

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	4
2	Einführung	6
3	Material und Methoden	13
3.1	Material	13
3.1.1	<i>Escherichia coli</i> -Stämme	13
3.1.2	Plasmide	14
3.1.3	<i>Candida</i> -Stämme	15
3.1.4	Oligonukleotide	16
3.1.5	Sonden zur Hybridisierung nach Southern	18
3.2	Allgemeine molekularbiologische Methoden	19
3.2.1	Methoden zur Herstellung rekombinanter DNA	19
3.2.2	Auftrennung von DNA in präparativen und analytischen Agarosegelen	19
3.2.3	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) (Saiki et al. 1988)	20
3.2.4	DNA-Sequenzierung (Sanger et al. 1977)	21
3.2.5	Anzucht der verwendeten <i>Candida</i> -Stämme	21
3.2.6	Genetische Transformation von <i>C. albicans</i> durch Elektroporation	22
3.2.7	DNA-Isolierung aus <i>Candida spec.</i> (Millon et al. 1994)	23
3.2.8	Southern-Hybridisierung	24
3.3	Expression von <i>IMH3</i> in <i>E. coli</i>	25
3.3.1	Isolierung von PolyA ⁺ -RNA und cDNA-Synthese	25
3.3.2	Herstellung der Expressionsvektoren	26
3.3.3	Überprüfung der Expression von <i>IMH3</i> in auxotrophen <i>Escherichia coli</i>	27
3.4	Herstellung einer <i>IMH3</i>-Mutante	28
3.4.1	Herstellung der Mutagenese-Kassette	28
3.4.2	Mutagenese von <i>Candida albicans</i>	29
3.4.3	Phänotypische Untersuchungen der Mutanten	29
3.5	Isolierung eines <i>IMH3</i>-Genfragments aus <i>C. dubliniensis</i>	30
3.5.1	Sequenzierung eines DNA-Fragments aus <i>C. dubliniensis</i>	30
3.5.2	Isolierung von <i>IMH3</i> aus <i>C. dubliniensis</i> durch inverse PCR	30
3.5.3	Erstellung einer gröbenselektionierten Genbank aus <i>C. dubliniensis</i>	31
3.6	Herstellung einer <i>PLB3</i>-Promotorfusion	31
3.6.1	Herstellung der FLP-Rekombinasefusion mit dem <i>PLB3</i> -Promotor	31

4	Ergebnisse	32
4.1	Expression von <i>IMH3</i> in <i>E. coli</i>	32
4.1.1	Herstellung der Expressionsvektoren	32
4.1.2	Überprüfung der Expression mittels SDS-PAGE	35
4.2	Herstellung der <i>IMH3</i> -Mutante	36
4.2.1	Herstellung der Mutagenese-Kassette	36
4.2.2	Transformation der Mutagenese-Kassette	37
4.2.3	Phänotypische Untersuchungen an den Mutanten	39
4.3	Isolierung eines <i>IMH3</i> -Genfragments aus <i>C. dubliniensis</i>	41
4.3.1	Sequenzierung eines DNA-Fragments aus <i>C. dubliniensis</i>	41
4.3.2	Ergebnisse des Southern-Blots mit der Sonde <i>CdIMH₅₀₀</i>	42
4.3.3	Elution der Fragmente aus einem Agarosegel	43
4.3.4	Inverse PCR und Erstellung einer gröbenselektionierten Gen-Bank	44
4.4	Herstellung einer <i>PLB3</i> -Promotorfusion	45
4.4.1	Herstellung der Reporterfusion durch Klonierung	45
4.4.2	Transformation der Reporterfusion in den Stamm CFI1	46
4.4.3	Untersuchungen zur Aktivität der Promotorfusion	48
5	Diskussion	51
5.1	Expression von <i>IMH3</i> in <i>E. coli</i>	51
5.2	Herstellung der <i>IMH3</i> -Mutante	54
5.3	Isolierung eines <i>IMH3</i> -Genfragments aus <i>C. dubliniensis</i>	59
5.4	Herstellung einer <i>PLB3</i> -Promotorfusion	61
5.5	Fazit	64
	Literaturverzeichnis	65

Erklärung häufig gebrachter Abkürzungen und Bezeichnungen

<i>ACTIT</i> :	Terminator des Actin-Gens (<i>ACT1</i>) aus <i>C. albicans</i>
<i>caFLP</i> :	FLP-Rekombinase aus <i>S. cerevisiae</i> , in deren Gensequenz 3 CTG- gegen TTG-Codons ausgetauscht wurden
<i>ecaFLP</i> :	Durch vier Aminosäurenaustausche modifiziertes <i>caFLP</i> -Gen
<i>caFLP</i> -Reporter:	[<i>caFLP-ACTIT-URA3</i>]-Fragment
<i>ecaFLP</i> -Reporter:	[<i>ecaFLP-ACTIT-URA3</i>]-Fragment
<i>FRT</i> :	Minimale Erkennungssequenz der FLP-Rekombinase (FLP-recognition-target)
<i>IMH3</i> :	Gen der IMP-Dehydrogenase aus <i>C. albicans</i>
IMP:	Inosinmonophosphat
MPA:	Mykophenolsäure
<i>MPA^R</i> :	Gen für MPA-resistente IMP-Dehydrogenase
<i>PLB3</i> :	Gen für Phospholipase B3 aus <i>C. albicans</i>
<i>PLB3P</i> :	Promotor von <i>PLB3</i>
<i>SAP2P</i> :	Promotor des <i>SAP2</i> -Gens für eine sekretierte Aspartatprotease aus <i>C. albicans</i>
<i>URA3</i> :	Gen für die Orotidylat-5'-Phosphatdecarboxylase; gebräuchlichster Auxotrophiemarker in <i>C. albicans</i>
<i>URA3</i> -Flipper:	[<i>FRT-SAP2P-caFLP-ACTIT-URA3-FRT</i>]-Fragment

1 Zusammenfassung

Bis vor wenigen Jahren war man bei der genetischen Manipulation von *Candida albicans*, dem Hauptverursacher nosokomialer Pilzinfektionen, auf auxotrophe Stämme und entsprechende genetische Marker angewiesen. Es war kein dominanter Selektionsmarker bekannt, der eine direkte genetische Manipulation klinischer Isolate von *C. albicans* mit wildtypischem Genotyp erlaubte. Die Entdeckung des *IMH3*-Gens aus *C. albicans*, welches eine Inosinmonophosphatdehydrogenase kodiert, erweiterte jedoch die Möglichkeiten. Das Enzym katalysiert in der de-novo-Synthese von Guanin-Nukleotiden die geschwindigkeits-bestimmende Umwandlung von Inosinmonophosphat (IMP) zu Xanthosinmonophosphat (XMP). Die IMP-Dehydrogenase läßt sich spezifisch durch Mykophenolsäure (MPA) hemmen, was dazu führt, daß die Zellen nicht mehr wachsen können. Das *MPA^R*-Allel jedoch kodiert eine MPA-resistente Form der IMP-Dehydrogenase und wurde schon erfolgreich als Selektionsmarker zur Insertionsmutagenese von *C. albicans* und als Reportergen eingesetzt.

In der vorliegenden Arbeit sollten die grundlegenden biochemischen und biologischen Eigenschaften der IMP-Dehydrogenase von *C. albicans* charakterisiert werden. Außerdem wurden Ansätze zur Optimierung des neuen Markersystems in den verschiedenen Anwendungen erarbeitet. Zur Untersuchung der Biochemie wurden Expressionsvektoren mit der cDNA von *IMH3* und *MPA^R* hergestellt. Mit Hilfe eines Proteingels wurde die Überexpression der klonierten Gene in *Escherichia coli* nachgewiesen. Die Genprodukte von *IMH3* und *MPA^R* könnten also nun spezifisch aufgereinigt werden und stehen somit für eine umfangreiche biochemische Untersuchung zur Verfügung. Zur biologischen Charakterisierung von *IMH3* wurde das Gen mit Hilfe der *URA3*-Flipper-Technologie in *C. albicans* inaktiviert. Die hergestellte Nullmutante ist für Guanidin auxotroph. Das wiederum deutet darauf hin, daß der Pilz im Unterschied zu anderen eukaryontischen Organismen nur einen Genlocus besitzt, der eine IMP-Dehydrogenase kodiert. Der Defekt in der Guanidin-Biosynthese konnte durch zusätzliches Guanin im Medium aufgehoben werden. Diese Purinbase mußte also über die sogenannten „salvage-pathways“ zu Guanidinmonophosphat (GMP) umgewandelt worden sein. Mit der Purinbase Xanthin ließ sich das Wachstumsdefizit der Mutante nicht aufheben. Diese Verbindung wird also

entweder nicht von den Zellen aufgenommen oder kann von *C. albicans* im Unterschied zu vielen anderen Organismen nicht über XMP in die Guanosin-Biosynthese eingeschleust werden. Neben dem grundlegenden Einblick in den Nukleotid-Stoffwechsel von *C. albicans* lieferte die vorliegende Arbeit wichtige Grundlagen zur Optimierung des *MPA^R*-Markersystems. *Candida dubliniensis* sollte die Quelle für einen neuen, artfremden *MPA*-Resistenzmarker für *C. albicans* sein. Die störende Rekombination des Selektionsmarkers mit den chromosomalen *IMH3*-Allelen, die bei der Transformation des bisher bekannten *MPA^R*-Gens immer wieder auftrat, könnte durch die Benutzung eines alternativen Markers unterdrückt werden. Die DNA-Sequenz für das entsprechende IMP-Dehydrogenase-Gen aus *C. dubliniensis* war zu Beginn der Arbeit jedoch unbekannt. Aus dem Genom dieser *Candida*-Art konnte aber ein Bereich von 504 Basenpaaren kloniert und sequenziert werden, der eine hochkonservierte Region innerhalb der bekannten IMP-Dehydrogenasen kodiert. Der Vergleich der ermittelten DNA-Sequenz aus *C. dubliniensis* mit der entsprechenden Basenfolge aus *C. albicans* ergab eine 96%ige Übereinstimmung. Das isolierte DNA-Fragment diente als Sonde zur Hybridisierung nach Southern. Aus der DNA-Sequenz ließen sich PCR-Primer für eine inverse PCR ableiten, mit der das gesamte Gen isoliert werden sollte. Das letzte Projekt der Arbeit beschäftigte sich mit der Anwendung von *MPA^R* zur *in vivo-expression technology* (IVET). Dazu wurde eine Fusion aus dem Promotor des Gens einer Phospholipase B (*PLB3*) mit der kodierenden Sequenz einer FLP-Rekombinase hergestellt und in das Genom von *C. albicans* integriert. Die Aktivität des fusionierten Promotors ließ sich durch die von der Rekombinase katalysierte, spezifische Deletion eines *MPA^R*-Markers messen. Dieser Marker war in vorhergehenden Arbeiten in das Genom des verwendeten Ausgangsstamms integriert worden. Die beschriebene Reporter-gen-Methode wurde für *in vivo*-Expressionsstudien verschiedener, virulenzassoziiertes *SAP* (*secreted aspartic proteinases*)-Gene aus *C. albicans* entwickelt. Die hier untersuchte Phospholipase B weist unter vielen verschiedenen *in vitro*-Bedingungen eine geringe Expression auf. Dies führte zu einem latenten Verlust des *MPA^R*-Markergens und behinderte die Anwendung der konstruierten Stämme für zukünftige Untersuchungen am Tiermodell. Die geschilderte Problematik tritt bei den streng regulierten *SAP*-Genen nicht auf, die nur *in vivo* und unter ganz speziellen *in vitro*-Bedingungen zum Ausdruck kommen. Die Realisierung verschiedener Anpassungen des Reportersystems an weniger streng regulierte Gene stellte ein Fernziel der Arbeiten dar. Die konstruierten Reporterstämme bieten nun das Modell für die zukünftige Optimierung der geschilderten Methode.

2 Einführung

Die Anzahl der Infektionskrankheiten, die von opportunistischen Keimen verursacht werden, nimmt seit Jahren zu. Dieses ist zum einen der steigenden Anzahl von HIV-Infektionen zuzuschreiben, zum anderen liegt das an den Möglichkeiten der modernen Medizin, die eine immer höhere Lebenserwartung ermöglichen. Bedingt durch neue Therapien bei Krebs und die Behandlung mit Immunsuppressiva nach Organtransplantationen, konnten sich seit den 80er Jahren vor allem Pilze als nosokomiale Krankheitserreger durchsetzen. Die Gattung *Candida* mit dem bekanntesten Vertreter *Candida albicans* ist mit einem Anteil von 80% der Hauptverursacher solcher Pilzinfektionen (Sternberg 1994).

Der Hefepilz *Candida albicans* gehört, wie die nahe verwandte Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae*, zur Klasse der Ascomycetes (Schlauchpilze). Er wird dabei den sogenannten „Fungi imperfecti“ zugeordnet, da keine sexuelle Vermehrungsphase bekannt ist (Jacob et al. 1994). Wegen der Fähigkeit sowohl in der Hefeform wachsen zu können, als auch echte Hyphen auszubilden, wird *C. albicans* auch als dimorpher Pilz bezeichnet. Diese Eigenschaft dient mit ziemlicher Sicherheit der Virulenz (Odds 1994). Neben diesem Dimorphismus werden noch weitere potentielle Virulenzdeterminanten diskutiert, die *C. albicans*, verglichen mit anderen Pilzen, seine hohe Pathogenität verleihen. In diesem Zusammenhang sind zu nennen:

- 1.) *phenotypic switching* – welches wie der Dimorphismus eine weitere morphologische Besonderheit darstellt (Soll 1997)
- 2.) Adhärenz an das Wirtsgewebe (Calderone 1993)
- 3.) molekulares Mimikry (Odds 1994)
- 4.) sekretierte hydrolytische Enzyme (Odds 1985; Ibrahim et al. 1995)

Die wachsende Bedrohung durch Pilzinfektionen führte zur routinemäßigen klinischen Anwendung der wenigen verfügbaren, antimykotisch wirksamen Präparate. Jedoch sind

mittlerweile Resistenzen gegen die verschiedenen Medikamente bekannt, die ihre Wirksamkeit enorm herabsetzen können (White et al. 1998).

Die geschilderten Probleme mit *C. albicans* als wichtigstem Erreger von Pilzinfektionen machen eine umfangreiche Erforschung dieses Organismus dringend notwendig. Er kann dabei auch als Modellorganismus für die Pathogenität anderer Pilze gesehen werden. Um sich grundlegend einen Einblick in die Biologie von *C. albicans* zu verschaffen, bedient man sich heute hauptsächlich der Methoden der Molekularbiologie. Aus diesem Grund soll jetzt auf einige genetische Besonderheiten eingegangen werden, die diesen Pilz auszeichnen.

C. albicans ist diploid. Es ist kein haploides, sexuell reproduktives Stadium bekannt. Das haploide Genom besteht aus circa 16 Millionen Basenpaaren, die auf 8 Chromosomen verteilt sind. Die zur Zeit noch nicht vollständig zusammengesetzte Genomsequenz ist über das World-Wide-Web allgemein zugänglich [<http://www-sequence.stanford.edu/group/candida/>]. Erste Auswertungen des Genoms ergaben, daß *C. albicans* circa 8000 offene Leseraster besitzt und damit 2000 mehr als *S. cerevisiae*. Ein direkter Vergleich der beiden Genomsequenzen von *C. albicans* und *S. cerevisiae* kann zur Identifizierung von Genen genutzt werden. Verschiedene Genfunktionen in *C. albicans* wurden schon aufgrund von Vergleichen mit *S. cerevisiae* aufgedeckt. Gene, die nur in *C. albicans* gefunden werden und nicht in *S. cerevisiae*, könnten Aufschluß über die Lebensweise als Kommensale geben (De Backer et al. 2000).

Untersuchungen an *C. albicans* auf Genomebene, zum Beispiel durch die systematische Mutagenese aller Gene, die Komplementation dieser Mutationen mit artfremden Genen oder die Suche nach Virulenzfaktoren mit Hilfe von Methoden aus der Infektionsbiologie (z. B. *Signature-tagged mutagenesis*), werden durch drei Besonderheiten des Pilzes erheblich behindert:

- 1.) Wegen der Diploidie von *C. albicans* (Scherer et al. 1990) müssen zur Mutagenese immer beide Allele eines Gens deletiert werden. Das bedarf einer komplizierten Methodik (Fonzi et al. 1993; Morschhauser et al. 1999).
- 2.) Das Codon CTG kodiert die Aminosäure Serin und nicht Leucin wie bei anderen Organismen. Die Expression artfremder Gene in *C. albicans* wird dadurch enorm behindert (Santos et al. 1996).

- 3.) *C. albicans* ist von Natur aus resistent gegen viele Substanzen, wie zum Beispiel G418, Cycloheximid, Hygromycin B, Methotrexat und Methioninsulfoxid. Genetische Marker, die auf einer Resistenz gegen diese Stoffe beruhen, konnten also nicht etabliert werden. Man ist auf Auxotrophiemarker angewiesen (De Backer et al. 2000).

Um das unter Punkt 3.) genannte Markerproblem zu unterstreichen, sei hier erwähnt, daß versucht wird, *CaDFRI*, welches in *C. albicans* die Dihydrofolatreduktase kodiert, bei Tabakpflanzen als Selektionsmarker gegen Methotrexat zu etablieren. Möglich wird dies durch die natürliche Resistenz des Enzyms aus *C. albicans* gegen den Inhibitor Methotrexat (Irdani et al. 1997).

Die Tatsache, daß es bisher keinen dominanten Selektionsmarker gab, der auf der Resistenz gegen ein cytotoxisches Agens beruht, beschränkte genetische Untersuchungen an *C. albicans* hauptsächlich auf den für Uridin auxotrophen Stamm CAI4, der einen Defekt im *URA3*-Gen besitzt. *URA3* ist der zugehörige Selektionsmarker. Die genetische Manipulation von klinischen Isolaten mit wildtypischem Genotyp war so gut wie nicht möglich (De Backer et al. 2000). Seit kurzem ist jedoch bekannt, daß die Überexpression von *IMH3* *C. albicans* eine Resistenz gegen Mykophenolsäure (MPA) verleiht (Köhler et al. 1997). *IMH3* kodiert die Inosinmonophosphatdehydrogenase (IMP-Dehydrogenase, EC 1.1.1.205). Das Enzym katalysiert den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt in der Guanosin-Biosynthese, nämlich die Oxidation von Inosinmonophosphat zu Xanthosinmonophosphat. Das Gen für die 521 Aminosäuren setzt sich aus zwei Exons (Position +1 bis +451 und Position +699 +1814) zusammen, die durch ein 248 bp langes Intron getrennt sind. MPA ist ein spezifischer Inhibitor der IMP-Dehydrogenase (Franklin et al. 1969). Die Entdeckung eines mutierten *IMH3*-Allels, welches *C. albicans* mit nur einer Kopie im Genom resistent gegenüber MPA macht, lieferte einen dominanten Selektionsmarker, wie er zur genetischen Manipulation von Wildstämmen benötigt wird (Gerwald Köhler, persönliche Mitteilung). Die Bezeichnung für dieses Allel lautet *MPA^R*. Für die Expression in *C. albicans* wurde bisher ein Fragment aus der kodierenden Nukleotidsequenz und dem 5'- (Pos. -601 bis -1) und 3'-nichtkodierenden Bereich (Pos. +1815 bis +2302) verwendet.

Der *MPA^R*-Marker wurde schon erfolgreich als Reportergen und zur spezifischen Mutagenese klinischer Isolate von *C. albicans* angewendet (Staib et al. 1999; Wirsching et al. 2000). Die ersten praktischen Erfahrungen deckten dabei zwar Probleme im Umgang

mit dem neuen Selektionsmarker auf, lieferten jedoch auch Anregungen für die Optimierung des Systems.

Die Methode, die zur Mutagenese von Wildstämmen mit Hilfe des *MPA^R*-Markergens verwendet wurde, ist eine Weiterentwicklung der sogenannten *URA3*-Flipper-Technik. Bei dem *URA3*-Flipper handelt es sich um eine DNA-Kassette, die zur Herstellung von homozygoten *CDR4*- und *MDR1*-Mutanten entwickelt wurde (Morschhauser et al. 1999). Der *MPA^R*-Flipper trägt als Selektionsmarker anstelle von *URA3* das *MPA*-resistente *IMH3*-Allel. Mit der *MPA^R*-Flipper-Technik konnten homozygote *MDR1*-Mutanten verschiedener klinischer Isolate von *C. albicans* hergestellt werden (Wirsching et al. 2000). Prinzipiell beruhen die genannten Techniken auf einer Insertionsmutagenese, die im folgenden kurz beschrieben wird: Flankiert vom 5'- und 3'-Bereich des Zielgens soll eine DNA-Kassette in eines der Allele des Gens inserieren, das inaktiviert werden soll. Der zugrunde liegende Mechanismus ist die homologe Rekombination. Die Selektion der Transformanten erfolgt dann auf einen in der DNA-Kassette enthaltenen Selektionsmarker (*URA3*, *MPA^R*). Wie schon erwähnt, ist *C. albicans* diploid. Um das zweite Allel ebenfalls auszuschalten, muß zunächst der Selektionsmarker aus der ersten Transformationsrunde deletiert werden. Das erfolgt über die induzierbare Expression einer Rekombinase. Hierbei handelt es sich um eine FLP-Rekombinase aus *S. cerevisiae* (*FLP*), in deren Nukleotidsequenz drei CTG- gegen TTG-Codons ausgetauscht wurden (*caFLP*) (Staub et al. 1999). Die kodierende DNA-Sequenz für dieses Enzym befindet sich innerhalb der Mutagenese-Kassette und steht unter der Kontrolle eines induzierbaren *SAP2*-Promotors (Staub et al. 1999). Die Rekombinase erkennt spezifisch zwei direkte Wiederholungssequenzen (*FRT*; *FLP*-recognition target) jeweils am 5'- und 3'-Ende der DNA-Kassette. Wird die Rekombinase aktiviert, erfolgt eine Exzision der Kassette durch intrachromosomale Rekombination zwischen den beiden *FRT*-Sequenzen. Zurück im Genom bleiben der nicht deletierte Bereich des Zielgens und eine Kopie der *FRT*-Sequenz. Das zweite Allel kann jetzt auf die gleiche Weise, mit demselben Selektionsmarker inaktiviert werden, der schon bei der Mutagenese des ersten Allels verwendet worden ist.

Eines der Hauptprobleme bei der Benutzung von *MPA^R* zur Selektion ist, daß bei der Transformation einer DNA-Kassette, die *IMH3*-Sequenzen enthält, die homologe Rekombination nicht nur zwischen dem Zielgen und dem 5'- und 3'-Bereich der Deletionskassette stattfinden kann, sondern auch zwischen dem *MPA^R*-Marker und den genomischen *IMH3*-Allelen, die sich ja in jeder Zelle befinden. Auch wenn schon

erfolgreich Mutanten von wildtypischen *Candida*-Stämmen mit dem MPA^R -Flipper gewonnen wurden, so zeigte die Praxis, daß es nicht immer leicht ist, die erwünschten Klone zu finden. Einen Hinweis auf einen neuen Ansatz zur Entwicklung eines verbesserten Markers lieferte die Tatsache, daß sich *C. dubliniensis*, ein sehr naher Verwandter von *C. albicans*, mit MPA^R transformieren läßt (Staib et al. 2001), ohne daß die unerwünschte Rekombination stattfindet. Ein Grund dafür könnte sein, daß die Unterschiede in der DNA-Sequenz zwischen dem *C. albicans*-Marker und den genomischen *IMH3*-Allelen aus *C. dubliniensis* eine Rekombination verhindern.

