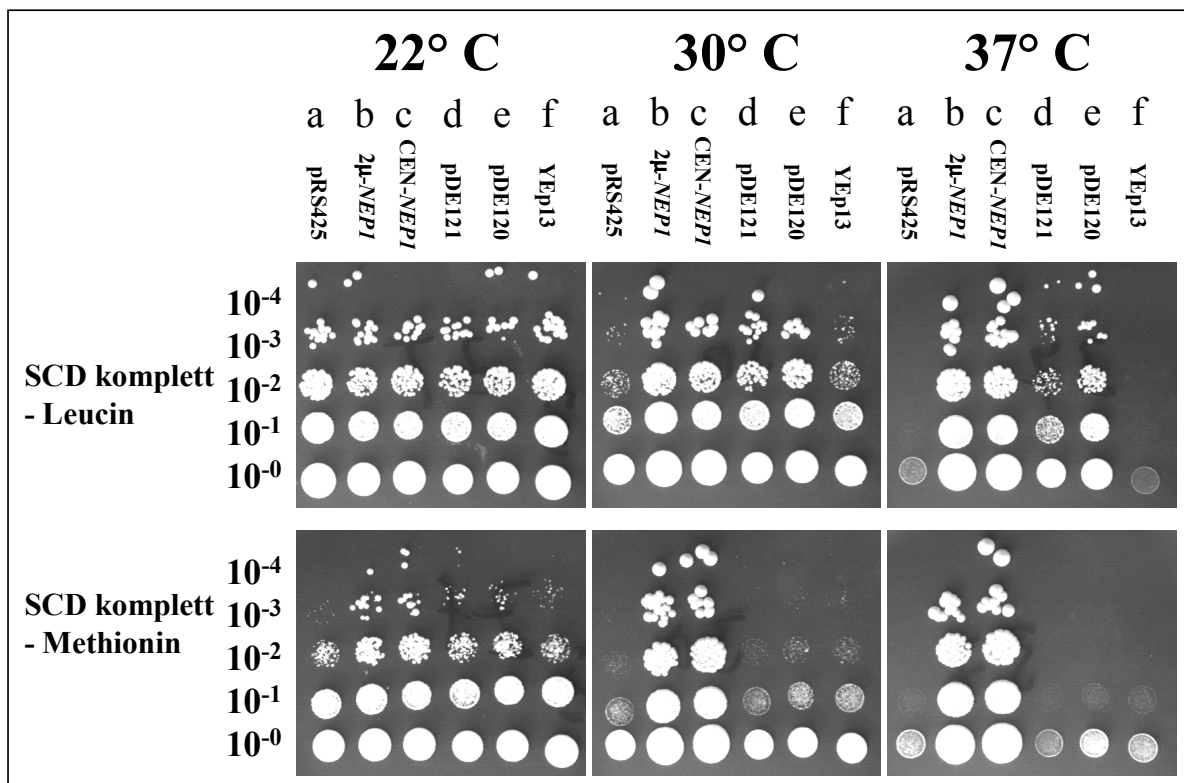


Abb. 3.65 : Suppression des temperaturempfindlichen Phänotyps von SDE4 (*nep1-ts1*) durch pDE120 und pDE121. Die Stämme SDE4 mit a) pRS425 (leerer 2 μ Hefevektor mit Selektionsmarke *LEU2*), b) pDE51 (*NEP1* auf einem 2 μ Hefevektor mit der Selektionsmarke *LEU2*), c) pDE93 (*NEP1* auf einem CEN6/ARS4 Hefevektor mit der Selektionsmarke *LEU2*), d) pDE121 (Suppressor Genbankplasmid), e) pDE120 (Suppressor Genbankplasmid) und f) YEp13 (leerer 2 μ Hefevektor mit der Selektionsmarke *LEU2*) wurden über Nacht in SCD ohne Leucin bei 22°C angezogen. Die Kulturen wurden auf eine OD₆₀₀ von 0,5 verdünnt und 10 μ l serieller Verdünnungen (10⁰, 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴) auf SCD Platten ohne Leucin sowie SCD Platten ohne Methionin getropft. Die Aufnahmen der bei 22°C inkubierten Stämme entstanden nach 4 Tagen, alle anderen nach 3 Tagen Inkubation.

pDE120 verhilft dem Stamm SDE4 bei 37°C zu besserem Wachstum als pDE121 (Abb. 3.65 obere Hälfte). Der Suppressionseffekt durch die beiden Plasmide ist auf SCD Platten ohne Methionin nicht mehr zu beobachten (Abb. 3.65 untere Hälfte). Das Suppressorplasmid pDE120 führt auch zur Suppression der temperaturempfindlichen Phänotypen in SDE5-7, wengleich der Effekt nur bei Stamm SDE5 genauso deutlich ist wie bei SDE4 (Abb. 3.66).

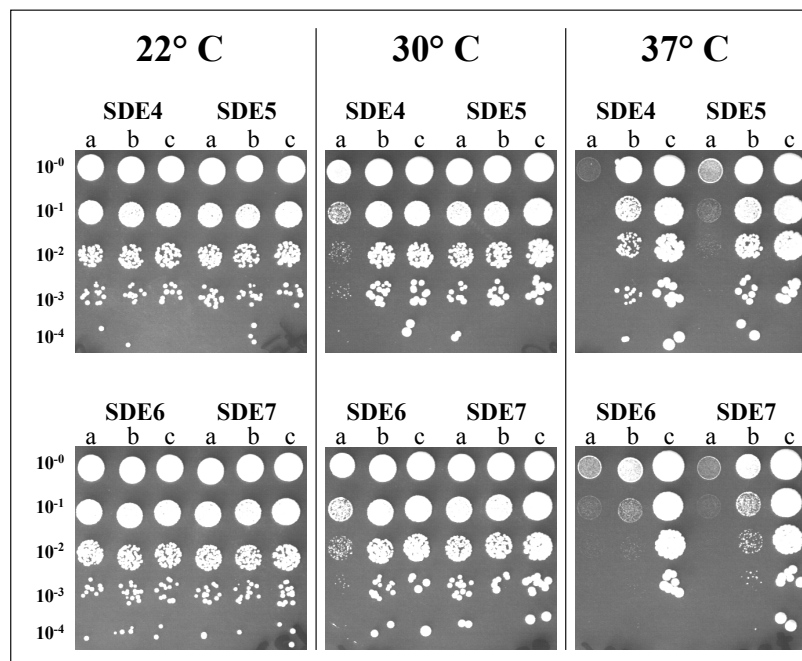


Abb. 3.66 : Suppressionseffekt von pDE120 in den temperaturempfindlichen Mutanten SDE4-7. Die Stämme SDE4-7 mit den Plasmiden a) pRS425, b) pDE120 und c) pDE93 wurden bei 22°C über Nacht in SCD ohne Leucin angezogen. Die über Nacht Kulturen wurden auf eine OD_{600} von 0,5 verdünnt und je 10 μ l serieller Verdünnungen (10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4}) auf SCD Platten ohne Leucin getropft. Die Aufnahmen entstanden nach drei Tagen Inkubation bei 22°C, 30°C bzw. 37°C.

Die Ansequenzierung der 5'- und 3'-Enden des *S. cerevisiae* Inserts in pDE120 zeigte, dass das 2 μ Plasmid die Sequenz 1450344-1454805 von Chromosom IV enthielt. Auf diesem Abschnitt findet man die drei annotierte Gene *RPL37B* (teilweise), *PLM2* und *SAM2*. Das Insert von Plasmid pDE121 enthielt die Sequenz 1449860-145460 von Chromosom IV, welches die annotierten Gene *RPL37B* (komplett), *PLM2* und *SAM2* enthält. Von dem Insert in pDE120 wurden drei Subklone angefertigt (Tab. 3.9; Abb. 3.67).

	vollständig enthaltene ORF's
pSUB1	<i>SAM2</i>
pSUB2	<i>RPL37B</i>
pSUB3	<i>PLM2 + RPL37B</i>

Tab. 3.9 : Vollständig enthaltene ORF's in pSUB1-pSUB3.

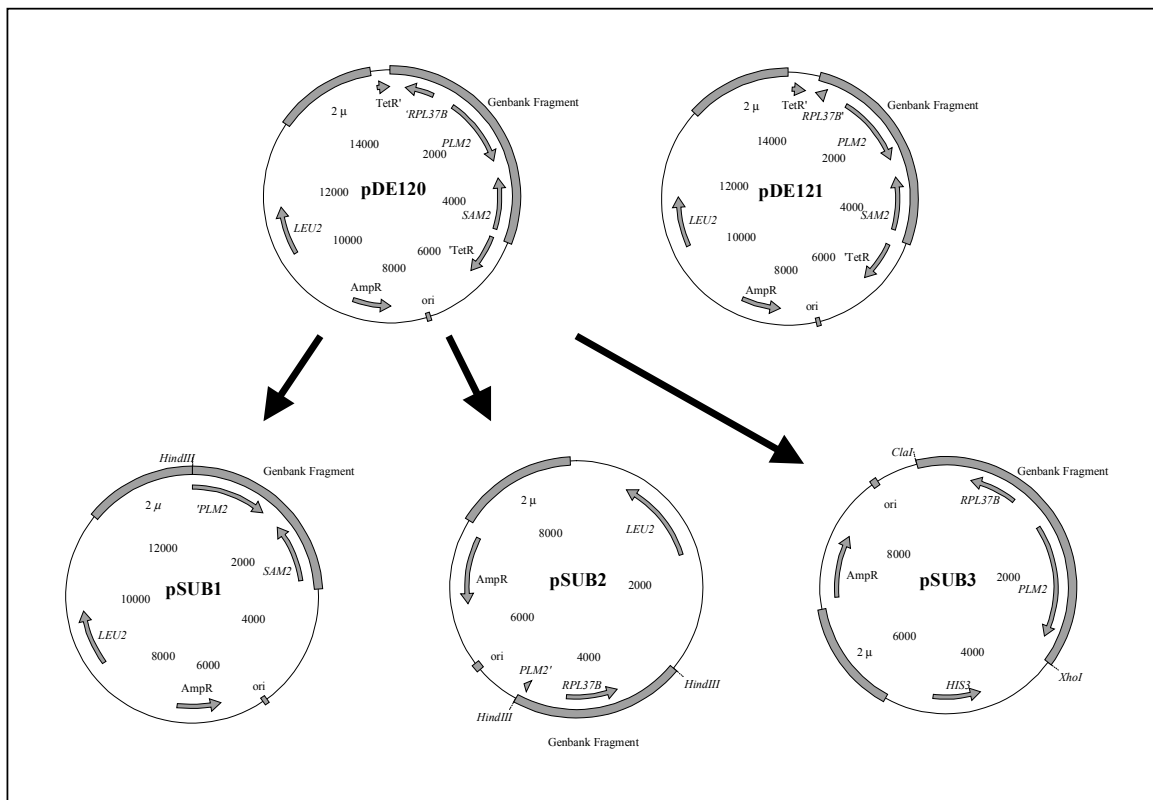


Abb. 3.67 : Multicopy-Plasmide pDE120 und pDE121 sowie die Subklone pSUB1-3 von pDE120.

Die Plasmide pSUB1, pSUB2 und pSUB3 wurden in SDE4 transformiert und je zwei Transformanten wurden auf Temperaturempfindlichkeit bei 37°C getestet (Abb. 3.68).

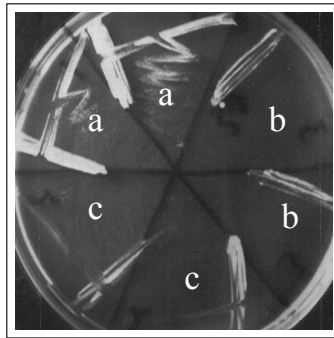


Abb. 3.68 : SDE4 (*nep1-ts1*) mit a) pSUB1, b) pSUB2 und c) pSUB3 auf YEPD Platten nach 2 Tagen Inkubation bei 37°C.

Der temperaturempfindliche Phänotyp von SDE4 konnte nur von pSUB1 supprimiert werden, womit *SAM2* als verantwortliches Gen hierfür identifiziert war. *SAM2* kodiert für eine S-Adenosylmethionin-Synthetase, welche Methionin unter ATP-Verbrauch zu S-Adenosylmethionin umsetzt. Neben *SAM2* existiert in *S. cerevisiae* das Gen *SAM1*, welches ein Isoenzym kodiert, das 93 % Identität zu Sam2p aufweist. Sam2p ist verantwortlich für den größten Teil der S-Adenosylmethion-Synthetase Aktivität. So besitzt ein $\Delta sam2$ Stamm lediglich 6%, ein $\Delta sam1$ Stamm aber noch 55-95% Restaktivität der S-Adenosylmethion-Synthetase im Vergleich zur Wildtypaktivität. Erst ein $\Delta sam1/\Delta sam2$ Stamm ist S-Adenosylmethionin auxotroph (Cherest und Surdin-Kerjan, 1978). pDE120 supprimiert den temperaturempfindlichen Phänotyp von SDE4 besser als pDE121. Ein Unterschied zwischen den Plasmiden liegt in der jeweiligen Promotorlänge des *SAM2* Gens. Während pDE120 nur ein kurzes Promotorfragment enthält (ca. 180 bp), beinhaltet pDE121 ca. 340 bp des *SAM2* Promotors. In den 340 bp Promotorbereich liegt ein mögliches negativ regulierendes Element, welches seine reprimierende Wirkung bei erhöhter Konzentration an S-Adenosylmethionin ausübt (Rückkopplungshemmung) (Thomas und Surdin-Kerjan, 1997). So ist es wahrscheinlich, dass pDE120 besser supprimiert, da dieses Element auf pDE120 nicht vorhanden ist und so die Expression von *SAM2* nicht durch eine Rückkopplungshemmung bei erhöhter Konzentrationen an S-Adenosylmethionin gebremst wird. Die Suppression durch *SAM2* kann prinzipiell auf zwei Arten erfolgen. Entweder ist das Enzym Sam2p selbst beteiligt oder durch Sam2p wird die zelluläre Konzentration von S-Adenosylmethionin stark erhöht, was zur Suppression führt. Um dies zu unterscheiden, wurde untersucht, ob S-Adenosylmethionin ohne die Anwesenheit eines Suppressorplasmids einen Einfluss auf den temperaturempfindlichen Phänotyp von SDE4 hat. Dazu wurde der Phänotyp des Wildtyp CEN.PK2-1C sowie der Stämme SDE4-7 auf YEPD bzw. YEPD + S-Adenosylmethionin (250 μ l S-

Adenosylmethionin einer 20 mg/ml Stammlösung aufplattiert) bei 22°C, 30°C und 37°C untersucht (Abb.3.69).

