

**Sekretierte Lipasen des
humanpathogenen Pilzes *Candida albicans*
und ihre Bedeutung als Virulenzfaktoren**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereichs Biologie
der Universität Hamburg

vorgelegt von

Frank Stehr

Hamburg, September 2003

Genehmigt vom
Fachbereich Biologie der
Universität Hamburg
auf Antrag von Herrn Professor Dr. W. SCHÄFER
Weitere Gutachter der Dissertation:
Herr Professor Dr. U. WIENAND

Tag der Disputation: 24. Oktober 2003

Hamburg, den 10. Oktober 2003



Professor Dr. A. Frühwald
Dekan

Ode to the Lipase

(by Trey Sato; Cold Spring Harbor 2002)

It was just a few months ago,
 when I received some great news.
I was accepted for this course,
 an opportunity I couldn't refuse.

The first night of the course,
 I met members of my group.
They were smart and interesting people,
 much knowledge I knew they'd contribute.

Mary had great experience
 in fish and insect physiologies.
While Fernando knew much,
 about an important autoimmune disease.

And there was Frank,
 who was last but not least.
He also knew many things,
 about an irritating yeast.

The next day we met Kostya,
 his scientific muscles he did flex.
Don't you recall him prosecuting Letizia
 hoping she'd reveal the structure of compound X?

While we were with Kostya,
 we purified proteins in reverse-phase.
This peaked Frank's curiosity,
 he hope it could isolate a lipase.

Next we met Dick,
 and isolated sigma in many ways.
Of course Frank had asked,
 "Can this be used to purify a lipase?"

Our next module with Al,
 was to purify AP-1.
We learned lots of things,
 and really, it was fun.

During our module with Al,
 A question Frank did raise.
"Why is this method useful,
 if it can't isolate the lipase?"

Finally we learned from Sue-Hwa,
 with data on detergents she did amaze.
But despite all of this,
 Frank didn't ask of their effects on the lipase.

So now the course is finally over,
 I have memories of fun-filled days.
I've become friends with many of you,
 especially Fernando, Mary, Frank, and the lipase.

INHALTSVERZEICHNIS**ABKÜRZUNGEN**

1	EINLEITUNG	1
1.1	Allgemeine Einführung	1
1.2	Prädisponierende Faktoren.....	3
1.3	Virulenzfaktoren	4
1.4	Analyse der Virulenzfaktoren von <i>C. albicans</i> mittels der <i>URA</i> -Blaster-Methode	8
1.5	Die Enzymgruppe der Lipasen (EC 3.1.1.3).....	10
1.5.1	Lipasen.....	10
1.5.2	Lipasen als Virulenzfaktor.....	13
1.5.2.1	Bakterien.....	13
1.5.2.2	Pilze	15
1.5.3	Lipase-Inhibitoren.....	16
1.5.4	Die Lipase-Genfamilie von <i>Candida albicans</i>	17
1.6	Ziel der Arbeit.....	18
2	MATERIAL UND METHODEN	19
2.1	Material.....	19
2.1.1	Pilz- und Bakterienstämme	19
2.1.2	Plasmide.....	21
2.1.3	Medien und Chemikalien.....	21
2.1.4	Nukleotide, Nukleinsäuren und DNA-Längenstandards	24
2.1.5	Oligonukleotide.....	24
2.1.6	Inhibitoren und Aktivatoren.....	27
2.1.7	Puffer und Lösungen.....	28
2.2	Allgemeine Methoden	31
2.2.1	<i>In silico</i> Arbeiten.....	31
2.2.2	Herstellung von Kulturmedien und Lösungen.....	32
2.2.3	Methoden zur DNA-Analyse	32
2.2.3.1	DNA-Präzipitation (Sambrook <i>et al.</i> , 1989).....	32
2.2.3.2	Gelelektrophorese und Ethidiumbromidfärbung	32
2.2.3.3	DNA-Isolierung aus Agarose-Gelen.....	32
2.2.4	Enzymatische Modifikation von DNA	33
2.2.4.1	DNA-Restriktion.....	33
2.2.4.2	Dephosphorylierung linearisierter Vektor DNA.....	33
2.2.4.3	Ligation	33
2.2.5	PCR und Klonierung von PCR-Fragmenten.....	33
2.2.5.1	Amplifikation mit der <i>Taq</i> -Polymerase	33
2.2.5.2	Amplifikation mit der <i>DeepVent</i> -Polymerase.....	34
2.2.5.3	Klonierung der PCR-Produkte.....	35
2.2.5.4	PCR zur Analyse von <i>E. coli</i> -Klonen	35

2.2.6	Sequenzierung von DNA	36
2.2.7	Mikrobiologische und molekularbiologische Methoden (<i>E. coli</i>)	36
2.2.7.1	Anzucht von <i>E. coli</i>	36
2.2.7.2	Transformation von <i>E. coli</i> mittels Elektroporation	37
2.2.7.3	Transformation von <i>E. coli</i> mittels Hitzeschock	37
2.2.7.4	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	38
2.2.7.4.1	Isolierung in kleinem Maßstab („Miniprep“)	38
2.2.7.4.2	Isolierung im mittleren Maßstab („Midiprep“).....	38
2.2.7.4.3	Isolierung im großen Maßstab („Maxiprep“), (Sambrook <i>et al.</i> , 1989; modifiziert)	38
2.2.8	Mikrobiologische und molekularbiologische Methoden (<i>Candida</i>).....	39
2.2.8.1	Anzucht und Bestimmung der Zellzahl von <i>Candida</i>	39
2.2.8.2	Expressionsstudien von <i>C. albicans</i> Lipase-Genen in verschiedenen Medien	39
2.2.8.3	Expressionsstudien von <i>C. albicans</i> Lipase-Genen in verschiedenen Haut- Infektionsmodellen	40
2.2.8.3.1	Orale Schleimhaut („reconstituted human epithelium“, RHE).....	40
2.2.8.3.2	Vaginales Schleimhautmodell	41
2.2.8.4	Expressionsstudien von <i>C. albicans</i> Lipase-Genen im Mausmodell einer systemischen Candidose	41
2.2.8.5	Expressionsstudien von <i>C. albicans</i> Lipase-Genen in Patientenproben	41
2.2.8.6	Molekularbiologische Unterscheidung von <i>C. albicans</i> und <i>C. dubliniensis</i>	42
2.2.8.7	RNA-Isolierung und -Konzentrationsbestimmung	43
2.2.8.8	Expressionsanalyse mittels RT-PCR	44
2.2.8.9	Gezielte Mutagenese von <i>C. albicans</i>	45
2.2.8.9.1	Transformation von <i>C. albicans</i> -Zellen nach Lithiumacetat- Behandlung	45
2.2.8.9.2	FOA (5-Fluoroorotic acid)-Behandlung von <i>C. albicans</i> - Transformanden	46
2.2.8.10	Analyse der <i>C. albicans</i> -Mutanten	46
2.2.8.10.1	Genomische DNA-Isolierung aus <i>Candida</i>	46
2.2.8.10.2	Southern Blot-Analyse.....	46
2.2.8.10.3	<i>In vitro</i> Analyse der <i>C. albicans</i> -Mutanten.....	48
2.2.8.10.4	Adhäsions- und „Damage“-Versuche mit <i>C. albicans</i>	49
2.2.8.10.5	Mausinfektionen mit <i>C. albicans</i> -Mutanten	52
2.2.8.11	Wachstumsstudien von <i>C. albicans</i> nach Applikation von Antisense- Oligonukleotiden.....	52
2.2.8.12	Aktivator- und Inhibitor-Studien	53
3	ERGEBNISSE	55
3.1	Analyse der aus <i>LIP1-10</i> abgeleiteten Proteinsequenzen (Lip1-10).....	55
3.2	Putative Gene im Genom von <i>C. albicans</i> , die für lipolytische Enzyme kodieren	58
3.3	Sequenzanalyse eines putativen Phospholipase A-Gens.....	61
3.4	Southern Blot-Nachweis des <i>PLA</i> -Gens bei <i>C. albicans</i> und anderen <i>Candida</i> - Arten.....	65

3.5	<i>In vitro</i> und <i>in vivo</i> Expressionsstudien des <i>PLA</i>-Gens von <i>C. albicans</i>.....	66
3.5.1	Untersuchung der Transkription des <i>PLA</i> -Gens von <i>C. albicans</i> während des Wachstums in Urea-Medium	66
3.5.2	Untersuchung der Transkription des <i>PLA</i> -Gens von <i>C. albicans</i> während der Infektion von künstlicher oraler und vaginaler Schleimhaut und in Patientenproben.....	66
3.6	Expression der Lipase-Genfamilie von <i>C. albicans</i> unter verschiedenen <i>in vitro</i> Bedingungen	67
3.6.1	Untersuchung der Transkription der Gene <i>LIP1-10</i> von <i>C. albicans</i> während des Wachstums in Urea-Medium.....	67
3.6.2	Untersuchung der Transkription der Gene <i>LIP1-10</i> von <i>C. albicans</i> während des Wachstums in YNB-Olivenöl.....	69
3.7	Expression der Lipase-Genfamilie von <i>C. albicans</i> unter verschiedenen <i>in vivo</i> Bedingungen	70
3.7.1	Zeitlicher Verlauf der <i>in vivo</i> Expression der Lipase-Genfamilie in intraperitoneal infizierten Mäusen	70
3.7.2	Vergleich der Lipase-Genexpression einer systemischen Infektion der Leber und Nieren in Mäusen.....	71
3.7.3	Infektionsverlauf und Expressionsstudie von <i>C. albicans</i> während der Infektion verschiedener künstlicher Hautmodelle	72
3.7.3.1	Untersuchung der Transkription der Gene <i>LIP1-10</i> von <i>C. albicans</i> während der Infektion eines künstlichen oralen Epithels (RHE).....	72
3.7.3.2	Untersuchung der Transkription der Gene <i>LIP1-10</i> von <i>C. albicans</i> während der Infektion eines künstlichen vaginalen Epithels.....	75
3.7.4	Lipase-Genexpression in Proben von Patienten mit Candidose	76
3.7.4.1	Molekularbiologische Unterscheidung von <i>C. albicans</i> und <i>C. dubliniensis</i>	76
3.7.4.2	Untersuchung der Transkription der Gene <i>LIP1-10</i> von <i>C. albicans</i> in Proben von Patienten mit Candidose	78
3.8	Suche nach <i>LIP8</i>-ähnlichen Genen in den Genomen anderer <i>Candida</i>-Arten.	79
3.9	Suche nach Lip8-ähnlichen Proteinen in den Proteomen anderer Mikroorganismen.....	81
3.10	Gezielte Zerstörung des <i>LIP8</i>-Locus.....	82
3.11	Herstellung von <i>lip8</i>-Knock-down-Mutanten	85
3.12	Herstellung einer <i>LIP8</i>-Überexpressionsmutante und einer <i>LIP8</i>-Retransformande	88
3.13	Phänotypische Analyse der <i>LIP8</i>-Mutanten und -Retransformanden von <i>C. albicans</i>	90
3.13.1	Wachstum der <i>LIP8</i> -Mutanten in verschiedenen Flüssigmedien	90
3.13.1.1	YPG-Medium.....	90
3.13.1.2	YNB-Tween 40.....	91
3.13.1.3	NuTRIflex® Lipid-Lösung.....	91
3.13.1.4	Flockung in YPG	92
3.13.2	Wachstum der <i>LIP8</i> -Mutanten auf verschiedenen Festmedien	93

3.13.2.1	pH-Sensitivität der <i>LIP8</i> -Mutanten.....	93
3.13.2.2	Temperatur-Sensitivität der <i>LIP8</i> -Mutanten.....	94
3.13.2.3	Myzel- und Chlamydosporenbildung der <i>LIP8</i> -Mutanten.....	94
3.13.2.4	Analyse des Phänotyps der <i>LIP8</i> -Mutanten auf S4D-Agar	95
3.13.2.5	Einfluß von anderen Kohlenstoff-Quellen als Glucose auf das Wachstum der <i>LIP8</i> -Mutanten.....	96
3.13.2.6	Einfluß von hohem osmotischen Druck auf das Wachstum der <i>LIP8</i> - Mutanten	97
3.13.2.7	Lipolytische Aktivität der <i>LIP8</i> -Mutanten auf Festmedium.....	98
3.13.3	Lipolytische Aktivität der <i>LIP8</i> -Mutanten im Kulturüberstand	98
3.14	Infektionsverhalten der <i>LIP8</i>-Mutanten.....	100
3.14.1	Untersuchung der Adhäsion der <i>LIP8</i> -Mutanten	100
3.14.1.1	Untersuchung der Adhäsion der <i>LIP8</i> -Mutanten an Gelatine.....	100
3.14.1.2	Untersuchung der Adhäsion der <i>LIP8</i> -Mutanten an humane Endothelzellen	101
3.14.2	„Damage“-Versuch der <i>LIP8</i> -Mutanten	101
3.14.3	Infektionsverlauf und Expressionsstudie von <i>LIP8</i> -Mutanten während der Infektion verschiedener künstlicher Hautmodelle	102
3.14.3.1	Untersuchung der Transkription der Gene <i>LIP1-10</i> einer KO-Mutante während der Infektion eines künstlichen oralen Epithels (RHE).....	103
3.14.3.2	Untersuchung der Transkription der Gene <i>LIP1-10</i> einer KO-Mutante während der Infektion eines künstlichen vaginalen Epithels.....	104
3.14.4	Analyse der <i>LIP8</i> -Mutanten in verschiedenen Maus-Infektionsmodellen	105
3.14.4.1	Intraperitoneale Infektion.....	105
3.14.4.2	Intravenöse Infektion	106
3.14.4.3	Infektion des Ösophagus.....	107
3.15	Wachstum von <i>C. albicans</i> in lipidhaltigen Medien und YPG nach Zusatz von Antisense-Oligonukleotiden.....	108
3.15.1	Wachstum von <i>C. albicans</i> mit Antisense-Oligonukleotiden.....	108
3.15.2	Wachstum von <i>C. albicans</i> mit degenerierten Antisense-Oligonukleotiden und Antisense-Phosphothioat-Oligonukleotiden	109
3.16	Wachstum von <i>C. albicans</i> in lipidhaltigen Medien nach Zusatz von Lipase- Inhibitoren und -Aktivatoren	111
3.17	Aktivitätstests mit Lipase-Inhibitoren und -Aktivatoren	113
4	DISKUSSION	117
5	ZUSAMMENFASSUNG	142
6	LITERATURVERZEICHNIS	144
ANHANG		
DANKSAGUNG		
WISSENSCHAFTLICHER WERDEGANG		

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb.	Abbildung
AIDS	erworbenes Immunschwächesyndrom („ <i>Acquired Immune Deficiency Syndrome</i> “)
ALS	„ <i>Agglutinine-like Sequences Genes</i> “
ALT	Alaninaminotransferase
Amp	Ampicillin
AS	Aminosäure(n)
ASS	Acetylsalicylsäure
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum Albumin
C	Cytosin
cAMP	(3',5'-cyclo-Adenosin-monophosphat)
cDNA	komplementäre DNA („ <i>complementary DNA</i> “)
CFU	„ <i>colony forming unit</i> “
CSPD	Dinatrium-3-(4-Methoxyspiro{1,2-Dioxethan-3,2'-(5'-Chloro)-tricyclo-[3.3.1.1 ^{3,7}]decan}-4-yl)-phenylphosphat
Da	Dalton
DAG	Diacylglycerol
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DIG	Digoxigenin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure („ <i>desoxyribonucleic acid</i> “)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
ds	„ <i>double strand</i> “
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
dUTP	Desoxyuraciltriphosphat
EDTA	Ethylendiamin-tetraacetat, di-Natriumsalz
ELISA	„ <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> “
et al.	und Mitarbeiter
EtOH	Ethanol
FCS	„ <i>Fetus Calf Serum</i> “
FFS	Freie Fettsäuren
FOA	„ <i>5-fluoroorotic acid</i> “
x g	Vielfaches der Erdbeschleunigung ($g = 9,81 \text{ m/s}^2$; „ <i>gravity</i> “)
G	Guanin
GPI-Anker	Glykosylphosphatidylinositol-Anker
H₂O	Wasser einer Millipore Aufbereitungsanlage
12-HETE	12-Hydroxyeicosatetraensäure
HIV	„ <i>human immunodeficiency virus</i> “
Hwp1	„ <i>Hyphal wall protein</i> “

HWZ	Halbwertszeit
IEP	Isoelektrischer Punkt
IgG	Immunglobulin
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalaktosid
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasen(paare)
KD	„ <i>knock-down</i> “
KO	„ <i>knock-out</i> “
LB	Luria-Bertani
LIP	Lipase-Gen
Lip	Lipase (Protein)
LTB₄	Leukotrien B ₄
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MCS	„ <i>Multiple cloning site</i> “
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
mRNA	Boten-RNA („ <i>messenger RNA</i> “)
MW	Molekulargewicht („ <i>molecular weight</i> “)
OD	Optische Dichte
ORF	Offener Leserahmen („ <i>open reading frame</i> “)
PAS	„ <i>periodic acid-Schiff</i> “
PBS	„ <i>phosphate-buffered saline</i> “
PCR	Polymerasekettenreaktion („ <i>polymerase chain reaction</i> “)
PEG	Polyethylenglykol
pH	Wasserstoffionen-Konzentration („ <i>potentia Hydrogenii</i> “)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
(r)ER	(rauhes) Endoplasmatisches Retikulum
RHE	„ <i>reconstituted human epithelium</i> “
RNA	Ribonukleinsäure („ <i>ribonucleic acid</i> “)
RNAi	RNA-Interferenz
rpm	Umdrehungen pro Minute („ <i>rounds per minute</i> “)
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	„ <i>reverse transcriptase-polymerase chain reaction</i> “
SAP	Sekretorisches Aspartatprotease-Gen
Sap	Sekretorische Aspartatprotease
SD	„ <i>synthetic defined</i> “
SDS	Natriumdodecylsulfat („ <i>sodiumdodecylsulfate</i> “)
ss	„ <i>single strand</i> “
SSC	Natriumchlorid und Natriumcitrat („ <i>sodiumchloride and sodiumcitrate</i> “)
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAG	Triacylglycerol
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Tris-Borat-EDTA
TE	Tris-EDTA
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-ammoniummethan
Tween	Polyoxyethylensorbitolmonolaurat

U	Einheit der Enzymaktivität („ <i>unit</i> “)
ÜN	über Nacht
UTR	Nicht translatierter Bereich („ <i>untranslated region</i> “)
UV	Ultraviolett
(v/v)	Volumen pro Volumen („ <i>volume per volume</i> “)
(w/v)	Gewicht pro Volumen („ <i>weight per volume</i> “)
wt	Wildtyp
X-Gal	5-Bromo-4-chlor-indolyl- β -D-galaktosid

Maßeinheiten werden nach dem Internationalen Einheitensystem (SI = *Système Internationale d'Unité*) verwendet.

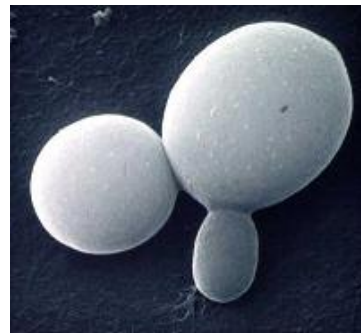
1 Einleitung

1.1 Allgemeine Einführung

Candida albicans ist ein opportunistischer Erreger, der für die meisten beim Menschen auftretenden Mykosen verantwortlich ist. Weitere wichtige Erreger der *Candida*-Gattung sind *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* und *Candida dubliniensis*. *C. tropicalis* scheint vor allem bei Patienten mit Leukämie Mykosen auszulösen (Kontoyiannis *et al.*, 2001). *C. glabrata* wird eine wichtige Stellung bei vaginalen Candidosen eingeräumt (Sobel, 1998). Diese haploide Hefe ist dazu fähig, schnell eine Resistenz gegen die Antimykotika-Klasse der Azole auszubilden (Warnock *et al.*, 1988), was die Behandlung dieser Pilzkrankungen erschwert. *C. parapsilosis* wird häufig als Erreger von Haut-Candidosen isoliert. Ein weiteres gravierendes Problem verursacht dieser Pilz durch Kolonisation von Kathetern (Dorko *et al.*, 1999). Über den Katheter kann *C. parapsilosis* direkt in die Blutbahn des Patienten gelangen und schwere Mykosen hervorrufen. *C. dubliniensis* wurde erst 1995 als eigenständige *Candida*-Art identifiziert (Sullivan *et al.*, 1995). Vorher wurde sie fälschlicherweise als *C. albicans* diagnostiziert. Erste Überprüfungen ergaben, dass ein Teil der Bestände an klinischen *C. albicans*-Isolaten in Wirklichkeit Isolate von *C. dubliniensis* sind. Diese *Candida*-Art verursacht vor allem Mykosen bei HIV-Infizierten und AIDS-Patienten (Sullivan *et al.*, 1995). Wie *C. glabrata* scheint diese Hefe eine schnelle Resistenzbildung gegenüber dem Antimykotikum Fluconazol zu besitzen (Moran *et al.*, 1998).

Die überwiegende Mehrheit der *Candida*-Infektionen beim Menschen wird jedoch durch *C. albicans* verursacht (Richardson & Warnock, 1997). Diese grampositive, kapsellose Hefe vermehrt sich durch Heranwachsen kleiner Tochterzellen (Sprosszellen) aus der Mutterzelle (Abb. 1).