MPA^R kann nicht nur als Selektionsmarker zur genetischen Manipulation dienen, sondern auch als Reportergen genutzt werden. Bei dieser Anwendung gibt der neue Marker indirekt Aufschluß über die Aktivität eines Promotors. Die eigentliche Reporterfusion wird zwischen dem *caFLP*-Gen, welches im Zusammenhang mit der *URA3*-Flipper-Technologie schon beschrieben wurde, und dem zu untersuchenden Promotor hergestellt. Ein Konstrukt, bestehend aus der Reporterfusion, einem *URA3*-Marker und dem 3'-Bereich des zu untersuchenden Gens, soll über homologe Rekombination in das Genom inserieren. Der *URA3*-negative Stamm *C. albicans* CFI1, der für die Transformation verwendet wird, enthält im Actin-Gen (*ACT1*) ein von *FRT*-Sequenzen flankiertes MPA^R -Allel. Ist der fusionierte Promotor aktiv, so wird MPA^R durch die Rekombinase deletiert, und die Zellen verlieren ihre Resistenz gegen MPA. Bei niedriger MPA-Konzentration in einem selektiven Medium formen sie kleine Kolonien. Zellen, die nicht genug Rekombinase exprimieren, behalten den Marker und formen unter selektiven Bedingungen große Kolonien. Der Vorteil des beschriebenen Reportersystems liegt darin, daß die Information über die Aktivität von Promotoren in den Zellen erhalten bleibt. Es eignet sich daher zu Expressionsstudien *in vivo*. Deshalb wird es auch zu einer Anwendung der *in vivo-expression technology* (IVET) gezählt, einer Methode, die aus Untersuchungen an Bakterien bekannt ist (Camilli et al. 1994). Für *C. albicans* ist diese Methode an verschiedenen *SAP*-Genen, die sekretierte Aspartatproteasen kodieren, *in vivo* etabliert worden (Staib et al. 1999; Staib et al. 2000).

Die vorliegende Arbeit beschäftigte sich zum einen mit der Verbesserung des neuen Markersystems. Zum anderen wurde die Biochemie und die biologische Rolle von *IMH3* im Vergleich zu MPA^R näher untersucht. Weiterhin wurde eine auf dem MPA^R -Markergen basierende Reporterfusion als Anwendungsbeispiel für den neuen Marker konstruiert.

Zur biochemischen Charakterisierung der MPA-sensitiven und MPA-resistenten IMP-Dehydrogenase sollten die entsprechenden Allele (*IMH3*, *MPA^R*) in *E. coli* exprimiert werden. Dazu wurde ein für Guanosin auxotropher Bakterienstamm (*E. coli* H712) verwendet. Die Zellen dieses Stammes besitzen eine Deletion im *guaB*-Gen, welches die bakterielle IMP-Dehydrogenase kodiert. Aus diesem Stamm sollte sich die rekombinante IMP-Dehydrogenase von *C. albicans* spezifisch aufreinigen lassen, ohne daß das bakterielle Enzym dabei stören würde. Außerdem ermöglichte die Auxotrophie der Bakterien eine positive Selektion auf Zellen, die mit einem funktionsfähigen *IMH3*-Gen komplementiert wurden. Auf die beschriebene Weise wurden schon erfolgreich IMP-Dehydrogenasen aus verschiedenen Organismen isoliert (Farazi et al. 1997; O'Gara et al. 1997; Zhou et al. 1997). Wegen des Introns von *IMH3* sollte für die Expression in *E. coli* cDNA verwendet werden.

Die biologische Rolle eines Enzyms läßt sich am besten durch eine gezielte Mutagenese des entsprechenden Gens ermitteln. *IMH3* wurde mit der *URA3*-Flipper-Technik im *C. albicans*-Stamm CAI4 inaktiviert. Eine *IMH3*-Mutante sollte zur Klärung der folgenden Fragen dienen:

- 1.) Gibt es weitere Gene in *C. albicans*, die eine IMP-Dehydrogenase kodieren?
- 2.) Wie wirkt sich der Verlust von *IMH3* phänotypisch auf die Zellen aus?
- 3.) Läßt sich die Mutante mit *MPA^R* komplementieren, und erfüllt dann dieses veränderte *IMH3*-Allel seine biologische Funktion genauso wie ein wildtypisches *IMH3*?

Die Mutante könnte auch zur Optimierung des neuen Markersystems sehr hilfreich sein. Wenn *MPA^R* aus *C. albicans* in *C. dubliniensis* funktioniert, dann müßte sich umgekehrt auch ein *IMH3*-Allel aus *C. dubliniensis* zu einem Resistenzmarker für *C. albicans* modifizieren lassen. Auf diese Weise könnte die störende Rekombination zwischen dem *MPA^R*-Gen und den chromosomalen *IMH3*-Allelen vermieden werden. In dieser Arbeit sollte *IMH3* aus *C. dubliniensis* isoliert und sequenziert werden. Eine *IMH3*-Mutante wäre dann ein ideales System, um die Funktionalität dieses Gens in *C. albicans* zu testen.

Zuletzt sollte eine FLP-Rekombinasefusion mit dem Promotor einer Phospholipase B (*PLB3*; Stephanie Theiß, persönliche Mitteilung; Genebank Accession-Number: AF038128) hergestellt werden. Die 2262 Basenpaare des *PLB3*-Exons enthalten die

Information für 754 Aminosäuren. Neben den sekretierten Aspartatproteasen werden Phospholipasen als möglicher Virulenzfaktor von *C. albicans* diskutiert (Ibrahim et al. 1995). Die Reporterfusion sollte zum einen mit dem beschriebenen *caFLP*-Gen konstruiert werden, zum anderen mit dem *ecaFLP*-Gen. Das zuletzt genannte Gen kodiert eine veränderte Form der FLP-Rekombinase, die durch vier Aminosäureaustausche eine höhere Temperaturstabilität besitzt und in ihrer Eigenschaft als Reporter gen ein wenig sensitiver ist (Staub et al. 2000). Dieser doppelte Ansatz erfolgte aus der Überlegung, daß sich nicht vorhersehen ließ, wie stark die Expression der Rekombinase unter der Kontrolle des *PLB3*-Promotors sein würde.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 *Escherichia coli*-Stämme

Für Klonierungen und die Expression rekombinanter *IMH3*-Allele wurden die in Tabelle 1 aufgeführten Bakterienstämme verwendet. Die Anzucht erfolgte in LB-Medium (1% Pepton aus Casein, 0,5% Hefeextrakt, 0,5% NaCl) unter Selektionsbedingungen mit 100 µg/ml Ampicillin.

Tabelle 1: In dieser Arbeit verwendete Bakterienstämme

Stamm	Genotyp	Referenz
DH5α	F ⁻ , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> (<i>r_K</i> ⁻ , <i>m_K</i> ⁻), <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>recA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> , $\Delta(\textit{argF-lac})\text{U169}$, λ^- , $\Phi 80\textit{dlacZ}\Delta\text{M15}$	(Woodcock et al. 1989)
H712	F ⁻ , <i>guaB</i> ⁻ , <i>thi</i> ⁻ , <i>his</i> ⁻ , <i>tyr</i> ⁻ , <i>try</i> ⁻ , <i>lac</i> ⁻ , <i>gal</i> ⁻ , <i>str</i> ^r	(Nijkamp et al. 1967)

3.1.2 Plasmide

In Tabelle 2 sind sämtliche Plasmide aufgeführt, die im Verlauf der Arbeit verwendet oder hergestellt worden sind.

Tabelle 2: In dieser Arbeit verwendete Plasmide

Bezeichnung	Grundvektor	Beschreibung	Referenz
pBluescript		Klonierungsvektor (pSK, pKS)	Stratagene, Heidelberg
pUC18		Klonierungsvektor	Life Technologies, Karlsruhe
pTacTac		Expressionsvektor	(Zhou et al. 1997)
pCD7	pSK [<i>KpnI</i> - <i>ClaI</i>]	enthält ein 500 bp großes <i>IMH3</i> -Fragment aus <i>C. dubliniensis</i>	diese Arbeit
pUCCDS4	pUC18 [<i>PstI</i> - <i>EcoRI</i>]	enthält <i>IMH3</i> -cDNA mit Deletion eines Nukleotids im 3'-Bereich	diese Arbeit
pUCCDS9	pUC18 [<i>PstI</i> - <i>EcoRI</i>]	enthält <i>MPA^R</i> -cDNA mit Deletion eines Nukleotids im 3'-Bereich	diese Arbeit
pTac1_5	pTacTac [<i>NdeI</i> - <i>HindIII</i>]	enthält vollständige <i>IMH3</i> -cDNA unter Kontrolle des Promotors von pTacTac	diese Arbeit
pTac4_13	pTacTac [<i>NdeI</i> - <i>HindIII</i>]	enthält vollständige <i>MPA^R</i> -cDNA unter Kontrolle des Promotors von pTacTac	diese Arbeit
pI4F	pSK [<i>EcoRI</i> - <i>BamHI</i>]	enthält <i>IMH3</i> -Gen aus <i>C. albicans</i> CAI4 (Pos. -601 bis +2302)	G. Köhler
pSFU1	pKS [<i>XhoI</i> - <i>BamHI</i>]	enthält <i>URA3</i> -Flipper	(Morschhauser et al. 1999)
pSFIMH3	pI4F	enthält [5' <i>IMH3</i> -TAG- <i>URA3</i> -Flipper-TAG-3' <i>IMH3</i>]-Fragment	diese Arbeit
pKP1	pSK [<i>BamHI</i> - <i>HindIII</i>]	enthält ein Fragment des <i>PLB3</i> -Gens von Pos. -950 bis Pos. 2149 (<i>BamHI</i> -Schnittstelle)	S. Theiß
pSFL29	pKS [<i>XbaI</i> - <i>KpnI</i>]	enthält [<i>SAP2P</i> - <i>caFLP</i> -Reporter-3' <i>SAP2</i>]-Fragment	P. Staib

pSFL213	pKS [<i>Xba</i> I- <i>Kpn</i> I]	enthält [<i>SAP2P-ecaFLP</i> -Reporter-3' <i>SAP2</i>]-Fragment	(Staub et al. 2000)
pPLPS29_3	pSFL29	enthält [<i>PLB3P-caFLP</i> -Reporter-3' <i>SAP2</i>]-Fragment	diese Arbeit
pPLPS213_3	pSFL213	enthält [<i>PLB3P-ecaFLP</i> -Reporter-3' <i>SAP2</i>]-Fragment	diese Arbeit
pPLB3S29	pPLPS29_3	enthält [<i>PLB3P-caFLP</i> -Reporter-3' <i>PLB3</i>]-Fragment	diese Arbeit
pPLB3S213	pPLPS213_3	enthält [<i>PLB3P-ecaFLP</i> -Reporter-3' <i>PLB3</i>]-Fragment	diese Arbeit

3.1.3 *Candida*-Stämme

In Tabelle 3 sind alle *Candida*-Stämme angegeben, die im Verlauf der Arbeit verwendet oder hergestellt wurden.

Tabelle 3: In dieser Arbeit verwendete *Candida*-Stämme

Stamm	Genotyp	Referenz
<i>Candida albicans</i>		
SC5314	Wildtyp	(Gillum et al. 1984)
CAF2	SC5314, <i>URA3/ura3::imm434</i>	(Fonzi et al. 1993)
CAI4	SC 5314, <i>ura3::imm434/ura3::imm434</i>	(Fonzi et al. 1993)
EC3	enthält anstelle des wildtypischen <i>IMH3</i> - das <i>MPA^R</i> -Gen	G. Köhler
CI1M7	CAI4, <i>IMH3/imh3::TAG-URA3-Flipper-TAG</i>	diese Arbeit
CI1M15	CAI4, <i>IMH3/imh3::TAG-URA3-Flipper-TAG</i>	diese Arbeit
CI1D7	CAI4, <i>IMH3/imh3::FRT</i>	diese Arbeit
CI1D15	CAI4, <i>IMH3/imh3::FRT</i>	diese Arbeit
CI2M7	CAI4, <i>imh3::FRT/imh3::TAG-URA3-Flipper-TAG</i>	diese Arbeit

CI2M15	CAI4, <i>imh3::FRT/imh3::TAG-URA3-Flipper-TAG</i>	diese Arbeit
CFI1	CAI4, <i>ACT1/act1::FRT-MPA^R-FRT</i>	(Staib et al. 1999)
PL3SF29_13*	CFI1, <i>PLB3-2/plb3-1::PLB3P-caFLP-Reporter-3'PLB3</i>	diese Arbeit
PL3SF29_15*	CFI1, <i>PLB3-1/plb3-2::PLB3P-caFLP-Reporter-3'PLB3</i>	diese Arbeit
PLSF213_13*	CFI1, <i>PLB3-1/plb3-2::PLB3P-ecaFLP-Reporter-3'PLB3</i>	diese Arbeit
PLSF213_17*	CFI1, <i>PLB3-2/plb3-1::PLB3P-ecaFLP-Reporter-3'PLB3</i>	diese Arbeit
<i>Candida dubliniensis</i>		
CD 33	Wildtyp	(Sullivan et al. 1995)

**PLB3-1* und *PLB3-2* bezeichnet zwei unterschiedliche Allele von *PLB3*, in die die Reporterfusion integriert ist.

3.1.4 Oligonukleotide

Tabelle 4 zeigt sämtliche Oligonukleotide. Alle wurden von der Firma MWG-Biotech in Ebersberg bezogen. T_M gibt die Schmelztemperatur laut Hersteller an. 5'-IRD 800 bezeichnet einen Fluoreszenzfarbstoff am 5'-Ende der Oligonukleotide zur Sequenzierung mit dem LI-COR-Sequenziergerät. Die Erkennungssequenzen für die angegebenen Restriktionsenzyme sind unterstrichen. Die angegebenen Positionen beziehen sich auf das Startcodon. Sie geben nur den Bereich an, welcher den Sequenzen des jeweiligen Gens entspricht. Heterologe Anteile der Oligonukleotide wurden in der Numerierung nicht berücksichtigt.

Tabelle 4: In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide

Bezeichnung und Länge	T_M (°C)	Sequenz/ Position (5'→3')	Verwendung
IDHCLAR (18-mer)	51,6	(+1511)-GCATGGC <u>ATCGAT</u> GGAAC-(+1496)	<i>IMH3</i> (-Strang) <i>ClaI</i> -site

LDHKPNE (18-mer)	46,4	(+993)-CTGCCATTGGT <u>ACCATTG</u> -(+1012)	<i>IMH3</i> (+Strang) <i>KpnI</i> -site
IDHXBAR (22-mer)	51,3	(+2302)-CCGCTCTAGAACTCAG TATATC-(+2286)	<i>IMH3</i> (-Strang) <i>XbaI</i> -site
IMH3RXF (29-mer)	47,9	(-601)-GATTAGAATTCTCTAGATG TTTATGATAC-(-584)	<i>IMH3</i> (+Strang) <i>EcoRI</i> -site
SMACD (27-mer)	65,7	(+1390)-TACATCCCGGGTGCPTCTTGT GTTATG-(+1405)	<i>IMH3</i> (+Strang) <i>SmaI</i> -site
CDSAC (27-mer)	63,4	(+1151)-CACTACCGCGGCAATAACTTG TAATTC-(+1136)	<i>IMH3</i> (-Strang) <i>SacII</i> -site
CA5CDS (33-mer)	67,0	(+1)-CGGCGGAATTCATGGTGT TTGAAACTTCAAAG-(+22)	<i>IMH3</i> (+Strang) <i>EcoRI</i> -site
CACDS3 (32-mer)	64,4	(+1810)-TGGA <u>ACTGCAGTTAGTTG</u> TGTAATCTCTTTTC-(+1790)	<i>IMH3</i> (-Strang) <i>PstI</i> -site
5TGCDS (21-mer)	52,0	(+2)- P_i -TGGTGTTTGAAACTTCA AAAG-(+22)	<i>IMH3</i> (+Strang)
CDS3HIND (35-mer)	64,8	(+1811)-TGGTCAAGCTTAGTTGTG TAATCTCTTTTCATA-(+1787)	<i>IMH3</i> (-Strang) <i>HindIII</i> -site
KOIMHS (52-mer)	> 75,0	(-19)-CAGGGACGACTGGT <u>CGACN</u> ₁₀ CC CGGGAGAAATGGGAATGGGTAG-(-39)	<i>IMH3</i> (-Strang) <i>SalI</i> -site
NIMHKO (52-mer)	> 75,0	(+1579)-TAATTGCGGCCGCTGCAGN ₁₀ GC ATGCCCAAGGTGTCTCTGGTTC-(+1599)	<i>IMH3</i> (+Strang) <i>NotI</i> -site
DATA1 (24-mer)	62,7	(+1609)- IRD 800 -ATCAACGACTGAACCA GAGACACC-(+1586)	<i>IMH3</i> (-Strang) Sequenzierung
DATA2 (20-mer)	55,3	(+714)- IRD 800 -CCGCCAACTTTA CCATTTTC-(+695)	<i>IMH3</i> (-Strang) Sequenzierung
DATA3 (20-mer)	55,3	(+285)- IRD 800 -GAATGATACCA ATACCACCC-(+266)	<i>IMH3</i> (-Strang) Sequenzierung
TUVOK1 (22-mer)	58,4	(+369)- IRD 800 -GTCATTTCTCCT GAAGTCACTG-(+390)	<i>IMH3</i> (+Strang) Sequenzierung
TUVOK2 (23-mer)	60,6	(+901)- IRD 800 -GGTGTCTTTGAT TTCTCGTACCG-(+927)	<i>IMH3</i> (+Strang) Sequenzierung
TUVOK3 (19-mer)	54,5	(+1507)- IRD 800 -CATGCAACAAAC CAACACC-(+1525)	<i>IMH3</i> (+Strang) Sequenzierung

2105IMH (18-mer)	56,0	(+1502)- IRD 800 -CGATGGAACCCA TACCTC-(+1485)	<i>IMH3</i> (-Strang) Sequenzierung
*SPLIC2 (31-mer)	66,8	(+435)-TTCCAGTCACTGAAAATGGTA AAGTTGGCG-(+715)	<i>IMH3</i> (+Strang) Sequenzierung
XAMPLI1 (29-mer)	63,9	(-950)-TAGTCTCTAGATTCGCCATTA CAAAGAGC-(-933)	<i>PLB3</i> (+Strang) <i>XbaI</i>
SALPRO (29-mer)	66,7	(-7)-CACAAGTCGACGAGAAGAAGC GAAAAC-(-22)	<i>PLB3</i> (-Strang) <i>SaII</i>
AMPLI1 (27-mer)	63,4	(-950)-TAGTCAAGCTTCGCCATTACA AAGAGC-(-933)	<i>PLB3</i> (+Strang)
PLB1390 (30-mer)	62,3	(+234)-GACTGCTCGAGTGTAAGACT TGCTGAATCG-(+216)	<i>PLB3</i> (-Strang) <i>XhoI</i>
ST4DOWN12 (18-mer)	53,7	(-495)- IRD 800 -TAATTCCGTCTGG TAGCC-(-513)	<i>PLB3</i> (-Strang) Sequenzierung
AXEL (18-mer)	51,4	(-213)- IRD 800 -GTCTGATAAAGTG ACAGC-(-230)	<i>PLB3</i> (-Strang) Sequenzierung
FLP11SEQ (23-mer)	60,6	IRD 800 -CAGTTCGAATCATCGGAAG AAGC	<i>FLP</i> (-Strang) Sequenzierung

*Der Primer SPLIC2 bindet nur an cDNA, da er am Übergang vom Exon1 zum Exon2 von *IMH3* liegt.

3.1.5 Sonden zur Hybridisierung nach Southern

Die Sonden für verschiedene Southern-Blots wurden mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion hergestellt. In Tabelle 5 werden die Primer genannt, die dazu verwendet wurden.

Tabelle 5: In dieser Arbeit verwendete DNA-Sonden

Bezeichnung	Zum Nachweis von	PCR-Primer zur Herstellung	Länge in Basenpaaren (bp)
<i>IMH3</i> _{KPNXBA}	<i>IMH3</i> aus <i>C. albicans</i>	LDHKPNE, IDHXBAR	ca. 1300 bp
<i>PLB3</i> _{AMPLI1}	<i>PLB3</i> aus <i>C. albicans</i>	AMPLI1, PLB1390	ca. 1200 bp
<i>CdIMH3</i> ₅₀₀	<i>IMH3</i>	LDHKPNE, IDHCLAR	ca. 500 bp

3.2 Allgemeine molekularbiologische Methoden

3.2.1 Methoden zur Herstellung rekombinanter DNA

Gängige Methoden der Molekularbiologie wurden anhand von etablierten Standardprotokollen durchgeführt (Ausubel 1989). Dazu gehörten die Isolierung von Plasmid-DNA gemäß dem Prinzip der alkalischen Lyse, die Aufreinigung von DNA durch Phenolisierung und Ethanol-fällung, das Auffüllen von 5'-Überhängen mit dem Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I aus *E. coli* (Life-Technologies; Karlsruhe, Deutschland), die enzymatische Hydrolyse von 5'-Phosphatgruppen mit Hilfe der Shrimp-Phosphatase (Amersham Pharmacia; Freiburg, Deutschland), die Ligation von DNA-Fragmenten durch die T4 DNA-Ligase (Life-Technologies) und die Transformation von *E. coli* mit der CaCl₂-Methode. Für die Spaltung von DNA wurden die Restriktionsendonucleasen der Firmen Amersham Pharmacia und New England Biolabs (Schwalbach/Taunus, Deutschland) mit den dazu angebotenen Reaktionspuffern verwendet. Die Reaktionsbedingungen wurden entsprechend der Angaben in den beigelegten Beschreibungen gewählt.

Zur DNA-Aufreinigung von Plasmid-DNA wurden auch der „Qiaprep Spin Miniprep Kit“ und der „Midiprep Kit“ der Firma Qiagen (Hilden, Deutschland) verwendet. PCR-Produkte, die zur Klonierung mit Restriktionsenzymen geschnitten werden mußten, wurden zuvor mit dem „PCR Purification Kit“ der Firma Qiagen aufgereinigt.

3.2.2 Auftrennung von DNA in präparativen und analytischen Agarosegelen

In dieser Arbeit wurden ausschließlich TAE-Agarosegele verwendet (50mal TAE-Stocklösung: 242 g Tris; 57,1 ml Eisessig; 100 ml 0,5 M EDTA pH 8,0; ad 1 l H₂O_{dest}). Um die DNA unter UV-Licht sichtbar zu machen, wurden die Gele nach dem Auftrennen im elektrischen Feld in einem Ethidiumbromidbad gefärbt. Analytische Gele waren einprozentig. Die Auftrennung der DNA erfolgte bei 100 V in der Elektrophoresekammer „Bio-Rad (Mini-) Sub-Cell GT“ (Bio-Rad; München, Deutschland). Die Auftrennung in präparativen Gelen (1% Agarose) und Gelen, die nach Southern geblottet werden sollten (0,8 % Agarose), erfolgte über Nacht bei 40 V in der Elektrophoresekammer „Bio-Rad Sub-Cell GT“. Die Elution von DNA-Fragmenten wurde mit Hilfe des „Gene-Clean Kits“ der Firma BIO 101 (bezogen über Q-Biogen, Deutschland) durchgeführt.

3.2.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) (Saiki et al. 1988)

PCR-Reaktionen wurden entweder mit dem „Elongase Enzyme Mix“ der Firma Life Technologies oder der „Herculase Enhanced DNA Polymerase“ von Stratagene (Amsterdam Zuidooost, Niederlande) durchgeführt. Als Template-DNA dienten entweder 500 ng chromosomale DNA oder 1-5 ng Plasmid-DNA. Nukleotide wurden in einer Endkonzentration von 200 μ M eingesetzt. Ein Reaktionsansatz von 100 μ l enthielt jeweils 25 pmol der beiden Primer. Die restlichen Komponenten wurden entsprechend der Vorschrift für das jeweilige Enzym zugegeben. Die Magnesiumchloridkonzentration bei Verwendung der Elongase betrug 1,6 mM (4 μ l „Buffer A“ und 6 μ l „Buffer B“ in 100 μ l Reaktionsgemisch).

Die PCR-Reaktionen liefen nach den folgenden Schemata ab:

„Elongase Enzyme Mix“: Es wurde 2 Minuten bei 94°C denaturiert. Dann folgten 35 Zyklen mit jeweils 30 s bei 94°C zum Denaturieren, 30 s Annealing der Primer und 60 s Extensionszeit bei 68°C pro kb zu amplifizierendes DNA-Fragment. Ein zusätzlicher Zyklus von 10 Minuten bei 68°C beendete das Programm.

„Herculase Enhanced DNA-Polymerase“: Zunächst wurde 2 Minuten bei 95°C denaturiert. Es folgten 10 Zyklen mit 30 s bei 95°C zum Denaturieren, 30 s Annealing der Primer und 60 s Extensionszeit bei 72°C pro kb zu amplifizierendes DNA-Fragment. Weitere 20 Zyklen folgten, die sich dadurch von den vorherigen 10 unterschieden, daß die Extensionszeit pro Zyklus um 10 s erhöht wurde. Der letzte Zyklus im Vergleich zur Reaktion mit dem „Elongase Enzyme Mix“ entfiel.