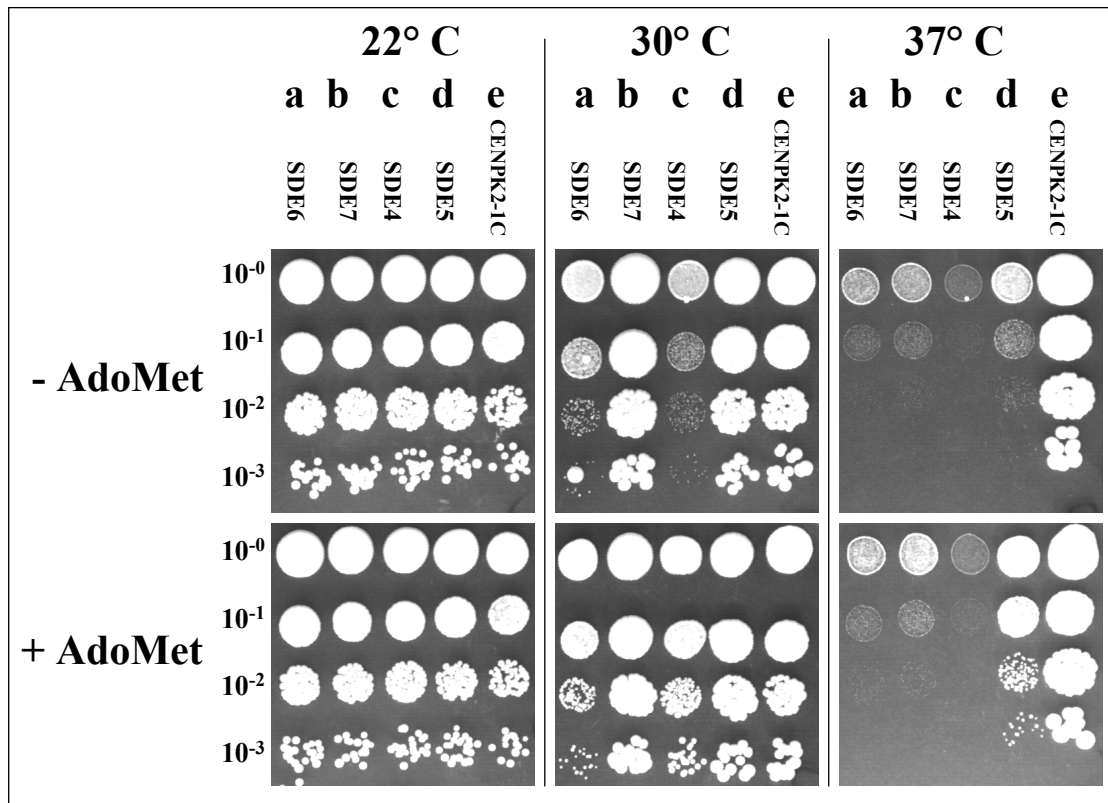


Abb. 3.69 : Phänotypanalyse von Stamm CEN.PK2-1C (Wildtyp) und SDE4-7 auf YEPD sowie YEPD + S-Adenosylmethionin Platten. Die Stämme a) SDE6, b) SDE7, c) SDE4, d) SDE5 und e) CEN.PK2-1C (Wildtyp) wurden bei 22°C über Nacht in YEPD angezogen. Die Kulturen wurden auf eine OD₆₀₀ von 0,5 verdünnt und 10 µl serieller Verdünnungen (10⁰, 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³) auf YEPD Platten bzw. YEPD + S-Adenosylmethionin Platten getropft. Die Aufnahmen entstanden nach drei Tagen Inkubation bei 22°C, 30°C bzw. 37°C.

S-Adenosylmethionin hatte einen Suppressionseffekt auf den temperaturempfindlichen Phänotyp von SDE4 und SDE5, die gleichen Stämme bei denen auch die beste Suppression durch die Überexpression von *SAM2* erreicht wurde. Zwar konnte S-Adenosylmethionin den temperaturempfindlichen Phänotyp von SDE4 bei 37°C nicht beeinflussen, bei 30°C verbesserte es aber sein Wachstum. SDE5 zeigte bei 30°C noch keinen Wachstumsphänotyp. Bei diesem Stamm führte S-Adenosylmethionin zu besserem Wachstum bei 37°C. Damit lässt sich auch erklären, warum die Plasmide pDE120 und pDE121 den temperaturempfindlichen Phänotyp von SDE4 auf SCD ohne Methionin nicht supprimieren können. In Minimalmedien ohne Methionin sind die endogenen Methionin Konzentrationen sehr gering (Thomas und

Surdin-Kirjan, 1991). So fehlt der S-Adenosylmethionin-Synthetase das Substrat, um es mit ATP zu S-Adenosylmethionin umzusetzen. Folglich wird wenig S-Adenosylmethionin gebildet und der temperaturempfindliche Phänotyp von SDE4 kann nicht supprimiert werden. Um zu klären, ob pDE120 spezifisch die temperaturempfindlichen Wachstumsphänotypen der Stämme SDE4-7 supprimiert oder ob die Überproduktion von S-Adenosylmethionin auch den letalen Phänotyp einer Deletion supprimieren kann, wurde untersucht, ob pDE120 (bzw. pSUB1) den konditional letalen Phänotyp von SDE3 ($\Delta nep1$ mit *GALI-C2F* auf pDE49) supprimieren kann. SDE3 wächst ohne sichtbaren Phänotyp auf Galaktose-haltigen Medien, jedoch nicht auf Glucose-haltigen Medien, da hier die Expression von C2F mittels des *GALI*-Promotors auf pDE49 reprimiert ist

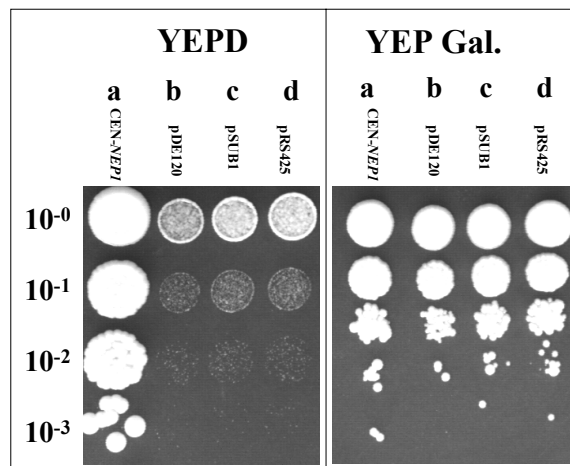


Abb. 3.70 : Phänotypanalyse der Überexpression von *SAM2* in SDE3 ($\Delta nep1$ mit *GALI-C2F* auf pDE49). Die Stämme SDE3 mit a) pDE93, b) pDE120, c) pSUB1 und d) pRS425 wurden über Nacht in SCGal ohne Uracil/Leucin angezogen. Die Kulturen wurden auf eine OD_{600} von 0,5 verdünnt und 10 μ l serieller Verdünnungen (10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}) auf YEPD bzw. YEPGal Platten getropft. Die Aufnahmen entstanden nach drei Tagen Inkubation bei 30°C.

Abbildung 3.70 zeigt, dass die Überexpression von *SAM2* und die damit verbundene erhöhte Konzentration von S-Adenosylmethionin nicht den letalen Phänotyp von $\Delta nep1$ supprimieren kann. S-Adenosylmethionin supprimiert somit spezifisch die temperaturempfindlichen Mutationen von *NEP1* in den Stämmen SDE4-7. Insbesondere der ts-Phänotyp von SDE4, der Stamm mit dem schlechtesten Wachstum bei 37°C, wird durch S-Adenosylmethionin supprimiert.

3.23 GFP-Fusion von *nep1-ts1*

Die temperaturempfindliche Mutation in *nep1-ts1* beeinflusst möglicherweise die Lokalisierung des Proteins in der Zelle, was durch eine Fusion des Mutantenallels an GFP untersucht werden sollte. Dazu wurde *nep1-ts1* in pUG34 kloniert und das resultierende Plasmid pDE123 (GFP-*nep1-ts1*) in SDE3 ($\Delta nep1$ mit *GAL1-C2F* auf pDE49) transformiert, um zu sehen, ob es die Funktion von *NEP1* übernehmen kann und den konditional letalen Phänotyp auf Glucose komplementiert. SDE3 mit pDE123 wurde auf SCD ohne Histidin getropft und untersucht, ob der Stamm nach Inkubation bei verschiedenen Temperaturen einen Wachstumsphänotyp zeigt (Abb. 3.71).

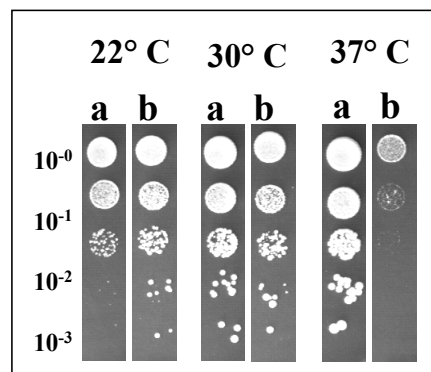


Abb. 3.71 : Wachstumsphänotyp von SDE3 ($\Delta nep1$ mit *GAL1-C2F* auf pDE49) mit pDE123 (GFP-*nep1-ts1*) auf SCD ohne Histidin. Die Stämme a) SDE1 (*MAT α $\Delta nep1::loxP-KanR-loxP$* mit pDE42) und b) SDE3 (*MAT α $\Delta nep1::loxP-KanR-loxP$* mit *GAL1-C2F* auf pDE49) mit pDE123 wurden über Nacht in SCGal ohne Histidin (Expression von C2F) angezogen. Die Kulturen wurden auf eine OD₆₀₀ von 0,5 verdünnt und 10 μ l serieller Verdünnungen (10⁰, 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴) auf SCD ohne Histidin Platten getropft (Repression von C2F). Die Aufnahmen entstanden nach drei Tagen Inkubation bei 22°C, 30°C bzw. 37°C.

pDE123 konnte den konditional letalen Phänotyp von SDE3 bei 22°C und 30°C komplementieren, jedoch nicht bei 37°C (Abb. 3.71). Die GFP-Fusion des temperaturempfindlichen Allels *nep1-ts1* verhält sich folglich wie das temperaturempfindliche Allel alleine.

Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen zeigen Unterschiede in der Lokalisierung von GFP-Nep1p-ts1 und GFP-Nep1p (Abb.3.72). Unter permissiven Temperaturen (22°C) fand man bei GFP-Nep1p-ts1 neben einer erhöhten Hintergrundfluoreszenz des Zytoplasmas eine Anfärbung des Zellkerns, jedoch war keine Mikrotubuli Assoziation zu erkennen. Nach Umsetzen von SDE3 mit GFP-Nep1p-ts1 von 22°C auf 37°C (restriktive Bedingungen)

änderte sich das mikroskopische Bild schnell. Bereits nach 60 min war eine Anfärbung des Zellkerns nicht mehr zu erkennen und die Hintergrundfluoreszenz des Zytoplasmas verschwand. GFP-Nep1p-ts1 war ausschließlich auf der Oberfläche der Zelle in einer Vielzahl von Punkten zu finden. Dies ließ sich besonders gut beobachten, wenn durch die Ebenen der Zelle fokussiert wurde (Abb. 3.72 d und e).

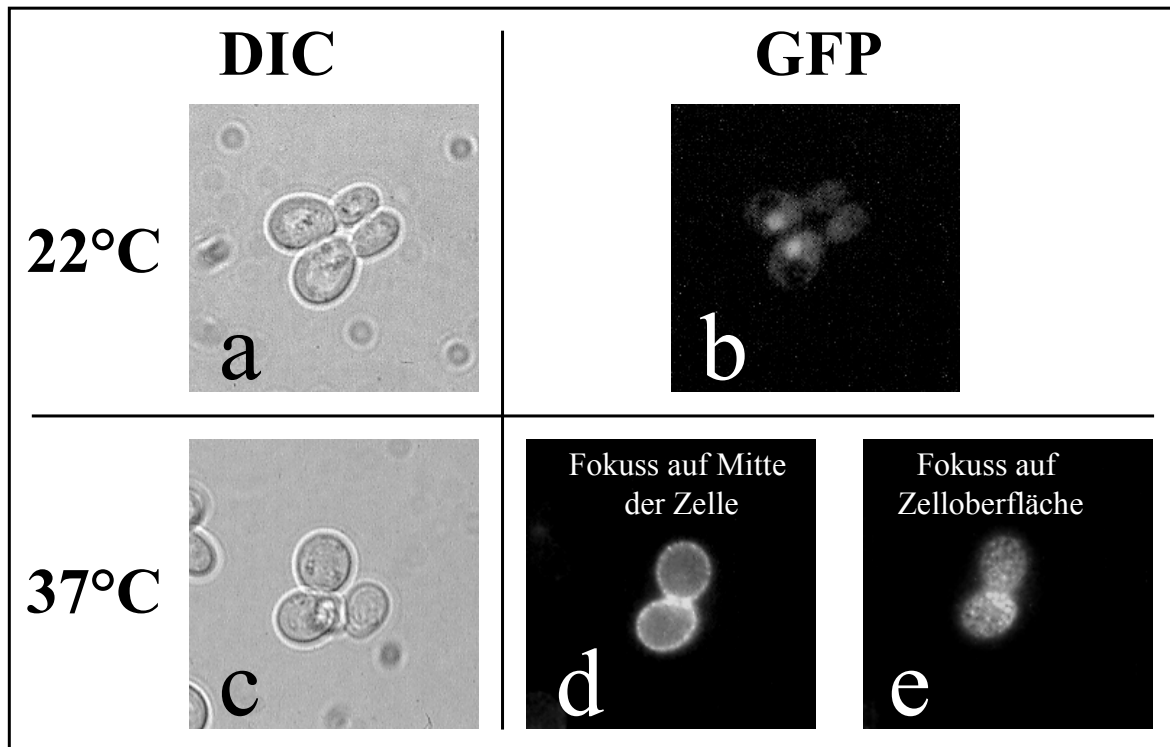


Abb. 3.72 : Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von GFP-Nep1p-ts1 in SDE3 angezogen bei 22°C in SCD ohne Histidin (a und b) sowie 60 min nach Temperaturwechsel zu 37°C (c-e).

C2F komplementiert den letalen Phänotyp von $\Delta nep1$ und ist in *S. cerevisiae* im Zellkern lokalisiert. Dies lässt darauf schließen, dass die essentielle Funktion von Nep1p im Zellkern lokalisiert ist. Die Temperaturempfindlichkeit von GFP-Nep1p-ts1 geht einher mit der Veränderung der Lokalisierung dieses Proteins vom Zellkern zum Cortex der Zelle. Dies lässt den Schluss zu, dass die Fehllokalisierung für die Temperaturempfindlichkeit verantwortlich ist. Die Überexpression von *SAM2*, und damit die erhöhte Konzentration von S-Adenosylmethionin, supprimiert den letalen Phänotyp von SDE4 bei 37°C. Es stellte sich die Frage, ob die Überexpression von *SAM2* auch die Fehllokalisierung von GFP-Nep1p-ts1 bei 37°C supprimiert. Dazu wurde in SDE3 mit pDE123 zusätzlich pDE120 transformiert.