Abb. 1: Eine knospende Hefezelle mit Tochterzelle(n), (http://botit.botany.wisc.edu/toms_fungi/jan99.html).



C. albicans ist diploid und besitzt acht Chromosomen-Paare mit insgesamt 32 Mbp. Die Chromosomen sind mit abnehmender Größe von 1 bis 7 durchnummeriert. Das größte Chromosom hat die Bezeichnung R, da es die ribosomale DNA beinhaltet. Hinzu kommen pro Zelle ca. 20 Kopien des mitochondrialen Genoms (1 Mbp). Das Genom des Pilzes ist mittlerweile vollständig sequenziert (<http://www-sequence.stanford.edu:8080/contigs-to-blast6.html>).

Es gibt erste Schätzungen, dass *C. albicans* ca. 8000 offene Leserahmen (ORFs) besitzt, die Proteine mit mindestens 100 Aminosäuren kodieren (Calderone, 2002). Wissenschaftler sind vor allem daran interessiert, herauszufinden, welche Gene und Genprodukte es dem Pilz ermöglichen, zum einen als Kommensal („Tischgenosse“) im Menschen zu persistieren, zum anderen als opportunistischer Pilz, Infektionen im Körper hervorzurufen. Es gibt Schätzungen, dass mindestens 50 % der Bevölkerung mit *C. albicans* besiedelt sind (Brandis & Otte, 1984). Vor allem Haut und Schleimhäute werden von ihm kolonisiert. *Candida*-Infektionen sind somit als endogene Infektionen zu betrachten. Dieses Pathogen scheint ein multipotenter Erreger zu sein, da es in der Lage ist, fast alle Bereiche im menschlichen Körper zu befallen. Es kann nicht nur Haut- und Schleimhautinfektionen (oberflächliche Mykosen) wie z.B. vaginale Candidosen auslösen, welche die häufigsten Pilzinfektionen bei Frauen im gebärfähigen Alter sind (Fidel, 1998), sondern auch invasive oder systemische Mykosen hervorrufen, die tödlich enden können (Wenzel, 1995). Während einer systemischen Candidose disseminiert der Pilz hämatogen und/oder lymphogen und befällt innere Organe. Über 80 % aller invasiven Pilzkrankungen beim Menschen werden durch *Candida*-Spezies verursacht (Rüchel, 1993). 90 % dieser Erkrankungen werden durch *C. albicans* hervorgerufen (Richardson & Warnock, 1997), was seine herausragende Rolle als Pathogen unterstreicht.

Erstaunlicherweise zeigt die humanpathogene Hefe *C. albicans* in vielen Merkmalen eine enge phylogenetische Verwandtschaft zu der Gattung *Saccharomyces*, die sich auf der Ebene der Nukleotidsequenz der 5S-rRNA (Chen *et al.*, 1984) und DNA bemerkbar macht. Gene von *C. albicans* können deshalb mit Hilfe einer Komplementation von auxotrophen *Saccharomyces cerevisiae*-Stämmen gefunden werden (Scherer & Magee, 1990). Ein Problem stellt jedoch der zum Teil unterschiedliche Codon-Gebrauch dar: *C. albicans* kodiert abweichend vom universalen Code „CUG“ als Serin und nicht als Leucin (Ohama *et al.*, 1993).

Im Gegensatz zu *S. cerevisiae* wird *C. albicans* den *Fungi imperfecti* zugeordnet. Neueste Forschungsergebnisse haben aber gezeigt, dass diese Zuteilung überarbeitet werden müsste, da indirekt ein sexueller Zyklus nachgewiesen werden konnte. *C. albicans* besitzt einen „mating-type Locus“ (MTL) (Hull & Johnson, 1999). Dieser Locus zeigt Homologien zum „mating-type Locus“ von *S. cerevisiae* (MAT). In *C. albicans* ist dieser Genort heterozygot, da ein MTL das a-1 homologe Gen besitzt und der andere Locus α 1- und α 2-ähnliche Gene aufweist. Aufgrund dieses Zustandes sollte keine Paarung möglich sein, da beide Genprodukte vorhanden sind. Durch das künstliche Ausschalten eines MTL konnte aber die Paarung ermöglicht werden (Hull *et al.*, 2000). Inwieweit dieser Zyklus klinisch relevant ist, bedarf näherer Klärung.

1.2 Prädisponierende Faktoren

Normalerweise liegt ein Äquilibrium zwischen Resistenz und Krankheit vor. Bei einer Änderung der Resistenz- und Immunitätslage des Wirtes kann es unter bestimmten Voraussetzungen zu einer Infektion kommen. In diesem Zustand kann sich das Pathogen von einem unbedenklichen zu einem gefährlichen parasitären Organismus entwickeln (Matthews, 1994). Damit der Pilz eine Krankheit auslösen kann, müssen bestimmte Bedingungen vorliegen, die sogenannten prädisponierenden Faktoren. Diese Faktoren können in vier Gruppen eingeteilt werden (Odds, 1988): natürliche, ernährungsspezifische, mechanische und iatrogene Faktoren. Zu den natürlichen Faktoren werden mikrobielle Infektionen, endokrine Fehlfunktionen, wie sie z.B. bei Diabetes mellitus vorliegen, Defekte der Lymphozyten oder Phagozyten, ein hohes Alter, Schwangerschaft und ein geringes Geburtsgewicht gezählt. Die Sterblichkeitsrate von Frühgeborenen mit Candidose liegt bei 25-50 % (Weese-Mayer *et al.*, 1987). Die bekannteste Infektion mit *Candida* ist der Soorbelag auf der Zunge und Mundschleimhaut bei Säuglingen (Abb. 2A).



Abb. 2A&B: Verschiedene Formen der Candidose.

(A) Säugling mit Soorbelag, verursacht durch *C. albicans*. Die Aufnahme wurde freundlicherweise von John H. Rex zur Verfügung gestellt, (<http://www.doctorfungus.org>) (B) Candidose der Speiseröhre, (http://gut1.peds.uiowa.edu/candida_esophagitis.htm).

Das klinische Bild des Mundsoors besteht in weißlichen Belägen vorwiegend auf der Zunge, an den Lippen sowie an anderen Stellen der Mund- und Rachenhöhle. In den letzten Jahren sind vor allem Erkrankungen mit Immunmangelsyndromen (AIDS und T-Zellen-Defekte) gestiegen, wodurch auch die Zahl der Candidosen drastisch zugenommen hat. Die Candidose der Mundhöhle oder der Speiseröhre (Abb. 2B) wird sogar als diagnostisches Mittel für eine AIDS-Erkrankung eingesetzt, da über 80 % der Patienten eine solche Candidose während ihrer Krankheit entwickeln. Eine Besiedlung der Speiseröhre und des gesamten Gastrointestinaltraktes wird durch die Säureresistenz der Hefen ermöglicht (Raith, 1994). Die ernährungsspezifischen Faktoren sind weitgehend unerforscht geblieben. Es wird angenommen, dass eine kohlenhydratreiche Ernährung oder ein Vitaminmangel die Proliferation von *C. albicans* unterstützen können (Odds, 1988).

Zu den mechanischen Faktoren gehören Traumata, Verbrennungen, Wunden und Zahnprothesen.

Mit dem medizinischen Fortschritt sind auch zugleich die Infektionen mit dem humanpathogenen Pilz *C. albicans* gestiegen, was auf die sogenannten iatrogenen Faktoren zurückzuführen ist. Sie verursachen eine kontinuierliche Zunahme von Pilzkrankungen. So unterliegen Patienten, die über einen Verweilkatheter ernährt werden, einem erhöhten Risiko, sich mit diesem Pilz zu infizieren (Edmond *et al.*, 1999). Ein Grund hierfür könnte der Einsatz von fettreichen Emulsionen für die parenterale Ernährung sein, da *C. albicans* in diesen Emulsionen wachsen kann (Lewis *et al.*, 2002). Erschwerend kommt hinzu, dass diese Lösungen und damit der Pilz über den Katheter direkt in das Blut des Patienten gelangen. Somit kann der Pilz die Schutzbarriere Haut direkt überwinden und sich über das Blut im ganzen Körper verteilen. Hinzu kommt, dass die Patienten häufig abwehrgeschwächt sind und daher an sich eine Risikogruppe darstellen. Aus diesem Grund werden sowohl Medikamente, welche die Immunabwehr beeinflussen, als auch eine Langzeitbehandlung mit Breitband-Antibiotika den iatrogenen Faktoren zugeordnet, da sie die candidahemmende Mikroflora zerstören. Ein weiteres Problem stellt die laterale Transmission der Erreger durch kontaminierte Hände von Ärzten und Krankenhauspersonal dar (Bauer *et al.*, 1990).

Diese prädisponierenden Faktoren ermöglichen es dem Pilz somit, die Lebensqualität beeinträchtigende und sogar lebensbedrohliche Infektionen auszulösen.

1.3 Virulenzfaktoren

Die Candidose ist ein Zusammenspiel zwischen verminderter Wirtsverteidigung und Pathogenität des Organismus, der die Krankheit verursacht. Der Ausprägungsgrad der Pathogenität eines Pilzes wird als Virulenz bezeichnet (Schäfer, 1994). Bei *C. albicans* ist die Virulenz multifaktoriell, d.h., dass dieser Pilz ein breites Reservoir an sogenannten Virulenzfaktoren besitzt, die ihm helfen, Infektionen auszulösen und dem Immunsystem zu widerstehen. Erst, wenn die beschriebenen prädisponierenden Faktoren vorliegen, kann der Pilz sein Repertoire an Virulenzfaktoren einsetzen, um eine Infektion zu verursachen. Die Analyse dieser Faktoren ist unumgänglich, um die Infektion zu verstehen und daraus neue Strategien zur Bekämpfung des Pathogens zu entwickeln. Im Gegensatz zu anderen mikrobiellen Erregern, die auf bestimmte Nischen im Wirt angewiesen sind, hat sich *C. albicans* an den Menschen hervorragend angepaßt. Er kann nahezu alle Gewebe befallen und wird vom Immunsystem offensichtlich nicht vollständig eliminiert.

Die Virulenzfaktoren ermöglichen dem opportunistischen Erreger das Überleben an Körperoberflächen und/oder das Vordringen zu tieferen Geweben und Organen. Dazu zählen Adhäsionsfaktoren, die morphologische Flexibilität und hydrolytische Enzyme (Odds, 1994). Die Adhäsion wird als erster Schritt einer Infektion angesehen. Die Oberfläche des Pilzes ist so beschaffen, dass er sich über hydrophobe Wechselwirkungen (Oberflächenhydrophobizität) und kovalente Bindungen, z.B. über Lektin-Kohlenhydrat-Interaktionen, an die Wirtszelle heften kann (Calderone & Braun, 1991; Odds, 1994).

Untersuchungen haben gezeigt, dass besonders hydrophobe *Candida*-Stämme, die bei 25 °C kultiviert wurden, virulenter waren, als solche, die bei 37 °C kultiviert wurden. Diese zeigten zudem eine geringere Hydrophobizität (Hazen & Hazen, 1987). Eine Reihe unterschiedlicher Adhäsionsfaktoren (Adhäsine) verhelfen *C. albicans* dazu, sich an Epithelzellen der oralen, gastrointestinalen oder vaginalen Schleimhaut zu heften, während andere Faktoren für die Adhäsion an das Endothelgewebe der Blutgefäße notwendig sind (Pendrak & Klotz, 1995; Sundstrom, 1999). Die Adhäsine vermitteln hierbei die Wirtserkennung und Kolonisation. Dazu zählen die „Agglutinine-like Sequences Genes“ (ALS)-Genfamilie, die Oberflächenglykoproteine kodiert (Hoyer, 2001), sowie das „Hyphal wall protein“ (Hwp1), welches über einen Glykosylphosphatidylinositol (GPI)-Anker an das β -Glukan-Gerüst der Zellwand gebunden ist. Der N-Terminus dieses Proteins fungiert dabei als Substrat der humanen Transglutaminase, einem quervernetzenden Enzym, welches im Epithel und Endothel vorkommt. Das Enzym vernetzt kleine prolinreiche Proteine, wie das Hwp1, mit humanen Proteinen und führt damit zu einer wirtsvermittelten Adhäsion (Staab *et al.*, 1999).

Die unterschiedlichen Gewebearten verlangen eine hohe Anpassung an die damit verbundenen, unterschiedlichen physiologischen Umgebungen. Ein Merkmal dieser Anpassung ist die morphologische Flexibilität von *C. albicans*. Der Pilz besitzt drei Wachstumsformen: Pseudomyzel, echtes Myzel sowie eine Hefeform und ist somit polymorph (Abb. 3). Außerdem kann *C. albicans* Chlamydosporen bilden, wobei deren klinische Relevanz bisher nicht geklärt ist.

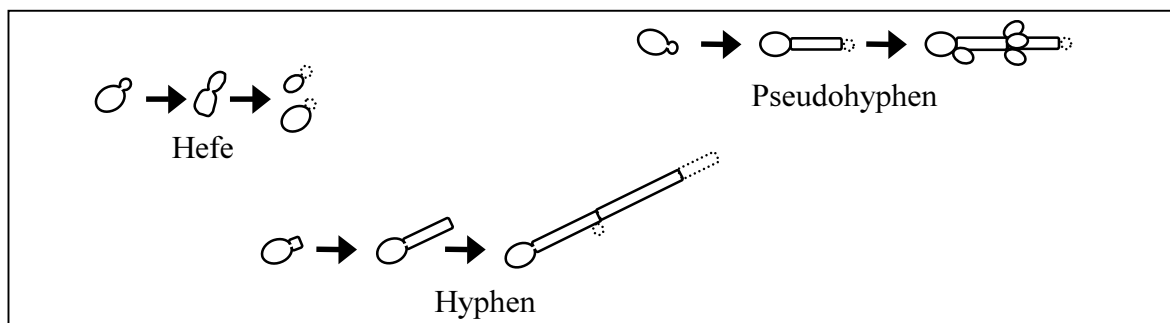


Abb. 3: Die verschiedenen morphologischen Formen (Hefe, Pseudomyzel und Myzel), die *C. albicans* einnehmen kann; modifiziert nach Odds, 1999.

Die septierten multizellulären Hyphen entstehen durch apikales Wachstum, wobei die Gesamtheit der Hyphen als Myzel bezeichnet wird. Pseudohyphen sind hingegen monozellulär und werden von unipolar sprossenden Zellen gebildet, die sich verlängern und an der mütterlichen Zelle haften bleiben. Der als Dimorphismus bezeichnete gezielte Übergang von der Hefe- zur Myzelform, wurde sehr genau erforscht (Brown & Gow, 1999). Der Wechsel wird durch verschiedene Signaltransduktionswege eingeleitet. Am Anfang der Signalkette stehen diverse Induktoren, wie z.B. eine Wachstumstemperatur, die über 35 °C liegt, ein pH-Wert, der größer als 6,5 ist, Stickstoff- und/oder Kohlenstoffmangel, eine niedrige Sauerstoffkonzentration, N-Acetylglucosamin, Prolin und Alkohole (Ernst, 2000). Serum gilt als stärkster Induktor (Feng *et al.*, 1999).

Am Ende der Signalkette stehen unterschiedliche Transkriptionsfaktoren, die jeder Zellmorphologie ein eigenes Genexpressionsprofil schaffen (Nantel *et al.*, 2002). Die Induktion wird vor allem über zwei Signaltransduktionswege vermittelt, einem mitogenaktivierten Proteinkinase (MAPK)-Weg und einem cAMP-vermittelten Weg. Am Ende des MAPK-Weges steht der Transkriptionsfaktor Cph1. Beim cAMP-Modul endet die Kette bei Efg1, einem Transkriptionsfaktor mit einem basischen Helix-Loop-Helix-Motiv. Er bindet an E-Boxen (5'-CANNTG-3'), die in Promotoren von hyphenspezifischen Genen, wie z.B. *HWPI*, *ALS3* und *ALS8*, vorkommen. Diese über cAMP und Proteinkinase A regulierte Kaskade scheint für die Ausbildung echter Hyphen in *C. albicans* von besonderer Bedeutung zu sein. Im Gegensatz zu *cph1*-Mutanten sind *efg1*-Mutanten nicht in der Lage, in serumhaltigen Medium Keimschläuche auszubilden. Zudem verhielten sich *cph1-efg1*-Doppelmutanten im Infektionsmodell avirulent (Lo *et al.*, 1997). Neben diesen Signalwegen scheinen mindestens noch drei weitere Kaskaden an der Hyphenbildung beteiligt zu sein (Gow *et al.*, 2002). Der Wechsel von der Hefe- zur Myzelform ermöglicht dem Pathogen nicht nur das Gewebe zu penetrieren, sondern auch der zellulären Immunabwehr des Wirtes zu widerstehen. Außerdem kann die Myzelform besser an Epithelzellen adhären (Odds, 1994). Wahrscheinlich erfüllen jedoch sowohl die Hefe- als auch die Myzelform bestimmte Aufgaben bei einer Infektion. Beim Übergang der Zellen von der Hefe- in die Hyphenform verändert sich nicht nur die Morphologie des Pilzes, sondern vermutlich auch die Ausprägung anderer Virulenzmerkmale, wie z.B. die Adhäsion oder die Sekretion hydrolytischer Enzyme. Aus diesem Grund sollten Virulenzdefekte von Mutanten, die phänotypisch in ihrer Hyphenbildung gestört sind, kritisch beurteilt werden (Brown & Gow, 1999).

Zusätzlich zum Morphologiewechsel besitzt *C. albicans* die Fähigkeit zum schnellen und reversiblen Wechsel des Phänotyps der Hefeform („phenotypic switching“). Dies ermöglicht dem Pilz, die Gestalt der Zellen spontan zu ändern (Soll, 1992). So kann z.B. der Stamm WO-1 in der Hefeform zwischen zwei Phänotypen wechseln, einer „white“- und einer „opaque“-Form (Slutsky *et al.*, 1987). Die „white“-Form bildet die bekannten runden Hefezellen (W-Zellen), wobei die „opaque“-Form eher stäbchenförmige Zellen ausbildet (O-Zellen). *C. albicans* ist dadurch offenbar in der Lage, sich an die momentane Umgebung anzupassen und besser auf das Immunsystem des Wirtes zu reagieren. Dieser Wechsel erfordert eine hohe genetische Flexibilität, die sich auch durch häufige Chromosomen-Translokationen auszeichnet (Slutsky *et al.*, 1987). Es zeigte sich, dass einige der pathogeneren Stämme den Phänotyp im Durchschnitt häufiger wechselten als weniger pathogene Stämme (Soll, 1992).

Diese Eigenschaften verdeutlichen die Flexibilität des komplexen Organismus, der auf veränderte Umgebungsreize mit einer veränderten Genexpression antwortet. *C. albicans* muß somit befähigt sein, spezifische Virulenzfaktoren, die für ganz bestimmte Infektionsschritte oder Infektionsformen nötig sind, gezielt einzusetzen.

Diese notwendige Adaptation an unterschiedliche Stadien einer Infektion könnte auch der Grund dafür sein, dass der Pilz für extrazelluläre hydrolytische Enzyme nicht nur einzelne Gene, sondern ganze Genfamilien besitzt (Stehr *et al.*, 2000). Sowohl sekretorische Aspartat-Proteasen (Saps), als auch sekretorische Lipasen (Lips) werden bei *C. albicans* von mindestens zehn verschiedenen Genen kodiert (Hube *et al.*, 2000; Hube & Naglik, 2001). Diese hohe Anzahl ähnlicher Gene ist möglicherweise dafür notwendig, dass bei jedem Infektionsschritt eine jeweils optimierte Gruppe von Hydrolasen sezerniert werden kann. Als weitere wichtige hydrolytische Enzyme sind die Phospholipasen zu nennen (Ibrahim *et al.*, 1995; McLain & Dolan, 1997; Sugiyama *et al.*, 1999). Bei *C. albicans* wurden extrazelluläre Phospholipase A-, B-, C- und D-Aktivitäten nachgewiesen, zum Teil konnten schon die entsprechenden Gene identifiziert und charakterisiert werden. Phospholipasen sind normalerweise bei der Umsetzung von Nährstoffen oder bei der Signaltransduktion beteiligt. Die phosphoinositol-spezifische Phospholipase C spielt u.a. eine wichtige Rolle beim Hefe-Myzel-Übergang (Ibrahim *et al.*, 1995; Bennett *et al.*, 1998). Diese Enzyme können aber auch direkt die Wirtszellmembran schädigen.