Die Annealingtemperatur wurde meist 2-5°C unter der Schmelztemperatur der eingesetzten Primer gewählt. Gelingt die PCR bei dieser Temperatur nicht, wurde sie mit dem „Mastercycler Gradient“ der Firma Eppendorf-Netheler-Hinz (Köln, Deutschland) empirisch ermittelt. Dieses Gerät ermöglicht ein PCR-Programm, bei dem verschiedene Proben parallel auf unterschiedliche Temperaturen gebracht werden können.

3.2.4 DNA-Sequenzierung (Sanger et al. 1977)

Die automatische DNA-Sequenzierung wurde mit den Sequenziergeräten der Firmen LI-COR (Model 4000; über MWG Biotech; Ebersberg, Deutschland) oder Perkin-Elmer (ABI PRISM 310 Genetic Analyzer) durchgeführt.

Für die Sequenzierung mit dem „LI-COR“-Sequenziergerät wurde der „T7 Sequencing Kit“ der Firma Amersham Pharmacia verwendet. Eingesetzt wurden 5 µg gereinigte Plasmid-DNA (Qiaprep Spin Miniprep Kit) und 1 pmol eines 5'-IRD 800 fluoreszenzmarkierten Primers. Einem Zyklus von 2 Minuten bei 95°C folgten in der Sequenzierreaktion 30 Zyklen mit jeweils 15 s bei 95°C zum Denaturieren, 15 s Annealing und 15 s Extension bei 70°C. Die gewählte Annealingtemperatur lag dabei 3°C über der Schmelztemperatur des Primers.

Die Sequenzierung am „ABI-Gerät“ wurde mit dem zugehörigen „Ampli Taq FS BigDye Terminator Sequencing Kit“ durchgeführt. Eingesetzt wurden 0,5 µg gereinigte Plasmid-DNA und 3-10 pmol Primer, der in diesem Fall nicht fluoreszenzmarkiert sein durfte. Die Reaktion lief folgendermaßen ab: Ein Zyklus von 2 Minuten bei 96°C, 25 Zyklen mit 30 s bei 96°C zum Denaturieren, 15 s Annealing und 4 Minuten Extension bei 60°C. Die Annealingtemperatur wurde entsprechend der Schmelztemperatur des Primers gewählt.

3.2.5 Anzucht der verwendeten *Candida*-Stämme

Für die Anzucht von *Candida spec.* wurden folgende Medien verwendet:

YPD-Medium 2 % Pepton aus Casein
 1 % Hefe-Extrakt
 2 % Glucose

MM-Medium 0,67 % YNB (Yeast Nitrogen Base; BIO 101)
 2 % Glucose
 1x CSM-URA (BIO 101)

YCB-BSA	2,34 % YCB (Yeast Carbon Base)
	0,4 % BSA (bovines Serumalbumin)
	0,2 % Hefe-Extrakt
	pH 4,0

Zur Herstellung von Agarplatten wurden 15 g Agar pro Liter Medium zugegeben. Die verwendeten *Candida*-Stämme wurden auf Agarplatten bei 30°C inkubiert, bis sich Kolonien gebildet hatten (2-4 Tage, je nach Medium). Anschließend wurden sie bis zur weiteren Verwendung bei 4°C aufbewahrt (maximal 4 Wochen). Übernachtkulturen in den Flüssigmedien wurden bei 30°C und 250 Umdrehungen pro Minute (Upm) geschüttelt. Bei Verwendung der Stämme CAI4 und CFI1 wurden die Medien unter nicht selektiven Bedingungen mit 100 µg/ml Uridin substituiert, das aus einer Stocklösung mit einer Konzentration von 100 mg/ml stammte. Teilweise selektive Bedingungen wurden mit weniger Uridin im MM-Medium (10µg/ml) erreicht. *URA3*-negative Zellen bildeten hier kleinere Kolonien als *URA3*-positive. Die *IMH3*-Mutanten benötigten ein Medium mit 28 µg/ml Guanin. Eine Stocklösung konnte nur mit 0,1 N NaOH hergestellt werden, in der sich maximal 14 mg/ml Guanin lösen ließen. Bei der Zugabe dieser alkalischen Lösung zu den jeweiligen Medien mußte darauf geachtet werden, daß das Guanin nicht präzipitierte. Gleiches galt für die Herstellung von MM-Medium mit Xanthin. Zur Selektion gegen Mykophenolsäure wurde das MM-Medium mit MPA in einer Endkonzentration von 2,5 bzw. 10 µg/ml ergänzt.

3.2.6 Genetische Transformation von *C. albicans* durch Elektroporation

Die Transformation von *C. albicans* erfordert die Herstellung von elektrokompenten Zellen, die Einschleusung der Fremd-DNA durch Elektroporation und das Ausplattieren der behandelten Zellen auf ein selektives Medium. In der vorliegenden Arbeit wurde dazu nach folgendem Protokoll verfahren (Köhler et al. 1997):

Als Basis zur Herstellung der kompetenten Zellen dienten 10 ml Übernachtkultur in YPD (mit Uridin). 5 µl dieser Kultur wurden Abends zum Animpfen einer Kultur in 50 ml YPD (mit Uridin) verwendet. Die Zellen sollten sich am nächsten Morgen in der logarithmischen Wachstumsphase befinden und eine optische Dichte von 1,2-1,8 bei

600 nm Wellenlänge besitzen. Wenn das der Fall war, wurde die Kultur in ein steriles 50 ml-Röhrchen (Greiner Labortechnik) gefüllt und die Zellen 5 Minuten bei 4°C und 4000 Upm abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 8 ml eiskaltem destilliertem Wasser (H_2O_{dest}) resuspendiert. Die Suspension wurde mit 1 ml 10fach konzentrierten TE-Puffer (100 mM Tris-Cl pH 7,5; 10 mM EDTA) und 1 ml 1 M Lithiumacetat (pH 7,5) auf 10 ml aufgefüllt, vorsichtig 60 Minuten bei 30°C geschüttelt und weitere 30 Minuten nach der Zugabe von 250 μ l 1 M DTT. Nachdem der Ansatz mit 40 ml eiskaltem H_2O_{dest} vermischt war, wurden die Zellen bei 4°C und 4000 Upm abzentrifugiert. Ein weiterer Waschschrift folgte mit 50 ml H_2O_{dest} . Die Zellen wurden in 10 ml 1 M Sorbitol resuspendiert, wiederum abzentrifugiert, in 50 μ l 1 M Sorbitol aufgenommen und auf Aliquots zu 40 μ l verteilt. Zur Elektroporation wurden die Aliquots mit ungefähr 1 μ g DNA vermischt. Die DNA wurde zuvor aus einem Agarosegel eluiert und so verdünnt, daß das Volumen der transformierten DNA-Lösung genau 5 μ l betrug. Die kompetenten Zellen wurden in einer Elektroporationsküvette mit 2 mm Durchmesser (Equibio) mit Hilfe des Elektroporationsgerätes „EasyjecT Prima“ der Firma Equibio einem Spannungsimpuls von 1,8 kV unterzogen. Bis zu diesem Zeitpunkt wurden die Zellen immer auf Eis gehalten. Nach der Elektroporation wurde der Transformationsansatz in 1 ml kaltem 1 M Sorbitol suspendiert, in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß (Eppendorf) überführt und jeweils 100 μ l auf 4 Agarplatten mit MM-Medium (ohne Uridin) ausplattiert. Eine weitere Platte diente für die restliche Suspension. Nach 3-5 Tagen bei 30°C konnten Klone gepickt und erneut auf MM-Medium überstrichen werden. Um sie dann zu überprüfen, wurde die chromosomale DNA isoliert und ein Southern-Blot angefertigt.

3.2.7 DNA-Isolierung aus *Candida spec.* (Millon et al. 1994)

Je eine Kolonie der zu untersuchenden *Candida*-Stämme wurde in 10 ml YPD-Medium angeimpft und über Nacht bei 30°C geschüttelt. Die Kultur wurde in ein 50 ml-Röhrchen (Greiner Labortechnik) umgefüllt und 5 Minuten bei 4000 Upm abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml 1 M Sorbitol suspendiert, in ein 2 ml-Reaktionsgefäß (Eppendorf) überführt und 2 Minuten bei 13.000 Upm abzentrifugiert. Die gewaschenen Zellen wurden in 1 ml Lyse-Puffer (1 M Sorbitol; 100 mM NaCitrat pH 5,8; 50 mM EDTA pH 8,0; 2% β -Mercaptoethanol; 500 Units pro ml Lyticase) suspendiert und für 45 Minuten bei 37°C

inkubiert. Daraufhin wurde das Lysat 5 Minuten bei 10.000 Upm abzentrifugiert, in 0,8 ml Proteinase-Puffer (10 mM Tris-Cl pH 7,5; 50 mM EDTA pH 7,5; 0,5% SDS, 1 mg/ml Proteinase K) resuspendiert und für 30 Minuten bei 60°C inkubiert. Das Gemisch wurde anschließend dreimal mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol im Verhältnis 25:24:1 extrahiert. Nach dem letzten Schritt wurde der Extrakt mit einem gleichen Volumen Isopropanol (-20°C) vermischt. Durch Invertieren des Reaktionsgefäßes wurde die ausgefallene DNA verknäuel und anschließend mit einer über dem Bunsenbrenner zugeschmolzenen Pasteur-Pipette aufgewickelt. Die DNA wurde in 70% Ethanol gewaschen und in 200 µl TE-Puffer (10 mM Tris-Cl pH 7,5; 1 mM EDTA) gelöst. Nach der Zugabe von 2 µl RNaseA-Lösung (10 mg/ml) wurde für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Einer erneuten Phenol-Extraktion mit 200 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol folgte die Präzipitation der DNA mit 200 µl 100% Ethanol (-20°C). Der DNA-Knäuel wurde wiederum aufgewickelt. Nach einem Waschschrift mit 70% Ethanol wurde die DNA in 100 µl H₂O_{dest} gelöst. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte photometrisch bei 260 und 280 nm Wellenlänge, wobei eine OD₂₆₀ (optische Dichte bei 260 nm) von 1 einer Konzentration von 50 µg/ml entspricht. Die Verunreinigung durch Proteine wurde bei 280 nm bestimmt. Das Verhältnis OD₂₆₀/OD₂₈₀ sollte nicht unter 1,8 liegen.

3.2.8 Southern-Hybridisierung

10 µg chromosomale DNA wurden mit entsprechenden Restriktionsenzymen über Nacht gespalten (siehe unten) und in einem 0,8% TAE-Agarosegel über Nacht bei 40 V aufgetrennt. Parallel wurde ein Größenstandard aufgetragen (Life Technologies 1 kb Ladder). Das Gel wurde nach dem Anfärben in einem Ethidiumbromidbad unter UV-Licht fotografiert, wobei zur späteren Größenermittlung ein Lineal danebengelegt wurde. Nachdem die DNA mit dem Vakuumblotter „VacuGene XL“ der Firma Amersham Pharmacia auf eine Nylonmembran übertragen und mit Hilfe von UV-Licht kovalent an die Membran gebunden worden war, erfolgte die Hybridisierung mit einer DNA-Sonde und die Belichtung eines Röntgenfilms mit dem „ECL labeling and detection kit“ der Firma Amersham Pharmacia. Die Nylonmembran wurde zusammen mit der Detektionslösung in einem handelsüblichen Frischhaltebeutel aufbewahrt.

3.3 Expression von *IMH3* in *E. coli*

3.3.1 Isolierung von PolyA⁺-RNA und cDNA-Synthese

Zur Isolierung der Gesamt-RNA aus *C. albicans* wurden 100 µl einer YPD-ÜN-Kultur (30°C) in 10 ml YPD-Medium verdünnt und bei 30°C geschüttelt, bis die Zellen eine OD₆₀₀ von 1 erreicht hatten. Die Kultur wurde in einem 50 ml-Röhrchen 5 Minuten bei 4°C und 4000 Upm abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 1 ml H₂O_{dest} resuspendiert und in ein 2 ml-Reaktionsgefäß überführt. Das Wasser war zuvor über Nacht mit 0,1% Diethylpyrocarbonat (DEPC) bei 37°C inkubiert worden. Nun wurden die Zellen 1 Minute bei 13.000 Upm abzentrifugiert und in 600 µl TES-Puffer aufgenommen (10 mM Tris-Cl pH 7,5; 10 mM EDTA; 0,5% SDS). Nach der Zugabe von 600 µl saurem Phenol wurde für 60 Minuten bei 65°C inkubiert. Das Reaktionsgefäß wurde für 10 s in ein Gemisch aus Ethanol und Trockeneis getaucht (-70°C) und für 5 Minuten bei 13.000 Upm zentrifugiert. Die wäßrige Phase wurde in folgender Reihenfolge extrahiert: saures Phenol, Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1), Chloroform/Isoamylalkohol. Die organischen Lösungsmittel wurden jeweils im Volumenverhältnis 1:1 zur wäßrigen Phase gegeben. Die Präzipitation der RNA erfolgte 5 Minuten bei -70°C (Ethanol/Trockeneis) mit 10% (v/v) Natriumacetat pH 5,2 und 2,5 Volumen 100% Ethanol. Es wurde 5 Minuten bei 13.000 Upm zentrifugiert und mit 70% Ethanol gewaschen. Die RNA wurde in 100 µl DEPC-H₂O_{dest} gelöst und die Konzentration photometrisch bestimmt. Eine OD₂₆₀ von 1 entspricht dabei einer Konzentration von 40 µg/ml.

Die PolyA⁺-RNA wurde mit dem „Oligotex mRNA Mini Kit“ der Firma Qiagen isoliert. Prinzip dieser Methode ist die Bindung der polyadenylierten mRNA an Oligo-dT-Zellulose. Eingesetzt wurde der komplette Ansatz (maximal jedoch 250 µg pro Reaktion) aus der Isolierung der Gesamt-RNA (100 µl). Die cDNA wurde mit Hilfe der „SUPERScript II RNase H⁻ Reverse Transcriptase“ der Firma Life Technologies synthetisiert, nachdem die mRNA-Konzentration zunächst photometrisch bestimmt worden war. Ein Gemisch aus 0,5 µg RNA und 100 pmol Oligo-dT-Primer wurde in einem Volumen von 12 µl 10 Minuten bei 70°C inkubiert und auf Eis abgekühlt. Die Lösung wurde mit 4 µl 5fach konzentriertem „First-Strand Buffer“ (Life-Technologies), 2 µl 0,1 M DTT (Life-Technologies) und 1 µl 10 mM dNTPs ergänzt. Nachdem dieser Ansatz zwei

Minuten bei 42°C inkubiert worden war, wurden 200 Units (1 µl) „SUPERSRIPT II Reverse Transcriptase“ dazu pipetiert. Es folgten weitere 50 Minuten bei 42°C und 15 Minuten bei 70°C. Um die RNA in den DNA/RNA-Hybriden zu hydrolysieren, wurde das Gemisch 20 Minuten bei 37°C mit einer Unit RNaseH (Roche Molecular Biochemicals; Mannheim, Deutschland) inkubiert.

3.3.2 Herstellung der Expressionsvektoren

Die Grundlage zur Herstellung der *IMH3*-Expressionsvektoren stellte das PCR-Produkt aus dem Primerpaar CACDS3 und CA5CDS. Als Template diente 1 µl cDNA-Erststrang. Die Annealingtemperatur in der PCR-Reaktion betrug 50°C. Das 1,6 kb große PCR-Produkt wurde in den pUC18-Vektor kloniert. Dazu wurden das Plasmid und das Fragment mit *EcoRI* und *PstI* geschnitten. Um die Qualität der reversen Transkription zu überprüfen, wurde der Vektor mit allen zur Verfügung stehenden *IMH3*-Primern sequenziert. Zur Expression von *IMH3* in IMP-Dehydrogenase-negativen *E. coli* wurde der Expressionsvektor pTacTac verwendet. Die Klonierung erfolgte zwischen der *NdeI*- und der *HindIII*-Schnittstelle. Die *NdeI*-Schnittstelle wurde mit Hilfe des Klenow-Fragments aufgefüllt. Ligiert wurde das 1,6 kb große PCR-Produkt der Primer 5TGCD3 und CDS3HIND, das vorher mit *HindIII* geschnitten worden war. Als Template in der PCR-Reaktion diente der pUC18-Vektor, der die klonierte *IMH3*-cDNA enthält. Die Annealingtemperatur betrug 55°C.

Um zu überprüfen, ob die *E. coli*-Zellen eine funktionsfähige IMP-Dehydrogenase exprimieren, wurde der *guaB*-negative Stamm H712 verwendet. Die Zellen dieses Stammes sind auxotroph für Guanin und sollten durch die rekombinanten *IMH3*-Allele komplementiert werden, sofern diese richtig exprimiert wurden. Für den Test wurde ein M9CA-Minimalmedium verwendet, welches kein Guanin, Guanosin, Xanthin oder Xanthosin enthielt. Nur die gewünschten Expressionsklone sollten auf Agarplatten mit dem Medium wachsen können:

M9CA-Medium	M9-Minimal Salts (Life Technologies)	10 g/l
	NaCl	17 mM
	CaCl ₂	0,1 mM
	MgSO ₄	1 mM
	Casamino acids (Life Technologies)	1 g/l
	10x CSM (BIO 101)	100 ml/l
	Glucose	0,2%
	Thiamin	1 g/l
	IPTG	1 mM
	Ampicillin	50 mg/l

3.3.3 Überprüfung der Expression von *IMH3* in auxotrophen *Escherichia coli*

Um die Expression von *IMH3* in *E. coli* sichtbar zu machen, wurde zunächst der *lacUV5*-Promotor vor dem rekombinanten *IMH3* mit IPTG induziert und anschließend ein Zellextrakt auf ein Proteingel aufgetragen.

Zur Induktion der Expression wurden 200 µl einer *E. coli* H712 ÜN-Kultur (LB-Ampicillin 37°C), die das Plasmid pTac1_5 bzw. pTac4_13 enthielten, in 20 ml LB-Ampicillin verdünnt. Als Kontrolle diente eine Bakterienkultur, die den Vektor pTacTac enthielt. Es wurde bei 37°C geschüttelt. Als die Zellen eine OD₆₀₀ von circa 0,5 erreicht hatten, wurde eine Probe entnommen und anschließend IPTG in einer Endkonzentration von 1 mM zu den Zellen pipetiert. Es wurde weiter bei 37°C geschüttelt. Weitere Probenentnahmen folgten 1,5 h und 5 h nach der IPTG-Zugabe. Das entnommene Volumen (V_{entn}) der Proben wurde entsprechend der Gleichung $V_{\text{entn}}=1 \text{ ml}/\text{OD}_{600}$ gewählt. Somit enthielt eine Probe die Zellzahl, die in einem Milliliter Kultur mit einer OD₆₀₀ von 1 zu finden ist.

Um die Zellen aufzuschließen, wurden die Proben 30 s bei 13.000 Upm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 200 µl Auftragepuffer (62,5 mM Tris-Cl pH 6,8; 20% Glycerol; 2% SDS; 5% β-Mercaptoethanol) resuspendiert. Dieses Gemisch

wurde für 10 Minuten bei 95°C inkubiert und 5 Minuten bei 13.000 Upm zentrifugiert. 20 µl des Überstandes wurden auf ein Proteingel aufgetragen. In dieser Arbeit wurde dazu die SDS-PAGE-Apparatur „Mini-PROTEAN 3“ der Firma Bio-Rad verwendet. Es wurden jeweils zwei Gele gleichzeitig gegossen, welche die folgende Zusammensetzung hatten (Laemmli 1970):

Tabelle 6: Zusammensetzung der Polyacrylamidgele

	Trenngel	Sammelgel
Acrylamid/Bisacrylamid (37,5/1)	12%	4%
Tris-Cl pH 8,8	375 mM	
Tris-Cl pH 6,8		125 mM
SDS	0,1%	0,1%
APS (Ammoniumperoxodisulfat)	0,05%	0,05%
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin)	0,05%	0,1%

Nach der Montage der Apparatur wurde diese mit Laufpuffer (25 mM Tris; 192 mM Glycin; 0,1% SDS pH 8,3) gefüllt und die Proteine circa 45 Minuten bei 25 mA pro Gel aufgetrennt (50 mA für zwei Gele). Die Gele wurden mit Coomassie-Blue R250 gefärbt (Ausubel 1989).

3.4 Herstellung einer *IMH3*-Mutante

3.4.1 Herstellung der Mutagenese-Kassette

Zur Herstellung des Plasmids pSFIMH3, welches den *URA3*-Flipper, flankiert vom *IMH3* 5'- und 3'-Bereich enthält, wurden zunächst die Schnittstellen für *SalI* und *NotI* im Plasmid pI4F entfernt. Dazu wurde das Plasmid mit einem der genannten Enzyme gespalten, der entstandene 5'-Überhang mit dem Klenow-Fragment aufgefüllt, das linearisierte Plasmid religiert und in *E. coli* DH5α transformiert. Die zweite Schnittstelle wurde auf die gleiche Weise entfernt. Das so modifizierte Plasmid pI4F diente als

Template für die divergente PCR mit den Primern KOIMHS und NIMHKO (Annealingtemperatur 50°C). Das 4 kb PCR-Produkt wurde mit *NotI* und *SalI* gespalten. Die Ligation erfolgte mit dem *NotI/XhoI*- Fragment des Vektors pSFU1, das ebenfalls 4 kb groß ist und den *URA3*-Flipper enthält. Das Ergebnis war das Plasmid pSFIMH3.

3.4.2 Mutagenese von *Candida albicans*

Die Transformation des Stammes CAI4 erfolgte mit dem circa 5 kb großen *ApaI/SacI*-Fragment aus pSFIMH3. *URA3*-positive Transformanten wurden im Southern-Blot überprüft. In richtigen Klonen wurde nun der Marker durch FLP-vermittelte Rekombination deletiert. Dazu wurden die *URA3*-positiven Klone in 10 ml YCB-BSA-Medium 20-24 h bei 30°C geschüttelt und 100 µl einer 10⁻⁵-Verdünnung dieser Kultur auf MM-Medium mit wenig Uridin (10 µg/ml) ausplattiert. Nach zwei bis drei Tagen waren große und kleine Kolonien sichtbar. Die Zellen in den kleinen Kolonien hatten den Marker verloren und wurden für die nächste Transformationsrunde verwendet. Als DNA-Fragment für diese zweite Transformation wurde das PCR-Produkt der Primer CDS3HIND und IMH3RXF verwendet. Als Template dienten 5 µl einer 10⁻³-Verdünnung des *ApaI/SacI*-Fragments aus der ersten Transformation. Die Annealingtemperatur in dieser PCR-Reaktion betrug 50°C.

3.4.3 Phänotypische Untersuchungen der Mutanten

Zur Untersuchung des Phänotyps wurde eine Wachstumskurve aufgenommen. Außerdem wurde das Vermögen der Zellen studiert, unter definierten Bedingungen wachsen zu können.

Für die Wachstumskurve wurde eine YPD-ÜN-Kultur (30°C) in verschiedenen Medien auf eine OD₆₀₀ von 0,1 verdünnt und über einen Zeitraum von 15 h stündlich die optische Dichte bei 600 nm Wellenlänge ermittelt. Ein weiterer Wert wurde am nächsten Tag genommen. Die Stoffwechselleistungen der Mutante wurde auf MM-Medium mit und ohne Guanin bzw. mit Xanthin überprüft.

3.5 Isolierung eines *IMH3*-Genfragments aus *C. dubliniensis*

3.5.1 Sequenzierung eines DNA-Fragments aus *C. dubliniensis*

Grundlage für die Isolierung eines vermeintlichen *IMH3*-Genabschnitts aus *C. dubliniensis* war ein 500 bp großes PCR-Produkt der Primer IDHCLAR und LDHKPNE. Als Template diente die chromosomale DNA des Stammes *C. dubliniensis* CD33. Die Annealingtemperatur in der PCR-Reaktion betrug 46°C. Das Fragment wurde mit Hilfe der Restriktionsenzyme *KpnI* und *Clal* in dem Vektor pBluescript SK kloniert und mit den vektorialen Primern M13-Universal und Reverse sequenziert.

3.5.2 Isolierung von *IMH3* aus *C. dubliniensis* durch inverse PCR

Das 500 bp-Fragment aus *C. dubliniensis* diente als Sonde für einen Southern-Blot. Untersucht wurden Spaltungen der chromosomalen DNA von *C. dubliniensis* mit verschiedenen Restriktionsendonukleasen. Fragmente mit einer Größe von 4-8 kb sollten durch eine inverse PCR (Ochman et al. 1988) amplifiziert werden. Bei dieser Methode werden lineare DNA-Fragmente durch Ligation zunächst zirkularisiert und mit gegenläufigen Primern amplifiziert.