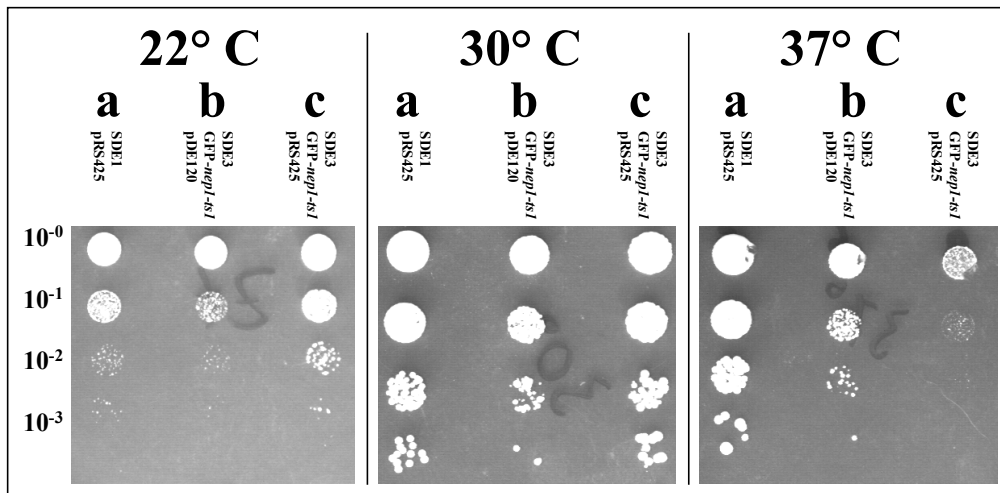


Abb. 3.73 : Phänotypanalyse von SDE3 mit pDE123 und pDE120 auf SCD ohne Leucin. Die Stämme a) SDE1 (*MAT α Δ nep1::loxP-KanR-loxP* mit pDE42) mit pRS425, b) SDE3 (*MAT α Δ nep1::loxP-KanR-loxP* mit *GAL1-C2F* auf pDE49) mit pDE123 und pDE120, sowie c) SDE3 (*MAT α Δ nep1::loxP-KanR-loxP* mit *GAL1-C2F* auf pDE49) mit pDE123 und pRS425 wurden über Nacht in SCGal ohne Histidin/Leucin angezogen. Die Kulturen wurden auf eine OD₆₀₀ von 0,5 verdünnt und 10 μ l serieller Verdünnungen (10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}) auf SCD ohne Leucin Platten getropft. Die Aufnahmen entstanden nach drei Tagen Inkubation bei 22°C, 30°C, bzw. 37°C.

Wie Abbildung 3.73 zeigt, war pDE120 fähig den konditional letalen Phänotyp von SDE3 mit GFP-Nep1p-ts1 bei 37°C zu supprimieren. Die Lokalisierung von GFP-Nep1p-ts1 wurde durch pDE120 jedoch nicht verändert (Daten nicht gezeigt). Unter permissiven Bedingungen (22°C) verteilte sich die Fluoreszenz auf den Zellkern und das Zytoplasma, unter restriktiven Bedingungen (37°C) war der Zellkortex punktartig angefärbt. Die erhöhte Konzentration an S-Adenosylmethionin hat somit keinen Einfluss auf die Lokalisation von Nep1p in der Zelle.

4. Diskussion

4.1 Die Gluconeogenese und der Glyoxylat-Zyklus in *C. albicans*

Gegenstand dieser Arbeit ist u.a. die Identifizierung und Charakterisierung der Gluconeogenese und Glyoxylat-Zyklus Gene/Proteine von *C. albicans*. Durch funktionelle Komplementation konnten die Gene *CaFBP1*, *CaPCK1*, *CaMLS1* und *CaICL1* isoliert werden. Die vorhergesagten Aminosäuresequenzen der dazugehörigen Proteine weisen hohe Sequenzidentitäten zu gluconeogenischen und Glyoxylat-Zyklus Enzymen anderer Pilze auf, insbesondere zu denen des nah verwandten Pathogen *Candida tropicalis* (Tab. 3.1).

Die Aktivitäten der Gluconeogenese und Glyoxylat-Zyklus Enzyme in *C. albicans* sind Kohlenstoffquellen-abhängig reguliert (Abb. 3.2 und 3.3). Bei Wachstum mit Glucose als Kohlenstoffquelle sind keine Enzymaktivitäten nachweisbar, zieht man die Zellen dagegen auf einer nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquelle an, sind alle Enzyme aktiv. In Mischmedien aus Glucose und einer nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquelle (Bsp. Ethanol) ist keine Enzymaktivität feststellbar. Dies belegt, dass die Enzyme der Gluconeogenese und des Glyoxylat-Zyklus in *C. albicans* der Glucoserepression unterliegen. Nicht alle nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquellen haben die gleiche aktivierende Wirkung auf die Enzyme der Gluconeogenese und des Glyoxylat-Zyklus. So kann die Reihenfolge Ethanol > Acetat > Glycerin in Bezug auf die Aktivierung der Gluconeogenese und Glyoxylat-Zyklus Enzyme aufgestellt werden. Bei Wachstum in einem Mischmedium aus Glycerin und Ethanol ist in *C. albicans* Rohextrakten eine Fbp1p Enzymaktivität messbar, die der bei Wachstum auf Ethanol gleicht. Ethanol scheint hier eine aktivierende Funktion zu besitzen. Auch die Icl1p Aktivität ist in dem Mischmedium deutlich höher als in einem Medium mit nur Glycerin als Kohlenstoffquelle, jedoch nur etwa halb so stark wie in einem Medium mit Ethanol als einziger Kohlenstoffquelle. Hier lässt sich nicht abschließend sagen, ob Ethanol aktivierend oder Glycerin reprimierend auf die Icl1p Aktivität wirkt.

Exprimiert man die Gluconeogenese und Glyoxylat-Zyklus Gene von *C. albicans* in den entsprechenden *S. cerevisiae* Deletionsmutanten, so sind deren Enzymaktivitäten immer noch Kohlenstoffquellen-abhängig reguliert (Abb 3.4). Um zu unterscheiden, ob die Regulation der heterolog exprimierten Enzyme in *S. cerevisiae* auf Ebene der Transkription oder auf einem posttranskriptionellen Mechanismus beruht, wurde die Aktivität der *C. albicans* Gene/

Enzyme in *S. cerevisiae* $\Delta cat8$ untersucht. Cat8p ist der zentrale Transkriptionsaktivator der Gluconeogenese und Glyoxylat-Zyklus Gene in *S. cerevisiae*. In einem $\Delta cat8$ Stamm findet keine Transkription dieser Gene mehr statt und folglich sind keine Enzymaktivitäten der Enzyme nach Umsetzen der Zellen auf eine nicht-fermentierbare Kohlenstoffquelle nachweisbar (Abb. 3.4). Auch nach Einbringen von *CaFBP1*, *CaMLS1* und *CaICL1* in *S. cerevisiae* $\Delta cat8$ ist keine dazugehörige Enzymaktivität nach Umsetzen der Zellen auf eine nicht-fermentierbare Kohlenstoffquelle feststellbar. Folglich ist die Aktivität der *C. albicans* Enzyme in *S. cerevisiae* *CAT8*-abhängig, was bedeutet, dass *S. cerevisiae* die Aktivität der *C. albicans* Gluconeogenese und Glyoxylat-Zyklus Enzyme auch auf der Ebene der Transkription reguliert, mit den gleichen Mechanismen, die es für seine eigenen Gene benutzt. Die *C. albicans* Gene müssen folglich auch die regulatorischen Sequenzen für die Kohlenstoffquellen-abhängige Transkription besitzen. Untersucht man die Promotoren dieser Gene auf mögliche UAS ("upstream activating sequence") -Motive, von denen man weiß, dass sie in *S. cerevisiae* essentiell für die Kohlenstoffquellen-abhängige Transkription der Gluconeogenese und Glyoxylat-Zyklus Gene sind, findet man solche in allen *C. albicans* Genen mit Ausnahme von *CaMLS1* (Abb. 3.5). Dies lässt den Schluss zu, dass in dem Promotor von *CaMLS1* andere, bisher nicht bekannte, cis-regulatorischen Elemente für die Cat8p-abhängige Genexpression existieren. Erste Hinweise, dass solche Elemente existieren, wurden bei der Promotoranalyse von *ScACR1* gefunden (Bojunga *et al.*, 1998). *ACR1* wurde als gluconeogenisches Gen identifiziert, dessen Transkription coreguliert zu allen anderen Gluconeogenese und Glyoxylat-Zyklus Genen ist. Seine Transkription ist *CAT8*-abhängig, wofür drei UAS-Motive im Promotor existieren, für die alle eine Kohlenstoffquellen-abhängige Expression eines heterologen Reportergens bestätigt wurde. Doch auch wenn alle drei UAS-Motive aus dem Promotor entfernt werden, kann immer noch 31 % Restaktivität (β -Galaktosidase) beobachtet werden. Dies lässt darauf schließen, dass neben den bekannten UAS-Motiven weitere Sequenzen für die Cat8p-abhängige Aktivierung des Gens bei Wachstum auf gluconeogenischem Substrat existieren.

Die Aktivität von CaPck1p in *S. cerevisiae* ist nicht ScCAT8-abhängig, aber Kohlenstoffquellen-abhängig reguliert (Abb. 3.4). Dies ist ein interessantes Phänomen, da auch *ScPCK1* das einzige Gluconeogenese/Gyoxylat-Zyklus Gen ist, das nicht strikt Cat8p-abhängig reguliert ist. Ein negativ-regulatorisches Element wurde im Promotor von *ScPCK1* identifiziert, das Ähnlichkeiten mit einer Ume6p Bindestelle hat. Wird dieses Motiv entfernt, zeigt der Promotor transkriptionelle Aktivität auf Glucose (Proft *et al.*, 1995a). Dieses

Element existiert nicht im Promotor von *CaPCK1*. Um zu untersuchen, ob die Aktivität von CaPck1p durch das Cat1p-abhängige Glucose Repression-/Derepressionssystem reguliert ist, wurde die CaPck1p Aktivität in *S. cerevisiae* Δ *cat1* gemessen. In *S. cerevisiae* Δ *cat1* können die Gluconeogenese und Glyoxylat-Zyklus Gene nicht mehr dereprimiert werden (Zimmermann *et al.*, 1977). Folglich ist bei diesem Stamm keine Aktivität der Gluconeogenese und Glyoxylat-Zyklus Enzyme in Rohextrakten messbar (sowohl in Glucose angezogenen Zellen als auch nach Umsetzen auf eine nicht-fermentierbare Kohlenstoffquelle). Es zeigte sich, dass *CaPCK1* in *S. cerevisiae* Δ *cat1* zu keiner CaPck1p Aktivität führt. Die Regulation von CaPck1p erfolgt demnach Cat1p-abhängig über das allgemeine Glucose Repressions-/Derepressionssystem der Hefe *S. cerevisiae*. Ein möglicher Kandidat, der für die Kohlestoffquellen-abhängige, *CAT1*-abhängige und *CAT8*-unabhängige Regulation von *CaPCK1* in *S. cerevisiae* verantwortlich sein könnte, ist der Mig Repressor Komplex. So existieren auch zwei mögliche URS-Elemente im Promotor von *CaPCK1* (Abb. 3.5 und Tab. 3.3), die als Mig1p Bindestellen dienen könnten. Möglicherweise existiert jedoch auch ein posttranskriptioneller Mechanismus, der die Aktivität dieses Enzyms in *S. cerevisiae* reguliert. Bringt man ein Fusionskonstrukt, welches aus dem *CaPCK1* Promotor und dem *LAC4* Reporter gen besteht, in *S. cerevisiae* ein, so findet man durch das Reporter gen verursachte β -Galaktosidase Aktivität auch bei Wachstum auf Glucose (Leuker *et al.*, 1997). Das bedeutet, dass *CaPCK1* in *S. cerevisiae*, zumindest teilweise, Kohlenstoffquellen-unabhängig transkribiert wird und ein posttranskriptioneller Mechanismus für die Regulation der Enzymaktivität verantwortlich ist. Diese Kohlenstoffquellen-unabhängige Transkription wird möglicherweise durch andere aktivierende Sequenzen im Promotor von *CaPCK1* vermittelt. So findet man eine putative Gcn4p Bindestelle (-39 bp - -30 bp), die normalerweise die Transkription von Genen des Purin- und Aminosäurestoffwechsels aktiviert. Auch ein *HSE2* Element befindet sich im Promotor von *CaPCK1*, welches gewöhnlich eine Bindestelle für den Hitzeschockfaktor Hsf1p darstellt und die Transkriptionsinduktion von Hitzeschockgenen gewährleistet. Von beiden erwähnten Elementen weiß man, dass sie in ihrer natürlichen Umgebung auch ohne Induktion zu einer basalen Transkription führen. Desweiteren findet man zwei überlappende Konsensussequenzen für die Bindung von Hap2p/Hap3p/Hap4p (-494 - -479 und -504 - -489), die eine Cat8p-unabhängige Transkription von *CaPCK1* bei Wachstum auf nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquellen ermöglichen könnten. Somit bleibt festzuhalten, dass bei heterologer Expression von *CaFBP1*, *CaICL1* und *CaMLS1* in *S. cerevisiae* die Aktivität der Enzyme Glucose reprimiert ist und deren Derepression ScCat8p-abhängig ist. Dies belegt, dass neben der Sequenzidentität auch die Regulation der

Enzyme zwischen *S. cerevisiae* und *C. albicans* sehr konserviert ist. Eine Ausnahme hiervon bildet *CaPCK1*. Zwar unterliegt die Aktivität von CaPck1p auch dem allgemeinen Cat1p-abhängigen Repressions-/ Derepressionssystem, welcher untergeordnete Mechanismus letztendlich für die Regulation von CaPck1p verantwortlich ist muss künftig noch geklärt werden.

All diese Untersuchungen wurden in *S. cerevisiae* gemacht. Die Regulation der Gluconeogenese in *C. albicans* erfolgt auch auf Ebene der Transkription, was exemplarisch mit Hilfe einer Northern Analyse für *CaFBP1* gezeigt wurde (Abb. 3.6). *CaFBP1* wird nicht exprimiert, wenn die Zellen in einem Medium mit Glucose als Kohlenstoffquelle angezogen werden. Bei Wachstum in einem Ethanol-haltigen Medium ist das Transkript von *CaFBP1* nachweisbar. Auch hier ist die Expression von *CaFBP1* stark abhängig von der Art der nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquelle. Während bei Wachstum mit Ethanol als Kohlenstoffquelle sehr viel Transkript von *CaFBP1* gebildet wird, ist das Transkript bei Wachstum mit Glycerin als Kohlenstoffquelle kaum nachweisbar. Somit sind die niedrigen Enzymaktivitäten der FBPase bei Wachstum mit Glycerin als Kohlenstoffquelle (und wahrscheinlich aller *C. albicans* Gluconeogenese und Glyoxylat-Zyklus Enzyme) eine Folge der schwachen Expression des Gens. Neben der Glucoserepression scheint Ethanol eine induzierende Rolle bei der transkriptionellen Regulation der Gluconeogenese und des Glyoxylat-Zyklus in *C. albicans* zu spielen. Dieses Phänomen kennt man in *S. cerevisiae* nicht, was einen Unterschied in der Regulation dieser Stoffwechselwege zwischen *C. albicans* und *S. cerevisiae* darstellt.