Sehr gut untersuchte Virulenzfaktoren sind die sekretierten Aspartat-Proteasen von *C. albicans* (Hube & Naglik, 2001). Die kodierenden Sequenzen der *SAP*-Gene haben eine Länge von 1173 bp (*SAP1*) bis 1764 bp (*SAP7*). Innerhalb der *SAP*-Genfamilie sind drei Gruppen mit sehr ähnlichen Genen (*SAP1-3*, *SAP4-6* und *SAP9-10*) zu unterscheiden, während die Gene *SAP7* und *SAP8* geringere Ähnlichkeiten mit anderen Mitgliedern der Genfamilie aufweisen. Alle Sap-Proteine haben jedoch gemeinsame Strukturmerkmale. Sie besitzen ein N-terminales Signalpeptid, haben darüber hinaus ein Propeptid mit Lys-Arg-Schnittstellen für die Prozessierung durch Kex2-Proteasen und weisen im reifen Protein konservierte Cysteinreste auf. Dies könnte auf eine konservierte dreidimensionale Struktur deuten. Bei den erst kürzlich identifizierten Genen *SAP9* und *SAP10* fällt als Besonderheit auf, dass die abgeleiteten Proteine ungefähr 50 Aminosäuren länger sind als die anderen Saps (Monod *et al.*, 1998; Felk, 2002). Diese Verlängerungen bestehen aus einer C-terminalen hydrophoben sowie serin- und threoninreichen Region, wie sie bei GPI-verankerten Proteinen typisch sind. Auch andere Kriterien deuten auf eine solche Verankerung hin, weswegen angenommen wird, dass Sap9 und Sap10 mit der Zelloberfläche assoziiert sind. Innerhalb dieser Genfamilie herrscht eine hohe Komplexität. Einzelne Mitglieder der *SAP*-Genfamilie werden differentiell reguliert und zu verschiedenen Infektionsstadien und in unterschiedlichen klinischen Formen der Candidose *in vivo* exprimiert (Naglik *et al.*, 1999). Diese Gene kodieren für hydrolytische Enzyme, welche an der Adhäsion an Epithelzellen, bei der Invasion des Pilzes in tiefere Gewebe und bei der Zerstörung von Immunglobulinen sowie anderen Abwehrproteinen beteiligt sein könnten (Hube, 1996). Bestimmte Protease-Gene ermöglichen es *C. albicans* auch, nach einer Phagozytose durch Makrophagen vereinzelt zu überleben (Borg-von Zepelin *et al.*, 1998). Hydrolytische Enzyme zerstören wahrscheinlich durch ihre Katalyse Wirtsgewebe und bieten so dem Pilz die Gelegenheit, in tiefere Gewebe zu penetrieren.

Außerdem könnten sie Modifikationen auf der Oberfläche des Pilzes verursachen und somit zum Nichterkennen durch das Immunsystem beitragen. Des Weiteren erschließen die hydrolytischen Enzyme *C. albicans* möglicherweise Nährstoffquellen durch den Abbau von Makromolekülen des Wirtes (Salyers & Whitt, 1994).

Die Rolle der sekretierten Lipasen von *C. albicans* ist bisher weitgehend ungeklärt. Obwohl es sich hierbei ebenfalls um eine Genfamilie handelt, wurden diese Lipasen bislang wenig erforscht.

1.4 Analyse der Virulenzfaktoren von *C. albicans* mittels der *URA*-Blaster-Methode

Als mögliche Angriffspunkte für eine Therapie gegen Candidosen werden die Virulenzfaktoren diskutiert. Um sie zu analysieren, wurden verschiedene Strategien zur Genaus- schaltung entwickelt. Die Gendisruption und Herstellung permanenter *C. albicans*- Mutanten soll die Rolle des jeweiligen Genproduktes während einer Infektion aufklären. Die gängigste Methode zur Genzerstörung ist die *URA*-Blaster-Methode.

Eine gezielte Gendisruption in *C. albicans* wird dadurch erschwert, dass Selektionsmarker wegen des bisher angenommenen asexuellen Lebenszyklus von *C. albicans* nicht durch eine Rückkreuzung aus dem Gen eliminiert und zum Ausschalten eines weiteren Gens angewendet werden können. Die Grundlage für die gezielte Genaus- schaltung wurde durch Fonzi & Irwin geschaffen (1993). Sie generierten den auxotrophen *ura3⁻*-Stamm CAI-4 von *C. albicans*. Als Ausgangswildtyp-Stamm diente das klinische Isolat SC5314 (Gillum *et al.*, 1984). Durch das Ausschalten des *URA3*-Gens wurde ein Defekt im letzten Schritt der *de novo* Pyrimidin-Biosynthese verursacht und die Mutanten können nur bei der Anwesenheit von Uridin im Medium existieren. *URA3* kodiert für die Orotidin-5'- Monophosphat (OMP)-Decarboxylase, welche die Umsetzung von OMP in Uridin-5'- Monophosphat katalysiert.

Der Stamm CAI-4 bildete den Ausgangspunkt für viele *Candida*-Mutanten, die mit der *URA*-Blaster-Methode hergestellt wurden. Dieser Blaster setzt sich aus dem *URA3*-Gen und zwei flankierenden, direkten Wiederholungen vom *hisG*-Gen des Enterobakteriums *Salmonella typhimurium* zusammen. Die Methode beruht auf einer mehrfachen Ver- wendung des Marker-Gens *URA3* in dem *ura3⁻*-auxotrophen Rezeptorstamm CAI-4. Durch Rekombination der homologen candidafremden *hisG*-Sequenzen kann nach erfolgreicher Transformation und Integration der Disruptionskassette in ein Allel des gewünschten Genortes der *ura3⁻*-auxotrophe Zustand wiederhergestellt werden (Abb. 4).

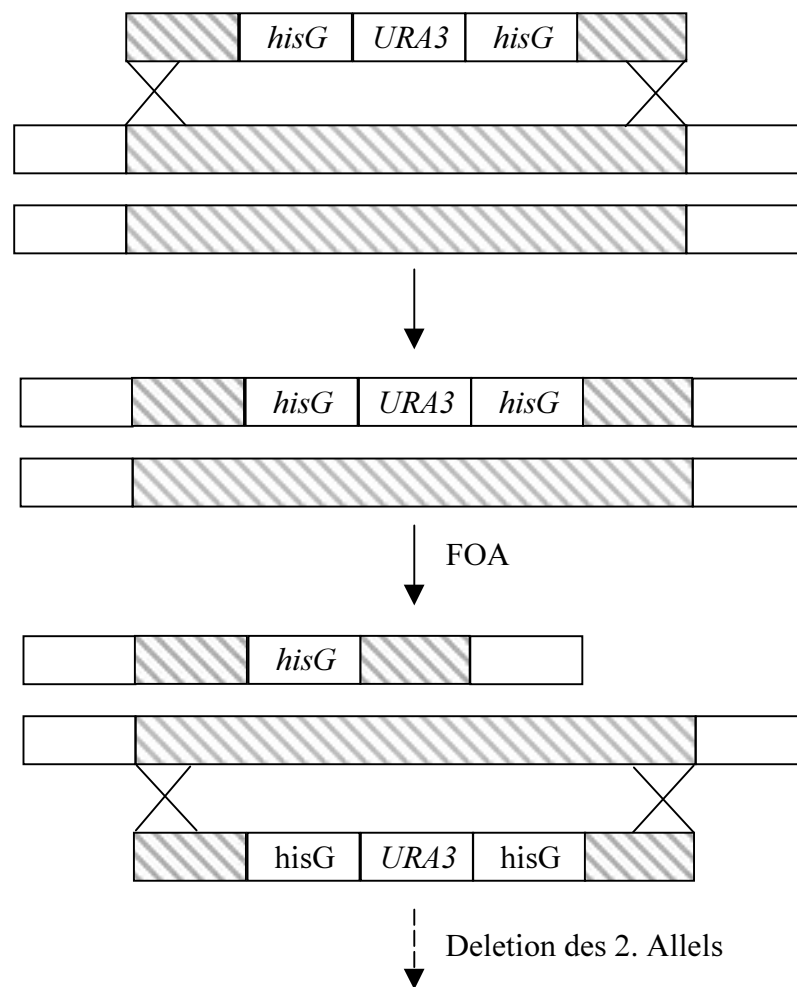


Abb. 4: Genzerstörung bei *C. albicans* mittels *URA*-Blaster-Methode.

Die Disruptionskassette besteht aus dem *URA3*-Gen, flankiert von zwei *hisG*-Sequenzen aus *S. typhimurium*. Um die homologe Rekombination der Kassette in den Ziellocus zu gewährleisten, werden stromaufwärts und stromabwärts der Kassette homologe Sequenzabschnitte des Zielgens kloniert. Nach erfolgreicher Transformation wird der Selektionsmarker durch eine 5-Fluoroorotat (FOA)-Behandlung zurückgewonnen. Ein Teil des Zielgens wird durch die Insertion der Disruptionskassette deletiert. Modifiziert nach Fonzi & Irwin (1993).

Hierfür wird ein Medium mit 5-Fluoroorotat (FOA)-Zusatz eingesetzt. Das FOA stellt ein toxisches Substrathomolog zum Uridin dar. Es wird somit nach Klonen selektiert, welche durch eine cis-Rekombination zwischen den beiden *hisG*-Sequenzen das *URA3*-Gen und eine Kopie der *hisG*-Sequenzen deletiert haben (Boeke *et al.*, 1984). Danach können das zweite Allel und nach erneuter Rekombination weitere Gene ausgeschaltet werden.

1.5 Die Enzymgruppe der Lipasen (EC 3.1.1.3)

1.5.1 Lipasen

Lipasen sind Triacylglycerolester-Hydrolasen, die neben anderen lipolytischen Enzymen an der Umsetzung von Lipiden beteiligt sind. Sie katalysieren die Hydrolyse von Triacylglycerolen (TAG) zu Di- und Monoacylglycerolen, Glycerol und freien Fettsäuren (FFS) (Brockerhoff & Jensen, 1974), wobei sie auch die Rückreaktion, also die Synthese von Esterbindungen, katalysieren können (Abb. 5).

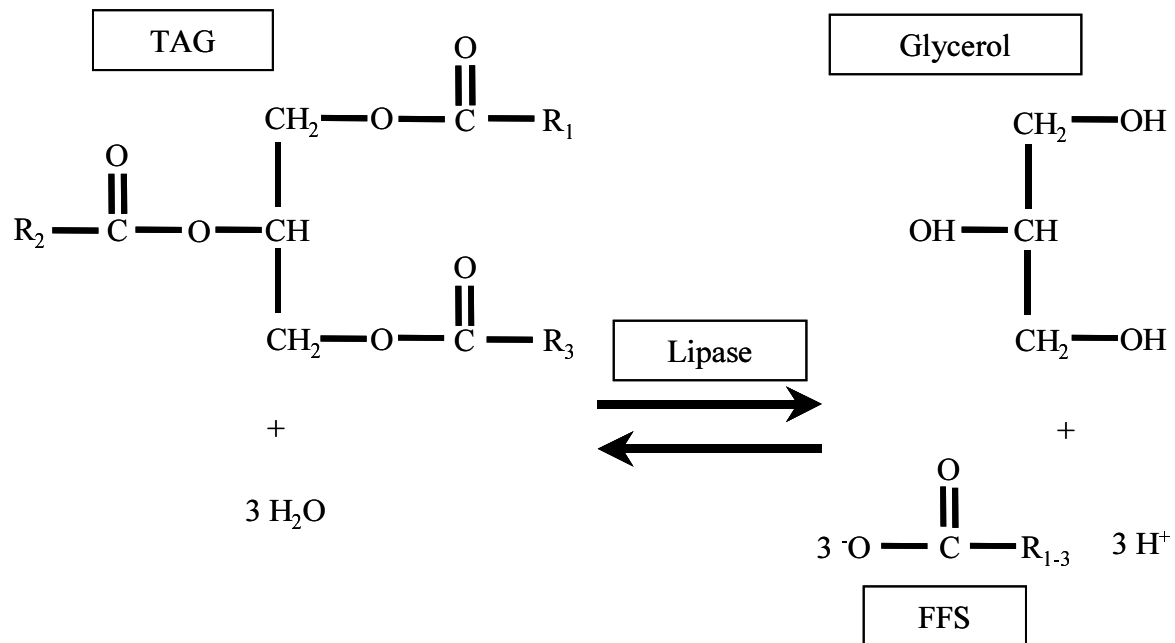


Abb. 5: Triacylglycerol (TAG)-Hydrolyse bzw. -Synthese katalysiert durch eine Lipase. Die Endprodukte der Hydrolyse sind freie Fettsäuren (FFS) und Glycerol.

Des Weiteren können Lipasen auch Esterbindungen synthetischer Substrate spalten, wie z.B. die sekundärer Alkohole, zum anderen katalysieren sie aber auch deren Veresterungs- und Umesterungsreaktionen.

Lipasen werden von Mikroorganismen, Pflanzen und Tieren produziert (Commenil *et al.*, 1995). Bei Bakterien wurde die Lipasebildung bereits am Anfang des Jahrhunderts durch Eijkman (1901) beschrieben. Die Adipocyten der Säugetiere und die keimenden Samen von Pflanzen enthalten Lipasen, die gespeicherte Triacylglycerole abbauen, wobei Fettsäuren für die Ausfuhr in andere Gewebe freigesetzt werden (Lehninger *et al.*, 1998). Bei der Verdauung von zuvor emulgierten Nahrungsfetten spielen Lipasen aus dem Pankreassekret eine wichtige Rolle. Sie bewirken an der Wasser-Lipid-Grenzfläche der Mizellen den Beginn der Hydrolyse und ermöglichen somit die Absorption der Nahrungsfette im Darm (Koolman & Röhm, 1994).

Zur Klassifizierung eines hydrolytischen Enzyms als Lipase wurde lange Zeit die Erfüllung zweier Kriterien vorausgesetzt: die Grenzflächenaktivierung (Sarda & Desnuelle, 1958) und das Vorhandensein eines „Deckels“ (Derewenda *et al.*, 1992).

Sobald Substrate der Lipasen monomere Schichten, Mizellen oder Emulsionen, d.h. Grenzflächen ausbilden, steigt die Aktivität einer Lipase stark an. Dieses Phänomen wird auch als Grenzflächenaktivierung bezeichnet. Die Aktivität von Lipasen ist unabhängig von der Substratkonzentration und ist daher nicht nach dem Michaelis-Menten-Modell beschreibbar. Dafür konnte eine Steigerung der Reaktionsgeschwindigkeit von Lipasen aufgrund der Beschaffenheit der Grenzfläche, welche von der Spannung und Viskosität abhängt, festgestellt werden. Die Reaktionsgeschwindigkeit ist nur von der Ausdehnung der Grenzfläche abhängig. Außerhalb der Grenzfläche nimmt die Aktivität sehr schnell ab. Dieses Phänomen wurde von Sarda & Desnuelle (1958) für eine pankreatische Lipase beschrieben. Außerdem wurde dieses Kriterium früher zur Unterscheidung von Esterasen und Lipasen herangezogen, mußte aber später relativiert werden, da Lipasen ohne Grenzflächenaktivierung entdeckt wurden. Hierzu zählen Lipasen von *Pseudomonas aeruginosa* (Jäger *et al.*, 1994), *Bacillus subtilis* (Lesuisse *et al.*, 1993) und des Pankreas vom Meerschweinchen (Hjorth *et al.*, 1993).

Der Zugang zum aktiven Zentrum der Lipasen wird durch ein als „Deckel“ bezeichnetes α -helikales Segment - bestehend aus ein bis zwei α -Helices - abgeschirmt, welches sich an der Proteinoberfläche befindet. Falls es zu einer Aktivierung an der Grenzfläche kommt, wird dieser „Deckel“ durch eine Konformationsänderung des Enzyms geöffnet (van Tilbeurgh *et al.*, 1993), wodurch das aktive Zentrum für das Substrat frei zugänglich wird. Durch diese Konformationsänderung erscheinen hydrophobe Aminosäuren an der Enzymoberfläche, welche mit dem Substrat interagieren. Zusätzlich wird die sogenannte Oxianionen-Bindungstasche geschaffen bzw. richtig positioniert (van Tilbeurgh *et al.*, 1993), welche das während der Hydrolyse entstehende tetraedrische Intermediat über Wasserstoffbrücken stabilisiert (Derewenda, 1994). Normalerweise erfolgt die molekulare Erkennung eines Substrats durch ein Enzym über spezifische Wasserstoffbrücken zu polaren Gruppen. Diese polaren Gruppen fehlen jedoch bei Fettsäuren, weshalb die Interaktion zwischen Substrat und Lipasen vor allem auf unspezifischen hydrophoben Wechselwirkungen beruht (Derewenda, 1994).

Es ist daher nicht überraschend, dass einige Lipasen, wie die menschliche hepatische Lipase und die pankreatische Lipase des Meerschweinchens, ein erweitertes Substratspektrum zeigen (Derewenda & Sharp, 1993; Anthonson *et al.*, 1995). Sie können neben Neutralfetten auch Phospholipide und andere organische Komponenten, die Esterbindungen besitzen, hydrolysieren. Für die Lipase des Pilzes *Rhizopus arrhizus* wurde nachgewiesen, dass sogar Digalaktosyldiglycerole, Sulpholipide und an Hexosen gebundene Acylgruppen hydrolysiert werden (Fischer *et al.*, 1973). Des Weiteren wurde auch eine Lipase entdeckt, die einen „Deckel“ aufweist und dennoch keine Interphasenaktivierung zeigt (Thirstrup *et al.*, 1994). Eine direkte Schlußfolgerung von einem „Deckel“ auf eine Grenzflächenaktivierung ist daher nicht zulässig.

Lipasen werden heute übergeordnet als Carboxylesterasen bezeichnet, welche die Hydrolyse langkettiger Acylglycerolester mit einer Kettenlänge von mindestens 10 Kohlenstoffatomen katalysieren (Derewenda & Sharp, 1993). Lipolytische Enzyme, die kürzere Acylglycerolester spalten, werden als Esterasen bezeichnet. Es liegt aber keine Allgemeingültigkeit vor, da die meisten Lipasen auch die kurzkettigen Substrate der Esterasen hydrolysieren können (Jäger *et al.*, 1999).

Ein wichtiges Strukturmerkmal der Lipasen ist die sogenannte „katalytische Triade“, die von den Aminosäuren Serin, Histidin und Aspartat oder Glutamat gebildet wird. Sie wurde bei allen Serin-Hydrolasen nachgewiesen (Kok *et al.*, 1995). Das nukleophile Serin befindet sich in dem hochkonservierten Motiv Gly-X₁-Ser-X₂-Gly (GX SXG), das allen Lipasen gemeinsam ist. Das Motiv ist ein Teil der Lipid-Bindungsregion. Eine Ausnahme bilden die Lipasen aus *Bacillus*-Arten (Dartois *et al.*, 1992). Ebenso weicht die Lipase/Acyltransferase aus *Aeromonas hydrophila* (Robertson *et al.*, 1994) von dieser Konsensussequenz leicht ab. Das nukleophile Serin liegt hier in dem Motiv GX SXS vor, welches z.B. auch die Thioesterase von *E. coli* besitzt (Upton & Buckley, 1995).

Im Jahr 1990 wurden von der humanen Pankreas-Lipase und der Lipase des Pilzes *Rhizomucor miehei* (Winkler *et al.*, 1990) die ersten dreidimensionalen Lipase-Strukturen bestimmt. Seitdem wurden zahlreiche weitere Strukturen aufgelöst, u.a. auch die Struktur von der Lipase des Erregers *Pseudomonas aeruginosa* (Abb. 6).



Abb. 6: Dreidimensionale Struktur der Lipase von *P. aeruginosa* (Nardini *et al.*, 2000), (<http://biotech.unf.dk/labdag1.php>).

Alle Lipasen weisen die typische α/β -Faltung mit einem zentralen β -Faltblatt auf, das von maximal acht Strängen, welche mit maximal sechs α -Helices untereinander verbunden sind, gebildet wird. Am C-terminalen Ende von $\beta 5$ liegt die konservierte GX SXG-Sequenz, welche das charakteristische „ β -Turn- α -Motiv“, den sogenannten „nukleophilen Ellbogen“, bildet. Die abgewinkelte Struktur mit der nukleophilen Aminosäure im Zentrum führt zu einer optimalen Ausrichtung des Nukleophils, welches somit sowohl für das katalytische Histidin als auch für das Substrat frei zugänglich ist. Zudem wird der intermediär gebildete tetrahedrale Zustand, ein ionisches Intermediat der Hydrolyse, optimal durch Aminosäuren der Oxianionen-Bindungstasche stabilisiert.

Die meisten gereinigten Lipasen sind saure Proteine mit einem Molekulargewicht zwischen 20 und 60 kDa. Sie sind häufig sehr temperatur- und detergentstabil, sowie resistent gegenüber Proteasen. Durch die erwähnten Eigenschaften der Lipasen bietet diese Enzymklasse eine Vielzahl industrieller Anwendungsmöglichkeiten (Corzo & Revah, 1999). Sehr genau untersucht wurden die Lipasen von *Rhizopus delemar* (Haas *et al.*, 1992), *Aspergillus oryzae* (Toida *et al.*, 1995), *Aspergillus niger* (Iwai & Tsujisaka, 1984), *Galactomyces geotrichum* (Schrag *et al.*, 1991), sowie von *Mucor*-Arten (Brady *et al.*, 1990) und mehreren nicht-pathogenen *Candida*-Arten (Anthonson *et al.*, 1995). Die Kombination aus häufig geringer Substratspezifität, hoher Stereo- und Regioselektivität - auch gegenüber synthetischen Substraten - sowie hoher Enzymstabilität in organischen Lösungsmitteln, machen Lipasen zu einem äußerst nützlichen Werkzeug in der organischen Synthese (Jäger & Reetz, 1998). Die lipasekatalysierten Biotransformationen finden heute deshalb sowohl in der Herstellung optisch reiner Wirkstoffe und synthetischer Intermediate als auch im Gebiet der Schutzgruppenchemie und der Modifikation natürlicher Lipide Anwendung.