Das Template für die inverse PCR wurde in der vorliegenden Arbeit auf folgende Weise gewonnen. 10 µg chromosomale DNA wurde mit Restriktionsenzymen gespalten, die zur gewünschten Fragmentgröße von 4-8 kb führten und auf ein Elutionsgel aufgetragen. Nach der Auftrennung wurden in der Höhe kleine Agaroseblöckchen ausgeschnitten, in der entsprechend der Ergebnisse des Southern-Blots die gesuchten Fragmente erwartet wurden. Die DNA wurde eluiert. Zwei von 20 µl Eluat dienten als Template für eine Kontroll-PCR mit den Primern IDHCLAR und LDHKPNE. Fraktionen, die ein gesuchtes Fragment enthielten, sollten ein 500 bp großes PCR-Produkt ergeben. Von den Eluaten, für die das der Fall war, wurden 2 µl unverdünnt und 2 µl einer 1:10-Verdünnung in eine 20 µl Ligationsreaktion eingesetzt. Die inverse PCR wurde mit 5 µl dieses Ansatzes als Template durchgeführt. Dazu dienten die gegenläufigen Primer CDSAC und SMACD bei einer Annealing-Temperatur von 60°C.

3.5.3 Erstellung einer gröbenselektionierten Genbank aus *C. dubliniensis*

Parallel zur inversen PCR wurden 7 µl der eluierten DNA in den Vektor pBluescript SK kloniert. Um Religanden des Vektors zu vermeiden, wurde das Plasmid nach dem Restriktionsverdau dephosphoryliert. Nach der Transformation in *E. coli* DH5α wurden die Kolonien mit LB-Medium abgeschwemmt und mit einem sechstel Volumen 86% Glycerin bei -80°C eingefroren.

3.6 Herstellung einer *PLB3*-Promotorfusion

3.6.1 Herstellung der FLP-Rekombinasefusion mit dem *PLB3*-Promotor

Ausgangspunkt für die Herstellung der Reporterfusion waren die Plasmide pSFL29 und pSFL213. Für die Klonierungsstrategie spielte die Unterscheidung zwischen diesen beiden Plasmiden keine Rolle. Der *PLB3*-Promotor wurde durch PCR mit den Primern XAMPLI und SALPRO (Annealingtemperatur 50°C) aus der chromosomalen DNA von *C. albicans* CAI4 angereichert und das 950 bp große Produkt mit *Xba*I und *Sal*I geschnitten. Es wurde dann mit dem *Xba*I/*Eco*RV-Fragment (5 kb) und dem *Sal*I/*Eco*RV-Fragment (350 bp) aus pSFL29 bzw. pSFL213 ligiert. Der 3'-*SAP2*-Bereich in den erhaltenen Plasmiden (pPLPS29_3 und pPLPS213_3) wurde durch Spaltung mit *Pst*I und *Sac*I entfernt. Das 7 kb-Fragment dieser Reaktionen wurde jeweils in eine Ligation mit dem *Pst*I/*Sac*I-Fragment (750 bp) aus pKP1 eingesetzt und ergab die Plasmide pPLB3S29 und pPLB3S213.

Zur Transformation von *C. albicans* CFI1 wurde das *Xba*I/*Sac*I-Fragment der beschriebenen Klonierung verwendet. Die Selektion positiver Transformanten erfolgte auf MM-Medium ohne Uridin. Die Überprüfung der Klone wurde mittels Southern-Blot durchgeführt. Um die Aktivität der Reporterfusion zu überprüfen wurden jeweils 100-200 Zellen auf MM-Medium mit Mykophenolsäure (2,5 µg/ml) ausplattiert. Dazu wurden zunächst Einzelkolonien der Klone in MM-Medium suspendiert und mit einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt.

4 Ergebnisse

4.1 Expression von *IMH3* in *E. coli*

Zielsetzung: Zur biochemischen Charakterisierung der MPA-sensitiven und MPA-resistenten Form der IMP-Dehydrogenase aus *C. albicans* sollten die beiden Enzyme in dem Bakterium *E. coli* exprimiert werden, damit sie für eine spätere, spezifische Aufreinigung zur Verfügung stehen. Zu diesem Zweck wurden Expressionsplasmide hergestellt und der Erfolg dieser Klonierung in einem Proteingel überprüft.

4.1.1 Herstellung der Expressionsvektoren

Da *IMH3* ein Intron besitzt, wurde für die Expression in *E. coli* cDNA verwendet. Wie im Methodenteil beschrieben, wurde zunächst die Gesamt-RNA und anschließend die PolyA⁺-RNA aus *C. albicans* isoliert. Um später die cDNA für das wildtypische *IMH3*-Allel zu erhalten, wurde die RNA aus dem Stamm CAI4 verwendet und für das *MPA^R*-Allel die RNA aus dem Stamm EC3 isoliert. Die Erststrangsynthese mit dem Oligo-dT-Primer und die Amplifikation des gesamten Leserasters von *IMH3* mit den Primern CA5CDS und CACDS3 erfolgte nach dem in Abbildung 1 dargestellten Schema.

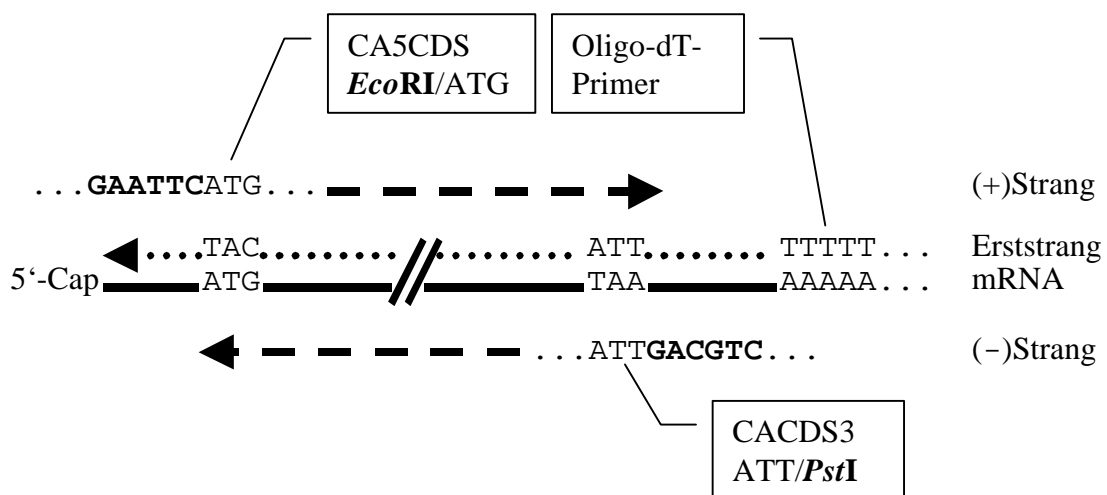


Abb. 1: Isolierung und Klonierung der kodierenden Sequenz von *IMH3* und *MPA^R* (Erklärung siehe Text)

Diese Abbildung zeigt die wesentlichen Bestandteile der PCR-Primer, nämlich die Schnittstellen für *EcoRI* und *PstI*, die zur Klonierung in den Vektor pUC18 dienten, und das Start und Stopcodon des Leserasters von *IMH3*. Die Klonierungen der 1,6 kb großen Fragmente des wildtypischen *IMH3*-Allels und des *MPA^R*-Allels ergaben die Plasmide pUCCDS4 und pUCCDS9. Durch Sequenzierung der Plasmide konnte jedoch eine Deletion eines Adenin-Nukleotids im Stopcodon festgestellt werden. Die restliche Sequenz entsprach aber den Erwartungen. Aus diesem Grund wurden die konstruierten Plasmide als Template für die PCR-Primer 5TGCDS und CDS3HIND verwendet. Der Primer CDS3HIND sollte die Deletion im 3'-Bereich durch gezielte PCR-Mutagenese beheben.

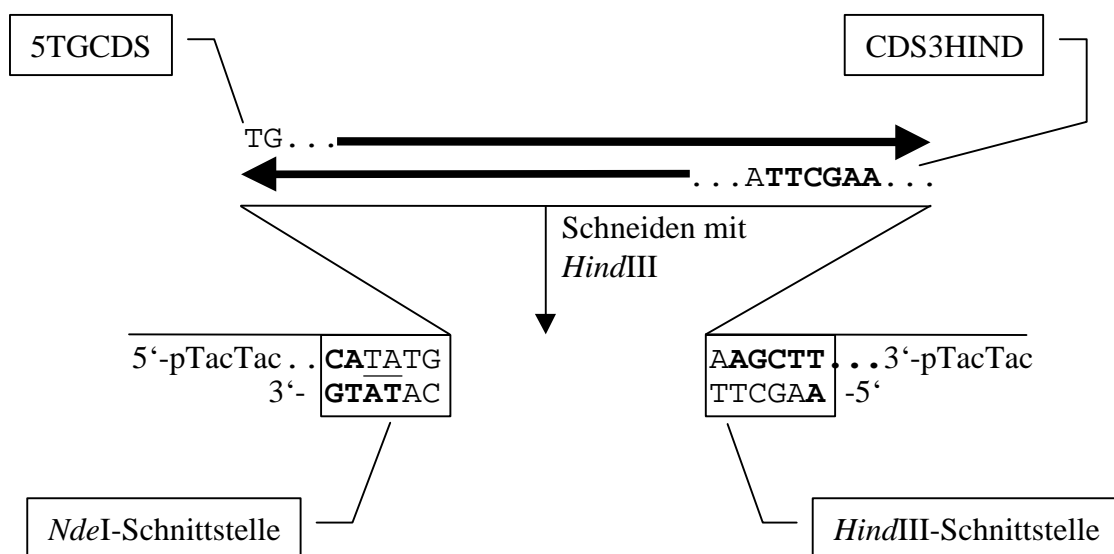


Abb. 2: Herstellung der Expressionsvektoren pTac1_5 und pTac4_13 (Erklärung siehe Text)

Abbildung 2 zeigt die Klonierung der PCR-Produkte in den Expressionsvektor pTacTac. Dieses Plasmid wurde ursprünglich zur mit IPTG induzierbaren Expression von T4-Lysozym in *E. coli* konstruiert. Durch die aufeinanderfolgende Behandlung mit *NdeI*, dem Klenow-Fragment und *HindIII* wurde die kodierende Sequenz für das T4-Lysozym aus dem Vektor ausgeschnitten. Die Nukleotide, mit denen die *NdeI*-Schnittstelle von pTacTac aufgefüllt wurde, sind in Abbildung 2 unterstrichen. Das PCR-Produkt wurde nur mit *HindIII* geschnitten. Die „blunt-end“-Klonierung auf der 5'-Seite des PCR-Produkts war notwendig, da dieses eine interne *NdeI*-Schnittstelle besitzt, welche eine Klonierung mit „sticky-ends“ verhinderte. Die wichtigsten Nukleotide der PCR-Primer sind in Abbildung 2 angegeben. Die Erkennungssequenz für *HindIII*, die mit dem Primer CDS3HIND eingebracht wurde, ist durch Fettdruck hervorgehoben. Der Erfolg der Klonierung von *IMH3* in den Expressionsvektor hing vor allem von den Basenabfolgen am 5'- und am 3'-

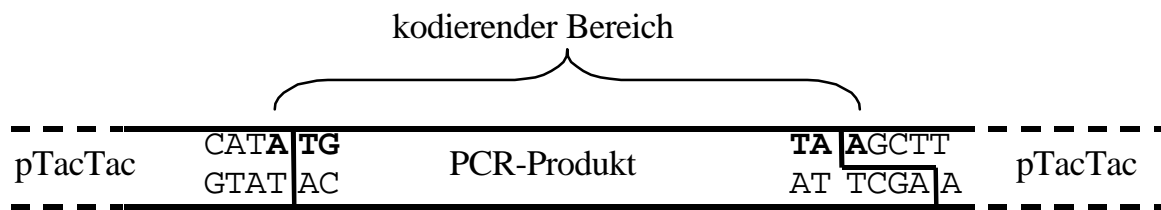


Abb. 3: Darstellung des Ligationsergebnisses bei der Herstellung der Vektoren pTac1_5 und pTac4_13 (Erklärung siehe Text)

Ende des rekombinanten DNA-Fragments ab. Denn wie in Abbildung 3 dargestellt wird, entstand das Start- und das Stopcodon erst durch die korrekte Ligation des PCR-Produkts mit dem Vektor. Das Adenin-Nukleotid im Startcodon ATG entstammte der aufgefüllten *Nde*I-Schnittstelle von pTacTac. Thymin und Guanin kamen aus dem PCR-Produkt. Das Stopcodon TAA bildete sich auf ähnliche Weise. Um die Klone zu finden, die eine funktionsfähige IMP-Dehydrogenase exprimiert hatten, wurden für die Klonierung die Guanosisin-auxotrophen *E. coli* H712-Zellen verwendet. Diese konnten aufgrund der Komplementation der *guaB*-Mutation durch das *IMH3*-Gen aus *C. albicans* positiv selektioniert werden (Abbildung 4). Das Ergebnis der Klonierung waren die Plasmide pTac1_5, welches die kodierende Sequenz der wildtypischen IMP-Dehydrogenase enthält, und pTac4_13. Dieses Plasmid enthält die cDNA für das MPA-resistente Allel der IMP-Dehydrogenase. Beide Vektor-Inserts wurden durch DNA-Sequenzierung überprüft.

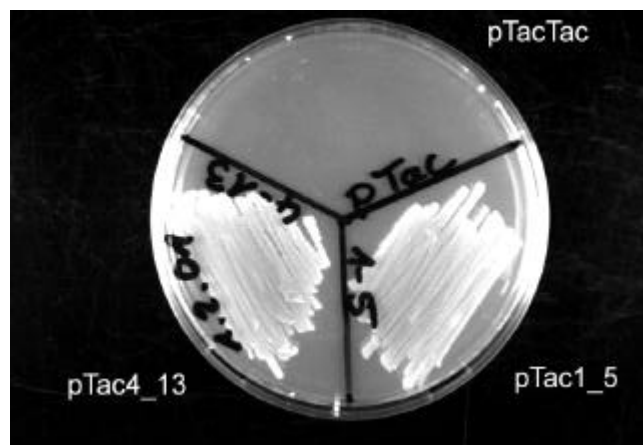


Abb. 4: Komplementation von *E. coli* H712 mit pTac1_5, pTac4_13 und pTacTac als Negativkontrolle auf M9CA-Minimal-Agar

4.1.2 Überprüfung der Expression mittels SDS-PAGE

Zur Überprüfung der Expression wurden *E. coli*-Extrakte aus Zellen hergestellt, die zuvor mit IPTG induziert worden waren, und in einem Proteingel aufgetrennt. Als Negativkontrolle diente der Vektor pTacTac. Zellen mit diesem Plasmid sollten das circa 18 kD große T4-Lysozym bilden, welches von einer 500 bp großen Insertion zwischen der *NdeI*- und der *HindIII* Schnittstelle kodiert wird. Die Inosinmonophosphatdehydrogenase sollte als eine Bande in einer Höhe von 54 kD zu sehen sein. Abbildung 5 zeigt das Proteingel, mit dem die Expression überprüft wurde. Pro untersuchten Klon erkennt man drei Spuren. Die erste Spur zeigt jeweils die Probe, die genommen wurde, bevor das IPTG dazugegeben wurde. Die zweite Spur entspricht dem Extrakt, der 90 Minuten nach der Induktion hergestellt wurde. Die dritte Spur entspricht dem Extrakt 5 h nach der Induktion. Auf einer Höhe zwischen 50 und 60 kD erkennt man bei pTac4_13 eine starke Bande, die erst durch die Induktion mit IPTG sichtbar wurde und nach 5 h ihr Maximum erreichte. Bei der Kontrolle mit pTacTac ist diese Bande nicht und bei pTac1_5 nur sehr schwach sichtbar. Neben der Größe, die das Protein in dieser Bande hat, spricht noch ein anderer

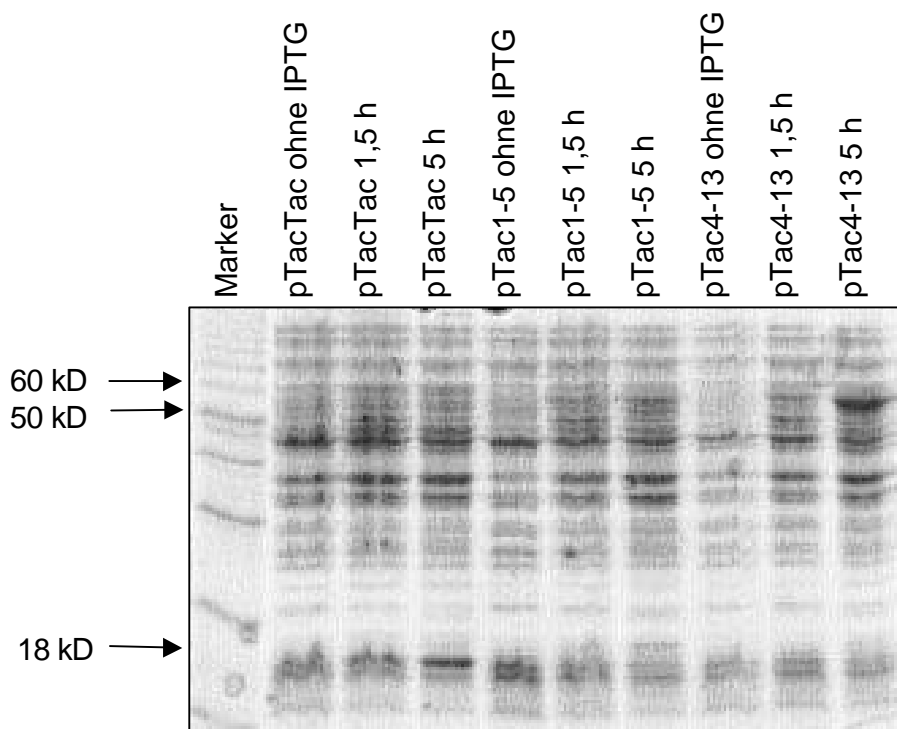


Abb. 5: Proteingel zur Überprüfung der Expression von *IMH3* (pTac1_5) und *MPA*^R (pTac 4_13) in *E. coli* H712. Als Negativkontrolle diente pTacTac. Die angegebenen Zeiten beziehen sich jeweils auf die IPTG-Zugabe.

Grund dafür, daß die IMP-Dehydrogenase richtig exprimiert wurde: Die Negativkontrolle mit dem Plasmid pTacTac weist keine 54 kD-Bande auf und bildet statt dessen das 18 kD große T4-Lysozym, welches von pTacTac kodiert wird. Zwischen den Klonen mit den Plasmiden pTac1_5 und pTac4_13 war ein deutlicher Unterschied in der Stärke der Expression sichtbar.

4.2 Herstellung der *IMH3*-Mutante

Zielsetzung: Zur Charakterisierung der biologischen Rolle von *IMH3* in *C. albicans* sollte eine Mutante des Gens mit Hilfe der *URA3*-Flipper-Technik hergestellt werden. Dazu wurde zunächst durch DNA-Klonierung eine Mutagenese-Kassette hergestellt, die wiederum zur schrittweisen Inaktivierung der beiden *IMH3*-Allele zweimal transformiert werden mußte.

4.2.1 Herstellung der Mutagenese-Kassette

Abbildung 6 zeigt das Ergebnis der Herstellung des Plasmids pSFIMH3, welches den *URA3*-Flipper flankiert vom 5'- und 3'-Bereich von *IMH3* enthält. Angegeben sind nur die Schnittstellen für die Restriktionsenzyme, die zur Herstellung genutzt wurden. Außerdem sind die Bindungsstellen der wichtigsten Primer angegeben. Das Plasmid pI4F enthält die komplette *IMH3*-Sequenz mit flankierenden Regionen (Pos. -601 bis +2203). Durch die Amplifikation dieses Vektors mit Hilfe einer divergenten PCR mit den Primern NIMHKO

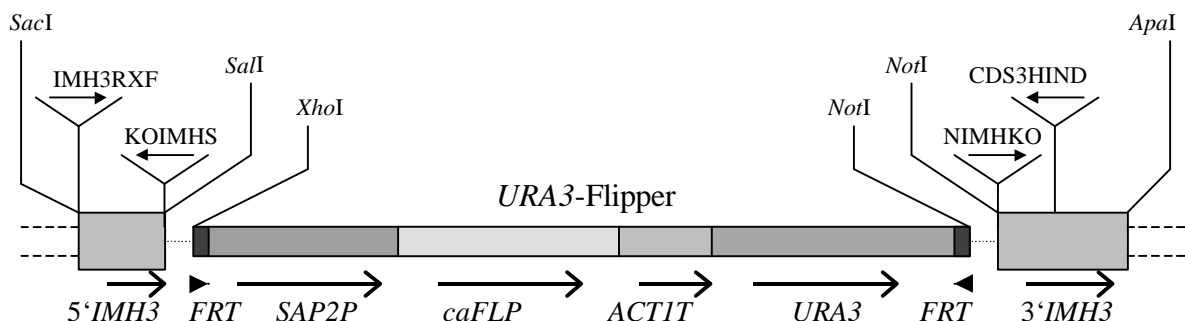


Abb. 6: Kassette zur Insertionsmutagenese von *IMH3*. Angegeben sind die Schnittstellen für die Restriktionsenzyme und die Bindungsstellen der PCR-Primer zur Herstellung des Plasmids pSFIMH3 aus pSFU1 und pI4F. Das 5 kb große Fragment erhält man durch Spaltung von pSFIMH3 mit *ApaI* und *SacI*.

und KOIMHS ging der Bereich von Position -18 bis +1578 verloren. Die Ligation des PCR-Produkts mit dem *URA3*-Flipper aus pSFU1 ergab das Plasmid pSFIMH3. Zur ersten Transformation diente das *ApaI/SacI*-Fragment aus diesem Plasmid. Die zweite Transformation wurde mit einer verkürzten Mutagenese-Kassette durchgeführt, da sich am Integrationsort, in einem der beiden *IMH3*-Allele vom *C. albicans*-Stamm CAI4, eine 200 bp große Insertion befindet. Diese liegt stromabwärts vom Primer CDS3HIND. Das Ausgangsplasmid (pI4F) zur Herstellung von pSFIMH3 enthielt das Allel ohne diese Insertion. Die notwendige Modifikation der DNA-Kassette, die eine allelspezifische Integration vermeiden sollte, wurde mit Hilfe einer PCR mit den Primern IMH3RXF und CDS3HIND erreicht.