Um die physiologische Rolle der Gluconeogenese in *C. albicans* weiter zu charakterisieren, wurde *CaFBP1* exemplarisch deletiert. Es zeigte sich, dass *CaFBP1* nicht generell essentiell für das vegetative Wachstum von *C. albicans* ist, sondern wie in *S. cerevisiae* essentiell für das Wachstum auf nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquellen. Zieht man *C. albicans* CAE3 (*Δfbp1/Δfbp1*) in Glucose-haltigen Medien an und setzt den Stamm auf Ethanol um, führt dies zu einer Hyperinduktion der CaIcl1p Aktivität im Vergleich zum gleich behandelten Stamm SC5314 (Wildtyp). Noch viel dramatischer wird dieser Effekt, wenn CAE3 von Glucose auf Glycerin-haltiges Medium umgesetzt wird. Dieser Stamm zeigt nach Umsetzen eine ca. 20-fach höhere Isocitrat Lyase Enzymaktivität als der Wildtyp SC5314. Es scheint als habe die FBPase eine reprimierende Funktion auf die Aktivität von CaIcl1p bei Wachstum auf nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquellen. Ein möglicher Repressionseffekt durch Glycerin wurde bereits bei Wachstum des Wildtyp Stammes SC5314 in Mischmedien festgestellt, wo die

Enzymaktivität von CaIc1p in einem Ethanol/Glycerin Medium zwar deutlich höher war als in einem Glycerin Medium (Ethanol Induktion), jedoch nur etwa halb so stark wie in einem Medium mit Ethanol als einziger Kohlenstoffquelle (Glycerin Repression). Möglicherweise erfolgt die Repression der CaIc1p Aktivität durch Glycerin über die Bildung von Glucose-6-Phosphat. Dies würde erklären, warum die Glycerin vermittelte Repression in CAE3 aufgehoben ist, da dieser Stamm nicht mehr fähig ist gluconeogenisch Glucose-6-Phosphat zu bilden. Ein ähnlicher Effekt wurde für *S. cerevisiae* bereits beschrieben (Dennis *et al.*, 1999). Wird ein *S. cerevisiae fbp1* Mutantenstamm in ein Medium mit nicht-fermentierbarer Kohlenstoffquelle umgesetzt, führt dies zu einer Hyperinduktion der Isocitrat Lyase Aktivität. Diese wird durch verstärkte Transkription von *ICLI* hervorgerufen. Eine mögliche Erklärung hierfür liefert die Annahme, dass die endogene Synthese von Glucosephosphaten während der Gluconeogenese einen gewissen Repressionseffekt auf die Transkription der Gluconeogenese und Glyoxylat-Zyklus Gene hat. So gibt die endogene Glucose-6-Phosphat Konzentration der Zelle ein Bild des Glucose-Repressionszustandes der Zelle wieder. Wird ein Wildtyp *S. cerevisiae* Stamm von Glucose auf Ethanol-haltiges Medium umgesetzt, fällt die Konzentration dieses Metabolits um etwa 75 % ab. In einem *fbp1* Mutantenstamm sinkt diese Konzentration noch weiter ab, bei gleichzeitig verstärkter Transkription der Gluconeogenese und Glyoxylat-Zyklus Gene.

Zwar ist die Gluconeogenese nicht essentiell für das vegetative Wachstum von *C. albicans*, trotzdem könnte dieser Stoffwechselweg für die Bereitstellung von Glucose bei hyphalem Wachstum unter Glucose-limitierten Bedingungen wichtig sein. Insbesondere nach Phagozytose durch Makrophagen oder Neutrophile ist eine Umgebung für die Hefe denkbar, bei der die Glucosekonzentration rasch absinkt. Die Phagozytose durch solche Zellen des Immunsystems hat nicht zwingend zur Folge, dass die Hefezelle zerstört wird. Durch einen induzierten Wachstumswechsel gelingt es *C. albicans* den Phagozyt mit einem Keimschlauch von innen zu durchwachsen und zu zerstören. Für dieses hyphale Wachstum benötigt die Zelle Glucose, z.B. für die Synthese der Zellwand. Die Gluconeogenese und der Glyoxylat-Zyklus sind Stoffwechselwege, die es der Zelle unter diesen Bedingungen ermöglichen würden, eine Vielzahl nicht-fermentierbarer Kohlenstoffquellen zum Wachstum zu verwerten. Deshalb wurde untersucht, ob die Gluconeogenese essentiell für die Keimschlauchbildung unter Glucose-limitierten Bedingungen ist. Dabei stellte sich heraus, dass ein *C. albicans* Stamm (CAE3), der nicht mehr zur Gluconeogenese befähigt ist, unter allen Glucose-limitierten Bedingungen Keimschläuche zu bilden vermochte, ohne Unterschiede im

Vergleich zum Wildtyp SC5314 zu zeigen. Ob die Gluconeogenese trotzdem wichtig für die Vitalität von *C. albicans* unter nativen Bedingungen ist, kann abschließend nur am Tiermodell untersucht werden. Alle bisherigen Ergebnisse deuten jedoch darauf hin, dass die Gluconeogenese kein geeigneter Zielort für antimykotisch wirksame Stoffe ist, da sie weder essentiell für das vegetative Wachstum ist noch Virulenzfaktoren, wie etwa die Fähigkeit hyphal zu wachsen, durch sie beeinflusst werden.

4.2 Split-Marker-Selektion zur Identifizierung essentieller Gene von *C. albicans*

Essentielle Gene/Proteine von *C. albicans* stellen besonders interessante Angriffsstellen für antimykotische Stoffe dar, insbesondere wenn keine homologen Gene/Proteine beim Menschen existieren. Im Rahmen der Funktionsanalyse des Genoms von *S. cerevisiae* sind bereits alle essentiellen Gene dieser Hefe identifiziert worden. Da essentiellen Gene häufig für Proteine mit Funktionen in konservierten, fundamental wichtigen zellbiologischen Prozessen kodieren, kann davon ausgegangen werden, dass zumeist homologe Gene/Proteine in *C. albicans* existieren. Die Tatsache, dass die meisten *C. albicans* Gene in *S. cerevisiae* exprimiert werden, ermöglichte die Etablierung einer Methode zur Identifizierung putativ essentieller Gene von *C. albicans* durch funktionelle Komplementation von *S. cerevisiae* Deletionsmutanten. Die in dieser Arbeit vorgestellte Methode der Split-Marker-Selektion ist geeignet, konditional letale *S. cerevisiae* Stämme für die Suche nach Funktionshomologen herzustellen. Die Methode hat jedoch einige gravierende Schwächen. Zum einen muss das essentielle Gen zunächst in einen Vektor kloniert werden. Dieser Arbeitsschritt ist zeitaufwendig und es steht nur eine limitierte Zahl an Restriktionsschnittstellen in dem Vektor pDE59 zur Verfügung. Außerdem ist jeder Klonierungsschritt fehleranfällig, insbesondere wenn PCR-Produkte kloniert werden, da selbst thermostabile Polymerasen mit Fehlerlesekorrektur nicht völlig fehlerfrei arbeiten. Nach Klonierung des essentiellen Gens in den Vektor muss die gesamte Split-Marker-Kassette durch eine PCR-Reaktion amplifiziert werden, um die Kassette ins Genom von *S. cerevisiae* zu integrieren. Dieses PCR-Produkt darf nicht übermäßig groß werden, da sonst Probleme bei dessen Amplifikation auftreten können. Dadurch beschränkt sich der Einsatz des beschriebenen Systems auf die Arbeit mit kleinen Genen. Abhilfe für all diese Probleme leistet die verbesserte Variante der Split-Marker-Selektion. Hierbei wird, durch zwei hintereinander durchgeführte Transformationen, eine geteilte Split-Marker-Kassette in den chromosomalen 5'- und 3'-Bereich des essentiellen Gens integriert (Abb. 4.1). Somit ist man unabhängig von der Größe des zu bearbeitenden Gens. In der neuen Split-Marker-Kassette existiert zudem eine weitere Marke (*LEU2*), die

nach der Cre-vermittelten Rekombination wieder verloren geht, was eine zusätzliche Verifikation der Klone auf Rekombinationsereignisse erlaubt. Der 5'-Bereich des *kan^r* Gens vor Cre-vermittelter Rekombination bleibt zudem immer gleich, unabhängig welches essentielle Gen markiert wird. Dieser Bereich hat keine Promotoraktivität, somit ist nicht zu erwarten, dass ein Split-Marker-Stamm entsteht, der bereits vor Cre-vermittelter Rekombination resistent gegen Geneticin ist. Nachteile dieser neuen Strategie sind, dass zwei integrative Transformationen durchgeführt werden müssen, bei der *URA3* als auch *LEU2* als Selektionsmarker für die Integration verbraucht werden. Somit stehen nur noch wenige Marker für die weitere Screening-Prozedur zur Verfügung. Die Strategie und Klonierungsarbeiten für diese verbesserte Split-Marker-Selektion wurden im Rahmen dieser Doktorarbeit angefertigt und mittlerweile, im Rahmen einer Diplomarbeit, zweifach erfolgreich eingesetzt.

Das Potential der Split-Marker-Selektion beschränkt sich nicht auf den Einsatz zur Klonierung essentieller Gene von *C. albicans*. Ist der konditional letale Stamm konstruiert, können neben chromosomalen Genbanken auch cDNS Genbanken höherer Eukaryonten auf funktionelle Homologe untersucht werden. Die Methode kann auch zur Funktionsanalyse essentieller Gene von *S. cerevisiae* eingesetzt werden. Sie erlaubt die Analyse terminaler Phänotypen, die Suche nach Multicopy-Suppressoren oder die Herstellung extragener Suppressoren (z.B. nach Mutagenese). Die einfache Herstellung konditional letaler Stämme durch diese Methode bietet eine Vielfalt an Möglichkeiten für die Analyse essentieller Gene in *S. cerevisiae*.

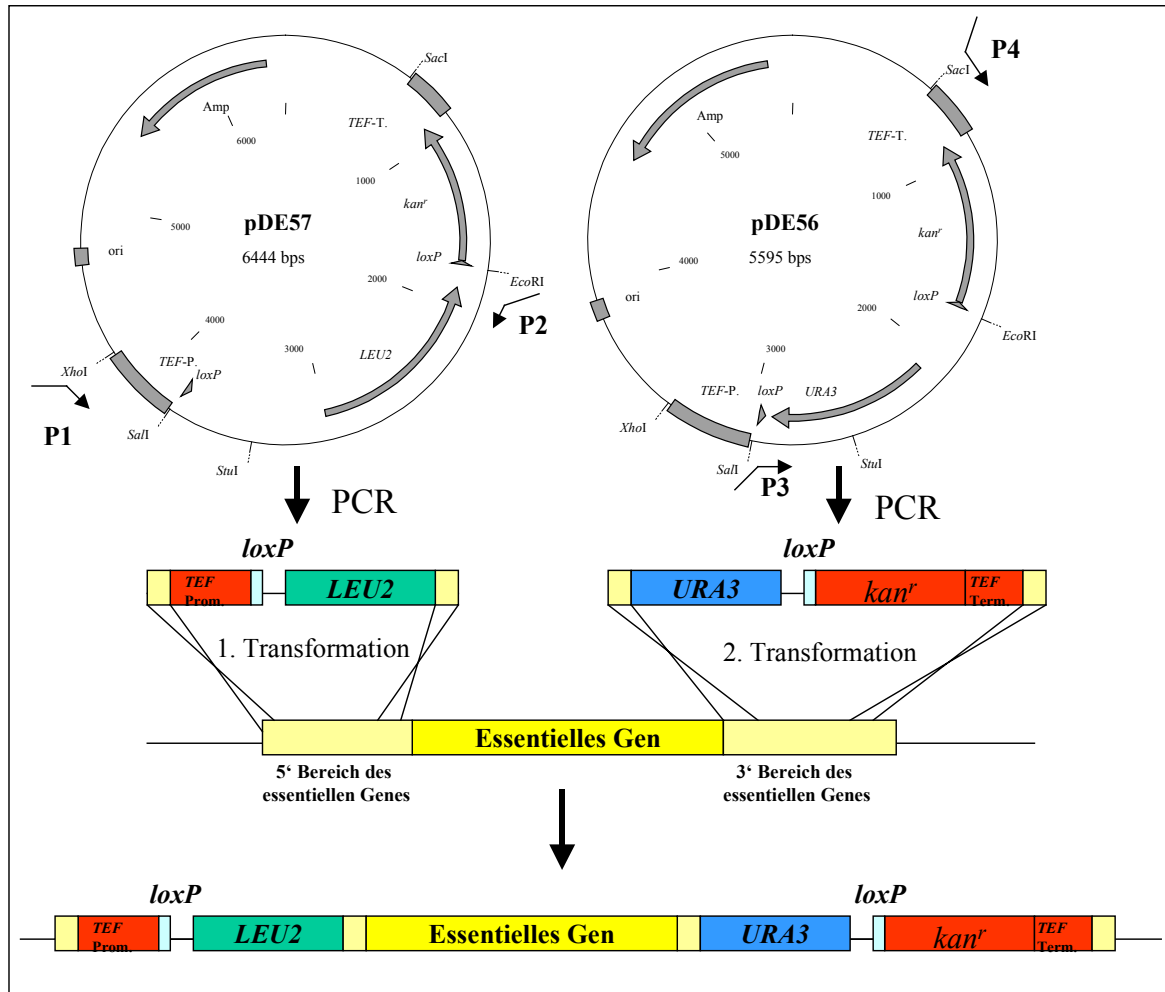


Abb. 4.1 : Strategie zur Herstellung von Split-Marker Stämmen durch Transformation einer geteilten Split-Marker-Kassette. Die fiktiven Primer P1 und P2 erzeugen an der Matrize pDE57 ein PCR-Produkt, das den *TEF*-Promotor, eine *loxP* Sequenz, das *LEU2* Gen sowie flankierend je 40 bp homologe Sequenz zum 5' Bereich des essentiellen Gens enthält. Die Primer P3 und P4 erzeugen an der Matrize pDE56 ein PCR-Produkt, welches das *URA3* Gen, eine *loxP* Sequenz, das *kan^r* Strukturgen, den *TEF*-Terminator sowie flankierend je 40 bp homologe Sequenz zum 3' Bereich des essentiellen Gens enthält. Beide PCR-Produkte werden nacheinander transformiert und flankieren schließlich chromosomal das essentielle Gen.

4.3 Charakterisierung von Nep1p

Die Split-Marker-Selektion wurde erfolgreich zur Identifizierung des *C. albicans* Gens *CaNEP1* ("nuclear essential protein") eingesetzt. Im Laufe dieser Arbeit zeigte sich, dass *NEP1* kein Pilz-spezifisches Gen ist, sondern im gesamten Reich der Eukaryonten und bei vielen Archaea vorkommt, nicht jedoch bei Eubakterien. Da sich das menschliche C2F und CaNep1p in der Sequenz deutlich unterscheiden (48 % Sequenzidentität), ist CaNep1p trotzdem ein attraktiver Kandidat für eine Suche nach Antimykotika, die spezifisch dessen

Funktion beeinträchtigen. Die Tatsache, dass sowohl das *C. albicans* Homolog als auch das humane C2F die essentielle Funktion von *NEP1* in *S. cerevisiae* übernehmen können zeigt, dass die Funktion dieser Proteine bei Eukaryonten stark konserviert ist. Dies bietet weiterhin die Möglichkeit mit *S. cerevisiae* als Modellorganismus nach Wirkstoffen zu suchen, welche spezifisch die Funktion des *C. albicans* Homologs beeinträchtigen, jedoch nicht die von C2F.

Die hier vorgestellten Untersuchungen zur Funktion von Nep1p zeigen, dass Nep1p in *S. cerevisiae* ein essentielles Protein ist, bei dessen Fehlen bzw. Ausdünnung Defekte in der Morphologie der Zelle auftreten. Die abnormen Zellmorphologien entstehen durch einen Defekt im apikal-isotropen Wachstumswechsel der Knospe. Die Knospe wächst bei Ausdünnung von Nep1p übermäßig lang apikal und bildet einen langen, gelegentlich erdnussartigen Schlauch. Zusätzlich haben diese Zellen einen Separierungsdefekt, so dass lange zusammenhängende Schläuche entstehen. Die beobachteten morphologischen Defekte sind wahrscheinlich nicht unmittelbare Folgen des fehlenden Nep1p, sondern vielmehr indirekte Begleiterscheinungen durch Zellzyklusarretierungen. Dies belegt die Tatsache, dass die morphologischen Defekte durch Zugabe von NaCl korrigiert werden können, der letale Phänotyp von *Δnep1* jedoch nicht.