1.5.2 Lipasen als Virulenzfaktor

Bei Vertebraten besitzen Lipasen Aufgaben in der Verdauung, der Absorption von Nährstoffen, dem Fett-Metabolismus und dem Lipoprotein-Stoffwechsel (Derewanda, 1994). Lipasen scheinen außerdem über ein hohes Virulenzpotential zu verfügen. So können z.B. bei der Pankreatitis des Menschen freigesetzte wirtseigene Lipasen erhebliche Gewebeschäden verursachen (Lang, 1987). Die Fehlfunktion von lipolytischen Enzymen im Menschen wird auch mit Atherosklerose in Verbindung gebracht (Derewanda & Sharp, 1993). Es gibt immer mehr Hinweise, dass extrazelluläre mikrobielle Lipasen neben den industriellen Anwendungen auch wichtige Virulenzfaktoren darstellen, wobei der Forschungsschwerpunkt bisher vor allem bei humanpathogenen Bakterien lag (Jäger *et al.*, 1994). Im Gegensatz dazu wurden Lipasen von pathogenen Pilzen als potentielle Virulenzfaktoren bisher nur wenig erforscht.

1.5.2.1 Bakterien

Die menschliche Haut ist die natürliche Umgebung vieler verschiedener Bakterien und Pilze. Unter diesen Mikroorganismen kommen einige opportunistische Pathogene vor, die Krankheiten auslösen, wenn die natürliche Verteidigung bzw. das Immunsystem des Wirtes geschwächt ist. Einer dieser Mikroorganismen ist *Staphylococcus epidermidis*, welcher als menschlicher Haut-Kommensal beschrieben ist (Noble, 1978). Dieses Bakterium ist dazu fähig, sich in einen opportunistischen Erreger zu verwandeln, sobald bestimmte prädisponierende Faktoren vorliegen, wie z.B. der Einsatz von Venenkathetern (Sitges-Serra *et al.*, 1980). Während der Infektion spielen wahrscheinlich zwei sekretierte Lipasen eine wichtige Rolle, indem sie die Kolonisation und das Wachstum durch die Spaltung von Talg-Triacylglycerolen fördern (Longshaw *et al.*, 2000).

Klinische Isolate von *Staphylococcus aureus*, welche aus tiefen Infektionsherden isoliert wurden, zeigten eine höhere Lipase-Aktivität als Isolate von oberflächlichen Lokalisationen (Rollof *et al.*, 1987). Dies deutet darauf hin, dass die lipolytische Aktivität wahrscheinlich wichtig für die Nährstoffbeschaffung und/oder die Ausbreitung der Bakterien ist. Darüber hinaus können Lipasen auch eine direkte Rolle in der Virulenz spielen. Es wurde postuliert, dass lipolytische Enzyme einen Einfluß auf die Pathogenese von Hautinfektionen mit *Staphylococce*n ausüben. *In vitro* Versuche haben gezeigt, dass die aufgereinigte Lipase von *S. aureus* die Funktionen von verschiedenen humanen Immunzellen, wie z.B. die Chemotaxis von Neutrophilen (Tyski *et al.*, 1987) und Granulozyten (Rollof *et al.*, 1988), beeinflusst. Zusätzlich zeigten diese mit Lipase behandelten Granulozyten eine verringerte Phagozytose von Bakterien. Ein möglicher Grund dafür könnte sein, dass das mikrobielle Enzym Oberflächenstrukturen der Immunzellen angegriffen hat. Ein deutlicher Hinweis, dass sekretierte Lipasen an der Pathogenese beteiligt sind, ist der Nachweis von Anti-Lipase Immunglobulin G (IgG)-Antikörpern in Seren von Patienten, die an *S. aureus*-Infektionen litten (Ryding *et al.*, 1992).

Neben *Staphylococcus* besitzen auch andere bakterielle Spezies Lipasen in ihrem pathogenen Repertoire. Ein weiterer Hautbewohner ist das *Propionibacterium acnes*, welches die Acne vulgaris verursacht. Dieses Bakterium produziert eine Reihe an extrazellulären Enzymen, einschließlich einer Lipase, welche an der mikrobiellen Kolonisation der menschlichen Haut beteiligt sein könnte. Durch die Lipolyse werden Fettsäuren freigesetzt, welche die bakterielle Adhäsion und somit die Kolonisation des Haarfollikels, der natürlichen Umgebung von *P. acnes*, unterstützen (Miskin *et al.*, 1997). In schwerwiegenderen Fällen bakterieller Infektionen können bestimmte Bakterien invasive und sogar systemische Infektionen hervorrufen. *Pseudomonas aeruginosa* ist dazu in der Lage, immungeschwächte Patienten zu befallen. Dieses Pathogen besitzt ein komplexes lipolytisches System mit mindestens zwei Phospholipasen C (Plc), einer Esterase, die an die äußere Membran gebunden ist, und einer sekretierten Lipase (Wilhelm *et al.*, 1999). Für die Lipase von *P. aeruginosa* konnte *in vitro* ein besonderes Phänomen gezeigt werden: Im Zusammenspiel mit der bakteriellen Plc inhibierte sie die Chemotaxis von Monozyten.

Weiterhin wurde dargestellt, dass diese Kombination zur Freisetzung immunreaktiver Substanzen, der 12-Hydroxyeicosatetraensäure (12-HETE) aus Thrombozyten sowie des Leukotrien B₄ (LTB₄) aus Neutrophilen, führte (Jäger *et al.*, 1992). Diese Reaktionen könnten möglicherweise eine hyperaktive oder eine supprimierte Immunantwort im Wirt hervorrufen und dadurch verschiedenen Geweben schaden und Entzündungsprozesse fördern.

Ebenfalls gezeigt wurde, dass beide Enzyme einen synergistischen Effekt auf die Spaltung von Dipalmitoylphosphatidylcholin haben, dem Hauptoberflächenlipid der Lunge (Jäger & Wohlfarth, 1993). Es liegt eine Korrelation zwischen einer *P. aeruginosa*-Besiedlung von Patienten mit zystischer Fibrose und einer verstärkten Zerstörung der Lunge vor.

Da Patienten mit zystischer Fibrose IgG-Antikörper gegen die Lipase und die Plc besitzen, sind während der Infektion wahrscheinlich beide Enzyme zugegen.

1.5.2.2 Pilze

Es sind mehr als 300 Pilzspezies bekannt, die Lipasen produzieren. Bei pflanzenpathogenen Pilzen besteht häufig ein „genetischer Überfluß“ an degradativen Enzymen. Vor allem lipolytische Enzyme werden hier als potentielle Virulenzfaktoren diskutiert (Schäfer, 1994). Speziell die Cutinasen sind vermutlich am hydrolytischen Abbau des ersten Schutzwalles der Pflanze, der wachshaltigen Cuticula, beteiligt (Köller, 1991). Diese Enzyme nehmen eine Stellung zwischen Lipasen und Esterasen ein (Martinez *et al.*, 1992). Einerseits sind sie in der Lage, die unlösliche Cutinschicht der Cuticula anzugreifen, andererseits werden sie nicht an Grenzflächen aktiviert und besitzen keinen „Deckel“ (Zandonella *et al.*, 1995). Interessanterweise besitzen sowohl Lipasen als auch Cutinasen die oben erwähnte katalytische Triade und gehören beide der Familie der Serinhydrolasen an. Aus diesem Grund könnte die verwandte Enzymklasse der Lipasen auch beim Abbau der Cuticula eine Rolle spielen.

Extrazelluläre Lipasen werden bei Pilzinfektionen des Menschen ebenfalls als Virulenzfaktoren diskutiert. Die *Malassezia*-Arten werden sowohl als opportunistische Erreger angesehen als auch zur kommensalen Mikroflora des Menschen gezählt. Bisher wurden sieben verschiedene *Malassezia*-Arten entdeckt (Gupta *et al.*, 2000), welche vor allem in den Talgdrüsen der menschlichen Haut vorkommen. Prädisponierende Faktoren wie Kortikosteroid-Behandlung und Immunschwächen können den Wechsel vom Kommensal zum Pathogen induzieren. Dies führt häufig zu Hauterkrankungen, wie z.B. Tinea versicolor und seborrhoischer Dermatitis, und manchmal sogar zu einer systemischen Infektion (Kwon-Chung & Bennett, 1992). Sechs der sieben *Malassezia*-Arten sind lipophil und brauchen exogene Lipide zum Wachstum, wobei sie langkettige Fettsäuren (FS) bevorzugen. Sekretierte Lipasen sind somit für diese Pilze notwendig zum Überleben, denn nur so können sie Kohlenstoff (C)-Quellen in Form von Neutralfetten oder Fettsäuren nutzen (Catteral *et al.*, 1978). Das pH-Optimum der lipolytischen Aktivität von *Malassezia furfur* liegt im sauren Bereich, ähnlich dem pH-Bereich der Haut (Ran *et al.*, 1993). Neben der Nährstoffbeschaffung scheinen extrazelluläre Lipasen auch die Adhäsion zu fördern. Für die Hefe *Hortea werneckii*, welche morphologisch und pathophysiologisch dem Pilz *M. furfur* nahesteht, wurde gezeigt, dass deren Zelloberfläche sehr hydrophob ist und somit dem Pilz ermöglicht, an die Haut des Wirtes zu adhären. Zelloberflächenhydrophobizität und lipolytische Aktivität sind anscheinend essentiell für die Pathogenese von Tinea nigra, einer auf die Epidermis beschränkte Dermatomykose (Göttlich *et al.*, 1995).

1.5.3 Lipase-Inhibitoren

Zum jetzigen Zeitpunkt gibt es nur wenige wirkungsvolle Medikamente ohne starke Nebenwirkungen gegen invasive oder systemische *C. albicans*-Infektionen. Durch die Zunahme der Risikopatienten wird die Situation weiter verschärft.

Darüber hinaus nimmt die Zahl resistenter Pilze, wegen der häufigen und prophylaktischen Anwendung der wenigen Medikamente, stark zu. Die bisher gegen *Candida*-Infektionen eingesetzten Medikamente basieren auf der Hemmung der Ergosterolsynthese (Azole), der Komplexierung des Ergosterols (Amphotericin B[®]) und der Inhibition der DNA-/RNA-Synthese (Flucytosin). Viele dieser Medikamente sind auch für die Wirtszellen toxisch und haben daher oft starke Nebenwirkungen. Darum ist es wichtig, neue pilzspezifische Angriffspunkte zu finden. Einige Veröffentlichungen beschreiben, dass der Einsatz von Lipase-Inhibitoren bei der Medikamentation bakterieller Infektionen aussichtsreich sein könnte. Für Pilzinfektionen wurden jedoch noch keine Daten veröffentlicht.

So können z.B. die Makrolid-Antibiotika Roxithromycin, Erythromycin und Tetrazyklin die Lipase-Produktion und die extrazelluläre Lipase-Aktivität von *Propionibacterium acnes* hemmen (Webster *et al.*, 1981; Lee *et al.*, 1982; Akamatsu *et al.*, 2002). Dieses humanpathogene Bakterium kann durch die Produktion freier Fettsäuren (FFS) Entzündungsreaktionen auf der Haut verursachen. Tetrazyklin kann weiterhin die Lipasen von *Staphylococcus aureus* (Mates, 1973) und *Candida rugosa* (Grippa *et al.*, 1999) inhibieren. Außerdem kann die Lipase von *C. rugosa* auch durch die Alkaloide Berberin sowie Sanguinarin gehemmt werden (Grippa *et al.*, 1999). Der Reaktionsmechanismus der Makrolid-Antibiotika und der Alkaloide ist bis zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht geklärt.

Im Allgemeinen besteht ein Lipase-Inhibitor aus zwei Komponenten: einer chemisch reaktiven Einheit, die mit dem katalytischen Zentrum des Enzyms reagiert, und einer Einheit, die für spezifische Interaktionen und die richtige Orientierung in der Enzymbindungstasche zuständig ist.

Unter den Lipase-Inhibitoren, welche direkt gegen das aktive Zentrum gerichtet sind, ist die Gruppe der Inhibitoren mit einem β -Lacton im Molekülgerüst von großer Bedeutung. Beispiele hierfür sind Tetrahydrolipstatin (Orlistat[®]), Esterastin (Umezawa *et al.*, 1978) und Valilacton (Kitahara *et al.*, 1987). Orlistat[®] ist durch seinen Einsatz zur Fettreduktion von übergewichtigen Menschen bekannt geworden (Ballinger & Peikin, 2002). Es ist ein Derivat des Lipstatins, welches aus *Streptomyces toxytricini* isoliert wurde. Dieser Lipase-Inhibitor ist dazu in der Lage, die humane Lipoprotein-Lipase (Lookene *et al.*, 1994), die pankreatische Lipase (Hadvary *et al.*, 1988), die Lipase des Magens und die gallensalz-stimulierte Lipase (Borgström, 1988) zu hemmen.

Der Inhibitor selbst dient als Pseudosubstrat für die Lipasen und ermöglicht die Ausbildung eines Enzym-Inhibitor-Komplexes. Das über eine Esterbindung an das aktive Serin gebundene Orlistat[®] wird langsam von der Lipase abgebaut (Lüthi-Peng *et al.*, 1992).

Ein anderer Inhibitor, das Hexadecansulfonylfluorid, hat gegenüber Orlistat[®] den Vorteil, durch die Lipasen nicht verbraucht zu werden und hat daher die Möglichkeit, die Enzyme irreversibel zu hemmen (Skottova *et al.*, 1995). Die kurzkettige Variante des Hexadecansulfonylfluorid, das Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), inhibiert sowohl Lipasen (Somma-Delpero *et al.*, 1995; Mamputu *et al.*, 1997; Moriyama *et al.*, 1999) als auch Serin-Proteasen, was auch auf das Diisopropylfluorophosphat (Somma-Delpero *et al.*, 1995; Moriyama *et al.*, 1999) zutrifft. Serin-Protease-Inhibitoren besitzen häufig eine reaktive Carbonyl-Gruppe, die mit dem Serin reagiert. Die nukleophile OH-Gruppe des Serins greift die elektrophile Carbonylgruppe des Inhibitors an, wodurch ein metastabiles Hemiacetal entsteht. Um diesen Mechanismus für Lipase-Inhibitoren zu nutzen, wurde die Oxo-Gruppe in ein lipophiles Alkohol-Rückgrat (Chiou *et al.*, 2000) oder ein TAG-Gerüst (Kokotos *et al.*, 2000) eingebaut. Es wurde bereits gezeigt, dass diese Art von Inhibitor, die Pankreas- und Magen-Lipasen hemmen (Kokotos *et al.*, 2000).

1.5.4 Die Lipase-Genfamilie von *Candida albicans*

Zusätzlich zu den Dermatophyten sind ebenfalls opportunistische Pilze wie die *Candida*-Spezies dafür bekannt, extrazelluläre Lipasen zu sekretieren. Für den humanpathogenen Pilz *C. albicans* wurde erstmals 1966 eine lipolytische Aktivität beschrieben (Werner, 1966). Werner zeigte, dass dieser Pilz mit verschiedenen Polyoxyethylensorbitanfettsäuren (Tweens) als einziger Kohlenstoff-Quelle wachsen konnte. 1996 wurden die ersten Daten über eine mögliche Esterase von Tsuboi und Mitarbeitern geliefert. Identifizierung und Klonierung eines Esterase-Gens blieben dennoch erfolglos. Das Gebiet der lipolytischen Enzyme wurde daher wenig erforscht. Erst 1997 wurde die erste Sequenz eines Lipase-Gens (*LIP1*) von *C. albicans* publiziert (Fu *et al.*, 1997). Anfängliche Expressionsanalysen ergaben, dass *LIP1* sowohl bei 30 °C als auch bei 37 °C transkribiert wird. Weiterhin konnten Transkripte nach Wachstum in verschiedenen Tween-Medien nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu konnte weder in einem Komplex-Medium noch in einem definierten Aminosäure-Medium (Lee's Medium), welches zur Induktion des Hefe-Myzel-Übergangs genutzt wird, *LIP1*-mRNA detektiert werden. Das Enzym wies keine phospholipolytische Aktivität gegenüber Phosphatidylcholin oder Lysophosphatidylcholin auf. Es handelt sich also um eine „reine“ Lipase. Eine erste Southern Blot-Analyse, die in diesem Zusammenhang durchgeführt wurde, wies darauf hin, dass in *C. albicans* eine ganze Lipase-Genfamilie existieren könnte (Fu *et al.*, 1997).

Durch Hybridisierungen von Fosmidbanken mit dem bereits publizierten Lipase-Gen *LIP1* wurden drei weitere Lipase-Gene, *LIP2*, *LIP3* und *LIP4*, isoliert und kloniert (Bossenz, 1998). Durch Sequenzierungen, und unter Verwendung der Sequenzdaten aus dem *Candida*-Genomprojekt, wurden die vollständigen Sequenzen von *LIP2-4* erhalten. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass die bereits publizierte Lip1-Sequenz unvollständig war und um 117 Aminosäuren länger ist.

Die identifizierten offenen Leserahmen der Gene *LIP1-4* wurden mit den Sequenzdaten des Genomprojektes verglichen. Dabei konnten sechs weitere Gene der Lipase-Genfamilie von *C. albicans* mit vollständigen offenen Leserahmen identifiziert werden (*LIP5-10*) (Stehr, 1999). Die ORFs der zehn Lipase-Gene sind zwischen 1281 bp (*LIP7*) und 1416 bp (*LIP3*) groß. Sie kodieren für putative sekretierte Lipasen.

In vitro Expressionsstudien, welche mittels Northern Blots und RT-PCR-Analysen durchgeführt wurden, haben gezeigt, dass die Lipase-Genfamilie differentiell reguliert wird (Stehr, 1999). Einige Lipase-Gene wurden unter allen getesteten Bedingungen konstitutiv exprimiert, während andere nur in speziellen Medien induzierbar waren (Hube *et al.*, 2000).

1.6 Ziel der Arbeit

Ziel der vorliegenden Dissertation ist es, die Bedeutung sekretierter lipolytischer Enzyme, speziell der Lipase-Genfamilie, bei der Besiedlung und Infektion von *C. albicans* aufzuklären. Das Projekt soll mögliche Funktionen der Lipasen zeigen und darlegen, wie bedeutend diese Enzyme für den Verlauf unterschiedlicher Infektionsarten in verschiedenen Infektionsstadien sind.

Mit mehreren Maus- und Hautinfektionsmodellen werden diverse Krankheitsformen der Candidose nachgestellt. Während experimenteller Infektionen sowie in Patientenmaterial soll das Transkriptionsprofil der Lipase-Genfamilie in Abhängigkeit von Ort und Zeit mit Hilfe der RT-PCR-Technik erstellt werden. Dadurch können Rückschlüsse auf die Regulation gezogen und mögliche Rollen der Genfamilie in der Pathogenese beschrieben werden.

Gerade die Analyse des Expressionsprofils der Lipase-Genfamilie von Patientenproben ist essentiell, um klinisch relevante Angriffspunkte zu identifizieren. Die Bedeutsamkeit eines Virulenzgens für die Pathogenität eines Erregers kann durch den Nachweis seiner Expression während der Infektion festgestellt werden. *In vivo* induzierte Gene stellen mögliche Kandidaten für eine gezielte Gendisruption dar. Parallel sollen neue molekularbiologische Strategien entwickelt werden, um mehrere Gene gleichzeitig zu hemmen. Für anschließende Versuche sollen isogene *lip*-Mutanten isoliert und charakterisiert werden.

Die phänotypischen Analysen der Mutanten könnten erste Rückschlüsse auf die Aufgaben der Lipasen zulassen. Schwerpunkte werden in der Untersuchung des Wachstums, der Morphologie, des Switching und der hydrolytischen Aktivität sowie der Adhäsions-eigenschaften liegen. Vor allem der Einsatz generierter Lipase-Mutanten in experimentellen Infektionen soll zur Aufklärung beitragen, welchen Einfluß die ausgewählten *LIP*-Gene auf die Pathogenese von Candidosen besitzen. Zusätzlich zur Analyse der Lipase-Genfamilie sollen neue lipolytische Enzyme identifiziert und die extrazelluläre lipolytische Aktivität charakterisiert werden. Durch den Einsatz von Lipase-Inhibitoren sollen neue Therapieansätze zur Bekämpfung von Candidosen geschaffen werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Pilz- und Bakterienstämme

Im Rahmen dieser Arbeit wurden mehrere klinische Pilzisolat, charakterisierte *Candida*-Arten und -Stämme (Tab. 1) sowie der *Saccharomyces cerevisiae* Stamm JRY α (freundlicherweise von Frau Prof. Pratje zur Verfügung gestellt) eingesetzt. Im folgenden wird das klinische *C. albicans* Isolat SC5314 als Wildtyp (wt) bezeichnet.

Tab. 1: Verwendete *Candida*-Arten mit Isolatbezeichnung und Herkunft.

<i>Candida</i> -Arten	Isolatbezeichnung	Quelle
<i>Candida albicans</i>	SC5314 (wt)	Gillum <i>et al.</i> , 1984
	WO-1	Slutsky <i>et al.</i> , 1987
<i>Candida dubliniensis</i>	CBS 7987	Centraalbureau of Schimmelcultures, Delft, NL
	CBS 8501	
<i>Candida glabrata</i>	332	} Von Herrn Prof. Rüchel freundlicherweise zur Verfügung gestellt
<i>Candida krusei</i>	1900	
<i>Candida parapsilosis</i>	4237	
<i>Candida tropicalis</i>	C8	
	C31	

Des weiteren wurde mit den *C. albicans*-Mutanten CAI-2 (Δ ura3::imm434/URA3) und CAI-4 (Δ ura3::imm434/ Δ ura3::imm434) (Fonzi & Irvin, 1993) gearbeitet. Für die in dieser Arbeit generierten *C. albicans*-Mutanten (Tab. 2) diente CAI-4 als Ausgangsstamm.