4.2.2 Transformation der Mutagenese-Kassette

Die erste Transformation des eluierten *ApaI/SacI*-Fragments aus pSFIMH3 in *C. albicans* CAI4 lieferte 48 *URA3*-positive Klone. Zwölf dieser Klone wurden im Southern-Blot überprüft. Aus den elf Klonen, die die gewünschte Integration enthielten, wurden CI1M7 und CI1M15 (Abbildung 8; Spur 2 und Spur 3) ausgewählt, um den *URA3*-Flipper durch FLP-vermittelte Rekombination zu deletieren. Nach der Induktion der Rekombinase wurden jeweils drei *URA3*-negative Klone im Southern-Blot überprüft, die alle den *URA3*-Flipper verloren hatten. Pro Ausgangsstamm für die Induktion der Rekombinase wurde jeweils einer für die zweite Transformationsrunde verwendet, nämlich der Klon CI1D7 und der Klon CI1D15 (Abbildung 8; Spur 4 und Spur 5). Die zweite Transformation wurde zunächst mit dem *ApaI/SacI*-Fragment durchgeführt und der Ansatz auf MM-Agar mit Guanin ausplattiert. Auf das Guanin wurde bei der ersten Transformation verzichtet. Jetzt mußte aber davon ausgegangen werden, daß der Verlust des zweiten *IMH3*-Allels zu einer Guanin-Auxotrophie führen würde. Ein zweites Gen für eine IMP-Dehydrogenase, welches die Funktion von *IMH3* hätte übernehmen können, ist in *C. albicans* noch nicht nachgewiesen worden. Die Transformation ergab insgesamt nur zehn *URA3*-positive Klone, die alle ohne Guanin wachsen konnten. Der Southern-Blot bestätigte die Vermutung, daß sich der *URA3*-Flipper aufgrund der Allelspezifität in das Allel integriert hatte, das schon bei der ersten Transformation betroffen war. Aus diesem Grund wurde die Mutagenese-Kassette mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion so verkürzt, daß der Bereich herausfiel, in dem der Alleldimorphismus von CAI4 auftritt. Die Transformation des so modifizierten Fragments ergab pro Ausgangsstamm (CI1D7 und CI1D15) ungefähr 60 Klone. Ein großer Teil der Transformanten konnte ohne Guanin wachsen. Nur ein Klon vom Ausgangsstamm CI1D7 war für Guanin auxotroph geworden. Vom Stamm CI1D15 konnten drei nicht mehr ohne Guanin wachsen. Diese insgesamt vier

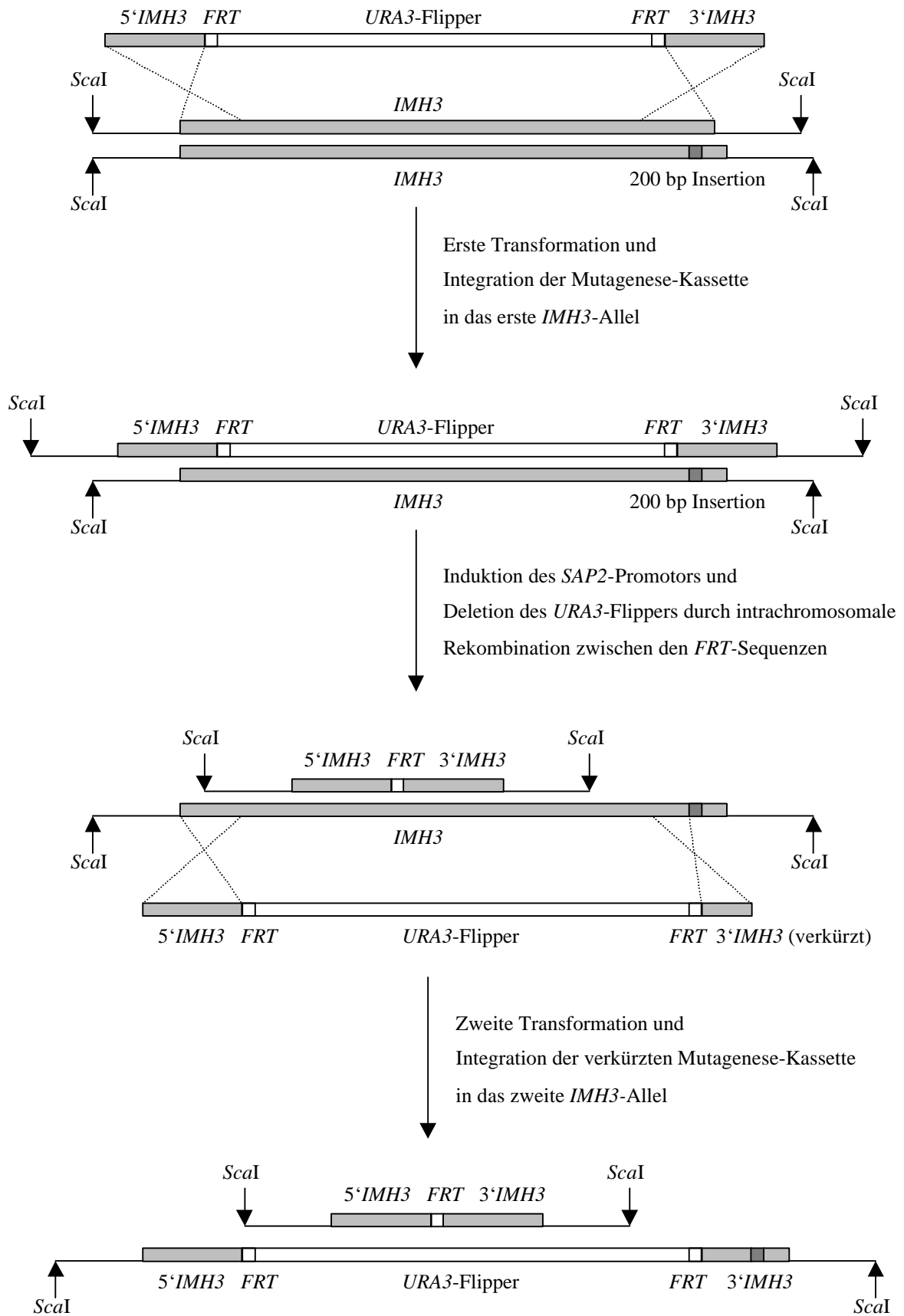


Abb. 7: Auf der vorherigen Seite ist schematisch dargestellt, wie die *IMH3*-Mutanten hergestellt wurden. Das wildtypische *ScaI*-Fragment vergrößerte sich durch die Integration des *URA3*-Flippers von 11,6 kb bzw. 11,4 kb auf ca. 14 kb. Durch die Deletion des *URA3*-Flippers verkleinerte es sich auf 10 kb. In der Abbildung ist die 200 bp-Insertion in einem der *IMH3*-Allele von CAI4 hervorgehoben. Dieser Alleldimorphismus machte die Modifikation der Mutagenese-Kassette vor der zweiten Transformation notwendig (Das Schema ist nicht maßstabsgetreu).

Klone (CI2M7_49, CI2M15_7, CI2M15_9 und CI2M15_59; Abbildung 8; Spuren 6-9) zeigten im Southern-Blot eine erfolgreiche Integration der DNA-Kassette in das zweite *IMH3*-Allel. Abbildung 7 fasst die Schritte zur Herstellung der Mutante und Abbildung 8 die Ergebnisse der Southern-Blots zusammen.

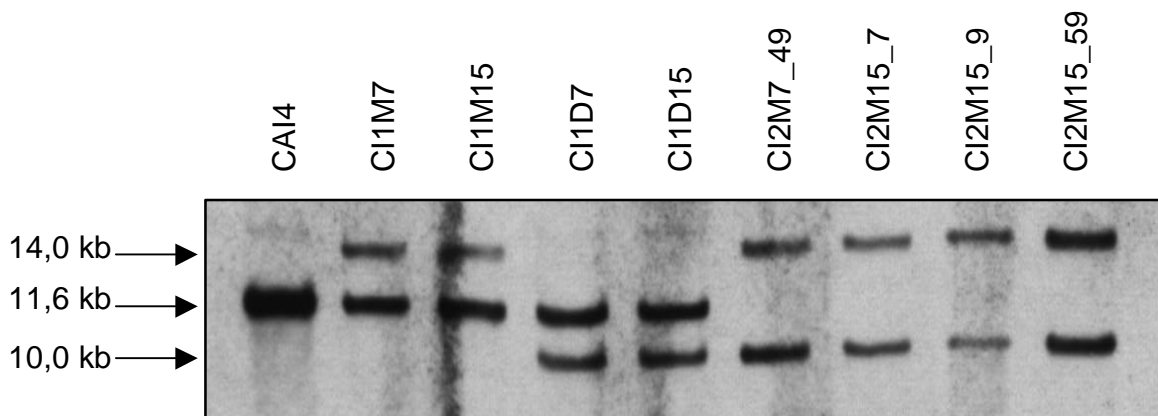


Abb. 8: Southern-Blot zur Überprüfung der Mutanten. Die chromosomale DNA wurde jeweils mit *ScaI* verdaut. Als Sonde diente *IMH3*_{KPNXBA}. Der Verdau mit *ScaI* erzeugt beim Wildtyp eine 11,4/ 11,6 kb-Doppellinienbande (CAI4). Die jeweilige Veränderung der Bandengröße durch die Integration und die Deletion des *URA3*-Flippers ist Abbildung 7 zu entnehmen. Die Bezeichnungen der Stämme sind im Text erklärt.

4.2.3 Phänotypische Untersuchungen an den Mutanten

Auf der nächsten Seite sind Wachstumskurven der heterozygoten *IMH3*-Mutanten zu sehen (Diagramm 1), die den *URA3*-Flipper und damit das *URA3*-Gen noch enthalten (CI1M7 und CI1M15). Die homozygoten Mutanten konnten in den Medien, in denen die Wachstumskurve aufgenommen wurde, nicht wachsen (MM- und YPD-Medium ohne die Zugabe von Guanin und Uridin). Um in Bezug auf *URA3* genotypisch vergleichbare Stämme zu untersuchen, wurde der CAI4-Ausgangsstamm *C. albicans* CAF2 als Referenz verwendet. CAF2 ist eine heterozygote *URA3*-Mutante. Der Verlauf der Wachstumsphasen veränderte sich durch den Verlust eines *IMH3*-Allels nicht wesentlich.

Diagramm 1: Wachstumskurve mit den heterozygoten *IMH3*-Mutanten

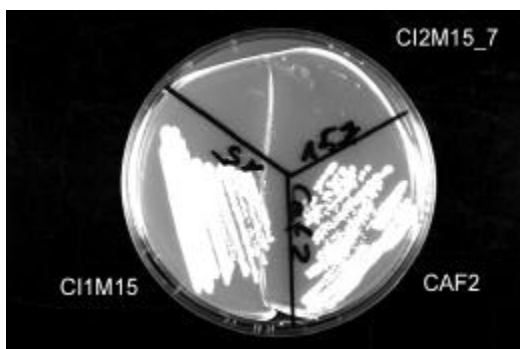
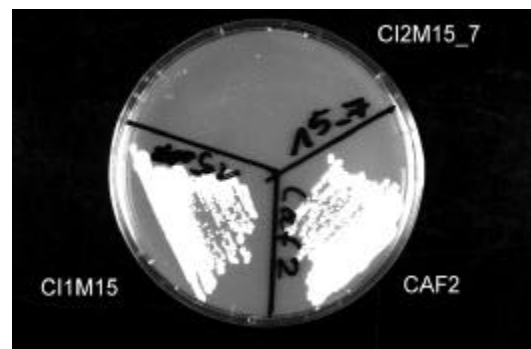
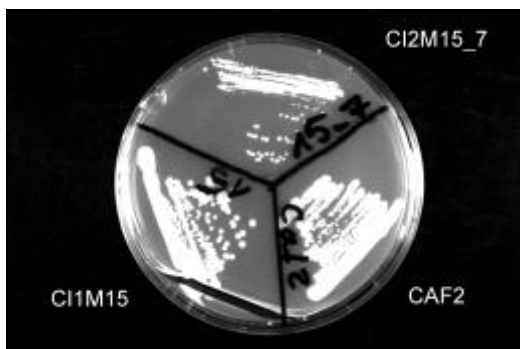
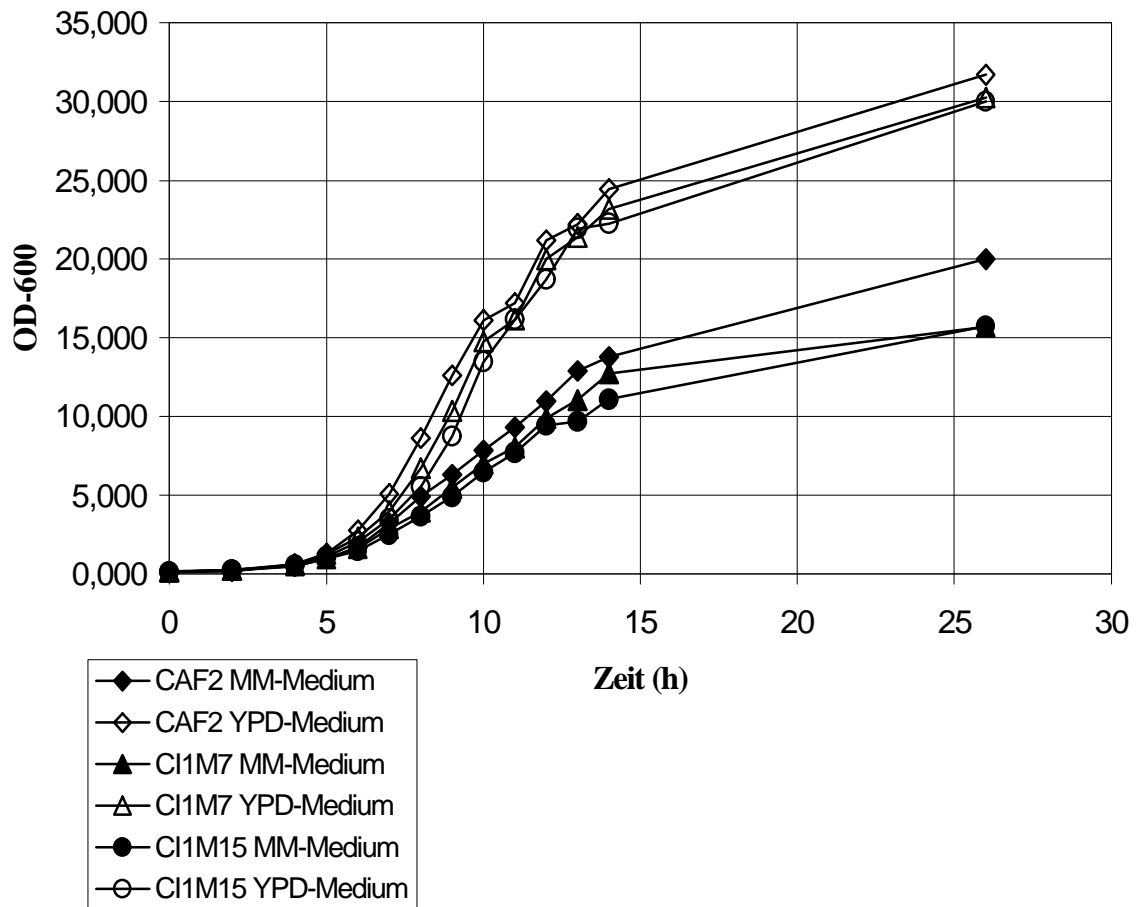


Abb. 9: Wachstum der Mutante CI2M15_7 und der heterozygoten Mutante CI1M15 auf MM-Medium mit Guanin (oben links) ohne Guanin (oben rechts) und mit Xanthin (unten links). Als Kontrolle diente der Stamm CAF2.

Das Wachstumsdefizit der homozygoten Mutanten konnte durch die Zugabe von Guanin zum Medium aufgehoben werden. Guanin war also über die sogenannten „salvage-pathways“ für die Zellen verwertbar. Ob die Zellen neben Guanin auch Xanthin verwerten können, wurde auf MM-Agar mit Xanthin untersucht. Das Ergebnis ist den in Abbildung 9 dargestellten Fotografien zu entnehmen. Die *IMH3*-Mutanten können Xanthin nicht nutzen.

4.3 Isolierung eines *IMH3*-Genfragments aus *C. dubliniensis*

Zielsetzung: In diesem Teil der Arbeit sollte das *IMH3*-Gen aus *C. dubliniensis* mit Hilfe einer inversen PCR isoliert werden, um es zu einem neuen *MPA^R*-Marker modifizieren zu können. Dieser sollte dann nicht mehr wie der bisher verwendete Marker mit den genomischen *IMH3*-Allelen der Transformanten rekombinieren können. Die Grundlage für dieses Projekt bildete ein 500 bp großes PCR-Produkt, das sich mit den Primern IDHCLAR und LDHKPNE aus dem Genom von *C. dubliniensis* amplifizieren ließ. Das entsprechende DNA-Fragment aus *C. albicans* kodiert einen hochkonservierten Bereich der IMP-Dehydrogenase.

4.3.1 Sequenzierung eines DNA-Fragments aus *C. dubliniensis*

Der Vergleich der DNA-Sequenz des 500 bp großen PCR-Produkts aus *C. dubliniensis* mit der entsprechenden DNA-Sequenz des *IMH3*-Gens aus *C. albicans* ergab eine 96prozentige Übereinstimmung. 484 der 504 sequenzierten Nukleotide waren identisch. Die große Ähnlichkeit der verglichenen Sequenzen erlaubte es, das Fragment aus *C. dubliniensis* auch als Sonde zur Hybridisierung mit chromosomaler DNA aus *C. albicans* einzusetzen. Außerdem konnten mit der bekannten Sequenz Primer für eine inverse PCR ausgesucht werden, mit der das *IMH3*-Gen aus *C. dubliniensis* isoliert werden sollte.

4.3.2 Ergebnisse des Southern-Blots mit der Sonde *CdIMH₅₀₀*

In Abbildung 10 ist ein Southern-Blot der chromosomalen DNA von *C. dubliniensis* CD33 gezeigt, die mit verschiedenen Restriktionsendonukleasen gespalten wurde. Als Sonde diente das oben beschriebene PCR-Produkt (*CdIMH₅₀₀*). Zur Kontrolle wurde eine Spaltung von *C. albicans* CAI4-DNA mit *Xba*I aufgetragen. Der Unterschied zwischen dem *IMH3*-Gen aus *C. dubliniensis* und *C. albicans* zeigt sich am *Xba*I-Fragment, welches bei *C. albicans* eine Größe von circa 3 kb (2,7 kb bzw. 2,9 kb, je nach Allel) hat. Bei *C. dubliniensis* sind dies über 10 kb. Die Restriktionsenzyme *Pst*I, *Sal*I, *Xho*I, *Kpn*I und *Sac*I ergaben ebenfalls Fragmente mit einer Größe von über 10 kb. Die Spaltung mit *Hind*III ergab ein sehr schwaches Signal auf einer Höhe von circa 2,5 kb, welches in dieser Abbildung nicht zu erkennen ist. Die Fragmente von *Eco*RI (circa 8 kb), *Bam*HI (circa 8 kb) und *Cla*I (circa 4,5 kb) schienen für eine inverse PCR und die Erstellung einer Gen-Bank am geeignetsten.

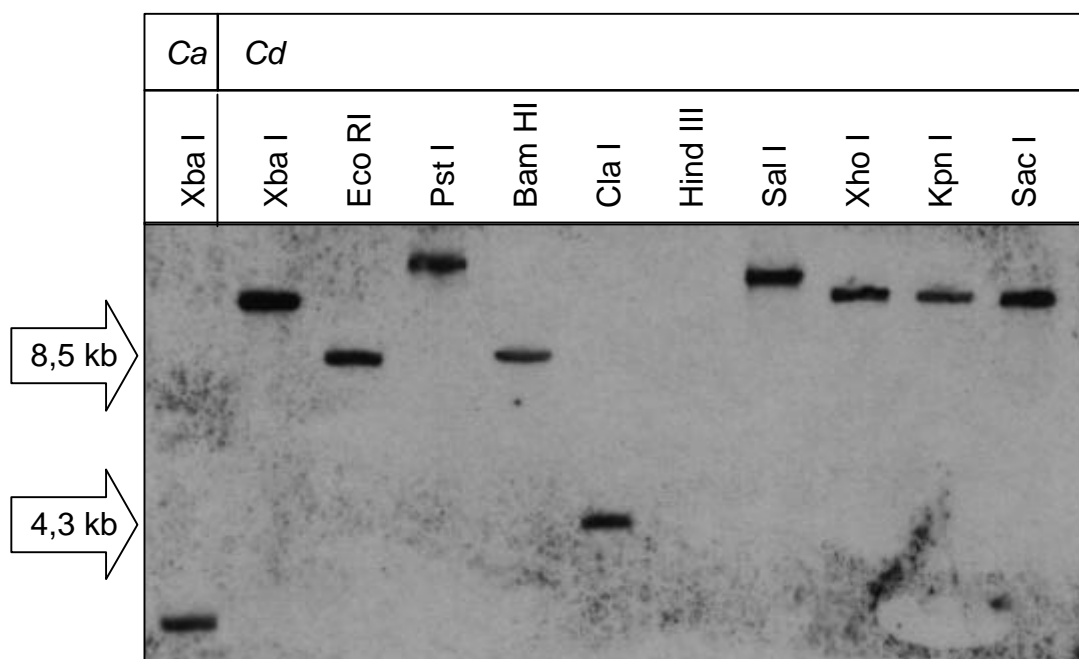


Abb. 10: Southern-Hybridisierung der chromosomalen DNA von *C. dubliniensis* (*Cd*), die mit verschiedenen Restriktionsendonukleasen behandelt wurde. Als Kontrolle diente die Spaltung der DNA von *C. albicans* (*Ca*) mit *Xba*I. Bei der Sonde handelte es sich um *CdIMH₅₀₀*.

4.3.3 Elution der Fragmente aus einem Agarosegel

Abbildung 11 zeigt ein Agarosegel, in dem die Spaltungen der genomischen DNA aus *C. dubliniensis* mit *EcoRI*, *BamHI* und *ClaI* aufgetrennt und aus dem jeweils kleine Agaroseblöckchen eluiert wurden. Das geschah in einer Höhe von 8 kb (*BamHI*), 4 kb (*ClaI*) und 8 kb (*EcoRI*). Die Blöckchen wurden in jeweils 3 Fraktionen zerschnitten. Ein Teil jeder Fraktion diente als Template für die Kontroll-PCR mit den Primern IDHCLAR und LDHKPNE. Die Ergebnisse dieser PCR sind in Abbildung 12 zu sehen. PCR-Produkte in der erwarteten Größe von 500 bp ergaben sich aus den Fraktionen *ClaI*-3 und *EcoRI*-3. Die Elution aus der Spaltung mit *BamHI* ergab kein PCR-Produkt. Als Positivkontrolle für die PCR diente der Vektor pCD7.

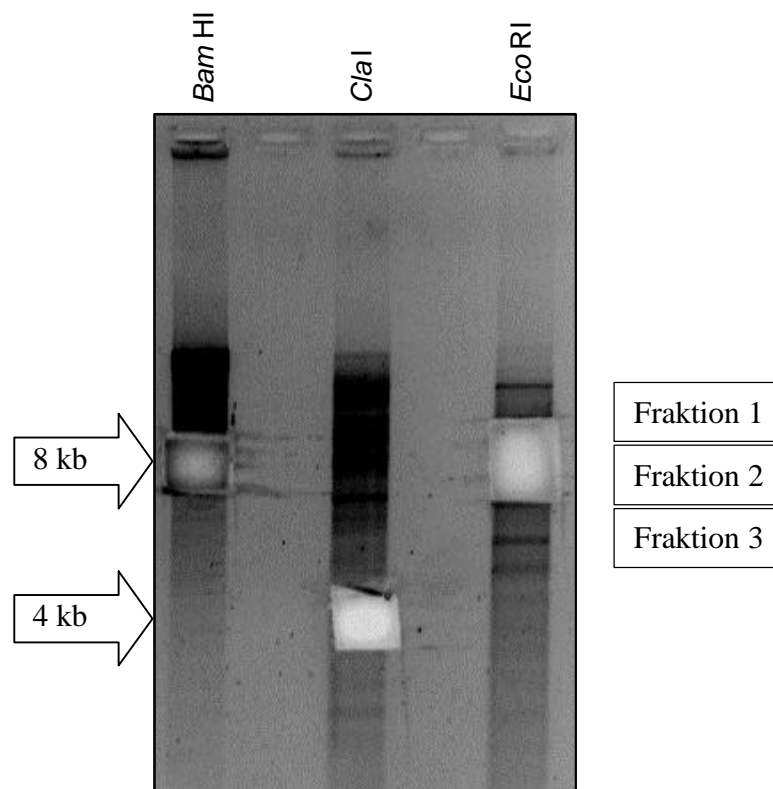


Abb. 11: Elution von Spaltungen der chromosomalen DNA von *C. dubliniensis* aus einem 1%igen Agarosegel. Die Gelblöckchen wurden wie dargestellt noch mal in 3 Fraktionen geteilt.