Mit Hilfe der Split-Marker-Methode gelang es langsam wachsende extragenische Suppressoren von *Δnep1* zu erzeugen. Zwei solcher Suppressoren wurden durch klassische genetische Methoden weiter charakterisiert. Leider gelang es nicht die mutierten Gene zu identifizieren, die den Suppressionseffekt verursachten. Hier muss künftig ein System entwickelt werden, das es erlaubt rezessive Suppressoren, die sehr einfach durch die Split-Marker-Methode erzeugt werden können, zu identifizieren. Eine Möglichkeit bestünde im Einsatz einer Transposon-Mutagenese, bei der sehr schnell nachgewiesen werden kann welches Gen durch Integration des Transposon inaktiviert wurde. Der rezessive Suppressor zeigte im Laufe seiner Charakterisierung interessante Eigenschaften, welche möglicherweise Hinweise auf dessen Funktion geben. So vermittelt die Mutation in Suppressor B Resistenz gegen das Aminoglycosid Geneticin (G418). Aminoglycoside sind mehrfach geladene Moleküle, die mit dem negativ geladenen Rückrat von RNS-Molekülen wechselwirken und so deren Funktion beeinflussen. Sie stören die zytoplasmatische als auch mitochondriale Translation oder das mRNS-Splicing. Mehrere Mechanismen können zur Resistenz gegen solche Antibiotika führen. Insbesondere in Bakterien findet man Enzyme die Aminoglycoside modifizieren und damit unschädlich machen. Dieser Resistenzmechanismus basiert auf einem

dominanten Funktionsgewinn, so dass man ihn für den gefundenen Suppressorphänotyp ausschließen kann. In der Hefe führt eine Mutation in der Protonenpumpe Pma1p, die in der Plasmamembran lokalisiert ist, zu erhöhter Resistenz gegen G418. Hier wird wahrscheinlich die aktive Aufnahme des Aminoglycosids herabgesetzt (McCusker *et al.*, 1987; Ulaszewski *et al.*, 1987; Perlin *et al.*, 1988 und 1989). Ein weiterer Mechanismus, der in der Hefe zur verminderten Empfindlichkeit gegen Aminoglycoside führt, ist den Wirkort des Aminoglycosids zu modifizieren (Li *et al.*, 1982). So führt eine Mutation in der 15s rRNS der mitochondrialen Ribosomen zu erhöhter Resistenz gegen das Aminoglycosid Paromomycin und Mutationen in der 18s rRNS zu erhöhter Resistenz gegen die Aminoglycoside Paromomycin und Geneticin (G418) (Chernoff *et al.*, 1994).

Nep1p ist in *S. cerevisiae* ein Kernprotein, das unter anderem an die Spindel assoziiert ist. Auch das *C. albicans* homologe Protein zeigt diese Assoziation an die Spindel in *S. cerevisiae*, was andeutet, dass dies in Pilzen konserviert ist. Das humane C2F ist in *S. cerevisiae* im Kern lokalisiert, zeigt aber keine Spindelassoziation. Da C2F den letalen Phänotyp von $\Delta nep1$ komplementiert, scheint die Kernlokalisierung, nicht aber die Spindelassoziation, zwingend nötig für die essentielle Funktion des Proteins zu sein. Interessant ist auch die Lokalisation von ScNep1p in nicht-knospenden Zellen. Das fluoreszenzmikroskopische Bild von GFP-Nep1p zeigt hier einen polaren Stab, der im Zellkern beginnt, die Kernmembran durchdringt und sich mit zunehmender Fluoreszenzintensität zur Oberfläche der Zelle erstreckt. Eine solche Struktur ist bisher nicht in der Literatur beschrieben. Es scheint jedoch wahrscheinlich, dass es sich hierbei um eine von Mikrotubuli gebildete Struktur handelt, weil a) nur von diesem Element des Zytoskeletts bekannt ist, dass es transiente Verbindungen vom Spindelpolkörper, der in der Kernmembran liegt, zur Zelloberfläche bildet und b) Nep1p ein Spindel/Mikrotubuli-assoziiertes Protein ist. Die Struktur des Stabes weicht jedoch deutlich von der Mikrotubulstruktur nicht-knospender Zellen ab (Abb. 4.2). So finden immer mehrere Mikrotubuli ihren Ursprung im Spindelpolkörper, von wo sie sich dann ins Zytoplasma erstrecken und gelegentlich die Zelloberfläche erreichen. Auch zeigen Mikrotubuli im fluoreszenzmikroskopischen Bild eine entgegengesetzte Polarität im Vergleich zu GFP-Nep1p. Bei Mikrotubulifärbungen oder GFP-Mikrotubuli Fusionsproteinen zeigt der Ursprung der Mikrotubulifaser am Spindelpolkörper die intensivste Färbung/Fluoreszenz, die im weiteren Verlauf abnimmt. Eine Hypothese ist, dass Nep1p nur an solche Mikrotubuli assoziiert ist, welche eine Verbindung von dem

Spindelpolkkörper zur Zelloberfläche darstellen. Um genau solche Mikrotubuli zu erkennen und von anderen Mikrotubuli zu unterscheiden, bedürfte es eines besonderen Mechanismus.

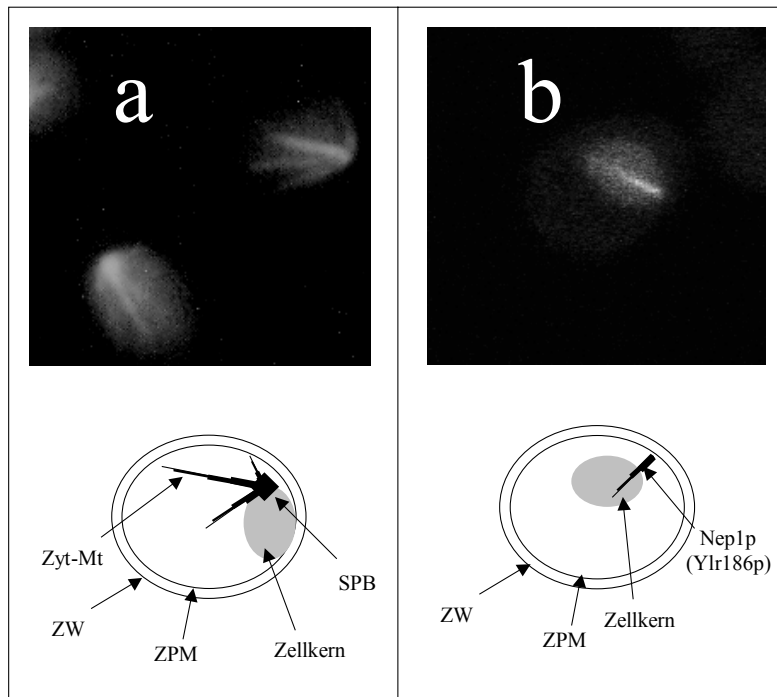


Abb. 4.2 : Vergleich der Mikrotubuliorganisation mit der Lokalisierung von GFP-Nep1p in nicht-knospendenden Zellen. a) Mikrotubulifärbung von CEN.PK-1C mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers gegen Hefe α -Tubulin (YOL 1/34) und eines TRITC-markierten Zweitantikörpers, darunter die schematische Darstellung der Mikrotubuliorganisation in nicht-knospendenden Zellen; b) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von GFP-Nep1p in CEN.PK-1C, darunter eine schematische Darstellung der Lokalisierung von GFP-Nep1p in nicht-knospendenden Zellen; Zyt.-Mt = Zytoplasmatische Mikrotubuli, ZW = Zellwand, ZPM = Zytoplasmamembran, SPB = Spindelpolkkörper

Durch Zwei-Hybrid-Analysen konnte Ydl148p als Interaktionspartner von Nep1p identifiziert werden. Auch dieses Protein ist essentiell für das vegetative Wachstum der Zelle. Es ist ein nukleares Protein, das sich insbesondere im Nukleolus befindet. Homologe von Ydl148p findet man im gesamten Reich der Eukaryonten, wenngleich es weit weniger konserviert ist als Nep1p. Im Reich der Eubakterien und Archaea findet man keine homologen Proteine. Das fluoreszenzmikroskopische Bild von GFP-Ydl148p zeigt außerdem eine dünne Verbindung zwischen telophasischen Zellkernen. Diese dünne Verbindung könnte die telophasische Spindel darstellen, was bedeuten würde, dass auch Ydl148p zeitweise an Mikrotubuli

assoziiert ist. Interessanterweise ist die Telophase genau die Zellzyklusphase, in der ScNep1p nicht an die Spindel assoziiert ist. In der Aminosäuresequenz von Ydl148p findet man eine sogenannte Coiled-Coil Domäne, die Wechselwirkungen mit anderen Proteinen, die eine solche Domänen haben, vermittelt (Homo- als auch Heterodimere). Diese Sequenz ist jedoch nicht die Domäne, welche mit Nep1p wechselwirkt. Ypr144p konnte als weiterer Interaktionspartner von Ydl148p identifiziert werden. Auch dieses Protein ist essentiell für das vegetative Wachstum und ist im Zellkern lokalisiert. Da Ypr144p nicht über eine Coiled-Coil Domäne mit Ydl148p wechselwirkt, sollten weitere bisher nicht identifizierte Interaktionspartner für Ydl148p existieren, die über die Coiled-Coil Domäne wechselwirken.

Da mittels der Zwei-Hybrid-Analysen nur Ydl148p als Wechselwirkungspartner von Nep1p identifiziert wurde, dies aber keine weiteren Schlüsse über die Funktion von Nep1p zulässt, sollte *NEPI* durch weitere genetische Methoden charakterisiert werden. So gelang es, temperaturempfindliche Stämme mit Punktmutationen in *NEPI* herzustellen. Der ts-Stamm mit dem deutlichsten Wachstumsphänotyp bei 37°C wurde weiter charakterisiert. Nach Umsetzen dieses Stamms von der permissiven (22°C) zur restriktiven Temperatur (37°C), arretiert das Wachstum in der G1-Phase. Die GFP-Fusionen der ts-Allele zeigen ein einheitliches Bild bei 22°C (permissive Temperatur). Es ist weder eine Assoziation an die Spindel noch eine stabförmige Struktur in nicht-knospenden Zellen zu sehen, dagegen findet man eine stärkere Hintergrundfluoreszenz des Zytoplasmas sowie Lokalisation im Zellkern. Dies verdeutlicht noch einmal, dass die Assoziation an Mikrotubuli nicht notwendig für die essentielle Funktion des Proteins ist. Erhöht man die Temperatur, so geht dies einher mit einer Veränderung der Lokalisation der temperaturempfindlichen GFP-Nep1p Fusionsproteine. Bereits nach 1 h Inkubation bei 37°C findet man GFP-Nep1p-ts weder im Kern noch diffus im Zytoplasma verteilt, sondern das Fusionsprotein erscheint in zahlreichen Punkten auf der Oberfläche der Zelle. Alle vier temperaturempfindlichen GFP-Nep1p Fusionen zeigen dieses Bild unter restriktiven Bedingungen (Daten nicht gezeigt). Dies lässt den Schluss zu, dass bei erhöhter Temperatur die native Struktur von Nep1p-ts verloren geht, wodurch wiederum eine essentielle Wechselwirkung für die korrekte Lokalisierung des Proteins verloren geht. Als Folge sieht man ausschließlich eine punktförmige Lokalisierung an der Zelloberfläche. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass das Protein auch in seiner nativen Form in geringen Mengen an der Zelloberfläche zu finden ist, hier könnte es möglicherweise Mikrotubuli mit dem Kortex der Zelle verbinden. Auch bei GFP-Nep1p (Wildtyp) kann die Lokalisierung an die Zelloberfläche induziert werden, wenn der Stamm einen kurzen Hitzeschock erhält (5 min

50°C) (Daten nicht gezeigt). Hier verändert sich die Lokalisierung innerhalb weniger Minuten, so dass alle stabartigen Strukturen verschwinden und stattdessen der Zellkortex gleichmäßig mit GFP-Nep1p erleuchtet ist, die Kernfärbung bleibt davon unbeeinflusst.

Für den Stamm SDE4 (*nep1-ts1*) konnte *SAM2* als Multicopy-Suppressor identifiziert werden. Die Suppression erfolgt hierbei nicht durch eine Wechselwirkung mit dem Protein Sam2p, sondern durch die erhöhte Konzentration an S-Adenosylmethionin. S-Adenosylmethionin vermag auch den temperaturempfindlichen Phänotyp von SDE5 (*nep1-ts2*) zu supprimieren, es hat jedoch weniger Einfluss auf die Stämme SDE6 (*nep1-ts3*) und SDE7 (*nep1-ts4*). Der Suppressionseffekt ist außerdem spezifisch für die temperaturempfindlichen Mutanten, d.h. S-Adenosylmethionin verhilft *S. cerevisiae* Δ *nep1* nicht zum Wachstum. Durch welche Mechanismen S-Adenosylmethionin zur Suppression der temperaturempfindlichen Phänotypen führt ist noch nicht geklärt. Klar ist, dass die Lokalisierung der temperaturempfindlichen Proteine nicht beeinflusst wird. S-Adenosylmethionin ist ein Coenzym für sehr viele enzymatischen Methylierungsreaktionen. Eine Überproduktion von S-Adenosylmethionin durch *SAM2* führt beispielsweise zur Suppression des temperaturempfindlichen Phänotyps von *abd1-ts*, der mRNS Cap-Methyltransferase der Hefe (Schwer *et al.*, 2000). Somit besteht die Möglichkeit, dass Nep1p eine Methyltransferase ist. Man findet jedoch in der Sequenz von Nep1p keine typischen Motive von Methyltransferasen (z.B. S-Adenosylmethionin Bindemotive; Niewmierzycka und Clarke, 1999).

5. Zusammenfassung

Mit Hilfe des Modellorganismus *S. cerevisiae* konnten alle bisher unbekanntenen Gene der Gluconeogenese und des Glyoxylat-Zyklus des opportunistisch humanpathogenen Pilzes *C. albicans* isoliert werden. Erste Hinweise führten zu der Annahme, dass diese Stoffwechselwege möglicherweise essentiell für das vegetative Wachstum sind, so dass sie gute Wirkorte für neu zu entwickelnde Antimycotica darstellen könnten. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass diese Stoffwechselwege ungeeignete Wirkorte für Antimycotica sind, da sie weder essentiell für das vegetative Wachstum sind noch von ihnen Virulenzfaktoren von *C. albicans* beeinflusst werden (z.B. Hyphenentwicklung). Die Regulation der Gluconeogenese und des Glyoxylat-Zyklus in *S. cerevisiae* ist gut untersucht und alle Ergebnisse mit *C. albicans* zeigen, dass die Regulation dieser Stoffwechselwege zwischen diesen beiden Hefen sehr konserviert ist.