Tab. 2: Generierte Mutanten von *C. albicans* mit Angabe des Genotyps.

<i>C. albicans</i> Mutanten-Stamm	URA3-Status (Ausgangsstamm)	Genotyp
Δlip8-Mutanten		
KO2	URA3 ⁺	Δ ura3::imm434/ Δ ura3::imm434
	(CAI-4)	LIP8/ Δ lip8::hisG-URA3-hisG
KO5	(CAI-4)	
KO2nFOA	ura3 ⁻	Δ ura3::imm434/ Δ ura3::imm434
	(KO2)	LIP8/ Δ lip8::hisG
KO5nFOA 2/3/3	(KO5)	
	URA3 ⁺	Δ ura3::imm434/ Δ ura3::imm434
5/7/5	(KO2nFOA)	Δ lip8::hisG/ Δ lip8::hisG-URA3-hisG
	(KO5nFOA)	

<i>C. albicans</i> Mutanten-Stamm	URA3-Status (Ausgangsstamm)	Genotyp
2/3/3/4	ura3 ⁻ (2/3/3)	Δ ura3:: <i>imm434</i> / Δ ura3:: <i>imm434</i> <i>Alip8</i> :: <i>hisG</i> / Δ <i>lip8</i> :: <i>hisG</i>
5/7/5/7	(5/7/5)	
LIP8-Retransformanden		
2/3/R2	URA3 ⁺ (KO2nFOA)	Δ ura3:: <i>imm434</i> / Δ ura3:: <i>imm434</i> <i>LIP8</i> / Δ <i>lip8</i> :: <i>hisG</i> pCIp10- <i>ACT</i> -Promotor- <i>LIP8</i>
5/7/R1	(KO5nFOA)	
2/3/3/4/R1	URA3 ⁺ (2/3/3/4)	Δ ura3:: <i>imm434</i> / Δ ura3:: <i>imm434</i> <i>Alip8</i> :: <i>hisG</i> / Δ <i>lip8</i> :: <i>hisG</i> pCIp10- <i>ACT</i> -Promotor- <i>LIP8</i>
5/7/5/7a	(5/7/5/7)	
LIP8-Knock-down-Mutanten		
AS2	URA3 ⁺ (CAI-4)	Δ ura3:: <i>imm434</i> / Δ ura3:: <i>imm434</i> <i>LIP8</i> / Δ <i>lip8</i> :: <i>TEF3</i> -Promotor- <i>hisG-URA3-hisG</i>
AS4	(CAI-4)	
RNAi1	URA3 ⁺ (CAI-4)	Δ ura3:: <i>imm434</i> / Δ ura3:: <i>imm434</i> <i>LIP8</i> / Δ <i>lip8</i> :: <i>LIP8-sense-LIP8-</i> <i>antisense-LIP8-Terminator-hisG-</i> <i>URA3-hisG</i>
RNAi5	(CAI-4)	
LIP8-Überexpressionsmutanten		
Ü12	URA3 ⁺ (CAI-4)	Δ ura3:: <i>imm434</i> / Δ ura3:: <i>imm434</i> pCIp10- <i>ACT</i> -Promotor- <i>LIP8</i>
Ü15	(CAI-4)	

Für molekulargenetische Klonierungsarbeiten wurden die in Tab. 3 aufgeführten *Escherichia coli*-Stämme eingesetzt.

Tab. 3: *E. coli*-Stämme für molekulargenetische Arbeiten unter Angabe ihres Genotyps.

<i>E. coli</i> -Stamm	Genotyp	Hersteller
DH5 α	F ⁻ <i>gyrA96</i> (Nal ^r) <i>recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17</i> (r _K ⁻ m _K ⁺) <i>glnV44 deoR</i> Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U169 [Φ 80d Δ (<i>lacZ</i>)M15]	Fermentas (St. Leon-Rot)
DH10B	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS.mcrBC</i>) Φ 80d <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74</i> <i>endA1 recA1 deoR</i> Δ (<i>ara, leu</i>)7697 <i>araD139 galU galK</i> <i>nupG rpsL</i> λ ⁻	Gibco BRL (Karlsruhe)

<i>E. coli</i> -Stamm	Genotyp	Hersteller
GM2163	F ⁻ <i>dam-13::Tn9</i> (Cam ^r) <i>dcm-6 hsdR2</i> (r _K ⁻ m _K ⁺) <i>leuB6 hisG4 thi-1 araC14 lacY1 galK2 galT22 xylA5 mtl-1 rpsL 136</i> (Str ^r) <i>fhuA31 tsx-78 glnV44 mcrA mcrB1</i>	Fermentas (St. Leon-Rot)
SURE	<i>e14</i> (<i>McrA</i> ⁻) Δ (<i>mcrCB-hsdSMR-mrr</i>) <i>171 endA1 supE44 thi-1 recA1 lac recB recJ sbcC umuC::Tn5</i> (<i>Kan</i> ^r) <i>uvrC</i> [<i>F'</i> <i>proAB lacI^fZ</i> Δ M15 Tn10 (<i>Tet</i> ^r) <i>Amy Cam</i> ^r]	Stratagene (Amsterdam, NL)
Top10	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS.mcrBC</i>) Φ 80d <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74 deoR recA1 araD139 Δ(<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU galK rpsL</i> (Str^R) <i>endA1 nupG</i></i>	Invitrogen (Groningen, NL)
XL1-Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [<i>F'</i> <i>pro AB lacI^fZ</i> Δ M15 Tn 10 (<i>Tet</i> ^r)] ^c	Stratagene (Amsterdam, NL)

2.1.2 Plasmide

Als Klonierungsvektoren wurden die Plasmide pCR-BluntII-TOPO (Invitrogen, Groningen, NL) und pGEM[®]-T (Promega, Mannheim) genutzt. Die in dieser Arbeit generierten Plasmide sind im Anhang 1 aufgeführt.

2.1.3 Medien und Chemikalien

Medien und Laborchemikalien wurden, soweit nicht anders angegeben, von folgenden Firmen bezogen: Difco (Michigan, USA), Duchefa (Haarlem, NL), Fluka (Neu-Ulm), Gibco BRL (Karlsruhe), Invitrogen (Groningen, NL), MBI Fermentas (St. Leon-Rot), Merck AG (Darmstadt), Roche (Mannheim), Roth (Karlsruhe), Serva Feinbiochemica (Heidelberg) und Sigma (Deisenhofen).

Das zum Ansatz von Stammlösungen und Medien verwendete Wasser entstammte einer Millipore Aufbereitungsanlage und wird im folgenden als H₂O bezeichnet.

Die zur Kultur und phänotypischen Analyse von *C. albicans* benötigten Medien sind in Tab. 4 aufgelistet.

Tab. 4: *C. albicans* Medien.

Medium	Zusammensetzung
FCS (Fetus Calf Serum)-Agar	5 % (v/v) fötales Kälberserum (Sigma, Deisenhofen), sterilfiltriert; 1 % (w/v) Agar
Reisextrakt-Agar	Reisextrakt-Agar (Difco)
S4D-Agar	0,17 % (w/v) YNB (ohne Aminosäuren und (NH ₄) ₂ SO ₄), 0,5 % (w/v) (NH ₄) ₂ SO ₄ , 4 % (w/v) Glucose, 2 % (w/v) Agar; 5 µg/ml Phloxine B (2',4',5',7'-Tetrabromo-4,5,6,7-tetrachlorofluorescein disodium salt; Sigma, Deisenhofen); sterilfiltriert (Andersen & Soll, 1987)
SD (Synthetic defined)-Minimalmedium	0,67 % (w/v) YNB ohne Aminosäuren, 2 % (w/v) Glucose
SD-Agar	SD-Minimalmedium, 1 % (w/v) Agar
SD-Glycerol/Galactose	SD-Agar, 3 % (w/v) Glycerol, 2 % (w/v) Galactose
SD-Glycerol/K-Ac	SD-Agar, 3 % (w/v) Glycerol, 2 % (w/v) Kaliumacetat
SD-7-Sorbitol	SD-Agar, 7 % (w/v) Sorbitol
SD-FOA (5-fluoroorotic acid)-Uridin-Selektionsagar	SD-Medium, 2 % (w/v) Agar; 0,1 % (w/v) FOA (Duchefa, Haarlem, NL), 2,5 % (w/v) Uridin; sterilfiltriert (Boeke <i>et al.</i> , 1984)
Spider	1 % (w/v) Mannitol, 1 % (w/v) Nutrient Broth, 0,2 % (w/v) K ₂ HPO ₄ , 1,5 % (w/v) Agar (Liu <i>et al.</i> , 1994)
Tween 20-Agar	1 % (w/v) Bacto-Pepton (BD Biosciences, Heidelberg), 0,5 % (w/v) NaCl, 0,01 % (w/v) CaCl ₂ , 1,5 % (w/v) Agar; 0,5 % (v/v) Tween 20 (Polyoxyethylensorbitanmonolaurat); sterilfiltriert
Tween 40-Agar	1 % (w/v) Bacto-Pepton (0,5 % (w/v) NaCl, 0,01 % (w/v) CaCl ₂ , 1,5 % (w/v) Agar; 0,5 % (v/v) Tween 40 (Polyoxyethylensorbitanmonopalmitat); sterilfiltriert
Tween 60-Agar	1 % (w/v) Bacto-Pepton, 0,5 % (w/v) NaCl, 0,01 % (w/v) CaCl ₂ , 1,5 % (w/v) Agar; 0,5 % (v/v) Tween 60 (Polyoxyethylensorbitanmonostearat); sterilfiltriert

Medium	Zusammensetzung
Tween 80-Agar	1 % (w/v) Bacto-Pepton, 0,5 % (w/v) NaCl, 0,01 % (w/v) CaCl ₂ , 1,5 % (w/v) Agar; 0,5 % (v/v) Tween 80 (Polyoxyethylensorbitanmonooleat); sterilfiltriert
Urea-Medium	50 mM NaCl, 30 mM (NH ₄) ₂ HPO ₄ , 50 mM KCl, 1 mM MgSO ₄ , 0,001 % Biotin, 5 mM Glucose, 0,4 M Harnstoff; mit konzentrierter Salzsäure auf einen pH-Wert von 5,0 eingestellt; sterilfiltriert (persönliche Mitteilung Frau Prof. M. Hostetter; Yale University, New Haven, USA)
YNB-Minimalmedium	0,17 % (w/v) YNB (Yeast Nitrogen Base) ohne Aminosäuren und (NH ₄) ₂ SO ₄ , 0,5 % (w/v) (NH ₄) ₂ SO ₄ , 2 % (w/v) Glucose
YNB-Olivenöl	0,7 % (w/v) YNB (ohne Aminosäuren, mit 0,5 % (w/v) (NH ₄) ₂ SO ₄); 2,5 % (v/v) Olivenöl; sterilfiltriert
YNB-Tween 40	0,7 % (w/v) YNB (ohne Aminosäuren, mit 0,5 % (w/v) (NH ₄) ₂ SO ₄); 2,5 % (v/v) Tween 40; sterilfiltriert
YPG (Yeast Peptone Glucose)-Medium	1 % (w/v) Hefeextrakt, 1 % (w/v) Pepton, 2 % (w/v) Glucose
YPG-Agar	YPG-Medium, 2 % (w/v) Agar; pH-Werte 4, 7 und 10 wurden mit HCl bzw. NaOH eingestellt
YPG-7-Glycerol	YPG-Agar, 7 % (w/v) Glycerol

Feste und flüssige Kulturmedien sowie Selektionsmedien von *E. coli* sind in Tab. 5 aufgeführt.

Tab. 5: Medien zur Kultivierung von *E. coli*.

Medium	Zusammensetzung
LB (Luria-Bertani)-Vollmedium	1 % (w/v) Trypton, 1 % (w/v) Hefeextrakt, 0,5 % (w/v) NaCl, pH 7,5; (Sambrook <i>et al.</i> , 1989)
LB-Agar	LB-Vollmedium, 1,5 % (w/v) Agar
LB-Amp	LB-Vollmedium, 100 µg/ml Ampicillin

Medium	Zusammensetzung
LB-Amp-Agar	LB-Amp, 1,5 % (w/v) Agar
LB-Amp-IPTG-X-Gal-Agar	LB-Agar, 100 µg/ml Ampicillin, 0,5 mM IPTG (Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid), 80 µg/ml X-Gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranosid)
LB-Kan	LB-Vollmedium, 50 µg/ml Kanamycin
LB-Kan-Agar	LB-Kan, 1,5 % (w/v) Agar
SOC-Medium	2 % (w/v) Bacto-Trypton, 0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 10 mM MgCl ₂ , 10 mM MgSO ₄ , 20 mM Glucose

2.1.4 Nukleotide, Nukleinsäuren und DNA-Längenstandards

Folgende Nukleotide, Nukleinsäuren und DNA-Marker wurden in dieser Arbeit verwendet:

dNTP Mix (10 mM); MBI Fermentas, St. Leon-Rot
 Oligo (dT)₁₂₋₁₈-Primer (500 ng/µl); Invitrogen, Groningen, NL
 SMART-Marker; Eurogentec, Seraing, B
 GeneRuler™ DNA Ladder Mix; MBI Fermentas, St. Leon-Rot
 DNA-Längenstandard VII, Digoxigenin-markiert; Roche, Mannheim
 Herring Testes Carrier DNA (10 mg/ml); Clontech, Heidelberg
 DIG-11-dUTP (Digoxigenin-11-2'-desoxy-uridin-5'-triphosphat) (1 mM); Roche,
 Mannheim

2.1.5 Oligonukleotide

Oligonukleotide wurden von den Firmen Eurogentec (Seraing, B), MWG (Ebersberg) und Roth (Karlsruhe) bezogen. Antisense-Oligomere sind in Tab. 6 und 7 aufgeführt. Primer für Klonierungen, Sequenzierreaktionen und Expressionsstudien sind in Tab. 8 zusammengefaßt.

Tab. 6: Antisense-Oligomere (d = a, g, t; r = a, g; w = a, t; y = c, t).

Bezeichnung der Oligomere	Sequenz (5' → 3')
FSdga1	TTdGGwCCyTCATAATCwGG
FSdga2	CCwCCAGArTAyCCCCAyA
FSt1	AATCCACCTAAGGCAGC
FSt2	ATAACAGTAGTGACAAT
FSt3	GGAGCACAATCAGCTTTAGCTGCAT

Tab. 7: Antisense-Oligomere mit Phosphothioat-Bindungen (mit Kleinbuchstaben gekennzeichnet) an den 5'- und 3'-Enden.

Bezeichnung der Oligomere	Sequenz (5' → 3')
LIP1-anti-pro	ccTCTCATTATTGTTGGTGATGGtgg
LIP2-anti-pro	ccTTTCATTGAGGAAATATATATtgc
LIP3-anti-pro	ttTTCATGTCTGTTATGAAATTgtt
LIP4-anti-pro	aaCAACATTTTCTTACTGATGTgga
LIP5-anti-pro	aaATACAACATTTTCTTGATTgga
LIP6-anti-pro	ctCTCATTGTAATAAATAATTTAatc
LIP7-anti-pro	caAACATTTGATTTGCATCTGTTaag
LIP8-anti-pro	aaACAACATTTGTTATTAATGTgga
LIP9-anti-pro	ttTTCTTGATTGGATAAGTAAAcac
LIP10-anti-pro	ttTTCATGAACTGAGATATTGAAacg

Tab. 8: Nukleotidsequenz und Annealing-Temperatur (T_A) der Klonierungs-, Sequenzierungs- und PCR-Primer mit den erwarteten Größen der PCR-Amplifikate. Erkennungssequenzen von Restriktionsenzymen sind durch Kleinbuchstaben gekennzeichnet.

Bezeichnung der Primer	Sequenz (5' → 3')	T_A	Produktgröße (bp)
EFB1a	ATTGAACGAATTCTTGGCTGAC	55 °C	cDNA: 554
EFB1b	CATCTTCTTCAACAGCAGCTTG		DNA: 919
LIP1a	ACAAATTCCTGCTGGATCAAGAG	55 °C	545
LIP1b	ATAAGTGACATGGACGTTACTG		
LIP2a1	TTTCCGACTTTGCTGTTCCAG	55 °C	588
LIP2b1	ATAATACTGCTTACAAGACCAAG		
LIP3a2	AGCTTTACAACAGGGGACTC	59 °C	511
LIP3b2	ACCAGGTCCCAATTGTGAGG		
LIP3b	AGAAAATCAACTGTCGTCGTAG	55 °C	1425
LIP3c	CATAGAATTCTCGCCCTTAAG		
LIP4a	TGATCAATTATATTGGTAAGCAC	61 °C	455
LIP4b	TCCTTTTTGGATGAGTATATTC		
LIP5a2	ACGGTGTGCTCAACTATATCGG	61 °C	455
LIP5a-4	CACCTGAATTAGGTGGTAAC	55 °C	674
LIP5b2	ATGGAGAACAACATCCATTGCTG		
LIP6a	TTAAACCTGGTGCCAAAGCTG	59 °C	441
LIP6b	TCGATGCCCTGGTGGTGAAC		
LIP6pa	TTGTTTTGAGTAATCCCCAGTTC	55 °C	1815
LIP6pb	TAGGCTGTTGTGTGTTTAGCAG		

Bezeichnung der Primer	Sequenz (5' → 3')	T _A	Produktgröße (bp)
LIP7a	TTCCATCATTCGAGACATTTTCAG	55 °C	878
LIP7a2	TGGATGTTTATTTCCCATTTGCAG	61 °C	424
LIP7b	ACGGAAGTACTGACTGAGAAATG		
LIP7pa	AGATTTACTAATAAAACAATACTACATC	55 °C	1765
LIP7pb	ATCAAATGGCTCATTGGACGCC		
LIP8a	AGAGTGATACAGACAAAAAATCAG	59 °C	521
LIP8a-3	TGAATTTGATAGTCATTGTTTAGC	55 °C	490
LIP8a-4	CACCTGAATTGAGTAGCAG	55 °C	683
LIP8b	AAGACCATTCAGCATCATGGTG		
LIP9a	TTTATAAAGTATGTGGGAGCTAG	63 °C	466
LIP9b	TAGGACCAAGCCCTTGTGTG		
LIP9pa	TTTATCGTTGTCTTTGTTTACATC	55 °C	1826
LIP9pb	TCTCGCAACCACAATGAAACC		
LIP10a2	TTAAGCTCAGTGCTAGATCTAC	59 °C	530
LIP10b2	TCCCGATCCTAAGTTAACCC		
LIP10pa2	AGGTAGAAACTTTTCAGCGATAC	55 °C	1915
LIP10pb	AGTAATTGTAGTTTCATAAATTGCG		
PHR1f	ATGTATTCATTAATCAAATCA	50 °C	1644
PHR1r	ATTTAAAAACAACGGACAT		
CdAct1f	GTATTTGTCGTTCCCCTTTC	58 °C	288
CdAct1r	GTGGTTGTGTGCACTAACGTC		
Unif	GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG	58 °C	614
Unir	GGTCCGTGTTTCAAGACG		
KO-3-5'	ATATTTTTAATATCCCACTGGC	55 °C	354
KO-3-3'	AACATCTTTGCTATATTTAGGTG		
M13forw	GTAAAACGACGGCCAG	55 °C	
M13rev	CAGGAAACAGCTATGAC		
PLA1	AAGTCCAATCGTGAAATTGACC	55 °C	627
PLA2	TTTGAACATAACCACTGGAGAC		
PLAexp1	GTCggatccACATAATGAAAGTTCTATTAGCCAC	55 °C	2259
PLAexp2	CCTctcgagATACTACTTTGATGTAACAGTAG		

Bezeichnung der Primer	Sequenz (5' → 3')	T _A	Produktgröße (bp)
LIP8-5'-KpnI	GgtaccAATTCCGGATACTCATTAGC	55 °C	816
LIP8-5'-KpnI-2	GgtaccTTGATAAACTAATCCATTATCTTC		1005
LIP8-5'-SacI	GagctcAGTTGTATTTCATTTCTATCCAC		
LIP8-3'-SalI	GtcgacCAACATGATAAAAAGATTAAGTAAC	56 °C	382
LIP8-3'-PstI	CtgcagTACTAGACACTTACAATTTACA		
TEF3-KpnI-2	GgtaccAAGCACTTCAACCAATCTTG	55 °C	1037
TEF3-KpnI	ggtaccACTAGCAGCAGACATTTTCC		
LIP8anti-BglII	GagatctAGTTGTATTTCATTTCTATCCAC	55 °C	816
LIP8anti-KpnI	ggtaccTTTGAATTCCGGATACTCATTAG		
PolyA-5'-BglII	GagatctTAAGCTGTTGACGCGGTCAC	55 °C	216
PolyA-3'-BglII	GagatctTTACTAGACACTTACAATTTACATTC		
Actin-5'-KpnI	ggtaccATGTCTTTAGAGCCTTCAGG	55 °C	1455
Actin-3'-KpnI	ggtaccCATACCAGAACCGTTATCG		
LIP8-Re-5'-KpnI	ggtaccATGTTGTTTTTATTATTCTTATTAATTAC	60 °C	1803
LIP8-Re-3'-NcoI	ccatggATAGATAAGAAAATCCGGCTCAAC		
Actin-5'-3'-SacI	gagctcATGTCTTTAGAGCCTTCAGG	55 °C	3252
LIP8-Re-3'-3'-SacI	gagctcATAGATAAGAAAATCCG		

2.1.6 Inhibitoren und Aktivatoren

Zur Untersuchung von Wachstum und lipolytischer Aktivität von *C. albicans* wurden Stammlösungen folgender Lipase-Inhibitoren und -Aktivatoren eingesetzt:

Acetylsalicylsäure (ASS; Sigma, Deisenhofen)	200 mg/ml in EtOH; Lagerung bei RT
Ebelacton A (Sigma, Deisenhofen)	2 mg/ml in EtOH; Lagerung bei 4 °C
Ebelacton B (Sigma, Deisenhofen)	1 mg/ml in EtOH; Lagerung bei 4 °C
Glykogen (MBI Fermentas, St. Leon-Rot)	1 mg/ml in H ₂ O; Lagerung bei 4 °C
Natriumtaurocholol (Sigma, Deisenhofen)	20 % (w/v); Lagerung bei RT
Orlistat [®] (von Dr. P. Hadvary, Pharma Preclinical Research, Hoffmann-La Roche AG zur Verfügung gestellt)	20 mg/ml in DMSO; Lagerung bei 4 °C

Quinidin Hydrochlorid Monohydrat 20 mg/ml in EtOH; Lagerung bei 4 °C
(Quinidin; Sigma, Deisenhofen)

Quinin Hydrochlorid 20 mg/ml in EtOH; Lagerung bei 4 °C
(Quinin; Sigma, Deisenhofen)

2.1.7 Puffer und Lösungen

In der folgenden Auflistung sind die in dieser Arbeit verwendeten Puffer und Lösungen aufgeführt.