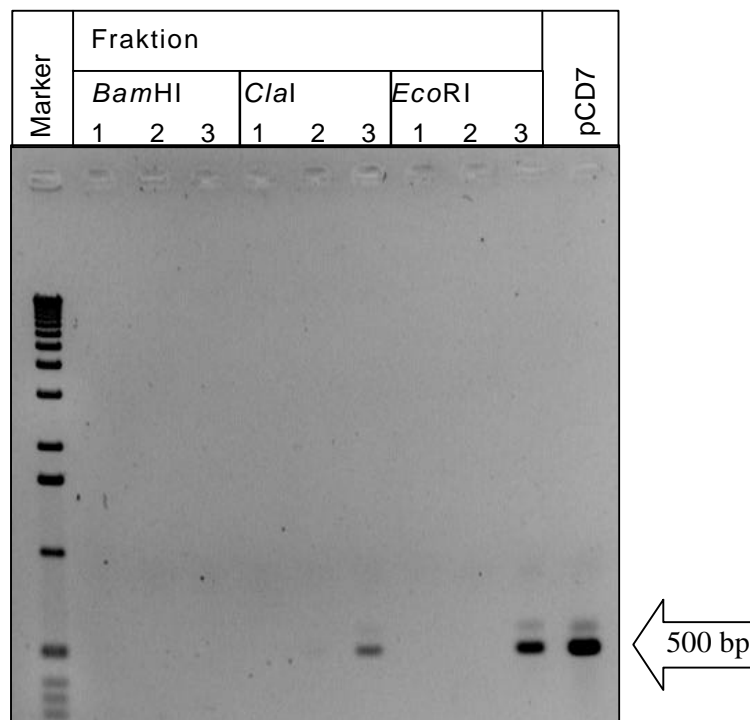


Abb. 12: PCR zur Kontrolle der eluierten *C. dubliniensis*-DNA, die mit verschiedenen Restriktionsendonukleasen gespalten wurde. Die Auftrennung erfolgte in einem 1%igen Agarosegel

4.3.4 Inverse PCR und Erstellung einer gröbenselektionierten Gen-Bank

Die Fraktionen *Cl*aI-3 und *Eco*RI-3 wurden wie im Methodenteil beschrieben in eine Ligation eingesetzt. Die zirkularisierten Produkte dieser Reaktion sollten mit den Primern SMACD und CDSAC, die entsprechend der bekannten Sequenz von 504 Basenpaaren konstruiert wurden, durch eine inverse PCR amplifiziert werden. Das Plasmid pCD7, welches das sequenzierte 500 bp-Fragment enthielt, ließ sich als Positivkontrolle bei verschiedensten Annealing-Temperaturen vermehren. Aus dem Ligationsansatz ergab sich jedoch niemals ein PCR-Produkt. Aus diesem Grund sollten die Fraktionen *Cl*aI-3 und *Eco*RI-3 in den Klonierungsvektor pSK ligiert werden, um die damit erhaltene gröbenselektionierte Gen-Bank dann weiter zu untersuchen. Der Vektor wurde zuvor mit den entsprechenden Restriktionsenzymen geschnitten. Die Transformation der Ligrationsreaktion in den Stamm *E. coli* DH5 α ergab pro Fragment ungefähr 500 bis 1000 Klone. Durch Blau-Weiß-Selektion konnte ermittelt werden, daß es sich circa bei einem Drittel (circa 200 bis 300) dieser Transformanten um Religanden des Plasmids pSK

handelte. Eine Ligationsreaktion, die nur den mit *EcoRI* geschnittenen, dephosphorylierten Vektor enthielt, diente zur Kontrolle. Sie ergab eine Anzahl von circa 200 blauen Klonen, die nur den religierten Vektor enthalten konnten. Die Kontrolligation des mit *ClaI* geschnittenen Plasmids lieferte blaue und weiße Transformanten. Es mußte davon ausgegangen werden, daß das Plasmid mit DNA-Fragmenten verunreinigt war, die die Gen-Bank kontaminiert hatten. Aus diesem Grund wurden nur die *EcoRI*-Klone von der Agarplatte abgeschwemmt und eingefroren. Leider konnte die *EcoRI*-Genbank im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter untersucht werden.

4.4 Herstellung einer *PLB3*-Promotorfusion

Zielsetzung: Die Nutzung des *MPA^R*-Markergens als Reporter der Genexpression von *C. albicans* in infizierten Versuchstieren ist an verschiedenen *SAP*-Genen bereits etabliert worden. In diesem Teil der Arbeit sollte die Methode mit einem *PLB3*-Gen getestet werden. Dazu wurde die Reporterfusion des *PLB3*-Promotors mit den zwei Typen der *FLP*-Rekombinase (*caFLP* und *ecaFLP*) hergestellt und in den Stamm *C. albicans* CF11 transformiert. Mit verschiedenen *in vitro*-Versuchen wurde das System getestet.

4.4.1 Herstellung der Reporterfusion durch Klonierung

Die Klonierungsschritte zur Herstellung der Reporterfusion aus dem *PLB3*-Promotor und den zwei Formen des *FLP*-Gens sind in Abbildung 13 dargestellt. Gezeigt ist die Zusammensetzung des erhaltenen Plasmids pPLB3S29 und des Ausgangsplasmids pSFL29. Die Plasmide pPLB3S213 und pSFL213 haben bis auf das *FLP*-Gen den gleichen Aufbau. Die wichtigsten Schnittstellen sind angegeben, genauso wie die Primerpositionen von XAMPLI und SALPRO, die zur Anreicherung der 950 Basenpaare des *PLB3*-Promotors aus der chromosomalen DNA von *C. albicans* CAI4 dienten. Aus der Abbildung wird auch deutlich, daß das *XbaI/SalI*-Fragment des *SAP2*-Promotors in pSFL29 und pSFL213 nicht einfach gegen das entsprechende Fragment des *PLB3*-Promotors ausgetauscht werden konnte. Dabei hätte die *SalI*-Schnittstelle zwischen dem *FLP*-Gen und dem Actin-Terminator im Reporterkonstrukt gestört. Aus diesem Grund wurde das *XbaI/EcoRV*-Fragment von pSFL29 und pSFL213 gegen den *PLB3*-Promotor (*XbaI/SalI*) und das kleine *SalI/EcoRV*-Fragment aus pSFL29 und pSFL213 ausgetauscht.

Der 3'-*PLB3*-Bereich wurde durch Spaltung von pKP1 mit *PstI* und *SacI* isoliert. Die *PstI*-Schnittstelle (Position 1382) liegt circa 750 bp stromaufwärts vom Stopcodon von *PLB3*. Bei der *SacI*-Schnittstelle handelt es sich um eine Sequenz der „Multi-Cloning-Site“ von pSK, die im Plasmid pKP1 in 3'-Richtung hinter dem klonierten *PLB3*-Fragment (3'-*BamHI*-site, Position 2149) liegt. Die Promotorfusion wurde mit den Primern ST4DOWN12, AXEL und FLP11SEQ sequenziert. Zur Transformation des Reporterstamms CFI1, welcher im *ACT1*-Locus eine Kopie des von *FRT*-Sequenzen flankierten *MPA^R*-Markergens trägt, diente jeweils das 4,7 kb große *XbaI/SacI*-Fragment aus den konstruierten Plasmiden pPLB3S29 und pPLB3S213.

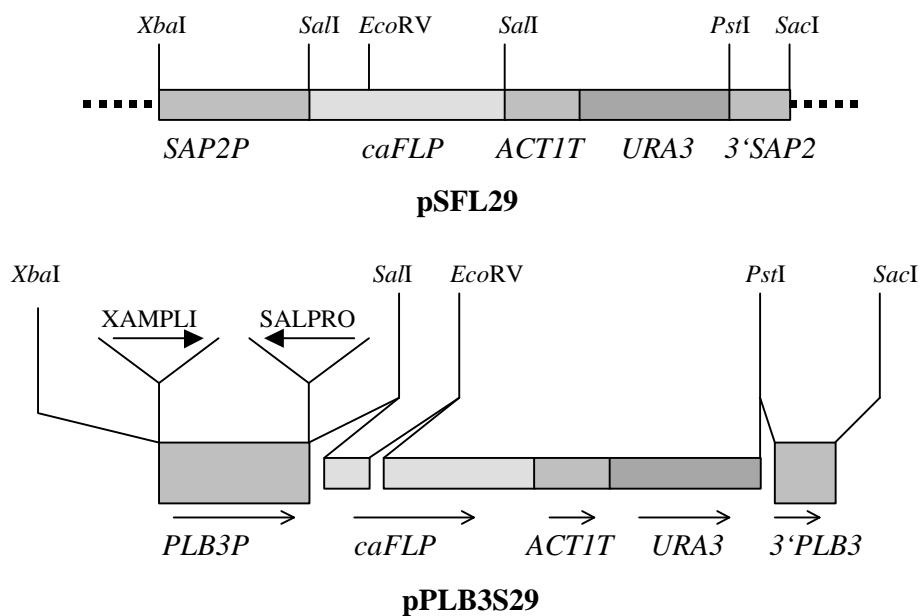


Abb. 13: Herstellung des Plasmids pPLB3S29 aus pSFL29. Das Plasmid pPLB3S213 wurde auf die gleiche Weise aus pSFL213 hergestellt, enthält aber anstelle von *caFLP*, das Gen *ecaFLP*. (Nähere Erläuterungen, siehe Text)

4.4.2 Transformation der Reporterfusion in den Stamm CFI1

Die Transformation mit dem *XbaI/SacI*-Fragment aus pPLB3S29 bzw. pPLB3S213 ergab jeweils circa 50 Klone. Zehn der *URA3*-positiven Transformanten (5 aus jedem Transformationsansatz) wurden im Southern-Blot untersucht. Anhand von leichten Unterschieden in der Fragmentgröße konnte auf Allelunterschiede an dem Ort geschlossen

werden, an dem die DNA-Kassette integriert war. Deshalb wurden jeweils 2 Klone pro Transformationsansatz (ein Klon pro Allel) für weitere Untersuchungen ausgewählt, so daß man am Ende 4 Stämme zur Verfügung hatte. In Abbildung 14 ist die Integration der Reporterfusion in das Genom von *C. albicans* CFI1 schematisch dargestellt. Abbildung 15 zeigt die Ergebnisse des Southern-Blots zur Überprüfung der korrekten Integration des Reporterkonstrukts. Dazu wurde die chromosomale DNA mit *ScaI* gespalten und mit der Sonde *PLB3_{AMPLII}* hybridisiert. Der Stamm CAI4 ergab die wildtypische Doppelbande auf einer Höhe von ungefähr 12 kb. Die vier konstruierten Stämme weisen eine Wildtypbande und eine um circa 1,7 kb vergrößerte Bande (circa 13,7 kb) auf, wie das für eine korrekte Integration des Reporterkonstrukts erwartet wurde (3,1 kb für die Rekombinase mit dem *URA3*-Marker, abzüglich der 1,4 kb großen Deletion im *PLB3*-Gen, Abbildung 14).

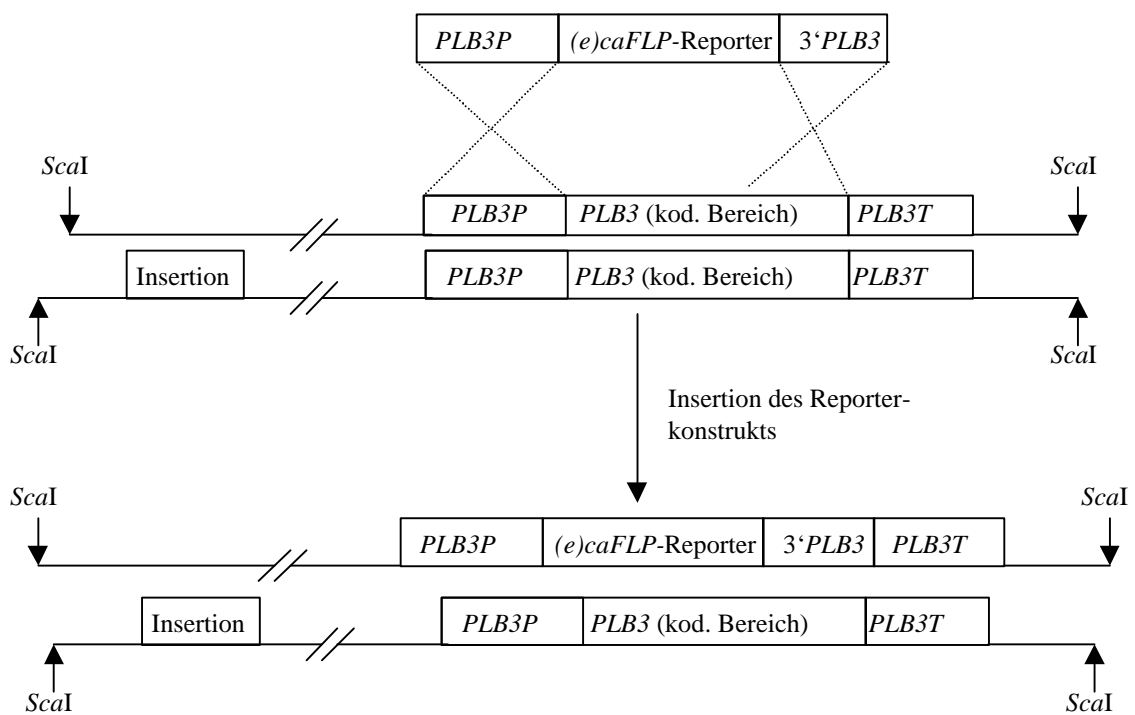


Abb. 14: Schema zur Insertion der Reporterfusion in das Genom von *C. albicans* CFI1. Durch die Integration ging ein Teil des kodierenden Bereiches von *PLB3* verloren. Der Promotor (*PLB3P*) und der Terminator (*PLB3T*) des *PLB3*-Gens blieben erhalten. Dargestellt ist die Integration in das Allel, welches die stromaufwärts gelegene vermutete Insertion nicht besitzt (hergestellte Stämme PL3SF29_13 und PL3SF213_17). Durch die Integration vergrößerte sich das 12 kb große *ScaI*-Fragment um ca. 1,7 kb. (Das Schema ist nicht maßstabsgetreu).

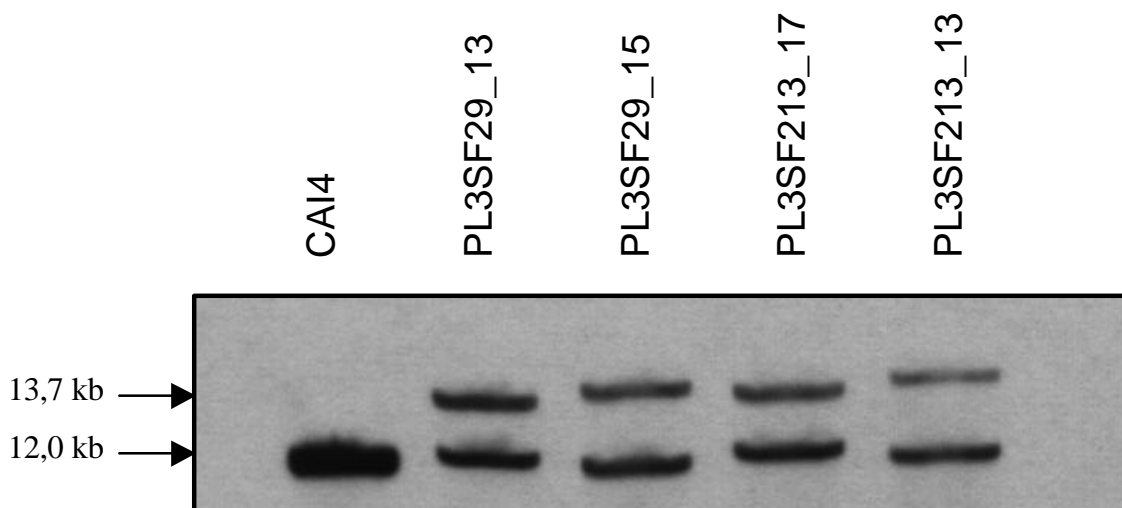


Abb 15: Southern-Blot zur Überprüfung richtigen Integration der *PLB3*-Reporterfusion in das Genom von *C. albicans* CFI1. Die chromosomale DNA wurde mit *ScaI* gespalten. Als Sonde diente das DNA-Fragment *PLB3_{AMPLII}*

Die Allelunterschiede am Integrationsort sind daran zu erkennen, daß PL3SF29_13 und PL3SF213_17 eine größere Wildtypbande aufweisen als die andern beiden Stämme. Der Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus wurde durch eine vermutete Insertion in einem der beiden homologen Chromosomen verursacht, die circa 8 kb stromaufwärts vom *PLB3*-Startcodon (G. Köhler, persönliche Mitteilung), innerhalb des untersuchten *ScaI*-Fragments liegt (Abbildung 14).

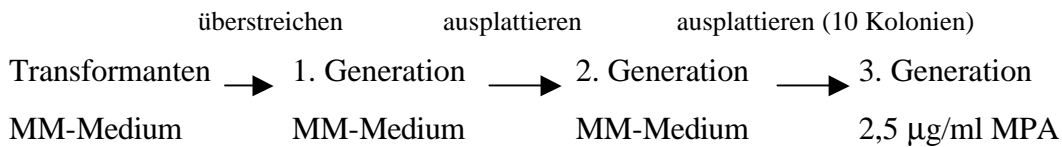
4.4.3 Untersuchungen zur Aktivität der Promotorfusion

Nach der Transformation wurde davon ausgegangen, daß die Klone ihren *MPA^R*-Marker durch eine geringe Aktivität des *PLB3*-Promotors verlieren könnten. Die Zellen wurden deshalb auf selektiven Agarplatten untersucht. Dazu wurde ein auf MM-Agar überstrichener Transformant auf eine 2,5 µg/ml *MPA*-Platte ausplattiert. Es konnte qualitativ beobachtet werden, daß ein großer Anteil der Zellen sensitiv gegenüber *MPA* war. Tabelle 7 gibt die Ergebnisse eines Tests wieder, in dem der Markerverlust später quantitativ erfaßt wurde. Die Deletion des *MPA^R*-Markers aus dem Genom vom *C. albicans*-Stamm CFI1 erfordert die Expression einer FLP-Rekombinase. Ein spontaner Verlust ist sehr selten (Staib et. al. 1999). In dem Auftreten von *MPA*-sensitiven Kolonien kann also ein Beweis für die Funktionalität der hergestellten Reporterfusion gesehen werden.

Tabelle 7: Induktion der Reporterfusion auf MM-Medium nach der Transformation

Stamm	große Kolonien	kleine Kolonien	Anteil der kleinen Kolonien
PL3SF29_13	17	45	72,6
PL3SF29_15	22	54	71,1
PL3SF213_13	46	109	70,0
PL3SF213_17	32	81	71,7

Die in Tabelle 7 aufgeführten Daten wurden erst nach der Überprüfung der Klone durch den Southern-Blot ermittelt. Die mehrmalige Inkubation der Transformanten bei 30°C (3 Tage nach der Transformation, 2 Tage nach einmaligen Überstreichen auf MM-Medium) und die kurzzeitige Lagerung der Klone bei 4°C, während der Southern-Blot erstellt wurde, könnten den hohen Anteil an Zellen erklären, die ihren Marker deletiert hatten. Die Aktivität des *PLB3*-Promotors während des Zeitraums, in dem die gewünschten Klone ermittelt wurden, hatte also bei circa 70% der Zellen zum Verlust der MPA-Resistenz geführt. Für weiterführende Experimente, wie zum Beispiel die Untersuchung am Tiermodell, benötigt man jedoch eine Reinkultur von MPA-resistenten Zellen. Im folgenden sollte dazu eine Methode entwickelt werden, mit der sich MPA-resistente Zellen anreichern lassen. Zunächst wurde dazu eine große Kolonie von einer 2,5 µg/ml MPA-Platte untersucht, die aus einer MPA-resistenten Zelle hervorgegangen sein mußte. Dieses schien die einfachste Möglichkeit zu sein, eine Reinkultur zu erhalten. Es stellte sich jedoch heraus, daß immer ein sehr unterschiedlicher Anteil (10-100%) von Zellen in einer solchen Kolonie den Marker verloren hatte. Der Unterschied war auch innerhalb gleicher Ausgangsstämme festzustellen. Um die Mykophenolsäure als Grund für diesen Effekt ausschließen zu können, wurde eine Methode entwickelt, mit der die Zusammensetzung frischer Kolonien studiert werden konnte, die nicht unter Selektionsdruck entstanden sind. Dazu wurden 100 Zellen der Ursprungsplatte (1. Generation), auf MM-Medium ohne MPA ausplattiert (2.Generation). Zehn zufällig ausgewählte Kolonien von dieser Platte wurden dann nach 2 Tagen auf MPA-Platten vereinzelt, um die Zusammensetzung der einzelnen Kolonien aus MPA-sensitiven und MPA-resistenten Zellen ermitteln zu können (3. Generation). Sollte einer der untersuchten Klone hier ausschließlich kleine Kolonien bilden, dann hatte es sich bei der Kolonie aus der 2. Generation um eine gehandelt, die aus einer MPA-sensitiven Ursprungszelle hervorgegangen war.



Dieser Test wurde für den Stamm PLSF29_13 (enthält *caFLP*-Gen) und PLSF213_13 (enthält *ecaFLP*-Gen) durchgeführt und ergab folgendes: Sieben Klone der zweiten Generation bildeten auf Mykophenolsäure ausschließlich kleine Kolonien. Für die restlichen Klone der zweiten Generation ließ sich durch Ausplattieren auf Mykophenolsäure die in Tabelle 8 dargestellte Zusammensetzung ermitteln. Eine quantitative Aussage läßt sich mit den angegebenen Daten aus statistischen Gründen wohl kaum treffen. Jedoch spricht der Anteil von knapp 100% an MPA-resistenten Zellen bei zwei Kolonien des Stamms PLSF29_13 dafür, daß die weniger sensitive Rekombinase wohl besser zur Anreicherung von Zellen geeignet ist, die den Marker noch besitzen, als die sensitive Rekombinase.

Tabelle 8: Zusammensetzung von Reporterstamm-Kolonien auf MM-Medium ohne MPA

Klon	PLSF29_13			PLSF213_13		
	MPA-resistente	MPA-sensitive	Anteil an MPA-resistenten Zellen	MPA-resistente	MPA-sensitive	Anteil an MPA-resistenten Zellen
1	95	0	100,0 %	1	138	0,7 %
2	133	2	98,5 %	48	95	33,6 %
3	40	50	44,4 %	95	35	73,1 %

5 Diskussion

5.1 Expression von *IMH3* in *E. coli*

Die Klonierung der kodierenden Sequenzen von *IMH3* und *MPA^R* erfolgte in den Expressionsvektor pTacTac. Die Erörterung der dadurch erhaltenen Ergebnisse bedarf noch einer Ergänzung zur Methodik, mit der versucht wurde, Expressionsplasmide für *IMH3* und *MPA^R* herzustellen. Anstelle von pTacTac wurde nämlich zunächst der Expressionsvektor pKK223-3 der Firma Amersham Pharmacia verwendet. Die Klonierung der kodierenden Sequenzen in den Vektor pKK223-3 wurde mit Hilfe der *EcoRI*- und *PstI*-Schnittstellen der RT-PCR-Produkte durchgeführt, die über die Primer CA5CDS und CACDS3 eingebracht wurden. Unter dem Einfluß von IPTG erhielt man dann auch Guanin-prototrophe Transformanten von *E. coli* H712. Es mußte also in beiden Fällen eine funktionsfähige IMP-Dehydrogenase exprimiert worden sein. Jedoch war der Anteil dieser Klone, gemessen an der Gesamtzahl von Transformanten, sehr gering. Bei den meisten Klonen war keine Komplementation der *guaB*-Mutation festzustellen. Die Sequenzierung der Vektor-Inserts aus den Komplementanten ergab jedesmal, daß sich Punktmutationen in der Gensequenz, meist am N-Terminus gebildet hatten. Aufgrund der beschriebenen Fakten konnte eine mögliche toxische Wirkung der nativen genauso wie der *MPA*-resistenten IMP-Dehydrogenase auf die *E. coli*-Zellen nicht ausgeschlossen werden. Eine Restaktivität des *tac*-Promotors von pKK223-3 würde in diesem Fall zu einer positiven Selektion auf Transformanten mit solchen Plasmiden führen, die eine veränderte und damit nichttoxische IMP-Dehydrogenase kodieren. Diese Erkenntnis deckte einen Nachteil des verwendeten Vektors pKK223-3 auf, nämlich daß der *tac*-Promotor laut Hersteller am besten durch einen sogenannten *lacI^q*-Repressor reprimiert wird, der vom verwendeten Bakterienstamm kodiert werden sollte. Ein chromosomal kodiertes *lacI^q*-Gen kann über 100 Repressormoleküle pro Zelle bilden, im Vergleich zum nativen *lacI*-Gen, welches nur 20-30 solcher Moleküle pro Zelle produziert (Baneyx 1999). Da der *E. coli*-Stamm H712 kein Gen für den modifizierten *lacI^q*-Repressor besitzt, mußte damit gerechnet werden, daß der Promotor von pKK223-3 nicht richtig reprimiert sein würde, und dessen Restaktivität

zum Verlust der erwünschten Klone durch eine negative Selektion führen könnte. Da zum Beispiel die humane IMP-Dehydrogenase vom Typ II (*IMPDH II*) mit Hilfe von pKK223-3 erfolgreich in *E. coli* H712 exprimiert worden war (Farazi et al. 1997), wurde die beschriebene Problematik erst im Laufe der Untersuchungen deutlich. Die gewonnenen Erkenntnisse zeigten auf, daß die orthologen Gene *IMPDH II* und *IMH3* aufgrund ihrer Ähnlichkeit nicht automatisch auf die gleiche Weise in *E. coli* exprimiert werden können. Für *IMH3* war dazu die im folgenden diskutierte Vorgehensweise notwendig.