Es wurde eine Methode für die Identifizierung von essentiellen Genen durch funktionelle Komplementation in *S. cerevisiae* entwickelt. Diese sogenannte Split-Marker-Selektion basiert auf einer Cre/*loxP*-vermittelten induzierten Deletion eines essentiellen Gens von *S. cerevisiae* und der Komplementation des resultierenden letalen Phänotyps durch ein heterolog exprimiertes Gen in einer DNS Genbank. Die Methode ist auch für die Funktionsanalyse von essentiellen Genen in *S. cerevisiae* geeignet (z.B. Identifizierung von Suppressoren, Analyse finaler Phänotypen). Mit Hilfe der Split-Marker-Selektion wurde das putativ essentielle Gen *NEP1* ("nuclear essential protein") von *C. albicans* identifiziert. Die Funktionsanalyse des homologen Gens in *S. cerevisiae* ergab, dass das Gen für ein Mikrotubuli-assoziiertes Protein kodiert, das in allen Eukaryonten existiert. Es erwies sich, dass das menschliche Homolog in *S. cerevisiae* funktionell ist und den letalen Phänotyp einer *NEP1* Deletion in *S. cerevisiae* überwindet. Es zeigte sich weiterhin, dass das menschliche Homolog in *S. cerevisiae* nicht an Mikrotubuli assoziiert ist. Dies deutet darauf hin, dass die Mikrotubuli-Assoziation nicht für die essentielle Funktion von Nep1p nötig ist. Das bisher uncharakterisierte Protein Ydl148p wurde als Interaktionspartner von Nep1p gefunden. Desweiteren konnte *SAM2* als Multicopy-Suppressor des konditional letalen Phänotyps (Temperatursensitivität) eines *NEP1* Mutantenallels (*nep1-ts1*) identifiziert werden. Die Suppression wurde hierbei über die erhöhte Konzentration an S-Adenosylmethionin vermittelt. Dieser Cofaktor ist an Methylierungsreaktionen beteiligt, so besteht die Möglichkeit, dass Nep1p eine Methyltransferase ist oder an Methylierungsreaktionen beteiligt ist.

6. Literaturverzeichnis

- Adams, A.E., Johnson, D.I., Longnecker, R.M., Sloat, B.F. and Pringle, J.R. (1990) *CDC42* and *CDC43*, two additional genes involved in budding and the establishment of cell polarity in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol*, **111**, 131-142.
- Adams, A.E. and Pringle, J.R. (1984) Relationship of actin and tubulin distribution to bud growth in wild-type and morphogenetic-mutant *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol*, **98**, 934-945.
- Adams, A.E. and Pringle, J.R. (1991) Staining of actin with fluorochrome-conjugated phalloidin. *Methods Enzymol*, **194**, 729-731.
- Altboum, Z., Gottlieb, S., Lebens, G.A., Polacheck, I. and Segal, E. (1990) Isolation of the *Candida albicans* histidinol dehydrogenase (*HIS4*) gene and characterization of a histidine auxotroph. *J Bacteriol*, **172**, 3898-3904.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. and Lipman, D.J. (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*, **215**, 403-410.
- Ansari-Lari, M.A., Shen, Y., Muzny, D.M., Lee, W. and Gibbs, R.A. (1997) Large-scale sequencing in human chromosome 12p13: experimental and computational gene structure determination. *Genome Res*, **7**, 268-280.
- Atomi, H., Ueda, M., Hikida, M., Hishida, T., Teranishi, Y. and Tanaka, A. (1990) Peroxisomal isocitrate lyase of the n-alkane-assimilating yeast *Candida tropicalis*: gene analysis and characterization. *J Biochem (Tokyo)*, **107**, 262-266.
- Barbacid, M. (1990) ras oncogenes: their role in neoplasia. *Eur J Clin Invest*, **20**, 225-235.
- Barton, R.C. and Gull, K. (1992) Isolation, characterization, and genetic analysis of monosomic, aneuploid mutants of *Candida albicans*. *Mol Microbiol*, **6**, 171-177.
- Belli, G., Gari, E., Aldea, M. and Herrero, E. (1998) Functional analysis of yeast essential genes using a promoter-substitution cassette and the tetracycline-regulatable dual expression system. *Yeast*, **14**, 1127-1138.
- Bennett, J. (1996) Antimicrobial agents: antifungal agents. In AG Gilman, T.R., AS Sies, P Taylor (ed.) *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*. Pergamon, Elmsford NY, pp. 1165-1181.
- Birnboim, H.C. and Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*, **7**, 1513-1523.
- Bodey, G.P. (1988) The emergence of fungi as major hospital pathogens. *J Hosp Infect*, **11 Suppl A**, 411-426.
- Bojunga, N., Kötter, P. and Entian, K.D. (1998) The succinate/fumarate transporter Acr1p of *Saccharomyces cerevisiae* is part of the gluconeogenic pathway and its expression is regulated by Cat8p. *Mol Gen Genet*, **260**, 453-461.

- Bretagne, S., Costa, J.M., Besmond, C., Carsique, R. and Calderone, R. (1997) Microsatellite polymorphism in the promoter sequence of the elongation factor 3 gene of *Candida albicans* as the basis for a typing system. *J Clin Microbiol*, **35**, 1777-1780.
- Broach, J.R., Strathern, J.N. and Hicks, J.B. (1979) Transformation in yeast: development of a hybrid cloning vector and isolation of the *CAN1* gene. *Gene*, **8**, 121-133.
- Brocard, C., Kragler, F., Binder, M. and Hartig, A. (1996) Regulation of malate synthase activity. *Ann N Y Acad Sci*, **804**, 694-695.
- Bruinenberg, P.G., Blaauw, M., Kazemier, B. and Ab, G. (1990) Cloning and sequencing of the malate synthase gene from *Hansenula polymorpha*. *Yeast*, **6**, 245-254.
- Cannon, R.D., Jenkinson, H.F. and Shepherd, M.G. (1992) Cloning and expression of *Candida albicans* *ADE2* and proteinase genes on a replicative plasmid in *C. albicans* and in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet*, **235**, 453-457.
- Care, R.S., Trevethick, J., Binley, K.M. and Sudbery, P.E. (1999) The *MET3* promoter: a new tool for *Candida albicans* molecular genetics. *Mol Microbiol*, **34**, 792-798.
- Carlson, M., Osmond, B.C. and Botstein, D. (1981) Mutants of yeast defective in sucrose utilization. *Genetics*, **98**, 25-40.
- Carminati, J.L. and Stearns, T. (1997) Microtubules orient the mitotic spindle in yeast through dynein-dependent interactions with the cell cortex. *J Cell Biol*, **138**, 629-641.
- Caspary, F., Hartig, A. and Schüller, H.J. (1997) Constitutive and carbon source-responsive promoter elements are involved in the regulated expression of the *Saccharomyces cerevisiae* malate synthase gene *MLS1*. *Mol Gen Genet*, **255**, 619-627.
- Chant, J. (1999) Cell polarity in yeast. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **15**, 365-391.
- Chen, X.J. and Fukuhara, H. (1988) A gene fusion system using the aminoglycoside 3'-phosphotransferase gene of the kanamycin-resistance transposon Tn903: use in the yeast *Kluyveromyces lactis* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*, **69**, 181-192.
- Cherest, H. and Surdin-Kerjan, Y. (1978) S-adenosyl methionine requiring mutants in *Saccharomyces cerevisiae*: evidences for the existence of two methionine adenosyl transferases. *Mol Gen Genet*, **163**, 153-167.
- Chernoff, Y.O., Vincent, A. and Liebman, S.W. (1994) Mutations in eukaryotic 18S ribosomal RNA affect translational fidelity and resistance to aminoglycoside antibiotics. *Embo J*, **13**, 906-913.
- Chibana, H., Beckerman, J.L. and Magee, P.T. (2000) Fine-resolution physical mapping of genomic diversity in *Candida albicans*. *Genome Res*, **10**, 1865-1877.
- Christianson, T.W., Sikorski, R.S., Dante, M., Shero, J.H. and Hieter, P. (1992) Multifunctional yeast high-copy-number shuttle vectors. *Gene*, **110**, 119-122.
- Chu, S., DeRisi, J., Eisen, M., Mulholland, J., Botstein, D., Brown, P.O. and Herskowitz, I. (1998) The transcriptional program of sporulation in budding yeast. *Science*, **282**, 699-705.

- Chu, W.S., Magee, B.B. and Magee, P.T. (1993) Construction of an *Sfi*I macrorestriction map of the *Candida albicans* genome. *J Bacteriol*, **175**, 6637-6651.
- Ciriacy, M. (1975) Genetics of alcohol dehydrogenase in *Saccharomyces cerevisiae*. II. Two loci controlling synthesis of the glucose-repressible ADH II. *Mol Gen Genet*, **138**, 157-164.
- Ciriacy, M. (1977) Isolation and characterization of yeast mutants defective in intermediary carbon metabolism and in carbon catabolite derepression. *Mol Gen Genet*, **154**, 213-220.
- Cormack, B.P., Bertram, G., Egerton, M., Gow, N.A., Falkow, S. and Brown, A.J. (1997) Yeast-enhanced green fluorescent protein (yEGFP) a reporter of gene expression in *Candida albicans*. *Microbiology*, **143**, 303-311.
- Cormier, M.J., Hori, K. and Anderson, J.M. (1974) Bioluminescence in coelenterates. *Biochim Biophys Acta*, **346**, 137-164.
- Cottingham, F.R. and Hoyt, M.A. (1997) Mitotic spindle positioning in *Saccharomyces cerevisiae* is accomplished by antagonistically acting microtubule motor proteins. *J Cell Biol*, **138**, 1041-1053.
- Csank, C., Schroppel, K., Leberer, E., Harcus, D., Mohamed, O., Meloche, S., Thomas, D.Y. and Whiteway, M. (1998) Roles of the *Candida albicans* mitogen-activated protein kinase homolog, Cek1p, in hyphal development and systemic candidiasis. *Infect Immun*, **66**, 2713-2721.
- Cuff, J.A. and Barton, G.J. (2000) Application of multiple sequence alignment profiles to improve protein secondary structure prediction. *Proteins*, **40**, 502-511.
- Cutler, J.E. (1991) Putative virulence factors of *Candida albicans*. *Annu Rev Microbiol*, **45**, 187-218.
- De Hoop, M.J. and Ab, G. (1992) Import of proteins into peroxisomes and other microbodies. *Biochem J*, **286**, 657-669.
- Dennis, R.A. and McCammon, M.T. (1999) Acn9 is a novel protein of gluconeogenesis that is located in the mitochondrial intermembrane space. *Eur J Biochem*, **261**, 236-243.
- Dennis, R.A., Rhodey, M. and McCammon, M.T. (1999) Yeast mutants of glucose metabolism with defects in the coordinate regulation of carbon assimilation. *Arch Biochem Biophys*, **365**, 279-288.
- DeRisi, J.L., Iyer, V.R. and Brown, P.O. (1997) Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. *Science*, **278**, 680-686.
- Diener, A.C. and Fink, G.R. (1996) *DLHI* is a functional *Candida albicans* homologue of the meiosis-specific gene *DMC1*. *Genetics*, **143**, 769-776.
- Dingwall, C. and Laskey, R.A. (1991) Nuclear targeting sequences--a consensus? *Trends Biochem Sci*, **16**, 478-481.
- Dixon, G.H. and Kornberg, H.L. (1959) Assay methods for key enzymes of the glyoxylate cycle. *Biochem J*, **72**, 3
- Dujon, B. (1996) The yeast genome project: what did we learn? *Trends Genet*, **12**, 263-270.

- Eck, R., Bruckmann, A., Wetzker, R. and Kunkel, W. (2000) A phosphatidylinositol 3-kinase of *Candida albicans*: molecular cloning and characterization. *Yeast*, **16**, 933-944.
- Entian, K.-D. and Barnett, J.A. (1992) Regulation of sugar utilization by *Saccharomyces cerevisiae*. *Trends Biochem Sci*, **17**, 506-510.
- Entian, K.-D. and Kötter, P. (1998) Yeast mutant and plasmid collections. In Brown, A.J.P. and Tuite, M.F. (eds.), *Yeast Gene Analysis*. Academic Press Ltd., San Diego. *Meth in Microbiol*, **26**, pp. 431-449.
- Entian, K.-D. and Schüller, H.-J. (1997) Glucose repression (carbon catabolite repression) in yeast. In Zimmermann, F.K. and Entian, K.-D. (eds.), *Yeast sugar metabolism: biochemistry, genetics, biotechnology and applications*. Technomics, Basel, pp. 409-434.
- Entian, K.-D., Vogel, R.F., Rose, M., Hofmann, L. and Mecke, D. (1988) Isolation and primary structure of the gene encoding fructose-1,6-bisphosphatase from *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett*, **236**, 195-200.
- Feierbach, B., Nogales, E., Downing, K.H. and Stearns, T. (1999) Alf1p, a CLIP-170 domain-containing protein, is functionally and physically associated with alpha-tubulin. *J Cell Biol*, **144**, 113-124.
- Fernandez, E., Moreno, F. and Rodicio, R. (1992) The *ICL1* gene from *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem*, **204**, 983-990.
- Filipits, M., Simon, M.M., Rapatz, W., Hamilton, B. and Ruis, H. (1993) A *Saccharomyces cerevisiae* upstream activating sequence mediates induction of peroxisome proliferation by fatty acids. *Gene*, **132**, 49-55.
- Fisher-Hoch, S.P. and Hutwagner, L. (1995) Opportunistic candidiasis: an epidemic of the 1980s. *Clin Infect Dis*, **21**, 897-904.
- Fonzi, W.A. and Irwin, M.Y. (1993) Isogenic strain construction and gene mapping in *Candida albicans*. *Genetics*, **134**, 717-728.
- Franz, R., Kelly, S.L., Lamb, D.C., Kelly, D.E., Ruhnke, M. and Morschhäuser, J. (1998) Multiple molecular mechanisms contribute to a stepwise development of fluconazole resistance in clinical *Candida albicans* strains. *Antimicrob Agents Chemother*, **42**, 3065-3072.
- Gancedo, J.M. (1992) Carbon catabolite repression in yeast. *Eur J Biochem*, **206**, 297-313.
- Gancedo, J.M. (1998) Yeast carbon catabolite repression. *Microbiol Mol Biol Rev*, **62**, 334-361.
- Gancedo, J.M. and Gancedo, C. (1971) Fructose-1,6-diphosphatase, phosphofructokinase and glucose-6-phosphate dehydrogenase from fermenting and non fermenting yeasts. *Arch Mikrobiol*, **76**, 132-138.
- Gangloff, S., Zou, H. and Rothstein, R. (1996) Gene conversion plays the major role in controlling the stability of large tandem repeats in yeast. *Embo J*, **15**, 1715-1725.
- Gehring, S. and Snyder, M. (1990) The *SPA2* gene of *Saccharomyces cerevisiae* is important for pheromone-induced morphogenesis and efficient mating. *J Cell Biol*, **111**, 1451-1464.