Gelelektrophorese

TAE: 40 mM Tris-Acetat (pH 8,0), 0,1 mM EDTA (Ethylendiamin-tetraacetat)

TBE: 90 mM Tris-Borat, 2 mM EDTA (pH 8,0)

Hitzeschock-Transformation (*E. coli*)

RF1-Puffer: 100 mM RbCl, 30 mM K-Ac, 10 mM CaCl₂, 50 mM MnCl₂,
15 % (v/v) Glycerol; pH 5,8

RF2-Puffer: 10 mM MOPS (3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure),
10 mM RbCl, 75 mM CaCl₂, 15 % (v/v) Glycerol; pH 6,8

„Maxiprep“

Lösung I: 50 mM Glucose, 25 mM Tris-HCl (pH 8,0), 10 mM EDTA
(pH 8,0); sterilfiltriert

Lösung II: 0,2 N NaOH, 1 % (w/v) SDS

Lösung III: 3 M K-Acetat (pH 4,8)

TE: 10 mM Tris-HCl (pH 7,4), 1 mM EDTA (pH 8,0)

Haut-Infektionsmodelle

Formalin: 10 % (v/v) Formalin (4 % Formaldehyd)

Maintenance Medium: chemisch definiertes Medium MCDB 153, 5 µg/ml Insulin,
(SkinEthic, Nizza, F) 1,5 mM CaCl₂, ohne Antibiotika (Boyce & Ham, 1983)

PBS: phosphate-buffered saline (Invitrogen, Groningen, NL)

RNA-Isolierung

DEPC: 0,1 % (w/v) Diethylpyrocarbonat in H₂O

DNA-Isolierung aus *Candida*

Lysispuffer: 100 mM Tris (pH 8,0), 50 mM EDTA, 1 % (w/v) SDS

Southern Blot-Analyse

Antikörperlösung: Anti-Digoxigenin-Antikörper, an dem eine alkalische Phosphatase gekoppelt ist, 1:10000 in B2 verdünnt; mit 1,2 µm-Filter sterilfiltriert

B1-Puffer: 100 mM Maleinsäure, 150 mM NaCl (pH 7,5)

B2: 1 % (w/v) Blockierungsreagenz (Roche, Mannheim) im B1-Puffer

B3-Lösung: 100 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl (pH 9,5)

Blot-Puffer: 20 x SSC-Puffer („Sodiumchloride and Sodiumcitrate“): 0,3 M Na-Citrat, 3 M NaCl; pH 7,0

CSPD-Lösung: Dinatrium-3-(4-Methoxyspiro{1,2-Dioxethan-3,2'-(5'-Chloro)-tricyclo-[3.3.1.1^{3,7}]decan}-4-yl)-phenyl-phosphat (CSPD), 1:100 in B3-Puffer

Denaturierungslösung: 1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH

Neutralisierungslösung: 1,5 M NaCl, 0,5 M Tris-HCl (pH 7,5)

„Nicking“-Lösung: 0,25 M HCl

Prähybridisierungspuffer: 5 x SSC, 0,1 % (w/v) N-Lauroylsarcosin, 2 % (w/v) Blockierungsreagenz, 0,2 % (w/v) SDS

„Strip“-Lösung: 0,2 M NaOH, 0,1 % (w/v) SDS

W1-hoch: 2 x SSC, 0,1 % (w/v) SDS

W2-hoch: 0,2 x SSC, 0,1 (w/v) % SDS

W1-niedrig: 5 x SSC, 0,1 % (w/v) SDS

W2-niedrig: 2 x SSC, 0,1 % (w/v) SDS

WP-Lösung: 0,3 % (v/v) Tween 20 in B1-Puffer

Adhäsions- und „Damage“-Versuche

EF-PBS:	Dulbeccos's Phosphate Buffered Saline Solution w/o Ca^{2+} + Mg^{2+}
Fibronectin:	1 mg/ml Fibronectin (Collaborative Biomedical Products, Mass., USA) in EF-(Endotoxin-freiem) H_2O (Baxter, IL, USA); mit HBSS 1:100 verdünnt; sterilfiltriert
Gelatine:	0,2 % (v/v) Gelatine Typ B von Rinder-Haut (Sigma, Deisenhofen); sterilfiltriert
HBSS:	Hanks' balanced salt solution ohne Phenolrot (Gibco-BRL, Karlsruhe)
Kollagenase-Lösung:	162,5 U Kollagenase in 1 ml RPMI 1640-Medium (Roswell Park Memorial Institute-1640 definiertes Medium); sterilfiltriert
M199:	9,9 mg/ml M199 Salz (Gibco BRL, Karlsruhe), 2,2 mg/ml EF- Natrium-Bicarbonat EF- H_2O , 1 % (v/v) L-Glutamin- Penicillin/Streptomycin Lösung (Irvine Scientific, USA), 10 % (v/v) fötales Rinderserum (Irvine Scientific, USA), 9 % (v/v) definiertes Kälberserum (Hyclone, Logan, Utah, USA); sterilfiltriert; Lagerung bei 4 °C
RPMI 1640:	RPMI 1640-Medium ohne L-Glutamin (Gibco BRL, Karlsruhe)
1 x Trypsin-EDTA:	0,05 % Trypsin-EDTA in EF-PBS

Lipolytischer Aktivitätstest

Fast Violet B-Lösung:	1 % (w/v) Fast Violet B (Sigma, Deisenhofen) in H_2O
-----------------------	--

2.2 Allgemeine Methoden

2.2.1 *In silico* Arbeiten

Um die Daten von DNA-Sequenzierungen mit bestehenden Datenbanken zu vergleichen, wurden *in silico* Arbeiten durchgeführt. Analysen der Nukleinsäuresequenzen sowie die „simulierte“ Translation in eine Aminosäuresequenz wurden mit dem Programm Prophet 5.0 (BBN Systems and Technologies, 1996) durchgeführt.

Da viele *Candida*-Arten, u.a. auch *C. albicans*, das Standard-Leucin-CUG-Codon abweichend vom universalen genetischen Code als Serin translatieren (Santos *et al.*, 1993; Ohama *et al.*, 1993), wurden in dieser Arbeit CTG-Codons in Serin übersetzt.

Homologievergleiche von Nukleinsäure- und Aminosäuresequenzen wurden über das Programm „Standard protein-protein BLAST“ des Servers des „National Center for Biotechnology Information“ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>; Altschul *et al.*, 1997) und der „GenBank“ des NCBI online durchgeführt. Daten über Hydrolasen wurden aus der ESTHER Database (<http://bioweb.enscm.inra.fr/ESTHER/general?what=index>) gewonnen. Die „Microbial Genomes Blast Databases“ (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Microb_blast/unfinishedgenome.html), die vom Stanford DNA Sequencing and Technology Center¹ erstellt wurden, dienten als Datenquellen, um Sequenzen von putativen *C. albicans*-Lipase-Genen zu vergleichen. Außerdem wurde die Genomdatenbank der Stanford University (<http://www-sequence.stanford.edu:8080/contigs-to-blast6.html>) nach weiteren lipolytischen Enzymen untersucht. Die Datenbank beinhaltet u.a. eine Zusammenstellung aller möglichen ORFs und deren abgeleiteten Proteine. Des Weiteren werden Proteine anderer Spezies angegeben, die Homologien zum jeweiligen *C. albicans*-Protein aufweisen. Außerdem kann ein interner „Blast Search“ verwandte ORFs/Proteine im *C. albicans*-Genom aufzeigen. Sequenzen bereits bekannter lipolytischer Enzyme wurden genutzt, um weitere nicht-charakterisierte lipolytische Enzyme im *C. albicans*-Genom zu identifizieren. Diese Sequenzen wurden v.a. auf das Lipase-Motiv „GX SXG“ hin untersucht.

Multiple Alignments der Nukleinsäuren und der daraus abgeleiteten Proteinsequenzen wurden über die Programme ClustalW (<http://dot.imgen.bcm.tmc.edu:9331/multi-align/Options/clustalw.html>) und MultAlin (<http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>) (Corpet, 1988) erstellt und mit dem Programm GeneDoc 2.1. (Nicholas & Nicholas, 1997) weiter bearbeitet.

Mit dem Programm „Webcutter 2.0“ wurden Schnittstellen für Restriktionsenzyme innerhalb der *Candida*- und Vektorsequenzen ermittelt (<http://www.firstmarket.com/cutter/cut2.html>).

¹Sequenzdaten für *Candida albicans* wurden am Stanford DNA Sequencing and Technology Center mit Unterstützung der NIDR und des Burroughs Wellcome Fund generiert.

2.2.2 Herstellung von Kulturmedien und Lösungen

Die zu autoklavierenden Puffer, Lösungen, Medien, Gefäße und Pipettenspitzen wurden für 20 min bei 120 °C und 2×10^5 Pa sterilisiert. Nicht-hitzebeständige Chemikalien wurden sterilfiltriert und dem autoklavierten Medium oder Puffer nach dem Erkalten unter sterilen Bedingungen zugesetzt.

2.2.3 Methoden zur DNA-Analyse

2.2.3.1 DNA-Präzipitation (Sambrook *et al.*, 1989)

DNA-Fällungen wurden zur Konzentration und Reinigung der DNA aus Restriktions- oder PCR-Ansätzen durchgeführt. Die DNA-Lösung wurde hierfür mit 0,1 Volumenteil 3 M Natriumacetat (pH 5,4) und 2 Volumen 96 %igem Ethanol (EtOH) oder 1 Volumen Isoopropanol versetzt und 10 min auf Eis inkubiert. Die gefällte DNA wurde 30 min bei maximaler Umdrehungszahl einer Tischzentrifuge und 4 °C pelletiert. Das DNA-Pellet wurde anschließend mit 70 %igem EtOH gewaschen, bei RT getrocknet und in H₂O aufgenommen.

2.2.3.2 Gelelektrophorese und Ethidiumbromidfärbung

Die analytische Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte in 0,8 bzw. 1,6 % (w/v) TBE- oder TAE-Agarose-Gelen in Horizontalelektrophorese-Kammern. Die Elektrophorese wurde bei einer angelegten Spannung von 100-150 V durchgeführt. Als Laufpuffer wurden 1 x TBE bzw. 1 x TAE eingesetzt.

Vor dem Beladen des Gels wurden die DNA-Proben im Verhältnis 6:1 mit dem Probenpuffer der Firma MBI Fermentas (St. Leon-Rot) versetzt. Als Kontrolle für die Qualität der elektrophoretischen Auftrennung der DNA und zur Ermittlung der Konzentration und Länge der DNA-Fragmente dienten der SMART-Marker (Eurogentec, Seraing, B) oder der GeneRuler™ DNA Ladder Mix (MBI Fermentas, St. Leon-Rot), welche parallel zu den Proben ebenfalls auf das Gel aufgetragen wurden.

Die Agarose-Gele wurden anschließend in einer Ethidiumbromidlösung (2 µg/ml) 10 min gefärbt und kurz mit H₂O gewaschen. Die angefärbten DNA-Banden wurden unter UV-Licht sichtbar gemacht und gegebenenfalls mit einem Videoprintsystem dokumentiert.

2.2.3.3 DNA-Isolierung aus Agarose-Gelen

Die DNA-Isolierung von verdauten Vektoren oder PCR-Fragmenten aus TBE-Agarose-Gelen wurde mit dem Nucleospin-Extract-Kit der Firma Macherey und Nagel (Düren) nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.2.4 Enzymatische Modifikation von DNA

2.2.4.1 DNA-Restriktion

Die Restriktion von DNA erfolgte in Reaktionsansätzen mit einem Mindestvolumen von 10 µl. Diese setzten sich aus der DNA, einem Puffer (ggf. mit BSA) nach Empfehlung des Enzymherstellers und dem jeweiligen Enzym zusammen.

In der Regel wurde für einen vollständigen Verdau ca. 1 U Enzym pro µg DNA eingesetzt. Die Reaktionsbedingungen wurden nach den Angaben des Herstellers gewählt. Die Vollständigkeit der Restriktion wurde gelelektrophoretisch überprüft.

Alle verwendeten Restriktionsendonukleasen wurden, soweit nicht anders angegeben, von den Firmen Roche (Mannheim), Promega (Mannheim), MBI Fermentas (St. Leon-Rot) und New England Biolabs (Schwalbach) bezogen.

2.2.4.2 Dephosphorylierung linearisierter Vektor DNA

Um bei der Ligation eine unerwünschte Religation restringierter Vektor-DNA zu verhindern, wurden deren endständigen 5'-Phosphatgruppen entfernt. Die Dephosphorylierung erfolgte mit der alkalischen Phosphatase TsAP (Gibco BRL, Karlsruhe) nach Herstellerangaben.

2.2.4.3 Ligation

Zur Klonierung von Restriktionsfragmenten wurden die Fragmente in einem präparativen Agarose-Gel aufgetrennt und die gewünschten DNA-Fragmente ausgeschnitten. Anschließend wurde die DNA extrahiert. Die DNA-Mengen wurden nach der elektrophoretischen Auftrennung anhand des DNA-Längenstandards abgeschätzt. Die Ligation der Restriktionsfragmente in linearisierte Vektoren erfolgte im nachfolgend angeführten Reaktionsansatz mit T4 DNA-Ligase (Fermentas, St. Leon-Rot). Die Inkubation erfolgte über Nacht (ÜN) auf auftauendem Eis.

- 1 - 12 µl DNA Vektor (50 ng - 0,4 µg)
- 1 - 12 µl DNA Fragment (0,1 µg - 1 µg)
- 2 µl 10 x Ligationspuffer
- 0,5 µl für „sticky ends“ T4 DNA-Ligase (4 U)
1 µl für „blunt ends“
- ad 20 µl H₂O

2.2.5 PCR und Klonierung von PCR-Fragmenten

2.2.5.1 Amplifikation mit der *Taq*-Polymerase

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) wurde zur Amplifikation bestimmter DNA-Fragmente verwendet. Hierfür wurde die thermostabile DNA-abhängige DNA-Polymerase aus *Thermophilus aquaticus* (*Taq*-Polymerase; Invitrogen, Groningen, NL) verwendet. Die Reaktion erfolgte in einem 0,5 ml-PCR-Reaktionsgefäß.

Die Zusammensetzung sah wie folgt aus:

- 2,5 µl 10 x PCR-Puffer ohne MgCl₂ (Invitrogen, Groningen, NL)
- 1,25 µl 50 mM MgCl₂ (Invitrogen, Groningen, NL)
- 1,25 µl 1 % W-1 (Detergenz; Invitrogen, Groningen, NL)
- 0,625 µl 10 mM dNTP-Mix (MBI Fermentas, St. Leon-Rot)
- je 0,5 µl 100 pmol/µl Primer
- 0,1 µl *Taq*-Polymerase (5 U/µl)
- 0,5-2 µl Template-DNA
- ad 25,0 µl H₂O

Für präparative PCRs wurde ein Ansatz mit doppeltem Volumen gewählt.

Für die spezifische Amplifikation von DNA-Fragmenten wurde ein Standard PCR-Programm (Tab. 9) verwendet, welches in der Temperatur für die Primeranlagerung variierte. Diese Temperatur wurde für jedes Primer-Paar mit Hilfe eines Gradienten-PCR-Cyclers (PCRExpress, Hybaid, Heidelberg) ermittelt. Der PCR-Block (PCRSprint, Hybaid, Heidelberg) wurde zunächst ohne Proben auf 95 °C vorgeheizt.

Tab. 9: Standard PCR-Programm.

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Denaturierung	95 °C	3 min	1
Denaturierung	95 °C	30 s	} 30-35
Primeranlagerung	siehe Tab. 8	30 s	
Strangverlängerung	72 °C	1 min/1 kb	
Strangverlängerung	72 °C	10 min	1
Programmende	4 °C	endlos	

2.2.5.2 Amplifikation mit der *DeepVent*-Polymerase

Bei der *DeepVent*-DNA-Polymerase (New England Biolabs, Schwalbach) handelt es sich um ein sogenanntes „proofreading enzyme“. Neben der Fehlerkorrektur erzeugt diese Polymerase glatte Enden („blunt ends“) bei den polymerisierten DNA-Fragmenten.

Es wurden 50 µl-Ansätze in 0,5 ml-Reaktionsgefäßen verwendet. Ein Standard-PCR-Ansatz mit der *DeepVent*-Polymerase setzte sich folgendermaßen zusammen:

- 100 ng-500 ng Template DNA
- 5 µl 10 x Reaktionspuffer
- 3 µl 10 mM dNTP-Mix
- je 1 µl 100 pmol/µl Primer
- 2 µl 100 mM MgSO₄
- 0,5 µl *DeepVent*-Polymerase (2 U/µl)
- ad 50 µl H₂O

Da die *DeepVent*-Polymerase eine geringere Prozessivität als die *Taq*-Polymerase besitzt, wurden in den PCR-Programmen die Zeiten für die Strangverlängerung verdoppelt.

2.2.5.3 Klonierung der PCR-Produkte

Bei der Klonierung von PCR-Fragmenten, die mit der *Taq*-Polymerase hergestellt wurden, wurde das pGEM[®]-T Vektor System der Firma Promega gewählt.

Auf Eis wurden in ein 0,5 ml-PCR-Reaktionsgefäß folgende Lösungen pipettiert:

- 5 µl 2 x Rapid Ligationspuffer
- 0,5 µl pGEM[®]-T Vektor (27 ng)
- 1-3,5 µl aufgereinigtes PCR-Produkt (molares Verhältnis zum Vektor 3:1)
- 1 µl T4 DNA Ligase (3 U/µl)
- ad 10 µl H₂O

Der Ansatz wurde ÜN in einem mit Eis gefüllten Gefäß inkubiert, um einen Temperaturgradienten für die Ligation zu durchlaufen.

PCR-Fragmente, welche mit der *DeepVent*-Polymerase hergestellt wurden, wurden in den Vektor pCR-Blunt II-TOPO (Invitrogen, Groningen, NL) kloniert. Für die Ligation wurden 4 µl des PCR-Produktes, das vorher in einem Gel aufgereinigt wurde, mit 1 µl pCR-Blunt II-TOPO Vektor versetzt und leicht gemischt. Nach 5 min Inkubation bei RT wurde die Reaktion mit 1 µl 6 x TOPO Cloning Stop Solution gestoppt und bis zur Transformation auf Eis gehalten. Die Selektion erfolgte auf kanamycinhaltigen LB-Platten (LB-Kan-Agar).

2.2.5.4 PCR zur Analyse von *E. coli*-Klonen

Zur PCR-Analyse von transformierten *E. coli*-Klonen wurde mit der Zusammensetzung der Ansätze wie unter 2.2.5.1 verfahren. Es wurde Plasmid-DNA (100-500 ng) als DNA-Vorlage eingesetzt oder die PCR wurde direkt aus *E. coli*-Kolonien ohne vorhergehenden Zellaufschluss durchgeführt. Bei der direkten Analyse aus Bakterienkolonien wurde eine Kolonie mit einer Pipettenspitze von der Agarplatte abgenommen und in ein leeres Reaktionsgefäß überführt. Der Reaktionsansatz wurde hinzugefügt und die PCR, wie in Tab. 9 beschrieben, durchgeführt.

2.2.6 Sequenzierung von DNA

Zur Sequenzierung von Plasmid-DNA wurde das Big Dye-Kit sowie das ABI-Sequenzierungssystem von Applied Biosystems (Foster City, USA) benutzt.