Um die unkontrollierte Expression der bei Überexpression vermutlich toxischen Genprodukte der *IMH3*- und *MPA^R*-cDNA zu vermeiden, sollten die RT-PCR-Produkte zunächst in einen einfachen Klonierungsvektor (pUC18) ligiert werden. Somit konnte durch DNA-Sequenzierung untersucht werden, ob die reverse Transkription fehlerfrei funktioniert hatte. Bei der Verwendung der SUPERScript II Reversen Transkriptase mußte mit einer verhältnismäßig hohen Fehlerrate gerechnet werden, die in der fehlenden 3'-5'-Exonukleaseaktivität von RNA-abhängigen DNA-Polymerasen begründet liegt (Michal 1999). Die sequenzierten pUC18-Derivate bildeten das Template für die PCR-Reaktion mit den Primern 5TGCD5 und CDS3HIND.

Zur Klonierung dieser PCR-Produkte diente der Vektor pTacTac (Abbildung 16). Dieses Plasmid wurde schon erfolgreich zur Expression der IMP-Dehydrogenase aus *Borrelia burgdorferi* in *E. coli* H712 eingesetzt (Zhou et al. 1997) und ist ein Derivat des Multi-Copy-Plasmids pBR322. Es enthält das Gen für einen *lacI^q*-Repressor. Außerdem steht die rekombinante DNA unter der Kontrolle des Promotors von *lacUV5*, der gut reprimierbar ist. Die Stärke der Expression sollte durch zwei *tac*-Promotoren erhöht werden, die dem *lacUV5*-Promotor folgen. Das Plasmid wurde bei seiner Herstellung in komplizierter Weise auf eine maximale Ausbeute von T4-Lysozym optimiert (Muchmore et al. 1989). Obwohl der Vektor ein eher ungewöhnliches Expressionssystem repräsentiert, versprach man sich jedoch von dessen Eigenschaften eine optimale Repression unter nichtinduzierten Bedingungen und eine hohe Ausbeute an IMP-Dehydrogenase nach der Induktion mit IPTG.

Mit Hilfe von pTacTac war es nun möglich, Expressionsplasmide herzustellen, die die richtige DNA-Sequenz für *IMH3* und *MPA^R* enthielten. Die Überprüfung der Expression im Proteingel ergab jedoch, wie im Ergebnisteil beschrieben wurde, eine sehr schwache Expression des rekombinanten *IMH3*, im Vergleich zur entsprechend klonierten,

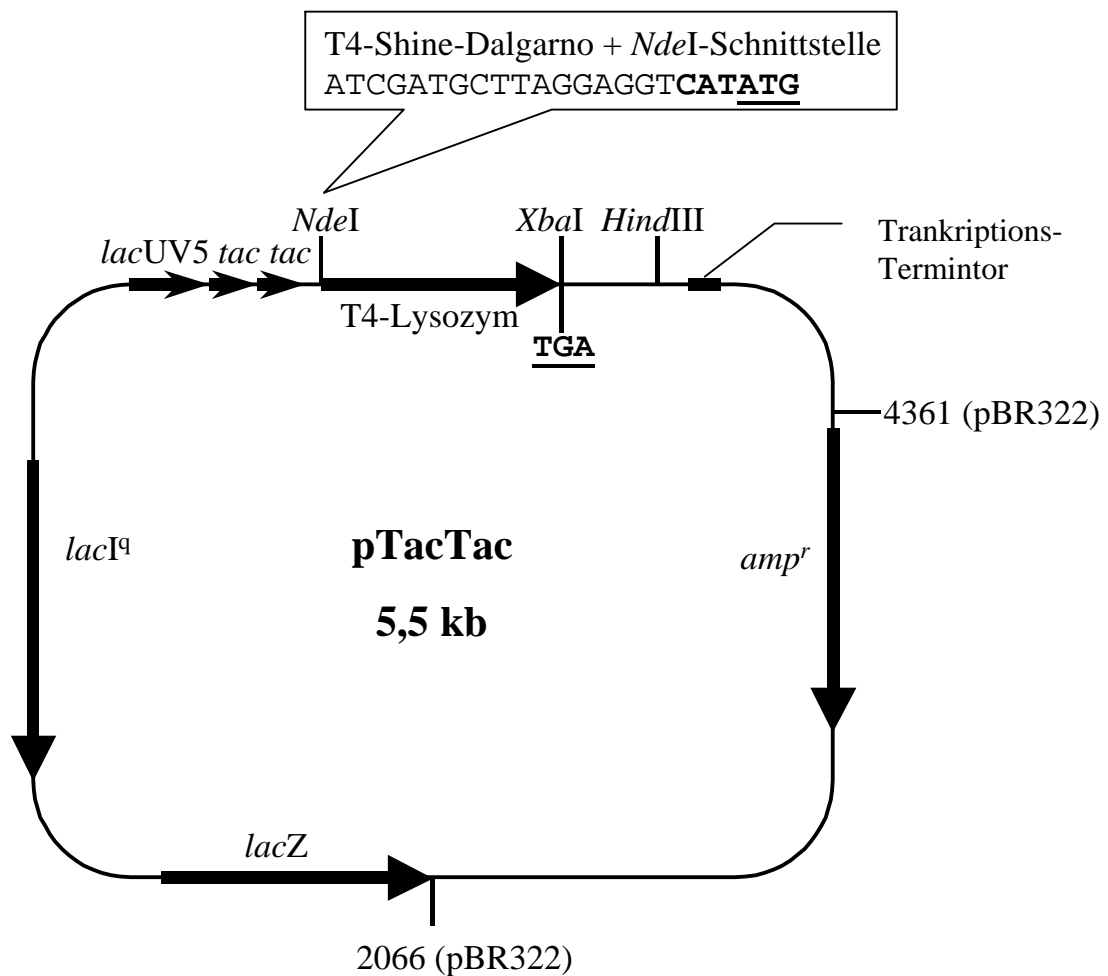


Abb. 16: Stark vereinfachtes Schema von pTacTac. Der Teil des Plasmids, der von pBR322 stammt, ist angegeben. Ebenfalls zu sehen sind wichtige Schnittstellen für Restriktionsenzyme, die Shine-Dalgarno-Sequenz, ein Transkriptions-Terminator und das Stopcodon (TGA) der kodierenden Sequenz des T4-Lysozym-Gens (Muchmore et. al., 1989)

kodierenden Sequenz von *MPA^R*. Über die Ursachen hierfür kann nur spekuliert werden. An dieser Stelle seien zwei Möglichkeiten genannt:

- 1.) Die Kopienzahl von pTac1_5 ist aufgrund einer Spontanmutation im Replikationsursprung verringert. Die Konsequenz wäre eine geringere Expression des vom Plasmid kodierten Gens.
- 2.) Der Promotor von pTac1_5 ist aufgrund einer Spontanmutation geschwächt worden.

Um auszuschließen, daß pTac1_5 eine verminderte Kopienzahl besitzt, könnte die Menge an Plasmid verglichen werden, die sich aus einer gleichen Zellzahl von pTac1_5- und pTac4_13-Klonen isolieren läßt. Ein Schaden im Promotor ließe sich durch Sequenzierung ermitteln. Sollte die Ausbeute an Protein, das von pTac1_5 gebildet wird, für die anschließende Aufreinigung nicht ausreichen, so müßte die Klonierung wiederholt werden.

Ausgangspunkt der geschilderten Experimente war die Entdeckung des neuen *MPA^R*-Markersystems. Das wildtypische *IMH3*-Protein und das *MPA*-resistente Genprodukt sollten biochemisch charakterisiert werden, um den Unterschied zwischen beiden Proteinen anhand von enzymkinetischen Daten darzustellen. Leider konnten im Rahmen dieser Arbeit nur die Expressionsplasmide hergestellt werden. Die Isolierung der IMP-Dehydrogenase aus *E. coli*-Zellen mit Hilfe der Affinitätschromatographie dürfte aber für die Zukunft kein Problem darstellen, zumal man schon einige Erfahrung mit der Aufreinigung dieses Enzyms besitzt (Farazi et al. 1997; O'Gara et al. 1997; Zhou et al. 1997). Ein weiterführender Ansatz, der auf diesem Projekt basiert, könnte zum Beispiel die Kristallisation und Strukturanalyse des *IMH3*- und *MPA^R*-Proteins sein. Aus pharmakologischer Sicht erscheint das sinnvoll, denn mittlerweile ist der Aufbau von verschiedenen IMP-Dehydrogenasen aus zahlreichen Organismen durch die Röntgenstrukturanalyse aufgeklärt worden. Auch über die Bindungseigenschaften und Wirkungsweisen der bekannten Inhibitoren der IMP-Dehydrogenase ist vieles bekannt (Sintchak et al. 2000). Vielleicht ließen sich in weiterführenden Untersuchungen spezifische Eigenschaften des Enzyms aus *C. albicans* finden, die das Design eines neuen Wirkstoffs gegen diesen medizinisch sehr bedeutsamen Pilz erlauben.

5.2 Herstellung der *IMH3*-Mutante

Bei der Herstellung der *IMH3*-Mutante ergaben sich verschiedene technische Probleme. Das erste Problem war das Medium. Guanin ist fast unlöslich in Wasser und vielen organischen Lösungsmitteln. Eine 0,1 molare Stocklösung ließ sich nur in 1 N NaOH herstellen. Wurde diese Lösung in einer Endkonzentration von 200 µM zum Minimalmedium gegeben, so erhöhte sich der pH-Wert von 5,8 auf 7 bis 8. Wurde nun versucht den pH-Wert wieder auf den ursprünglichen Wert zu bringen, dann präzipitierte das Guanin. Die Inaktivierung des ersten *IMH3*-Allels wurde dadurch nicht gestört, da die Zellen noch kein Guanin im Medium benötigten. Die zweite Transformation der

heterozygoten Mutanten ergab dann allerdings Klone, die Guanin zum Wachstum brauchten. Mit 200 μM Guanin war, bedingt durch den pH-Wert und die Löslichkeit, die höchstmögliche Endkonzentration im Medium erreicht. Das reichte gerade zur Anzucht der Zellen. Eine geringe Ausbeute bei der Isolierung der chromosomalen DNA war die Folge. Ein viel größeres Problem war jetzt die Induktion der FLP-Rekombinase zur Deletion des *URA3*-Flippers. Der *SAP2*-Promotor läßt sich nämlich nur im sauren YCB-BSA Medium aktivieren. Die DNA-Kassette mit dem Flipper konnte, aufgrund der Schwierigkeiten mit der Löslichkeit von Guanin, noch nicht aus dem zweiten Allel entfernt werden.

Eine Möglichkeit, die Handhabung von Guanin-auxotrophen Mutanten zu erleichtern, könnte darin liegen, den Stoffwechseldefekt mit anderen Zwischenprodukten der GMP-Biosynthese auszugleichen, die sich leichter und unter neutralen Bedingungen lösen lassen würden. In Frage kämen die Nukleoside Guanosin und Xanthosin. Diese Stoffe sind aber laut Herstellerangaben (Sigma) unwesentlich besser löslich in neutralen Lösungsmitteln als Guanin.

Der FLP-vermittelten Deletion des Markers stünde noch die Möglichkeit gegenüber, das zweite Allel mit der sogenannten *URA3*-Blaster Technik zu inaktivieren (Fonzi et al. 1993). Dabei müßte der Marker nicht durch FLP-vermittelte Rekombination entfernt werden, sondern durch die vom pH-Wert unabhängige, zufällige Rekombination zweier direkter Sequenzwiederholungen des *hisG*-Gens aus *Salmonella typhimurium*, die das Markergen flankieren würden. *URA3*-negative Klone ließen sich dann durch Selektion auf 5-Fluororotat (FOA) identifizieren, da solche Zellen resistent gegenüber dem toxischen Basenanalogen FOA sind. Eine *URA3/IMH3*-Doppelmutante wäre das Ergebnis.

Solche doppelt auxotrophen Mutanten sind bereits beschrieben und wurden zur sogenannten „one-step disruption“ verwendet (Negredo et al. 1997). In einer *HIS1/URA3*-Doppelmutante wurde dabei ein Allel des *ARG5,6*-Gens mit einer *URA3*-Marker-Kassette deletiert, das andere Allel mit einer *HIS1*-Kassette. Es war nur ein Transformationsschritt notwendig. Die komplizierte Deletion des Markers entfiel. Eventuell ließe sich eine *URA3/IMH3*-Doppelmutante auch für solche Zwecke einsetzen. *IMH3* würde in diesem Fall nicht als dominanter Resistenzmarker dienen, sondern als Auxotrophiemarker.

Ein weiteres Problem bei der Herstellung der Mutante war die spezifische Integration des Flippers in das *IMH3*-Allel, welches im 3'-Bereich keine 200 bp lange Insertion enthält. Die Verkürzung der Mutagenese-Kassette lieferte zwar letztendlich eine homozygote

Mutante, doch konnten ungefähr 90% der Klone der zweiten Transformations-runde noch ohne Guanin wachsen. Da bisher kein zweites Gen für eine IMP-Dehydrogenase in *C. albicans* nachgewiesen wurde, konnte davon ausgegangen werden, daß die Guanin-prototrophen Transformanten noch ein intaktes *IMH3*-Allel besaßen. Demnach wäre der modifizierte Flipper also bevorzugt in das *IMH3*-Allel integriert worden, welches schon bei der ersten Transformation betroffen war. Daraus ließe sich folgern, daß sich die beiden *IMH3*-Allele von *C. albicans* CAI4 eventuell noch in anderen Bereichen unterscheiden, als nur in der 200 bp Insertion. Wie vor kurzem publiziert, reichen für die bevorzugte Integration einer homologen DNA-Sequenz in ein Allel schon geringe Unterschiede in der Nukleotidsequenz zum anderen Allel aus (Yesland et al. 2000). Um dieses Problem zu umgehen, wäre eine für jedes Allel spezifisch hergestellte DNA-Kassette notwendig gewesen.

Im Wachstum der heterozygoten Mutante war ein leichtes Defizit im Vergleich zum Stamm CAF2 zu erkennen. Das erscheint logisch, zumal der Verlust von einem *IMH3*-Allel ja bedeutet, daß weniger IMP-Dehydrogenase gebildet werden kann, die zur Synthese von Guanin-Nukleotiden benötigt wird. Der Verlust des zweiten *IMH3*-Allels führte dazu, daß die Mutante sogar im Vollmedium (YPD) ohne zusätzliches Guanin nicht mehr wachsen konnte. Es liegt nahe zu vermuten, daß die Mutante auch im Tiermodell einen enormen Nachteil hätte, was die Vermehrung betrifft. Sollte nachgewiesen werden, daß *IMH3* essentiell für das Wachstum und damit für die Virulenz im Tiermodell ist, dann hätte man ein neues Zielenzym zur Entwicklung eines spezifischen Wirkstoffs gegen *C. albicans*. Die Vorarbeiten zu den biochemischen Studien, die zur Entwicklung eines solchen Inhibitors notwendig sind, wurden im ersten Teil dieser Arbeit geleistet. Aufschluß darüber, wie sich *C. albicans* im Wirt verhält, wenn die IMP-Dehydrogenase gehemmt wird, könnte man, abgesehen von Tierversuchen mit der Mutante, auch aus einer klinischen Studie erhalten. Die Erhebung müßte an Patienten erfolgen, die zum Beispiel aufgrund einer Nieren oder Herztransplantation mit immunsuppressiv wirksamen MPA-Derivaten behandelt werden (Sintchak et al. 2000). Eine vergleichbare Studie hat nämlich gezeigt, daß Protease-Inhibitoren, die ursprünglich gegen das HI-Virus entwickelt wurden, sowohl *in vitro* als auch *in vivo* hemmend auf die sekretierten Aspartyl-Proteasen von *C. albicans* wirken und damit die Virulenz abschwächen (Cassone et al. 1999). Eine vergleichbar positive Nebenwirkung könnten auch Immunsuppressiva haben, die eigentlich gegen die humane IMP-Dehydrogenase gerichtet sind, gleichzeitig aber das *IMH3*-Protein aus *C. albicans* hemmen.

Da nach der Integration des *URA3*-Flippers in das verbliebene *IMH3*-Allel zweier heterozygoter Ausgangsklone jeweils Guanin-auxotrophe Zellen gefunden wurden, konnte davon ausgegangen werden, daß *C. albicans* nur einen Gen-Locus für eine IMP-Dehydrogenase besitzt. Dies ist ein wesentlicher Unterschied zum humanen Genom und zu dem von *S. cerevisiae*. Der Mensch besitzt nämlich zwei (*IMPDH I* und *IMPDH II*) und *S. cerevisiae* sogar 4 Gene (*IMD1-4*), die eine IMP-Dehydrogenase kodieren. Die beiden menschlichen Enzyme haben unterschiedliche Aufgaben. Während die IMP-Dehydrogenase vom Typ I konstitutiv exprimiert wird, kommt es nur in sich rasch teilenden Zellen zur Induktion der IMP-Dehydrogenase vom Typ II (Farazi et al. 1997; Escobar-Henriques et al. 2001). In *C. albicans* dagegen muß die koordinierte Biosynthese von Guanin-Nukleotiden an dieser Stelle von nur einem Enzym übernommen werden. Eine Erklärung dafür zu finden, daß die zu *C. albicans* verwandte Bäckerhefe vier Versionen eines Gens besitzt, während das Genom von *C. albicans* nur die Information für eines dieser Gene enthält, fällt schwer. Dennoch regt die Entdeckung dieser Besonderheit zum Vergleich mit parasitischen Protozoen an. Bei Trypanosomen und anderen Parasiten kennt man zwar auch eine IMP-Dehydrogenase, jedoch fehlt die vorgeschaltete de-novo Synthese von Purin-Nukleotiden. Anstelle dessen haben diese Organismen eine ganze Reihe von Möglichkeiten, derartige Nukleinsäure-Bausteine über die „salvage-pathways“ zu gewinnen. Für die Neusynthese sind sie komplett auf den Wirt angewiesen (Hammond et al. 1984; Doyle 1998). Der Besitz nur eines IMP-Dehydrogenase-Gens könnte als eine Form der Reduktion von Stoffwechsellleistungen gesehen werden, die eine Anpassung an die kommensale Lebensweise von *C. albicans* darstellt.

Daß die Inaktivierung des *IMH3*-Gens eine auxotrophe Mutante ergab, ließ nicht nur Rückschlüsse auf die Anzahl von IMP-Dehydrogenase-Genen zu. Jetzt bestand auch die Möglichkeit zu testen, ob *C. albicans* neben Guanin auch Xanthin verwerten kann. Xanthin ist die Base von Xanthosinmonophosphat (XMP), dem Produkt der biochemischen Reaktion, die von der IMP-Dehydrogenase katalysiert wird. Bei vielen Organismen gibt es einen alternativen Weg, auf dem XMP aus Phosphoribosylpyrophosphat und Xanthin gebildet wird. Dieser „salvage pathway“ kann katalysiert werden von den Enzymen Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase (HGPRT; EC 2.4.2.8) oder Xanthin-Phosphoribosyl-Transferase (XPRT; EC 2.4.2.22) und ist in Abbildung 17 dargestellt. Die Angaben wurden der Web-Seite <http://www.genome.ad.jp/kegg/kegg.html> der Kyoto Universität in Japan entnommen. Aus dem Unvermögen der *IMH3*-Mutanten, auf Xanthin zu wachsen, läßt sich folgern, daß *C. albicans* entweder die genannten Enzymaktivitäten der „salvage-pathways“ nicht aufweist oder daß Xanthin nicht in die Zellen eindringen kann.

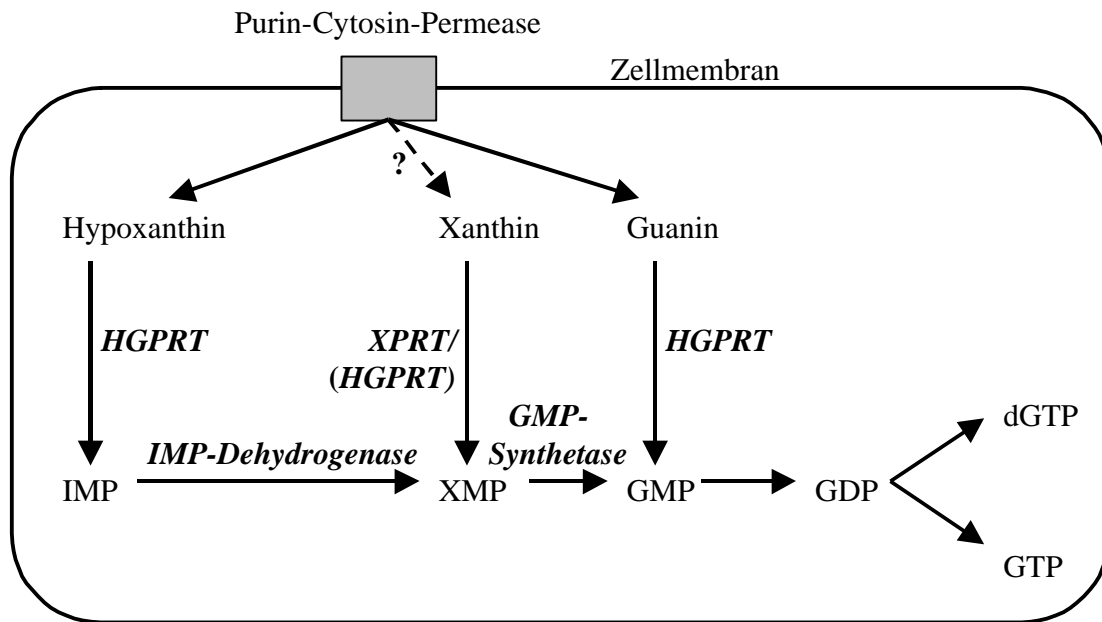


Abb. 17: Biosynthese von GMP über die de-novo Synthese oder die „salvage-pathways“ (Erklärung im Text)

Einen Hinweis darauf, daß Xanthin mit hoher Wahrscheinlichkeit in die Zellen aufgenommen werden kann, ist darin zu sehen, daß Guanin von den Mutanten verwertet wurde. Mit Hilfe der HGPRT mußte aus dem Guanin GMP entstanden sein, nachdem die Base über die Purin-Cytosin-Permease in die Zellen gelangt war. Dieses Kanalprotein transportiert neben Guanin auch noch Adenin, Hypoxanthin und Cytosin (Sen Gupta et al. 1995). Für Xanthin wurde der Weg noch nicht untersucht. Jedoch kann die chemische Verwandtschaft dieser Purin-Base zu den bekannten Substraten der Permease den Grund zur Vermutung geben, daß auch Xanthin über diesen Transporter in die Zellen gelangen könnte (Abbildung 17).

Die gerade geschilderten Erkenntnisse könnten einen Ansatz zur Entwicklung eines neuen Selektionsmarkers liefern. Sollte sich nämlich bestätigen, daß *C. albicans* Xanthin zwar aufnehmen, dieses aber nicht verwerten kann, dann könnte eine Xanthin-Phosphoribosyl-Transferase aus einem anderen Organismus dem Pilz eine Resistenz gegen Mykophenolsäure verleihen. Das würde in der Weise geschehen, daß die gehemmte de-novo-Synthese durch die Zugabe von Xanthin umgangen würde. Das Gen *XPT1* aus *S. cerevisiae*, welches vor kurzer Zeit entdeckt wurde (Guetsova et al. 1999), wäre zum Beispiel ein potentieller Kandidat für einen neuen dominanten Selektionsmarker auf der Basis einer Xanthin-Phosphoribosyl-Transferase. Das Ergebnis wären zwei molekularbiologische Werkzeuge zur Manipulation von *C. albicans*-Wildstämmen. Die Selektion nach der Transformation mit dem neuen *XPT1*-Marker müßte auf Klone

erfolgen, die in Gegenwart von Xanthin resistent gegen MPA sind. Eine zweite Transformation mit dem MPA^R -Marker wäre möglich, ohne das $XPTI$ -Gen zuvor entfernen zu müssen. Bei der MPA^R -Selektion dürfte kein Xanthin im Medium sein.