- Georgopapadakou, N.H. and Walsh, T.J. (1994) Human mycoses: drugs and targets for emerging pathogens. *Science*, **264**, 371-373.
- Gillum, A.M., Tsay, E.Y. and Kirsch, D.R. (1984) Isolation of the *Candida albicans* gene for orotidine-5'-phosphate decarboxylase by complementation of *S. cerevisiae ura3* and *E. coli pyrF* mutations. *Mol Gen Genet*, **198**, 179-182.
- Goffeau, A., Barrell, B.G., Bussey, H., Davis, R.W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J.D., Jacq, C., Johnston, M., Louis, E.J., Mewes, H.W., Murakami, Y., Philippsen, P., Tettelin, H. and Oliver, S.G. (1996) Life with 6000 genes. *Science*, **274**, 546, 563-567.
- Goldberg, D., Marbach, I., Gross, E., Levitzki, A. and Simchen, G. (1993) A *Candida albicans* homolog of *CDC25* is functional in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem*, **213**, 195-204.
- Groll, A.H., Piscitelli, S.C. and Walsh, T.J. (1998) Clinical pharmacology of systemic antifungal agents: a comprehensive review of agents in clinical use, current investigational compounds, and putative targets for antifungal drug development. *Adv Pharmacol*, **44**, 343-500.
- Guarente, L. (1983) Yeast promoters and *lacZ* fusions designed to study expression of cloned genes in yeast. *Methods Enzymol*, **101**, 181-191.
- Güldener, U., Heck, S., Fielder, T., Beinhauer, J. and Hegemann, J.H. (1996) A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast. *Nucleic Acids Res*, **24**, 2519-2524.
- Haarasilta, S. and Taskinen, L. (1977) Location of three key enzymes of gluconeogenesis in baker's yeast. *Arch Microbiol*, **113**, 159-161.
- Hakuno, F., Hughes, D.A. and Yamamoto, M. (1996) The *Schizosaccharomyces pombe mra1* gene, which is required for cell growth and mating, can suppress the mating inefficiency caused by a deficit in the Ras1 activity. *Genes Cells*, **1**, 303-315.
- Hansen, R.J., Hinze, H. and Holzer, H. (1976) Assay of phosphoenolpyruvate carboxykinase in crude yeast extracts. *Anal Biochem*, **74**, 576-584.
- Hartig, A., Simon, M.M., Schuster, T., Daugherty, J.R., Yoo, H.S. and Cooper, T.G. (1992) Differentially regulated malate synthase genes participate in carbon and nitrogen metabolism of *S. cerevisiae*. *Nucleic Acids Res*, **20**, 5677-5686.
- Hedges, D., Proft, M. and Entian, K.D. (1995) CAT8, a new zinc cluster-encoding gene necessary for derepression of gluconeogenic enzymes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, **15**, 1915-1922.
- Hieter, P., Bassett, D.E. and Valle, D. (1996) The yeast genome--a common currency. *Nat Genet*, **13**, 253-255.
- Holstege, F.C., Jennings, E.G., Wyrick, J.J., Lee, T.I., Hengartner, C.J., Green, M.R., Golub, T.R., Lander, E.S. and Young, R.A. (1998) Dissecting the regulatory circuitry of a eukaryotic genome. *Cell*, **95**, 717-728.
- Hoffman, C.S. and Winston, F. (1987) A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene*, **57**, 267-272.

- Hoyer, L.L., Scherer, S., Shatzman, A.R. and Livi, G.P. (1995) *Candida albicans ALS1*: domains related to a *Saccharomyces cerevisiae* sexual agglutinin separated by a repeating motif. *Mol Microbiol*, **15**, 39-54.
- Hull, C.M. and 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. and Johnson, A.D. (2000) Evidence for mating of the "asexual" yeast *Candida albicans* in a mammalian host. *Science*, **289**, 307-310.
- Imai, Y., Miyake, S., Hughes, D.A. and Yamamoto, M. (1991) Identification of a GTPase-activating protein homolog in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Cell Biol*, **11**, 3088-3094.
- Iwaguchi, S., Homma, M., Chibana, H. and Tanaka, K. (1992) Isolation and characterization of a repeated sequence (*RPS1*) of *Candida albicans*. *J Gen Microbiol*, **138**, 1893-1900.
- James, P., Halladay, J. and Craig, E.A. (1996) Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics*, **144**, 1425-1436.
- Jimenez, A. and Davies, J. (1980) Expression of a transposable antibiotic resistance element in *Saccharomyces*. *Nature*, **287**, 869-871.
- Johnson, D.I. (1999) Cdc42: An essential Rho-type GTPase controlling eukaryotic cell polarity. *Microbiol Mol Biol Rev*, **63**, 54-105.
- Johnson, D.I. and Pringle, J.R. (1990) Molecular characterization of *CDC42*, a *Saccharomyces cerevisiae* gene involved in the development of cell polarity. *J Cell Biol*, **111**, 143-152.
- Johnston, M. (1987) A model fungal gene regulatory mechanism: the *GAL* genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Rev*, **51**, 458-476.
- Johnston, M. (1996) Towards a complete understanding of how a simple eukaryotic cell works. *Trends Genet*, **12**, 242-243.
- Johnston, M. and Carlson, M. (1992) Regulation of carbon and phosphate utilization. In E. W. Jones, J.R.P.a.J.R.B.e. (ed.) *The molecular and cellular biology of the yeast Saccharomyces*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y., Vol. vol. 2. Gene expression, pp. 193-281.
- Johnston, R.B. and Newman, S.L. (1977) Chronic granulomatous disease. *Pediatr Clin North Am*, **24**, 365-376.
- Kilmartin, J.V. and Adams, A.E. (1984) Structural rearrangements of tubulin and actin during the cell cycle of the yeast *Saccharomyces*. *J Cell Biol*, **98**, 922-933.
- Kim, W.I., Lee, W.B., Song, K. and Kim, J. (2000) Identification of a putative DEAD-box RNA helicase and a zinc-finger protein in *Candida albicans* by functional complementation of the *S. cerevisiae rok1* mutation. *Yeast*, **16**, 401-409.
- Kratzer, S. and Schüller, H.J. (1997) Transcriptional control of the yeast acetyl-CoA synthetase gene, *ACSI*, by the positive regulators *CAT8* and *ADRI* and the pleiotropic repressor *UME6*. *Mol Microbiol*, **26**, 631-641.

- Kwon-Chung, K.J., Varma, A., Edman, J.C. and Bennett, J.E. (1992) Selection of *ura5* and *ura3* mutants from the two varieties of *Cryptococcus neoformans* on 5-fluoroorotic acid medium. *J Med Vet Mycol*, **30**, 61-69.
- Leberer, E., Harcus, D., Broadbent, I.D., Clark, K.L., Dignard, D., Ziegelbauer, K., Schmidt, A., Gow, N.A., Brown, A.J. and Thomas, D.Y. (1996) Signal transduction through homologs of the Ste20p and Ste7p protein kinases can trigger hyphal formation in the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 13217-13222.
- LePage, D.F., Church, D.M., Millie, E., Hassold, T.J. and Conlon, R.A. (2000) Rapid generation of nested chromosomal deletions on mouse chromosome 2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 10471-10476.
- Leuker, C.E., Hahn, A.M. and Ernst, J.F. (1992) beta-Galactosidase of *Kluyveromyces lactis* (Lac4p) as reporter of gene expression in *Candida albicans* and *C. tropicalis*. *Mol Gen Genet*, **235**, 235-241.
- Leuker, C.E., Sonneborn, A., Delbruck, S. and Ernst, J.F. (1997) Sequence and promoter regulation of the *PCK1* gene encoding phosphoenolpyruvate carboxykinase of the fungal pathogen *Candida albicans*. *Gene*, **192**, 235-240.
- Lew, D.J. and Reed, S.I. (1993) Morphogenesis in the yeast cell cycle: regulation by Cdc28 and cyclins. *J Cell Biol*, **120**, 1305-1320.
- Li, M., Tzagoloff, A., Underbrink-Lyon, K. and Martin, N.C. (1982) Identification of the paromomycin-resistance mutation in the 15 S rRNA gene of yeast mitochondria. *J Biol Chem*, **257**, 5921-5928.
- Lo, H.J., Kohler, J.R., DiDomenico, B., Loebenberg, D., Cacciapuoti, A. and Fink, G.R. (1997) Nonfilamentous *C. albicans* mutants are avirulent. *Cell*, **90**, 939-949.
- Losberger, C. and Ernst, J.F. (1989) Sequence of the *Candida albicans* gene encoding actin. *Nucleic Acids Res*, **17**, 9488.
- Lutfiyya, L.L., Iyer, V.R., DeRisi, J., DeVit, M.J., Brown, P.O. and Johnston, M. (1998) Characterization of three related glucose repressors and genes they regulate in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **150**, 1377-1391.
- Lutfiyya, L.L. and Johnston, M. (1996) Two zinc-finger-containing repressors are responsible for glucose repression of *SUC2* expression. *Mol Cell Biol*, **16**, 4790-4797.
- Maddox, P., Chin, E., Mallavarapu, A., Yeh, E., Salmon, E.D. and Bloom, K. (1999) Microtubule dynamics from mating through the first zygotic division in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol*, **144**, 977-987.
- Magee, B.B. and Magee, P.T. (1997) WO-2, a stable aneuploid derivative of *Candida albicans* strain WO-1, can switch from white to opaque and form hyphae. *Microbiology*, **143**, 289-295.
- Magee, B.B. and Magee, P.T. (2000) Induction of mating in *Candida albicans* by construction of MTL α and MTL α strains. *Science*, **289**, 310-313.

- Maniatis, C., Fritsch, E.F. and Sambrook, F. (1982) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Marodi, L., Korchak, H.M. and Johnston, R.B. (1991) Mechanisms of host defense *against Candida species*. I. Phagocytosis by monocytes and monocyte-derived macrophages. *J Immunol*, **146**, 2783-2789.
- McCusker, J.H., Perlin, D.S. and Haber, J.E. (1987) Pleiotropic plasma membrane ATPase mutations of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, **7**, 4082-4088.
- McMillan, J.N., Sia, R.A. and Lew, D.J. (1998) A morphogenesis checkpoint monitors the actin cytoskeleton in yeast. *J Cell Biol*, **142**, 1487-1499.
- Mercado, J.J., Vincent, O. and Gancedo, J.M. (1991) Regions in the promoter of the yeast *FBPI* gene implicated in catabolite repression may bind the product of the regulatory gene *MIG1*. *FEBS Lett*, **291**, 97-100.
- Miller, P.J. and Johnson, D.I. (1997) Characterization of the *Saccharomyces cerevisiae cdc42-1ts* allele and new temperature-conditional-lethal *cdc42* alleles. *Yeast*, **13**, 561-572.
- Morise, H., Shimomura, O., Johnson, F.H. and Winant, J. (1974) Intermolecular energy transfer in the bioluminescent system of *Aequorea*. *Biochemistry*, **13**, 2656-2662.
- Morschhäuser, J., Michel, S. and Staib, P. (1999) Sequential gene disruption in *Candida albicans* by FLP-mediated site-specific recombination. *Mol Microbiol*, **32**, 547-556.
- Mulholland, J., Preuss, D., Moon, A., Wong, A., Drubin, D. and Botstein, D. (1994) Ultrastructure of the yeast actin cytoskeleton and its association with the plasma membrane. *J Cell Biol*, **125**, 381-391.
- Mumberg, D., Muller, R. and Funk, M. (1994) Regulatable promoters of *Saccharomyces cerevisiae*: comparison of transcriptional activity and their use for heterologous expression. *Nucleic Acids Res*, **22**, 5767-5768.
- Navarro-Garcia, F., Sanchez, M., Pla, J. and Nombela, C. (1995) Functional characterization of the *MKCl* gene of *Candida albicans*, which encodes a mitogen-activated protein kinase homolog related to cell integrity. *Mol Cell Biol*, **15**, 2197-2206.
- Nehlin, J.O., Carlberg, M. and Ronne, H. (1991) Control of yeast GAL genes by MIG1 repressor: a transcriptional cascade in the glucose response. *Embo J*, **10**, 3373-3377.
- Nehlin, J.O. and Ronne, H. (1990) Yeast *MIG1* repressor is related to the mammalian early growth response and Wilms' tumour finger proteins. *Embo J*, **9**, 2891-2898.
- Newport, G. and Agabian, N. (1997) *KEX2* influences *Candida albicans* proteinase secretion and hyphal formation. *J Biol Chem*, **272**, 28954-28956.
- Niedenthal, R.K., Riles, L., Johnston, M. and Hegemann, J.H. (1996) Green fluorescent protein as a marker for gene expression and subcellular localization in budding yeast. *Yeast*, **12**, 773-786.

- Niederacher, D., Schüller, H.J., Grzesitza, D., Gutlich, H., Hauser, H.P., Wagner, T. and Entian, K.D. (1992) Identification of UAS elements and binding proteins necessary for derepression of *Saccharomyces cerevisiae* fructose-1,6-bisphosphatase. *Curr Genet*, **22**, 363-370.
- Nielsen, H., Kharazmi, A. and Faber, V. (1986) Blood monocyte and neutrophil functions in the acquired immune deficiency syndrome. *Scand J Immunol*, **24**, 291-296.
- Niewmierzycka, A. and Clarke, S. (1999) S-Adenosylmethionine-dependent methylation in *Saccharomyces cerevisiae*. Identification of a novel protein arginine methyltransferase. *J Biol Chem*, **274**, 814-824.
- Nolan, T. and Rosamond, J. (1996) Isolation and molecular characterisation of the *POL3* gene from *Candida albicans*. *Gene*, **183**, 159-165.
- Odds, F.C. (1988) *Candida and Candidiasis*. Bailliere Tindall, London.
- Odds, F.C. (1994) Pathogenesis of Candida infections. *J Am Acad Dermatol*, **31**, 2-5.
- Panzner, S., Dreier, L., Hartmann, E., Kostka, S. and Rapoport, T.A. (1995) Posttranslational protein transport in yeast reconstituted with a purified complex of Sec proteins and Kar2p. *Cell*, **81**, 561-570.
- Parry, M.F., Root, R.K., Metcalf, J.A., Delaney, K.K., Kaplow, L.S. and Richar, W.J. (1981) Myeloperoxidase deficiency: prevalence and clinical significance. *Ann Intern Med*, **95**, 293-301.
- Pellman, D., Bagget, M., Tu, Y.H., Fink, G.R. and Tu, H. (1995) Two microtubule-associated proteins required for anaphase spindle movement in *Saccharomyces cerevisiae* [published erratum appears in J Cell Biol 1995 Oct;131(2):561]. *J Cell Biol*, **130**, 1373-1385.
- Perepnikhatka, V., Fischer, F.J., Niimi, M., Baker, R.A., Cannon, R.D., Wang, Y.K., Sherman, F. and Rustchenko, E. (1999) Specific chromosome alterations in fluconazole-resistant mutants of *Candida albicans*. *J Bacteriol*, **181**, 4041-4049.
- Perlin, D.S., Brown, C.L. and Haber, J.E. (1988) Membrane potential defect in hygromycin B-resistant pma1 mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, **263**, 18118-18122.
- Perlin, D.S., Harris, S.L., Seto-Young, D. and Haber, J.E. (1989) Defective H(+)-ATPase of hygromycin B-resistant pma1 mutants from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, **264**, 21857-21864.
- Petter, R., Chang, Y.C. and Kwon-Chung, K.J. (1997) A gene homologous to *Saccharomyces cerevisiae* *SNF1* appears to be essential for the viability of *Candida albicans*. *Infect Immun*, **65**, 4909-4917.
- Pla, J., Gil, C., Monteoliva, L., Navarro-Garcia, F., Sanchez, M. and Nombela, C. (1996) Understanding *Candida albicans* at the molecular level. *Yeast*, **12**, 1677-1702.
- Pringle, J.R., Preston, R.A., Adams, A.E., Stearns, T., Drubin, D.G., Haarer, B.K. and Jones, E.W. (1989) Fluorescence microscopy methods for yeast. *Methods Cell Biol*, **31**, 357-435.