Ein Sequenzierungsansatz setzte sich aus folgenden Komponenten zusammen:

- 2 μ l Big Dye-Reaktionslösung
- 6 μ l Verdünnungspuffer (2,5x)
- 15 pmol Primer
- 100 ng/250 zu sequenzierende bp Plasmid (säulengereinigt mit dem NucleoSpin® Plus Kit der Firma Macherey und Nagel, Düren)
- ad 20 μ l H₂O

Die Sequenzierung erfolgte nach der Kettenabbruch-Methode unter Verwendung von Didesoxynukleotiden (Sanger *et al.*, 1977). Hierfür wurden 2',3'-Didesoxynukleotide, die mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind, eingesetzt. Das zugehörige PCR-Programm ist in Tab. 10 dargestellt. Die 2 μ l Big Dye-Reaktionslösung wurden erst nach der Erstdenaturierung zugegeben. Die Didesoxynukleotide der Reaktionslösung führen zu einem statistischen Abbruch der DNA-Amplifikation.

Tab. 10: Programm zur Sequenzierung aus Plasmiden.

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Denaturierung	95 °C	5 min	1
Denaturierung	95 °C	30 s	} 25
Primeranlagerung	50 °C	15 s	
Strangverlängerung	60 °C	4 min	
Programmende	4 °C	endlos	

Nach der Sequenzierreaktion wurden die Ansätze mit EtOH gefällt, nicht gewaschen und die Pellets bei RT getrocknet. Die Auftrennung auf dem Sequenzierungsgel sowie die fluorometrische Detektion wurde im Sequenzierlabor des Universitätsklinikums Eppendorf (Hamburg) durchgeführt. Des Weiteren wurden über Säulen gereinigte Plasmide zur Sequenzierung direkt an die Firma MWG (Ebersberg) versandt.

2.2.7 Mikrobiologische und molekularbiologische Methoden (*E. coli*)

2.2.7.1 Anzucht von *E. coli*

Die Kultivierung von *E. coli* erfolgte in LB-Medium oder auf LB-Agar. Die Anzucht von UN-Flüssigkulturen erfolgte bei 37 °C mit 180 rpm für 14 bis 18 h. Sollte eine Selektion erfolgen, wurde dem Medium ein entsprechendes Antibiotikum hinzugefügt. Kurzfristig wurden die Bakterienstämme auf Platten bei 4 °C gelagert. Für die langfristige Lagerung wurden die Kulturen mit Glycerol (Endkonzentration 40 %) versetzt und bei -70 °C kryokonserviert.

2.2.7.2 Transformation von *E. coli* mittels Elektroporation

Die Elektroporation ist eine schnelle Transformationsmethode, in der die bakterielle Zellmembran durch einen elektrischen Impuls kurz destabilisiert wird, um Fremd-DNA in die Zelle einzuschleusen.

Die Herstellung kompetenter Zellen und die Transformation erfolgte nach Ausubel *et al.* (1994). 5 ml LB-Medium wurden mit einer Einzelkolonie von *E. coli* beimpft und ÜN bei 37 °C geschüttelt. Es wurden 200 µl der Startkultur in 100 ml LB-Medium in einen 500 ml Erlenmeyerkolben überführt und weiter bei 37 °C geschüttelt. Hatte die Kultur eine OD₆₀₀ zwischen 0,5 und 0,7 erreicht, wurden die Bakterien zunächst 10 min in einem Eisbad abgekühlt und anschließend für 10 min bei 2 °C und 3000 x g pelletiert. Die Pellets wurden dreimal mit eiskaltem H₂O gewaschen (20 min, 3000 x g, 2 °C) und zum Schluß in 500 µl H₂O aufgenommen. Die Zellen wurden direkt für eine Transformation eingesetzt oder bei -20 °C gelagert.

Vor der Elektroporation wurde der Ligationsansatz mittels Ethanolpräzipitation entsalzt. Hierfür wurde der Ansatz zunächst auf 200 µl aufgefüllt. Anschließend wurden 3 µl Glykogen, 100 µl 10 M Ammoniumacetat und 700 µl 96 %iger EtOH hinzugefügt und intensiv gemischt. Dann wurde die DNA bei -20 °C für 1 h ausgefällt und mittels Zentrifugation (30 min, 4 °C, 12000 x g) sedimentiert. Das Pellet wurde dreimal mit 70 %igem EtOH gewaschen und abschließend in 10 µl H₂O aufgenommen.

Zur Transformation wurden die elektrokompetenten *E. coli*-Zellen frisch eingesetzt bzw. auf Eis aufgetaut. Zu je 100 µl Zellen wurden 2-4 µl des entsalzten Ligationsansatzes gegeben. Diese Lösung wurde in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette pipettiert. Danach erfolgte die Elektroporation nach der Vorschrift des Herstellers (EasyJect). Nach dem elektrischen Puls wurden die Zellen sofort in 700 µl SOC-Medium überführt. Es folgte eine einstündige Inkubation bei 37 °C im Schüttler. Die transformierten Zellen wurden anschließend in Aliquots auf Selektionsplatten ausgestrichen, auf denen sie ÜN bei 37 °C im Brutschrank inkubiert wurden.

2.2.7.3 Transformation von *E. coli* mittels Hitzeschock

Es wurden fertig präparierte chemisch kompetente *E. coli*-Zellen (OneShot Top10 Zellen; Invitrogen, Groningen, NL) eingesetzt. Ligations- und Hitzeschockbedingungen wurden nach Angaben des Herstellers übernommen. Nach dem Hitzeschock wurden die Zellen auf Eis abgekühlt und mit 250 µl vorgewärmtem SOC-Medium versetzt und für 1 h bei 37 °C geschüttelt. Zum Schluß wurden die Zellen auf Selektionsplatten ausplattiert und ÜN inkubiert.

Des weiteren wurden kompetente *E. coli*-Zellen nach der sogenannten Rubidiumchlorid-Methode (Hanahan, 1985) hergestellt, welche in Hitzeschock-Transformationen zum Einsatz kamen. Zuerst wurden 50 ml LB-Medium mit einer ÜN-Kultur von *E. coli* angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5-0,7 bei 37 °C geschüttelt.

Danach wurde die Kultur auf zwei Zentrifugenröhrchen aufgeteilt und für 10 min auf Eis inkubiert. Nach der anschließenden Zentrifugation (10 min, 4 °C, 1100 x g) wurden die Pellets in jeweils 7 ml vorgekühltem RF1-Puffer resuspendiert. Für 15 min wurde dann auf Eis inkubiert und erneut bei 4 °C für 10 min mit 1100 x g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 1,6 ml vorgekühltem RF2-Puffer aufgenommen und weitere 15 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden in 200 µl Einheiten in 1,5 ml-Reaktionsgefäße aliquotiert. Die so behandelten Zellen konnten entweder sofort für die Transformation eingesetzt oder bei -70 °C gelagert werden. Zu einem Aliquot kompetenter Zellen wurden 4 µl des Ligationsansatzes gegeben und für 20-30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 1 min bei 42 °C im Wasserbad einem Hitzeschock ausgesetzt und dann für 2 min auf Eis abgekühlt. Danach wurde der Ansatz zur Regeneration der Zellen mit 500 µl SOC-Medium versetzt. Es folgte eine einstündige Inkubation bei 37 °C im Schüttler mit 180 rpm. Die transformierten Zellen wurden zum Schluß in Aliquots auf selektiven LB-Agarplatten ausgestrichen, auf denen sie ÜN bei 37 °C im Brutschrank wuchsen.

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

2.2.7.4.1 Isolierung in kleinem Maßstab („Miniprep“)

Die Isolierung der Plasmide aus *E. coli*-Zellen erfolgte mit dem NucleoSpin® Plus Kit der Firma Macherey und Nagel (Düren) oder mit dem Mo Bio UltraClean™ 6 Minute Mini Plasmid Prep Kit der Firma MO BIO Laboratories (CA, USA) nach den Anweisungen der Hersteller.

2.2.7.4.2 Isolierung im mittleren Maßstab („Midiprep“)

Für die Isolierung von Plasmiden im mittleren Maßstab wurde das Produkt „NucleoBond Plasmid Midi“ der Firma Clontech (Heidelberg) unter Einhaltung der Hersteller-Protokolle verwendet.

2.2.7.4.3 Isolierung im großen Maßstab („Maxiprep“), (Sambrook *et al.*, 1989; modifiziert)

Eine 250 ml-ÜN-Kultur von *E. coli* wurde in einem 500 ml Nalgene-Zentrifugenbecher für 20 min bei 2900 x g und 4 °C im Rotor A6.9 (Kontron-Hermle Zentrifuge) pelletiert. Das Zellpellet wurde in 5 ml Lösung I und 300 µl 50 mg/ml Lysozym (in TE) gelöst und anschließend für 10 min auf Eis inkubiert. Dann wurden zur Denaturierung 10 ml der frisch angesetzten Lösung II zugegeben. Nach weiteren 10 min Inkubation auf Eis wurde zur Neutralisierung 7,5 ml Lösung III hinzupipettiert und die gesamte Lösung in ein 30 ml-Nalgene-Röhrchen überführt. Es wurde für 10 min auf Eis inkubiert. Dann folgte eine 30minütige Zentrifugation im Rotor A8.24 (48300 x g, 4 °C). Der Überstand wurde anschließend mit 0,6 Vol Isopropanol versetzt und für 15 min bei RT inkubiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt im Rotor A8.24 (10 min, 24200 x g, 4 °C) wurde das Pellet getrocknet und in 8 ml TE gelöst.

Mitgeschleppte RNA wurde mit 8 ml 5 M LiCl für 15 min auf Eis gefällt und mit einer 15minütigen Zentrifugation (23700 x g, 4 °C) pelletiert. Der Überstand wurde ein weiteres Mal mit Isopropanol (1 Vol) für 10 min auf Eis behandelt und zentrifugiert (10 min, 23700 x g, 4 °C). Das Pellet wurde in 5 ml TE und 5 µl 10 mg/ml RNase A-Lösung (Sigma) aufgenommen und 1 h bei 37 °C inkubiert. Diese Lösung wurde danach in 10 ml-Röhrchen überführt und mit 5 ml Phenol/Chloroform ausgeschüttelt und zentrifugiert (Hereaus Sephatech Omnifuge 2.0RS; 5 min, 1100 x g, 4 °C), um Proteine zu denaturieren. Die obere Phase wurde erneut mit Phenol/Chloroform behandelt und zentrifugiert. Die neue obere Phase wurde mit 10 ml Chloroform-Isoamylalkohol (24:1, v/v) versetzt, geschüttelt und zentrifugiert (5 min, 1100 x g, 4 °C), um das restliche Phenol zu extrahieren. Anschließend wurde zu der oberen Phase 1/10 Vol 3 M Na-Acetat und 1 Vol Isopropanol gegeben und mindestens für 1 h auf Eis inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation für 5 min bei 24200 x g und 4 °C im Rotor A8.24. Das Pellet wurde mit 10 ml 70 %igem EtOH gewaschen und in TE aufgenommen.

2.2.8 Mikrobiologische und molekularbiologische Methoden (*Candida*)

2.2.8.1 Anzucht und Bestimmung der Zellzahl von *Candida*

Zur Anzucht wurden Pilz-Stämme auf YPG-Agarplatten bei 25-37 °C kultiviert, bei 4 °C gelagert und monatlich auf frisches Medium überimpft. Zum Absichern von Isolaten und hergestellten Mutanten-Stämmen (Tab. 2) wurden YPG-ÜN-Kulturen mit Glycerol versetzt (Endkonzentration 40 %) und bei -70 °C kryokonserviert.

Für die Bestimmung der Zellzahl wurde ein Aliquot aus einer *Candida*-Suspension entnommen. Durch Zugabe von 10 % SDS wurde zusammenhaftendes Pilzmyzel getrennt. Falls erforderlich wurde mit H₂O weiter verdünnt. Danach erfolgte mikroskopisch die Zellzahlbestimmung in einer Neubauer-Zählkammer (Roth, Karlsruhe).

2.2.8.2 Expressionsstudien von *C. albicans* Lipase-Genen in verschiedenen Medien

Für Expressionsstudien wurde die erste Vorkultur (5 ml-YPG) des zu untersuchenden *Candida*-Stammes ÜN bei 30 °C oder 37 °C und 150 rpm geschüttelt. Am nächsten Tag wurde eine zweite YPG-Vorkultur mit einem Aliquot aus der ersten Vorkultur angeimpft und erneut ÜN geschüttelt. Dadurch sollte sichergestellt werden, dass sich die Zellen in einer möglichst gleichen Wachstumsphase befanden (Semisynchronisation). Nach einer Zellzahlbestimmung der zweiten Vorkultur und einmaligem Waschen mit dem jeweils neuen Medium der Hauptkultur oder H₂O wurde anschließend die Hauptkultur auf die benötigte Zellkonzentration eingestellt. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Aliquots entnommen und die Zellen pelletiert. Nach dem Entfernen des Überstandes wurden die Pellets sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur RNA-Isolierung bei -70 °C gelagert.

2.2.8.3 Expressionsstudien von *C. albicans* Lipase-Genen in verschiedenen Haut-Infektionsmodellen

Um das Expressionsprofil während eines Infektionsverlaufs an verschiedenen Hautarten (orale und vaginale Schleimhaut) zu erstellen, wurden künstliche Hautmodelle kontrolliert infiziert.

2.2.8.3.1 Orale Schleimhaut („reconstituted human epithelium“, RHE)

Für ein *in vitro* Modell einer oralen Candidose (Schaller *et al.*, 1998) wurde künstliches humanes Epithel ohne Stratum corneum (RHE) von der Firma SkinEthic Laboratory (Nizza, F) bezogen. Dieses Epithel wird aus der Tumorzelllinie TR146 gezüchtet. Hierbei handelt es sich um transformierte humane Keratinozyten. Die Zellen werden auf Polycarbonat-Filtern kultiviert. Das Epithel ist nicht mit Antibiotika und Antimykotika behandelt worden, und die Nährmedien enthielten ebenfalls keinen dieser Zusätze. Vor der eigentlichen Infektion wurden die Wells (3,5 cm²) einer 6-Well-Platte mit je 1 ml des gelieferten „Maintenance Mediums“ befüllt. Anschließend wurden die Filter mit der Haut in die entsprechenden Wells plaziert. Das Maintenance Medium benetzt dabei die künstliche Haut von unten und ernährt sie (Abb. 7).

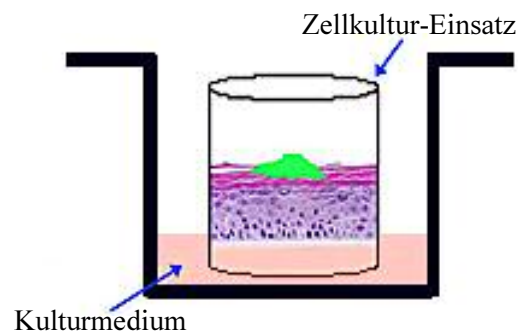


Abb. 7: Skizze eines Einsatzes mit künstlicher Haut (<http://www.skinethic.com/>), der in einem Well platziert wurde. Die Haut wird von unten von „Maintenance Medium“ (Kulturmedium) benetzt. Die präparierte Haut kann anschließend z.B. mit *C. albicans*-Zellen inokuliert werden.

Die Proben wurden ÜN kultiviert und am folgenden Tag infiziert. Über die gesamte Versuchsdauer wurden alle 24 h 500-1000 µl des Maintenance Mediums hinzugegeben.

Für die Infektion wurden ÜN bei 25 °C gewachsene wt- bzw. Mutanten-Zellen zweimal mit PBS gewaschen und anschließend in PBS resuspendiert. Jede Hautprobe wurde mit 2×10^6 *Candida*-Zellen in 50 µl PBS infiziert. Eine Probe wurde nur mit PBS versetzt (Negativ-Kontrolle). Die Proben wurden für 12, 36 und 48 h bei 37 °C unter einer 5 %igen CO₂-Atmosphäre inkubiert. Nach den entsprechenden Zeiten wurden die Hautstücke mit dem Polycarbonat-Filter und den anhaftenden *Candida*-Zellen mit einem Skalpell aus ihrer Plastikfassung geschnitten und geteilt. Eine Hälfte wurde direkt in ein 2 ml-Reaktionsgefäß mit 500 µl RNAPure überführt. Diese Probe wurde dann in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur RNA-Isolierung bei -70 °C gelagert.

Die andere Hälfte wurde in 10 % (v/v) Formalin eingelegt und zur Durchführung von histologischen Untersuchungen zu SkinEthic geschickt.

2.2.8.3.2 Vaginales Schleimhautmodell

Es wurden ebenfalls Infektionsstudien an einem vaginalen Schleimhautmodell (SkinEthic, Nizza, F) vorgenommen. Die Zellen entstammten der humanen Zelllinie A431, die von einem humanen vaginalen Epidermoidcarcinom abgeleitet wurden. Diese Zellen besitzen kein Stratum corneum. Während des Infektionsverlaufs wurden nach 12, 24 und 48 h Proben genommen. Ansonsten erfolgte die Durchführung analog zum RHE-Modell (2.2.8.3.1).

2.2.8.4 Expressionsstudien von *C. albicans* Lipase-Genen im Mausmodell einer systemischen Candidose

Um die zeitliche Regulation der *LIP*-Expression während einer systemischen *Candida*-Infektion zu ermitteln, wurden zu verschiedenen Zeitpunkten Leber und Nieren von infizierten Mäusen entnommen. Zusätzlich konnte somit überprüft werden, ob die Expression der Lipase-Gene vom Infektionsort abhing.

Die Infektion von Mäusen erfolgte im Labor von Frau Dr. M. Kretschmar (Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Klinikum Mannheim). Balb/c-Mäuse wurden mit 1×10^8 Zellen des klinischen Isolates SC5314 intraperitoneal infiziert. Für dieses bereits etablierte Modell einer systemischen *C. albicans*-Infektion (Kretschmar *et al.*, 1999) wurde eine ÜN-Kultur der wt-Zellen in Sabouraud-Broth-Medium (Difco, Michigan, USA) angeimpft. Am nächsten Tag wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und anschließend in die Bauchhöhle der Mäuse injiziert. Nach 4 h und 72 h wurden von infizierten Mäusen die Leber sowie die Nieren entnommen.

Die Organproben wurden sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur RNA-Isolierung (2.2.8.7) gelagert. Es wurden mindestens sechs Organe mit anhaftenden *Candida*-Zellen pro Zeitpunkt untersucht.

2.2.8.5 Expressionsstudien von *C. albicans* Lipase-Genen in Patientenproben

In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Neuber (Klinik für Dermatologie und Venerologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf) wurden Proben von Patienten mit möglichen Candidose-Befunden untersucht. Hierfür wurden Proben von verschiedenen Infektionsorten, wie Zeh-Zwischenraum, Vagina, Stuhl und vor allem Mundhöhle und Zunge genommen (durchgeführt von Frau B. Mähnß, Klinik für Dermatologie und Venerologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf).

Es wurden jeweils zwei Proben von einem Patienten genommen. Eine Probe, um den Erreger zu bestimmen und eine zweite, um das Lipase-Genexpressionsprofil zu ermitteln. Die phänotypische Erregerbestimmung wurde von der Hautklinik durchgeführt. Die zweite Patienten-Probe wurde mit einer Plastiköse sofort in ein Reaktionsgefäß mit 500 µl peqGOLD RNAPure™ (Peqlab, Erlangen) überführt. Diese Probe wurde bis zur RNA-Isolierung in flüssigem Stickstoff gelagert. Zum Zeitpunkt der Probennahme waren die Patienten noch nicht mit Antimykotika behandelt worden.

2.2.8.6 Molekularbiologische Unterscheidung von *C. albicans* und *C. dubliniensis*

Um *C. albicans* und *C. dubliniensis* molekularbiologisch zu differenzieren, wurden zwei PCR-Strategien miteinander kombiniert (Tab. 11 und 12). Zum einen wurde eine PCR mit Primern gegen das Intron des Actin-Gens durchgeführt, da gezeigt wurde, dass sich die beiden *Candida*-Arten bezüglich dieses Introns unterscheiden (Donnelly *et al.*, 1999). Die eingesetzten Primer sind spezifisch für das Actin-Intron von *C. dubliniensis*. Ein zweites Primer-Paar (Unif und Unir) wurde als interne Positiv-Kontrolle verwendet. Hierbei handelt es sich um universelle Hefe-Primer, die ein ca. 610 bp großes Fragment der pilzlichen großen Untereinheit des rRNA Gens amplifizieren (Fell, 1993). Zum anderen wurde eine weitere PCR durchgeführt, die *C. albicans*-spezifisch den gesamten ORF vom *PHR1* (pH-regulated)-Gen amplifiziert (Kurzai *et al.*, 1999).

Tab. 11: PCR-Programm für die Actin-Intron-PCR.

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Denaturierung	95 °C	6 min	1
Denaturierung	95 °C	30 s	} 30
Primeranlagerung	58 °C	30 s	
Strangverlängerung	72 °C	30 s	
Strangverlängerung	72 °C	10 min	1
Programmende	4 °C	endlos	

Tab. 12: PCR-Programm für die *PHR1*-PCR.