5.3 Isolierung eines *IMH3*-Genfragments aus *C. dubliniensis*

C. albicans und *C. dubliniensis* zählen beide zu den imperfekten Hefen und weisen auf genetischer Ebene große Ähnlichkeiten auf. So läßt sich in der kodierenden Region des *URA3*-Gens beider Organismen eine 93%ige Übereinstimmung in der Nukleotidsequenz feststellen (Staub et al. 2001). Daher verwundert es nicht, daß die 504 Basenpaare, die in dieser Arbeit vom *C. dubliniensis* *IMH3*-Gen sequenziert wurden, zu 96% mit der vergleichbaren Sequenz von *C. albicans* übereinstimmen. Der nichtkodierende Bereich von *URA3* weist allerdings eine geringere Identität auf. Hier sind es nur noch circa 70% (Staub et al. 2001). Sollte sich das bei *IMH3* ähnlich verhalten, dann sind möglicherweise große Unterschiede in der flankierenden 5'- und 3'-Region von *IMH3* der Grund dafür, daß sich *C. dubliniensis* mit dem MPA^R -Gen transformieren läßt, ohne daß die unerwünschte Integration des Markers am *IMH3*-Locus stattfindet.

Ziel des Projektes war die Isolierung von *IMH3* aus *C. dubliniensis*, um dieses Gen als Selektionsmarker für *C. albicans* zu etablieren. Bis zum Schritt, in dem die *EcoRI*- und *ClaI*-Fragmente der genomischen DNA von *C. dubliniensis* aus einem Agarosegel eluiert worden waren und mittels PCR bestätigt wurde, daß sie die Sequenz für ein *IMH3*-Gen enthalten müßten, gab es keine Schwierigkeiten. Die Amplifikation durch eine inverse PCR gelang jedoch in keinem Fall. Die größte Schwierigkeit bei einer inversen PCR ist es, die richtige DNA-Konzentration für die Ligationsreaktion zu finden. Zuviel DNA führt dazu, daß sich Ketten aus den Fragmenten bilden. Bei einer zu geringen Konzentration läßt sich die zirkularisierte DNA nicht mehr amplifizieren. Diesen Widerspruch empirisch zu lösen, gelang in dieser Arbeit leider nicht. Eine Möglichkeit wäre noch gewesen, die DNA-Konzentration der Ligationsreaktion möglichst gering anzusetzen und der ersten PCR eine sogenannte „nested“-PCR nachzuschalten mit Primern, die innerhalb des ersten PCR-Produkts binden sollten. In der Kürze der für diese Arbeit verbliebenen Zeit war es aber leider nicht mehr möglich, diesen Ansatz zu verfolgen. Alternativ dazu wurden die eluierten DNA-Fragmente in den Vektor pSK ligiert und in den *E. coli*-Stamm DH5 α

transformiert. Die Klone der so erhaltenen gröÙenselektionierten Genbank wurden mit LB-Medium von der Agarplatte abgeschwemmt und bei -80°C eingefroren.

Das Fernziel von diesem Teil der Arbeit war die Optimierung des *MPA^R*-Markersystems. Eine Alternative zur komplizierten Isolierung eines Gens mit unbekannter Sequenz hätte auch darin liegen können, andere IMP-Dehydrogenase-Gene von Organismen mit bekannter DNA-Sequenz zu verwenden. Jedoch wäre auch dieser Ansatz nicht ganz unproblematisch gewesen. Das *guaB*-Gen aus *E. coli* enthält zum Beispiel 20 CTG-Codons, die zuvor hätten verändert werden müssen. Bei dem Gen *YML056C* (*IMD3* [Swiss protein accession number P50094]) aus *S. cerevisiae*, welches ein Protein kodiert, dessen Aminosäuresequenz zu 76% identisch mit der des *IMH3*-Proteins aus *C. albicans* ist (Köhler et al. 1997), könnte ein anderes Problem auftreten. Es enthält zwar keine CTG-Codons, jedoch kodiert das Intron des Gens für die snoRNA (small nucleolar RNA) snR54. SnoRNAs werden in *S. cerevisiae* zur Ribose-2'-O-Methylierung der ribosomalen RNA benötigt (Lowe et al. 1999). Bedingt durch diese Besonderheit im Intron von *IMD3* könnte es bei dem Versuch, das Gen in *C. albicans* zu exprimieren, zu Problemen beim Splicen kommen. Diese Schwierigkeit wäre eventuell durch die Verwendung von cDNA zu überwinden.

Die Modifizierung eines artfremden IMP-Dehydrogenase-Gens zu einem neuen Selektionsmarker eröffnet übrigens noch eine interessante Anwendungsmöglichkeit für die hergestellte *IMH3*-Mutante. Mit ihr wäre es nämlich möglich, die Exprimierbarkeit rekombinanter IMP-Dehydrogenasen aus anderen Organismen in *C. albicans* zu überprüfen. Ein solches Gen müÙte die Mutante nämlich komplementieren können. Nach einer mutagenen Behandlung der Komplementante (mit UV-Licht oder chemischen Stoffen) könnte dann auf *MPA*-resistente Klone selektioniert werden. Die Mutation, die ein *MPA*-resistentes Enzym erzeugt, würde auf diese Weise rein zufällig entstehen und müÙte nicht durch eine spezifische PCR-Mutagenese eingebracht werden. Die Suche nach einer Mutation, die dem Enzym eine Resistenz gegen *MPA* verleiht, würde durch die beschriebene Methode erleichtert, zumal die Mutation, die dem *MPA^R*-Marker aus *C. albicans* seine Resistenz gegen Mykophenolsäure verleiht, nicht automatisch dem entsprechenden *S. cerevisiae*-Enzym die gleiche Eigenschaft verleihen muß.

5.4 Herstellung einer *PLB3*-Promotorfusion

Ziel des Projekts war es, die *FLP*-Reporter-Gen-Methode für *in vivo*-Expressionsstudien des *PLB3*-Gens zu etablieren. Dazu wurden zunächst die DNA-Kassetten hergestellt und anschließend in den Stamm *C. albicans* CF11 transformiert. Da sich die Stärke der Expression der *FLP*-Rekombinase in der *PLB3*-Promotorfusion nicht vorhersehen ließ, wurde die Fusion zum einen mit dem *caFLP*-Gen (pSFL29) hergestellt und zum anderen mit dem *ecaFLP*-Gen (pSFL213).

Wie im Ergebnisteil dieser Arbeit schon erwähnt wurde, war es die Schwierigkeit bei diesem Projekt einen Nullwert zu finden, bei dem die verglichenen Reporterstämme einen gleichen und möglichst hohen Anteil von Zellen enthielten, die den *MPA^R*-Marker noch besaßen. Die einfachste Möglichkeit der Reinkultur wäre eine große Kolonie von einer MM-Platte mit 2,5 µg/ml *MPA* gewesen. In der Praxis war die Zusammensetzung der großen Kolonien immer verschieden. Die wahrscheinlichste Erklärung dafür könnte sein, daß die Mykophenolsäure die Zellteilung stört. Unter dem Streß, dem *C. albicans* durch den Inhibitor der Guanin-Nukleotid-Biosynthese ausgesetzt ist, bilden sich sogenannte „Multi-Buds“. Das sind Zellklumpen, die an einen Arrest bei der Teilung von Hefezellen erinnern (Quinn et al. 1990). Diese Zellhaufen konnten durch Ausplattieren nicht vereinzelt werden. Sollten sich Zellen mit und ohne *MPA^R*-Marker in einem solchen Klumpen befunden haben, dann würden sich daraus Mischkolonien entwickeln. Das könnte erklären, daß durch das Ausplattieren einer großen Kolonie immer ein ziemlich unterschiedlicher Anteil von großen und kleinen Kolonien ermittelt wurde.

Aus diesem Grund wurde die beschriebene Methode entwickelt, mit der „große“ Kolonien untersucht werden konnten, die nicht unter dem Einfluß von Mykophenolsäure standen. In diesem Zusammenhang steht „groß“ für eine Kolonie, die sich aus einer vereinzelt Zelle mit *MPA^R*-Marker, aber ohne Selektionsdruck entwickelt hatte. Da man solche Kolonien nicht direkt erkennen konnte, wurden immer gleich 10 Klone untersucht. Das bedeutete, daß für jeden untersuchten Ursprungsklon 10 Kolonien ausplattiert werden mußten. Der experimentelle Aufwand ist leicht vorstellbar, sofern mehr als nur ein Reporterstamm untersucht werden sollte.

Die Untersuchungen, die im Ergebnisteil beschrieben sind, ergaben, daß alle 4 untersuchten Reporterstämme zu 70% ihren Marker verloren hatten, nachdem sie mehrfach überstrichen wurden. Es war also kein Unterschied zu sehen. Jedoch zeigte die etwas

komplizierte Untersuchung der Einzelkolonien von PLSF29_13 und PLSF213_13 einen Unterschied in der Rekombinase-Aktivität. Zwei der zehn untersuchten PLSF29_13-Kolonien, die sich innerhalb von 2 Tagen bei 30°C entwickelt hatten, besaßen noch zu knapp 100% ihren Marker. Mit dem Stamm PLSF213_13 lag die Ausbeute bei einer der zehn Kolonien bei 73%. Dieses Ergebnis deckt sich mit der Tatsache, daß der Stamm PLSF213_13 das sensitivere *ecaFLP*-Reportergenkonstrukt enthält.

Mit der beschriebenen Methode konnte zwar eine Kolonie von PLSF29_13 gefunden werden, in der so gut wie alle Zellen noch einen Marker besaßen. Jedoch war die Untersuchung keine sichere Methode, mit dem sich uninduzierte Zellen anreichern ließen. Für die Infektion von Versuchstieren wäre aber ein zuverlässiges Protokoll notwendig, nachdem sich ausschließlich Zellen anzüchten lassen, die ihren *MPA^R*-Marker noch besitzen. Aus der Problematik wird deutlich, daß sich das verwendete Reportersystem am besten zu *in vivo*-Expressionsstudien mit Promotoren eignet, die *in vitro* keine Aktivität aufweisen. Diese Bedingung entspricht der klassischen Vorstellung, daß Virulenzgene ausschließlich innerhalb bestimmter Phasen des Infektionszyklus zum Ausdruck kommen (Cotter et al. 1998). Bei den verschiedenen *SAP*-Genen, an denen das *FLP*-System erfolgreich eingesetzt wurde, ist das der Fall (Staib et al. 1999; Staib et al. 2000). Im Gegensatz dazu läßt sich für *PLB3* unter vielen getesteten *in vitro*-Bedingungen mit Hilfe der Northern-Hybridisierung eine geringe Expression nachweisen (S. Theiß, persönliche Mitteilung). Aufgrund dieser Tatsache läßt sich jedoch nicht ausschließen, daß der Phospholipase eine Rolle während der Infektion zukommen könnte. Erste Versuche am Tiermodell lieferten Hinweise darauf, daß eine *plb3*-Mutante in der Virulenz abgeschwächt ist (S. Theiß, persönliche Mitteilung). Eine Optimierung des vorliegenden *IVET*-Systems für *PLB3* könnte weitere wertvolle Hinweise zur Rolle des Gens in der Virulenz liefern. Im nächsten Abschnitt werden einige Vorschläge zur Anpassung des Systems an *PLB3* genannt.

Eine Möglichkeit, den vorzeitigen Verlust des Markergens durch die geringe *in vitro*-Expression zu vermeiden, könnte darin bestehen, daß die Sensitivität des Systems herabgesetzt wird. Durch eine Veränderung der *FRT*-Sequenzen der *FLP*-Rekombinase könnte die Rekombinationshäufigkeit vermindert werden. Das Reportersystem könnte so auch für *in vivo*-Expressionsstudien von anderen Genen angewendet werden, die *in vitro* ebenfalls wie *PLB3* eine geringe Aktivität aufweisen. Ein anderer Ansatz wäre, nach einem Medium zu suchen, in dem die Expression von *PLB3* stark vermindert ist. Auf diese Weise

ließe sich vermeiden, daß die Zellen schon nach der Transformation des Reporterkonstrukts ihren *MPA^R*-Marker verlieren. Außerdem ließen sich die Reporterstämme in einem solchen Medium problemlos für Untersuchungen im Tiermodell anzüchten. Abgesehen von diesen systematischen Veränderungen der Methode müßte man nach einem Weg suchen, auf dem die Zellen möglichst kurzen Inkubations- und Lagerzeiten nach der Transformation ausgesetzt sind.

Unabhängig von der Zielsetzung, das Reportersystem für *in vivo*-Expressionsstudien von *PLB3* zu etablieren, eröffneten die erhaltenen Ergebnisse noch einen ganz anderen experimentellen Ansatz. Bei der Integration der Konstrukte in das *PLB3*-Gen fiel nämlich der Allel-Dimorphismus der *ScaI*-Fragmente auf. Aus vorhergehenden Arbeiten (G. Köhler, persönliche Mitteilung) wurde gefolgert, daß dieser Allelunterschied vermutlich auf einer Insertion in einem Bereich beruht, der circa 7-8 kb stromaufwärts der *PLB3*-Sequenz liegen mußte. Der Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus könnte als Hinweis darauf gesehen werden, daß innerhalb des Genomabschnitts von *PLB3* weitere Unterschiede zwischen den homologen Chromosomen vorliegen. Diese könnten auch die regulatorische Promotorsequenz von *PLB3* betreffen. Die Abhängigkeit der Genexpression vom jeweiligen *PLB3*-Allel wäre eine mögliche Folge. Aus diesem Grund wurden auch pro Fragment, das transformiert wurde (*caFLP*-Reporter bzw. *ecaFLP*-Reporter), zwei Klone ausgesucht, für jedes Allel einer. Aufgrund der beschriebenen Probleme, die mit den ersten Tests des vorliegenden Reportersystems an *PLB3* auftraten, können noch keine Aussagen über die mögliche Abhängigkeit der Expression von *PLB3* vom jeweiligen Allel getroffen werden. Die *in vitro*-Expressionsanalyse, die für solche Aussagen notwendig wäre, ließe sich in Zukunft unabhängig von dem verwendeten Reportersystem durchführen. Da es sich bei den konstruierten Reporterstämmen ja gleichzeitig um heterozygote Mutanten von *PLB3* handelt, könnte eine Northern-Hybridisierung mit einer *PLB3*-Sonde einen möglichen Unterschied in der Genregulation der noch intakten Allele aufdecken. Außerdem könnten die konstruierten Stämme zur spezifischen Anreicherung der Promotoren aus den einzelnen Allelen mit Hilfe der PCR verwendet werden. Die DNA-Sequenzierung der PCR-Produkte könnte dann Aufschluß über eventuelle Unterschiede in der Basenfolge der Promotoren geben.

5.5 Fazit

Der Schwerpunkt dieser Arbeit sollte auf der molekularen Charakterisierung der IMP-Dehydrogenase von *C. albicans* liegen. Aus diesem Grund wurden die Expressionsvektoren und die Mutante hergestellt. Die beiden anderen Projekte verfolgten einen vielversprechenden Ansatz, konnten gegen Ende der Arbeit aber leider nicht weitergeführt werden. Jedoch zeigten die Ergebnisse aller vier Teile dieser Arbeit zahlreiche neue Perspektiven für zukünftige Untersuchungen auf.

Literaturverzeichnis

Ausubel F.(Hrsg.) (1989): Current protocols in molecular biology. New York, John Wiley & Sons.

Baneyx F. (1999): "Recombinant protein expression in *Escherichia coli*." *Curr Opin Biotechnol* **10**(5): 411-421.

Calderone R. A. (1993): "Recognition between *Candida albicans* and host cells." *Trends Microbiol* **1**: 55-58.

Camilli A., Beattie D. T. und Mekalanos J. J. (1994): "Use of genetic recombination as a reporter of gene expression." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 2634-2638.

Cassone A., De Bernardis F. und al. e. (1999): "In vitro and in vivo anticandidal activity of Human Immunodeficiency Virus Protease Inhibitors." *J Infect Dis* **180**: 448-453.

Cotter P. A. und Miller J. F. (1998): "In vivo and ex vivo regulation of bacterial virulence gene expression." *Curr Opin Microbiol* **1**(1): 17-26.

De Backer M. D., de Hoogt R. A., Froyen G., Odds F. C., Simons F., Contreras R. und Luyten W. H. (2000): "Single allele knock-out of *Candida albicans* CGT1 leads to unexpected resistance to hygromycin B and elevated temperature." *Microbiology* **146**: 353-365.

De Backer M. D., Magee P. T. und Pla J. (2000): "Recent developments in molecular genetics of *Candida albicans*." *Annu Rev Microbiol* **54**(1): 463-498.

Doyle P. S. (1998): "Hypoxanthine, guanine, xanthine phosphoribosyltransferase activity in *Cryptosporidium parvum*." *Exp Parasitol* **89**(1): 9-15.

Escobar-Henriques M. und Daignan-Fornier B. (2001): "Transcriptional Regulation of the Yeast GMP Synthesis Pathway by Its End Products." *J Biol Chem* **276**(2): 1523-1530.

- Farazi T., Leichman J., Harris T., Cahoon M. und Hedstrom L. (1997): "Isolation and characterization of mycophenolic acid-resistant mutants of inosine-5'-monophosphate dehydrogenase." *J Biol Chem* **272**(2): 961-965.
- Fonzi W. A. und Irwin M. Y. (1993): "Isogenic strain construction and gene mapping in *Candida albicans*." *Genetics* **134**(3): 717-728.
- Franklin T. J. und Cook J. M. (1969): "The inhibition of nucleic acid synthesis by mycophenolic acid." *Biochem J* **113**(3): 515-524.
- Gillum A. M., Tsay E. Y. und 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**(1): 179-182.
- Guetsova M. L., Crother T. R., Taylor M. W. und Daignan-Fornier B. (1999): "Isolation and characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* *XPT1* gene encoding xanthine phosphoribosyl transferase." *J Bacteriol* **181**(9): 2984-2986.
- Hammond D. J. und Gutteridge W. E. (1984): "Purine and pyrimidine metabolism in the Trypanosomatidae." *Mol Biochem Parasitol* **13**(3): 243-261.
- Ibrahim A. S., Mirbod F., Filler S. G., Banno Y., Cole G. T., Kitajima Y., Edwards J. E., Nozawa Y. und Ghannoum M. A. (1995): "Evidence implicating phospholipase as a virulence factor of *Candida albicans*." *Infect Immun* **63**(5): 1993-1998.
- Irdani T., Bogani P., Mengoni A., Mastromei G. und Buiatti M. (1997): "Construction of a new vector conferring methotrexate resistance in *Nicotinia tabacum* plants." *Plant Mol Biol* **37**(6): 1079-1084.
- Jacob F., Jäger E. J. und Ohmann E. (1994): "Botanik." Jena, Gustav Fischer Verlag.
- Köhler G. A., White T. C. und Agabian N. (1997): "Overexpression of a cloned IMP dehydrogenase gene of *Candida albicans* confers resistance to the specific inhibitor mycophenolic acid." *J Bacteriol* **179**(7): 2331-2338.
- Laemmli U. K. (1970): "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* **227**(259): 680-685.

- Lowe T. M. und Eddy S. R. (1999): "A computational screen for methylation guide snoRNAs in yeast." *Science* **283**(5405): 1168-1171.
- Michal G. (1999): "Biochemical Pathways." Heidelberg; Berlin, Spektrum, Akad. Verl.
- Millon L., Manteaux A., Reboux G., Drobacheff C., Monod M., Barale T. und Michel-Briand Y. (1994): "Fluconazole-resistant recurrent oral candidiasis in human immunodeficiency virus-positive patients: persistence of *Candida albicans* strains with the same genotype." *J Clin Microbiol* **32**(4): 1115-1118.
- Morschhauser J., Michel S. und Staib P. (1999): "Sequential gene disruption in *Candida albicans* by FLP-mediated site-specific recombination." *Mol Microbiol* **32**(3): 547-556.
- Muchmore D. C., McIntosh L. P., Russel C. B., Anderson D. E. und Dahlquist F. W. (1989): "Expression and nitrogen-15 labeling of proteins for proton and nitrogen-15 nuclear magnetic resonance." *Methods Enzymol* **177**: 44-73.
- Negredo A., Moneoliva L., Gil C., Pla J. und Nombela C. (1997): "Cloning, analysis and one-step disruption of the *ARG5,6* gene of *Candida albicans*." *J Biol Chem* **272**(46): 28954-28961.
- Nijkamp H. J. und De Haan P. G. (1967): "Genetic and biochemical studies of the guanosine 5'-monophosphate pathway in *Escherichia coli*." *Biochim Biophys Acta* **145**(1): 31-40.
- Ochman H., Gerber A. S. und Hartl D. L. (1988): "Genetic applications of an inverse polymerase chain reaction." *Genetics* **120**(3): 621-623.
- Odds F. C. (1985): "*Candida albicans* proteinase as a virulence factor in the pathogenesis of *Candia* infections." *Zbl Bakt Hyg* **260**: 539-542.
- Odds F. C. (1994): "*Candida* species and virulence." *ASM News* **60**(6): 313-318.
- O'Gara M. J., Lee C. H., Weinberg G. A., Nott J. M. und Queener S. F. (1997): "IMP dehydrogenase from *Pneumocystis carinii* as a potential drug target." *Antimicrob Agents Chemother* **41**(1): 40-48.

- Quinn C. M., Bugeja V. C., Gallagher J. A. und Whittaker P. A. (1990): "The effect of mycophenolic acid on the cell cycle of *Candida albicans*." *Mycopathologia* **111**(3): 165-168.
- Saiki R. K., Gelfand D. H., Stoffel S., Scharf S. J., Higuchi R., Horn G. T., Mullis K. B. und Erlich H. A. (1988): "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase." *Science* **239**(4839): 487-491.
- Sanger F., Nicklen S. und Coulson A. R. (1977): "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**(12): 5463-5467.
- Santos M. A., Perreau V. M. und Tuite M. F. (1996): "Transfer RNA structural change is a key element in the reassignment of the CUG codon in *Candida albicans*." *Embo J* **15**(18): 5060-5080.
- Scherer S. und Magee P. T. (1990): "Genetics of *Candida albicans*." *Microbiol Rev Antimicrob Agents Chemother* **54**(3): 226-241.
- Sen Gupta S., Kerridge D. und Chevallier M. R. (1995): "A purine permease in *Candida glabrata*." *FEMS Microbiol Lett* **126**(1): 93-96.
- Sintchak M. D. und Nimmegern E. (2000): "The structure of inosine 5'-monophosphate dehydrogenase and the design of novel inhibitors." *Immunopharmacology* **47**(2-3): 163-84.
- Soll D. R. (1997): "Gene regulation during high-frequency switching in *Candida albicans*." *Microbiology* **143**: 279-288.
- Staib P., Kretschmar M., Nichterlein T., Hof H. und Morschhauser J. (2000): "Differential activation of a *Candida albicans* virulence gene family during infection." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(11): 6102-6107.
- Staib P., Kretschmar M., Nichterlein T., Kohler G., Michel S., Hof H., Hacker J. und Morschhauser J. (1999): "Host-induced, stage-specific virulence gene activation in *Candida albicans* during infection." *Mol Microbiol* **32**(3): 533-546.
- Staib P., Moran G. P., Sullivan D. J., Coleman D. C. und Morschhauser J. (2001): "Isogenic Strain Construction and Gene Targeting in *Candida dubliniensis*." *J Bacteriol* **183**(9): 2859-2865.

- Sternberg S. (1994): "The emerging fungal threat." *Science* **266**(5191): 1632-1634.
- Sullivan D. J., Westerneng T. J., Haynes K. A., Bennett D. E. und Coleman D. C. (1995): "Candida dubliniensis sp. nov.: phenotypic and molecular characterization of a novel species associated with oral candidosis in HIV-infected individuals." *Microbiology* **141**: 1507-1521.
- White T. C., Marr K. A. und Bowden R. A. (1998): "Clinical , cellular and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance." *Clin Microbiol Rev* **11**(2): 382-402.
- Wirsching S., Michel S. und Morschhauser J. (2000): "Targeted gene disruption in *Candida albicans* wild-type strains: the role of the MDR1 gene in fluconazole resistance of clinical *Candida albicans* isolates." *Mol Microbiol* **36**(4): 856-865.
- Woodcock D. M., Crowther P. J., Doherty J., Jefferson S., DeCruz E., Noyer-Weidner M., Smith S. S., Michael M. Z. und Graham M. W. (1989): "Quantitative evaluation of *Escherichia coli* host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants." *Nucleic Acids Res* **17**(9): 3469-3478.
- Yesland K. und Fonzi W. A. (2000): "Allel-specific gene targeting in *Candida albicans* results form heterology between alleles." *Microbiology*(146): 2097-2104.
- Zhou X., Cahoon M., Rosa P. und Hedstrom L. (1997): "Expression, purification, and characterization of inosine 5'-monophosphate dehydrogenase from *Borrelia burgdorferi*." *J Biol Chem* **272**(35): 21977-21981.