- Proft, M., Grzesitza, D. and Entian, K.D. (1995a) Identification and characterization of regulatory elements in the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene *PCK1* of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet*, **246**, 367-373.
- Proft, M., Kötter, P., Hedges, D., Bojunga, N. and Entian, K.D. (1995b) *CAT5*, a new gene necessary for derepression of gluconeogenic enzymes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo J*, **14**, 6116-6126.
- Rahner, A., Schöler, A., Martens, E., Gollwitzer, B. and Schüller, H.J. (1996) Dual influence of the yeast Cat1p (Snf1p) protein kinase on carbon source-dependent transcriptional activation of gluconeogenic genes by the regulatory gene *CAT8*. *Nucleic Acids Res*, **24**, 2331-2337.
- Randez-Gil, F., Bojunga, N., Proft, M. and Entian, K.D. (1997) Glucose derepression of gluconeogenic enzymes in *Saccharomyces cerevisiae* correlates with phosphorylation of the gene activator Cat8p. *Mol Cell Biol*, **17**, 2502-2510.
- Raymond, M., Dignard, D., Alarco, A.M., Mainville, N., Magee, B.B. and Thomas, D.Y. (1998) A Ste6p/P-glycoprotein homologue from the asexual yeast *Candida albicans* transports the a-factor mating pheromone in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol*, **27**, 587-598.
- Rex, J.H., Rinaldi, M.G. and Pfaller, M.A. (1995) Resistance of *Candida* species to fluconazole. *Antimicrob Agents Chemother*, **39**, 1-8.
- Richman, T.J., Sawyer, M.M. and Johnson, D.I. (1999) The Cdc42p GTPase is involved in a G2/M morphogenetic checkpoint regulating the apical-isotropic switch and nuclear division in yeast. *J Biol Chem*, **274**, 16861-16870.
- Roberts, C.J., Nelson, B., Marton, M.J., Stoughton, R., Meyer, M.R., Bennett, H.A., He, Y.D., Dai, H., Walker, W.L., Hughes, T.R., Tyers, M., Boone, C. and Friend, S.H. (2000) Signaling and circuitry of multiple MAPK pathways revealed by a matrix of global gene expression profiles. *Science*, **287**, 873-880.
- Rogers, T.E. and Galgiani, J.N. (1986) Activity of fluconazole (UK 49,858) and ketoconazole against *Candida albicans* in vitro and in vivo. *Antimicrob Agents Chemother*, **30**, 418-422.
- Romani, L., Mencacci, A., Cenci, E., Puccetti, P. and Bistoni, F. (1996) Neutrophils and the adaptive immune response to *Candida albicans*. *Res Immunol*, **147**, 512-518.
- Ronne, H. (1995) Glucose repression in fungi. *Trends Genet*, **11**, 12-17.
- Roth, F.P., Hughes, J.D., Estep, P.W. and Church, G.M. (1998) Finding DNA regulatory motifs within unaligned noncoding sequences clustered by whole-genome mRNA quantitation. *Nat Biotechnol*, **16**, 939-945.
- Rout, M.P., Aitchison, J.D., Suprapto, A., Hjertaas, K., Zhao, Y. and Chait, B.T. (2000) The yeast nuclear pore complex: composition, architecture, and transport mechanism. *J Cell Biol*, **148**, 635-651.

- Rustchenko, E.P., Howard, D.H. and Sherman, F. (1997) Variation in assimilating functions occurs in spontaneous *Candida albicans* mutants having chromosomal alterations. *Microbiology*, **143**, 1765-1778.
- Ryley, J.F. and Ryley, N.G. (1990) *Candida albicans*--do mycelia matter? *J Med Vet Mycol*, **28**, 225-239.
- Sadhu, C., Hoekstra, D., McEachern, M.J., Reed, S.I. and Hicks, J.B. (1992) A G-protein alpha subunit from asexual *Candida albicans* functions in the mating signal transduction pathway of *Saccharomyces cerevisiae* and is regulated by the a1-alpha 2 repressor. *Mol Cell Biol*, **12**, 1977-1985.
- Sambrook, J., Fritsch, F.F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **74**, 5463-5467.
- Santos, M.A. and Tuite, M.F. (1995) The CUG codon is decoded in vivo as serine and not leucine in *Candida albicans*. *Nucleic Acids Res*, **23**, 1481-1486.
- Sasada, M. and Johnston, R.B. (1980) Macrophage microbicidal activity. Correlation between phagocytosis-associated oxidative metabolism and the killing of *Candida* by macrophages. *J Exp Med*, **152**, 85-98.
- Scherer, S. and Magee, P.T. (1990) Genetics of *Candida albicans*. *Microbiol Rev*, **54**, 226-41.
- Scherer, S. and Stevens, D.A. (1987) Application of DNA typing methods to epidemiology and taxonomy of *Candida* species. *J Clin Microbiol*, **25**, 675-679.
- Schiestl, R.H. and Gietz, R.D. (1989) High efficiency transformation of intact yeast cells using single stranded nucleic acids as a carrier. *Curr Genet*, **16**, 339-346.
- Schöler, A. and Schüller, H.J. (1993) Structure and regulation of the isocitrate lyase gene *ICLI* from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet*, **23**, 375-381.
- Schöler, A. and Schüller, H.J. (1994) A carbon source-responsive promoter element necessary for activation of the isocitrate lyase gene *ICLI* is common to genes of the gluconeogenic pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, **14**, 3613-3622.
- Schonebeck, J. and Ansehn, S. (1973) 5-Fluorocytosine resistance in candida spp. and *Torulopsis glabrata*. *Sabouraudia*, **11**, 10-20.
- Schule, T., Rose, M., Entian, K.D., Thumm, M. and Wolf, D.H. (2000) Ubc8p functions in catabolite degradation of fructose-1, 6-bisphosphatase in yeast. *Embo*, **19**, 2161-2167.
- Schwartz, K., Richards, K. and Botstein, D. (1997) *BIMI* encodes a microtubule-binding protein in yeast. *Mol Biol Cell*, **8**, 2677-2691.
- Schwer, B., Saha, N., Mao, X., Chen, H.W. and Shuman, S. (2000) Structure-function analysis of yeast mRNA cap methyltransferase and high-copy suppression of conditional mutants by AdoMet synthase and the ubiquitin conjugating enzyme Cdc34p. *Genetics*, **155**, 1561-1576.

- Sedivy, J.M. and Fraenkel, D.G. (1985) Fructose bisphosphatase of *Saccharomyces cerevisiae*. Cloning, disruption and regulation of the *FBP1* structural gene. *J Mol Biol*, **186**, 307-319.
- Sharp, P.M. and Li, W.H. (1987) The codon Adaptation Index--a measure of directional synonymous codon usage bias, and its potential applications. *Nucleic Acids Res*, **15**, 1281-1295.
- Shepherd, M.G., Poulter, R.T. and Sullivan, P.A. (1985) *Candida albicans*: biology, genetics, and pathogenicity. *Annu Rev Microbiol*, **39**, 579-614.
- Sikorski, R.S. and Hieter, P. (1989) A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **122**, 19-27.
- Sitte, P., Ziegler, H., Ehrendorfer, F. and Bresinsky, A. (1991) *Lehrbuch der Botanik*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
- Smith, H.A., Allaudeen, H.S., Whitman, M.H., Koltin, Y. and Gorman, J.A. (1988) Isolation and characterization of a beta-tubulin gene from *Candida albicans*. *Gene*, **63**, 53-63.
- Spellman, P.T., Sherlock, G., Zhang, M.Q., Iyer, V.R., Anders, K., Eisen, M.B., Brown, P.O., Botstein, D. and Futcher, B. (1998) Comprehensive identification of cell cycle-regulated genes of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* by microarray hybridization. *Mol Biol Cell*, **9**, 3273-3297.
- Stanley, V.C. and Hurley, R. (1969) The growth of *Candida* species in cultures of mouse peritoneal macrophages. *J Pathol*, **97**, 357-366.
- Steiner, S. and Philippsen, P. (1994) Sequence and promoter analysis of the highly expressed TEF gene of the filamentous fungus *Ashbya gossypii*. *Mol Gen Genet*, **242**, 263-271.
- Stucka, R., Valdes-Hevia, M.D., Gancedo, C., Schwarzlose, C. and Feldmann, H. (1988) Nucleotide sequence of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene from *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res*, **16**, 10926.
- Szostak, J.W. and Wu, R. (1980) Unequal crossing over in the ribosomal DNA of *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature*, **284**, 426-430.
- Talibi, D. and Raymond, M. (1999) Isolation of a putative *Candida albicans* transcriptional regulator involved in pleiotropic drug resistance by functional complementation of a *pdr1 pdr3* mutation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol*, **181**, 231-240.
- Thomas, D. and Surdin-Kerjan, Y. (1991) The synthesis of the two S-adenosyl-methionine synthetases is differently regulated in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet*, **226**, 224-232.
- Thomas, D. and Surdin-Kerjan, Y. (1997) Metabolism of sulfur amino acids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev*, **61**, 503-532.
- Tuller, G., Prein, B., Jandrositz, A., Daum, G. and Kohlwein, S.D. (1999) Deletion of six open reading frames from the left arm of chromosome IV of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **15**, 1275-1285.
- Ueda, M., Okada, H., Hishida, T., Teranishi, Y. and Tanaka, A. (1987) Isolation of several cDNAs encoding yeast peroxisomal enzymes. *FEBS Lett*, **220**, 31-35.

- Ulaszewski, S., Van Herck, J.C., Dufour, J.P., Kulpa, J., Nieuwenhuis, B. and Goffeau, A. (1987) A single mutation confers vanadate resistance to the plasma membrane H⁺-ATPase from the yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J Biol Chem*, **262**, 223-228.
- Ullmann, A., Jacob, F. and Monod, J. (1967) Characterization by in vitro complementation of a peptide corresponding to an operator-proximal segment of the beta-galactosidase structural gene of *Escherichia coli*. *J Mol Biol*, **24**, 339-343.
- Valdes-Hevia, M.D., de la Guerra, R. and Gancedo, C. (1989) Isolation and characterization of the gene encoding phosphoenolpyruvate carboxykinase from *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett*, **258**, 313-316.
- Vanden Bossche, H. (1995) Chemotherapy of fungal infections. In Lyr, H. (ed.) *Modern Selective Fungicides: Properties, Applications, Mechanism of Action*. Gustav Fisher Verlag, Jena, Ger, pp. 431-484.
- Vanden Bossche, H., Dromer, F., Improvisi, I., Lozano-Chiu, M., Rex, J.H. and Sanglard, D. (1998) Antifungal drug resistance in pathogenic fungi. *Med Mycol*, **36 Suppl 1**, 119-128.
- Vazquez-Torres, A. and Balish, E. (1997) Macrophages in resistance to candidiasis. *Microbiol Mol Biol Rev*, **61**, 170-192.
- Vincent, O. and Carlson, M. (1998) Sip4, a Snf1 kinase-dependent transcriptional activator, binds to the carbon source-responsive element of gluconeogenic genes. *Embo J*, **17**, 7002-7008.
- Wach, A., Brachat, A., Pohlmann, R. and Philippsen, P. (1994) New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **10**, 1793-1808.
- Wang, Y., Xu, H.P., Riggs, M., Rodgers, L. and Wigler, M. (1991) *byr2*, a *Schizosaccharomyces pombe* gene encoding a protein kinase capable of partial suppression of the *ras1* mutant phenotype. *Mol Cell Biol*, **11**, 3554-3563.
- Warit, S., Zhang, N., Short, A., Walmsley, R.M., Oliver, S.G. and Stateva, L.I. (2000) Glycosylation deficiency phenotypes resulting from depletion of GDP-mannose pyrophosphorylase in two yeast species. *Mol Microbiol*, **36**, 1156-1166.
- White, T.C. (1997) The presence of an R467K amino acid substitution and loss of allelic variation correlate with an azole-resistant lanosterol 14 α demethylase in *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother*, **41**, 1488-1494.
- White, T.C., Marr, K.A. and Bowden, R.A. (1998) Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. *Clin Microbiol Rev*, **11**, 382-402.
- Wilson, R.B., Davis, D. and Mitchell, A.P. (1999) Rapid hypothesis testing with *Candida albicans* through gene disruption with short homology regions. *J Bacteriol*, **181**, 1868-1874.
- Winston, F., Chumley, F. and Fink, G.R. (1983) Eviction and transplacement of mutant genes in yeast. *Methods Enzymol*, **101**, 211-228.
- Xu, H.P., White, M., Marcus, S. and Wigler, M. (1994) Concerted action of RAS and G proteins in the sexual response pathways of *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Cell Biol*, **14**, 50-58.

- Yeh, E., Skibbens, R.V., Cheng, J.W., Salmon, E.D. and Bloom, K. (1995) Spindle dynamics and cell cycle regulation of dynein in the budding yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol*, **130**, 687-700.
- Zamenhoff, S. (1957) Preparation and assay of deoxyribonucleic acids. *Methods in Enzymol*, **3**, 696-704.
- Zaragoza, O., Rodriguez, C. and Gancedo, C. (2000) Isolation of the *MIG1* gene from *Candida albicans* and effects of its disruption on catabolite repression. *J Bacteriol*, **182**, 320-326.
- Ziman, M., JM, O.B., Ouellette, L.A., Church, W.R. and Johnson, D.I. (1991) Mutational analysis of *CDC42*, a *Saccharomyces cerevisiae* gene that encodes a putative GTP-binding protein involved in the control of cell polarity. *Mol Cell Biol*, **11**, 3537-3544.
- Zimmermann, F.K., Kaufmann, I., Rasenberger, H. and Haubetamann, P. (1977) Genetics of carbon catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae*: genes involved in the derepression process. *Mol Gen Genet*, **151**, 95-103.

Lebenslauf

Anschrift: Dietmar Eschrich
Pallaswiesenstr. 44
64293 Darmstadt

Geburtsdatum: 23.12.1969

Geburtsort: Darmstadt

Familienstand: ledig

Schulbesuch: 1976 - 1980 Grundschule Reinheim
1980 - 1982 Förderstufe Albert-Einstein-Schule Groß-Bieberau
1982 - 1989 Gymnasium Albert-Einstein-Schule Groß-Bieberau

Grundwehrdienst: Juni 1989 - Oktober 1990 Instandsetzungskompanie 50 in Homberg/Efze

Berufsausbildung: Oktober 1990 - Juni 1992 Ausbildung zum Industriekaufmann bei der Schenck AG in Darmstadt

Studium: Oktober 1992 - September 1997 Studium der Biologie an der Technischen Hochschule Darmstadt
Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe von Prof. F.K. Zimmermann

Thema der Diplomarbeit: Molekularbiologische Untersuchung des ABC-Transporters Yll015p der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*

Promotionsstudium: seit November 1997 in der Arbeitsgruppe von Prof. Karl-Dieter Entian im Institut für Mikrobiologie an der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt

Thema: Identifizierung und Charakterisierung essentieller Gene/Proteine der humanpathogenen Hefe *Candida albicans* als mögliche Wirkstoff-Zielorte