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Denaturierung	95 °C	5 min	1
Denaturierung	95 °C	30 s	} 30
Primeranlagerung	50 °C	1 min	
Strangverlängerung	72 °C	1 min 30 s	
Strangverlängerung	72 °C	10 min	1
Programmende	4 °C	endlos	

2.2.8.7 RNA-Isolierung und -Konzentrationsbestimmung

Die Isolierung der Gesamt-RNA aus *Candida*-Zellkulturen, infizierten Mäuse-Organen, Proben von verschiedenen Hautmodellen und Patientenproben erfolgte nach dem peqGOLD RNAPure™ Protokoll der Firma PeqLab. Diese Methode basiert auf einer einstufigen Flüssigphasentrennung. Das verwendete Reagenz enthält Phenol und Guanidin-isothiocyanat in einphasiger Lösung. Nach Zugabe von Chloroform und anschließender Zentrifugation trennt sich das Homogenat in drei Phasen auf, wobei sich die RNA in der wäßrigen Phase befindet.

Die gefrorenen Proben wurden zunächst mit 500 µl des oben genannten Reagenzes versetzt, falls sie nicht bereits darin gelagert wurden, und sofort für 20 min nach Zugabe von 300 µl mit Salzsäure gewaschenen Glasperlen (Sigma, Deisenhofen) unter Vortexen aufgeschlossen.

Nach einer 5minütigen Inkubation bei RT wurde der Überstand für weitere 5 min bei 21000 x g und 4 °C zentrifugiert, um unlösliche Bestandteile wie Proteoglycane und Polysaccharide zu entfernen. Zum neuen Überstand wurden 250 µl Chloroform pipettiert. Danach wurde für 15 s gevortext. Nach 10 min Inkubation bei RT erfolgte eine erneute Zentrifugation (10 min, 21000 x g, 4 °C). Während die obere, wäßrige Phase zum größten Teil RNA enthielt, waren die untere, gelbe Phenol-Chloroform-Phase und die Interphase überwiegend mit DNA und Proteinen angereichert. Falls es eine ausgeprägte Interphase gab, wurde zur Sicherheit die wäßrige Phase nochmals mit 250 µl RNAPure und 50 µl Chloroform behandelt, um etwaige Proteinverunreinigungen zu vermeiden. Die wäßrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 2 µl Glykogen (20 µg/µl) als Fällungshilfe und 500-700 µl Isopropanol wurden die Gefäße geschwenkt und ÜN bei -20 °C inkubiert, um eine größtmögliche RNA-Ausbeute zu erzielen. Der folgenden Zentrifugation (30 min, 21000 x g, 4 °C) schloß sich ein Waschschrift mit 1 ml 70 %igem EtOH an (10 min, 21000 x g, 4 °C).

Nach dem Entfernen des EtOH wurde das RNA-Pellet anschließend an der Luft ange-trocknet. Danach wurde das Pellet in DEPC-behandelten H₂O (DEPC-H₂O) aufgenommen und für 5-10 min bei 55 °C im Thermomixer unter leichtem Schütteln gelöst. Die RNA-Lösung wurde bei -70 °C gelagert.

Für die RNA-Konzentrationsbestimmung wurde 1 µl der RNA-Lösung mit 99 µl DEPC-H₂O versetzt. Die RNA-Proben wurden anschließend in einer Quarzküvette im Spektral-photometer bei 260 und 280 nm vermessen. Das Photometer wurde vorher gegen DEPC-H₂O geeicht. Für die Mengenbestimmung galt: 1 OD₂₆₀ = 40 µg RNA.

2.2.8.8 Expressionsanalyse mittels RT-PCR

Mit Hilfe eines DNase-Verdau wurden die zu untersuchenden RNA-Proben von eventuellen DNA-Kontaminationen befreit. Hierfür wurde das Enzym (Deoxyribonuclease I, Amplification Grade 1 U/ μ l; Invitrogen, Groningen, NL) verwendet. Die Reaktionen erfolgten in 0,5 μ l-PCR-Reaktionsgefäßen. Die RNA wurde mit DEPC-H₂O auf 1 μ g/6 μ l eingestellt, bei Organproben von Mäusen bis maximal 10 μ g/6 μ l.

Folgende Pipettierschritte wurden durchgeführt:

- max. 6 μ l RNA (1-10 μ g)
- 1 μ l 10 x DNase-Reaktionspuffer
- 1 μ l RNaseOUT™ Ribonuclease Inhibitor (40 U/ μ l);
(Invitrogen, Groningen, NL)
- 2 μ l DNase I (1 U/ μ l)
- ad 10 μ l DEPC-H₂O

Der DNase-Verdau wurde ÜN bei RT durchgeführt. Die Reaktion wurde mit 1 μ l 25 mM EDTA gestoppt. Anschließend wurde der Ansatz zur vollständigen Inaktivierung der DNase für 10 min bei 65 °C inkubiert. Danach wurde die Probe sofort mit Eis gekühlt, um eine mögliche Bildung von Sekundärstrukturen der RNA zu verhindern.

Die RT-PCR wurde durchgeführt, um reproduzierbare Transkriptionsprofile der Lipase-Gene während verschiedener *in vitro* Bedingungen und Infektionen zu erhalten. Die Gesamtreaktion der RT-PCR besteht aus zwei Schritten, der Reversen Transkription, in der die mRNA in eine komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben wird, und der Amplifikation der gebildeten cDNA.

Die Synthese der cDNA erfolgte mit Reagenzien der Firma Invitrogen (Groningen, NL) nach Angaben des Herstellers. Dazu wurden die Lösungen der DNase verdauten RNA mit folgendem Gemisch versetzt:

- 1 μ l Oligo (dT)₁₂₋₁₈ -Primer (500 μ g/ml)
- 4 μ l 5 x Erststrang-Puffer
- 2 μ l 0,1 M DTT
- 1 μ l 10 mM dNTPs
- 1 μ l RNaseOUT™ Ribonuclease Inhibitor (40 U/ μ l)

Daran schloß sich eine zweiminütige Inkubation der Proben bei 42 °C an. Es folgte die Zugabe von 1 μ l SUPERSCRIPT™ II RNase H⁻ Reverse Transcriptase (200 U/ μ l). Die Ansätze wurden für 60 min erneut bei 42 °C inkubiert. Die Reaktion endete mit der Denaturierung der Proben für 15 min bei 70 °C und anschließender Abkühlung auf 4 °C. Die gesamte cDNA-Synthese wurde in einem zyklischen Thermoblock der Firma Hybaid (PCRSprint, Heidelberg) durchgeführt.

Zur Überprüfung der RT-PCR-Reaktion wurde die Expression des Gens *EFB1* des Elongationsfaktors EF-1 β (Maneu *et al.*, 1996) von *C. albicans* überprüft. Dieses Gen, welches ein Intron von 365 bp enthält, wird konstitutiv exprimiert. Der Nachweis der Genexpression von *EFB1* ermöglicht somit die Abschätzung der cDNA-Qualität. Die Anwesenheit des Introns wurde zur Prüfung von eventuellen Kontaminationen durch genomische DNA der Proben herangezogen. Die Primer EF5' und EF3' ergeben bei Vorhandensein des Introns (genomische DNA) ein PCR-Fragment von 919 bp-Länge. Bei Abwesenheit des Introns (cDNA) wird ein kürzeres Fragment von 554 bp erwartet.

Zur Amplifikation von *EFB1*-Fragmenten wurde folgendes PCR-Programm gewählt (Tab. 13).

Tab. 13: Das PCR-Programm für die EF-PCR.

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Denaturierung	95 °C	3 min	} 1
Primeranlagerung	55 °C	3 min	
Strangverlängerung	72 °C	3 min	
Denaturierung	95 °C	30 s	} 35
Primeranlagerung	55 °C	30 s	
Strangverlängerung	72 °C	1,5 min	
Strangverlängerung	72 °C	10 min	1
Programmende	4 °C	endlos	

2.2.8.9 Gezielte Mutagenese von *C. albicans*

2.2.8.9.1 Transformation von *C. albicans*-Zellen nach Lithiumacetat-Behandlung

Die Transformationsmethode basiert auf einem Protokoll für *S. cerevisiae* (Gietz & Schiestl, www.umanitoba.ca/faculties/medicine/biochem/gietz/method.html; geändert für *C. albicans*).

45 ml YPG mit 0,8 mg/ml Uridin wurden mit einer 5 ml ÜN-Kultur eines auxotrophen, *ura3*⁻-*C. albicans*-Stammes angeimpft. Nach 3-5 h Inkubation bei 30 °C und 150 rpm wurden die Zellen für 5 min bei 3000 x g pelletiert. Anschließend wurden die Zellen einmal mit H₂O gewaschen. Danach wurde das Pellet in 1 ml 100 mM LiAc aufgenommen und in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Es folgte eine kurze Zentrifugation mit maximaler Geschwindigkeit. Nach dem Entfernen des Überstandes wurden erneut, 100 mM LiAc bis zu einem Endvolumen von ca. 500 μ l hinzugegeben. Die Zellen wurden gevortext, in 50 μ l Aliquots aufgeteilt und auf Eis gehalten. Ein Aliquot wurde für 30 s pelletiert und der Überstand entfernt. Anschließend wurden 240 μ l PEG (MW 4000, 50 % (w/v)) hinzugegeben.

Dann wurden 36 µl 1,0 M LiAc, 4 µl Herring Testes Carrier DNA (liegt denaturiert vor) und 50 µl der in H₂O gelösten zu transformierenden DNA zupipettiert. Das gesamte Gemisch wurde so lange gevortext, bis sich das Pellet vollständig gelöst hatte. Dieser Ansatz wurde 30 min bei 30 °C und anschließend 20-25 min bei 42 °C (Hitzeschock) inkubiert. Die Zellen wurden 15 s bei 3000 x g pelletiert, vorsichtig in 200 µl TE aufgenommen und auf SD-Agar ausgestrichen. Die Platten wurden für 2-4 Tage bei 30 °C inkubiert.

2.2.8.9.2 FOA (5-Fluoroorotic acid)-Behandlung von *C. albicans*-Transformanden

Die jeweilige *URA*⁺-Mutante wurde in 5 ml YPG angeimpft und ÜN bei 30 °C und 150 rpm inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen pelletiert und einmal mit 10 ml H₂O gewaschen.

Anschließend wurden 10⁵, 10⁶ und 10⁷ Zellen pro FOA-Platte ausgestrichen und für mindestens 3-4 Tage bei 30 °C inkubiert. Mögliche Klone wurden auf eine frische FOA-Platte übertragen, um sicherzustellen, dass die FOA-Selektion erfolgreich war. Mehrere Klone wurden per Southern Blot bzw. PCR kontrolliert.

2.2.8.10 Analyse der *C. albicans*-Mutanten

2.2.8.10.1 Genomische DNA-Isolierung aus *Candida*

Um genomische DNA von *Candida* zu isolieren, wurde eine 5 ml-ÜN-Kultur in YPG angeimpft und bei 30 °C geschüttelt. Die Zellen wurden pelletiert und einmal mit H₂O gewaschen. Danach wurde das Zellpellet in 500 µl Lysispuffer resuspendiert und mit säuregewaschenen Glasperlen für 2 min gevortext. Die wäßrige Phase wurde anschließend mit 275 µl 7 M Ammoniumacetat (pH 7,0) für 5 min bei 65 °C inkubiert und danach für 5 min auf Eis abgekühlt. Des Weiteren wurde mit 500 µl Chloroform gevortext und dann 2 min zentrifugiert. Die Nukleinsäuren wurden aus dem Überstand mit 1 ml Isopropanol präzipitiert. Nach 5 min Inkubation bei RT folgte eine fünfminütige Zentrifugation. Das Pellet wurde einmal mit 70 %igem EtOH gewaschen, anschließend getrocknet und in 50 µl RNase A (10 µg/ml)-haltigem H₂O gelöst und 30 min bei 37 °C inkubiert, um restliche RNA zu zerstören. Die Reinheit und Konzentration wurden in einem 1 %-TBE-Agarosegel bestimmt.

2.2.8.10.2 Southern Blot-Analyse

Mindestens 500 ng genomische DNA des Pilzes wurden mit einem geeigneten Restriktionsenzym nach Angaben des Herstellers in einem Volumen von 500 µl ÜN verdaut. Anschließend wurde die DNA mit einer EtOH-Fällung aufgereinigt und aufkonzentriert. Die DNA wurde in 10 µl H₂O aufgenommen. Die zu untersuchenden DNA-Fragmente wurden dann in einem 1 %igen-Agarosegel gemeinsam mit einem DIG (Digoxigenin)-markierten DNA-Längenstandard (Roche, Mannheim) bei 80 V 3-4 h aufgetrennt.

Anschließend wurde das Gel für 5 min mit der „Nicking“-Lösung und danach für 10 min in der Denaturierungslösung inkubiert. Nach dem Entfernen der Lösung wurde das Gel für den gleichen Zeitraum mit der Neutralisierungslösung behandelt.

Zur Durchführung eines Kapillar-Blots wurden eine Hybond-NX Nylonmembran (Amersham, Freiburg), 6 Whatman-Filter und ein Stapel von Papiertüchern (Höhe von ca. 5 cm) entsprechend der Größe des Gels zurechtgeschnitten. Auf eine flache Wanne, welche Blot-Puffer enthielt, wurde eine Glasscheibe gelegt. Außerdem wurde ein langer Streifen Whatman-Filter so auf die Scheibe plaziert, dass er mit beiden Seiten in den Blot-Puffer reichte. Darauf wurden das Gel, die in 2 x SSC getränkte Membran, drei Lagen getränktes Filterpapier, drei Lagen trockenes Filterpapier und der Stapel Papiertücher gelegt. Zum Abschluß kam eine weitere Glasplatte und ein Gewicht von ca. 500 g. Das Blotten erfolgte ÜN. Die Nylonmembran wurde nach dem Blotten kurz mit Wasser gewaschen und an der Luft getrocknet. Anschließend wurde sie mit UV-Licht bestrahlt (1200 mJ im Stratalinker von Stratagene, Heidelberg), um die DNA kovalent an die Membran zu binden.

Zur DNA-Detektion auf Southern Blot-Membranen wurde die Methode der nicht-radioaktiven Digoxigenin (DIG)-DNA-Markierung genutzt (Roche, Mannheim).

Die Herstellung und DIG-Markierung einer DNA-Sonde wurde mittels PCR durchgeführt.

PCR-Ansatz:

- 2 µl Template-DNA (5 ng genomische DNA von *C. albicans*/µl)
- 5 µl 10 x PCR-Puffer
- 2,5 µl 50 mM MgCl₂
- 2,5 µl 1 % W-1
- 5 µl 10 x DIG-dNTP-Mix (1 mM dATP, 1 mM dCTP, 1 mM dGTP, 0,625 mM dTTP, 0,35 mM DIG-11-dUTP)
- je 1 µl genspezifischer Primer (100 pmol/µl)
- 0,2 µl *Taq*-Polymerase (5 U/µl)
- ad 50 µl H₂O

Zur Kontrolle wurde ein PCR-Ansatz mit nicht markiertem dNTP-Mix angesetzt und die DNA in beiden Reaktionsansätzen mit dem Standard-PCR-Programm (2.2.5.1; Tab. 9) amplifiziert. Anschließend wurden die PCR-Produkte in einem Kontroll-Agarose-Gel aufgetrennt. Die DIG-Markierung ließ sich durch die etwas geringere Laufstrecke des PCR-Produktes im Vergleich zum Kontrollansatz erkennen, da sie das Laufverhalten der DNA aufgrund der angehängten DIG-Moleküle änderte.

Für die Hybridisierung von Southern Blot-Membranen wurde die Hälfte des DIG-markierten PCR-Ansatzes mit H₂O auf ein Endvolumen von 200 µl aufgefüllt. Der Ansatz wurde für 5 min bei 95 °C denaturiert und zu 30-50 ml Prähybridisierungspuffer gegeben.

Die Sonden konnten bei -20 °C aufbewahrt werden. Bei Wiederverwendung wurden sie für 10 min bei 100 °C erneut denaturiert.

Je nach Art der gewünschten Stringenz wurden verschiedene Prähybridisierungs-, Hybridisierungs- und Waschbedingungen gewählt. Die Detektion unter hochstringenten Bedingungen erfolgte bei 68 °C. Für weniger stringente Bedingungen wurden niedrigere Temperaturen gewählt.

Nach der DNA-Fixierung wurde die Membran in 6 x SSC angefeuchtet, für 3-5 h bei 68 °C bzw. 56 °C im vorgewärmten Prähybridisierungspuffer hybridisiert und anschließend ÜN bei gleicher Temperatur mit einer DIG-markierten Sonde, die zum Prähybridisierungspuffer gegeben wurde, hybridisiert.

Die Membran wurde nach der Hybridisierung abhängig vom gewünschten Grad der Stringenz wie folgt gewaschen: für niedrigstringente Bedingungen wurde die Membran zweimal für 5 min bei RT mit W1-niedrig und anschließend zweimal für 15 min bei 56 °C mit W2-niedrig gewaschen; für hochstringente Bedingungen wurde die Membran beim zweiten Waschschrift bei einer höheren Temperatur inkubiert und die beiden eingesetzten Lösungen besaßen eine niedrigere Salzkonzentration. Zuerst wurde die Membran für zweimal 5 min bei RT mit W1-hoch gewaschen. Danach wurde sie bei 68 °C mit W2-hoch für zweimal 15 min gewaschen. Anschließend wurde die Membran für 1 min in B1-Puffer bei RT inkubiert. Als nächstes wurden unspezifische Bindungsstellen blockiert. Hierfür wurde das Blockierungsreagenz B2 für 30 min bei RT eingesetzt. Dann wurde die Membran mit der Antikörperlösung für 30 min bei RT inkubiert. Es folgten drei Waschschriffe für 20 min bei RT mit der WP-Lösung. Die Membran wurde anschließend mit der B3-Lösung für 5 min bei RT äquilibriert. Nun wurde die Membran in einem PE-Schlauch 5 min mit CSPD-Lösung bei RT inkubiert (Lumineszenzreaktion). Ein Röntgenfilm wurde zunächst für bis zu 1-30 min aufgelegt und die Kassette bei 37 °C inkubiert. Nach der Entwicklung des Filmes wurde nach Bedarf ein weiterer Film länger oder kürzer exponiert. Um eine Membran nochmals mit einer neuen Sonde zu hybridisieren, wurde die Membran für 1 min in H₂O gewaschen. Daraufhin folgten zwei weitere Waschvorgänge mit einer „Strip“-Lösung für jeweils 10 min bei 37 °C. Abschließend wurde die Membran in 2 x SSC äquilibriert.

2.2.8.10.3 *In vitro* Analyse der *C. albicans*-Mutanten

Nach der Überprüfung der Mutanten mittels Southern Blot oder PCR wurden sie in verschiedenen *in vitro* und *in vivo* Tests analysiert. Zum einen wurde das Wachstum der *Candida*-Mutanten in verschiedenen Flüssigmedien (YPG und YNB-Tween 40) mit dem wt-Stamm SC5314 verglichen. Hierfür wurden die Hauptkulturmedien mit einer definierten Zellzahl aus einer ÜN-Kultur angeimpft. Die Endkonzentration betrug 10⁶ Zellen/200 µl Medium. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurde die Zelldichte am „Enzyme-linked immunosorbent assay“ (ELISA)-Reader (Dynatech MR4000, Dynatech Laboratories) bestimmt.

Außerdem wurde das Wachstum der Mutanten bei 37 °C in NuTRIflex® Lipid der Firma B. Braun Melsungen AG überprüft, welches in der parenteralen Ernährung eingesetzt wird (freundlicherweise von Fr. B. Solhdju, Firma B. Braun Melsungen AG, zur Verfügung gestellt). Hierfür wurde eine Zellkonzentration von 10⁶ Zellen/ml eingestellt. Die Zellzahl wurde zu verschiedenen Zeitpunkten mikroskopisch bestimmt.

Um die Flockung zu bestimmen (Liu *et al.*, 1996), wurden die Kulturen in YPG-Medium ÜN bei 37 °C kultiviert. Anschließend wurden die Proben gevortext und nach 1 min die Sedimentbildung festgehalten.

Neben den Wachstumsversuchen in Flüssigmedien wurden auch das Wachstum und der Phänotyp der Kolonien von generierten Mutanten und Revertanten auf verschiedenen Festmedien analysiert. Hierfür wurden der wt und die Mutanten in YPG ÜN bei 25 °C oder 30 °C kultiviert. Nach einmaligem Waschen mit H₂O wurden die verschiedenen Agar-Platten mit 10⁶ Zellen in 10 µl H₂O angeimpft. Es wurden maximal sechs Stämme auf einer Platte parallel getestet. Das Spider-Medium wurde mit 10-100 Zellen in 100 µl H₂O inokuliert, um einzelne Kolonien zu erhalten.

Des Weiteren wurden lipolytische Aktivitätstests durchgeführt. Hierfür wurden der wt und die verschiedenen Mutanten in der NuTRIflex® Lipid-Lösung in Erlenmeyer-Kolben mit Schikanen kultiviert. Die Inkubation erfolgte ÜN bei 37 °C und 180 rpm. Nach 24 h wurde die Zellzahl bestimmt und der Überstand entnommen, welcher auf sekretierte lipolytische Aktivität getestet wurde (2.2.8.12). Da keine Inhibitionsstudien erfolgten, wurden von jeder Probe insgesamt 500 µl direkt mit dem Reaktionsgemisch versetzt und für 2 h unter Schütteln bei 37 °C inkubiert. Ansonsten wurde analog zum Versuchsablauf verfahren, der unter Abschnitt 2.2.8.12 beschrieben ist. Es wurde mindestens eine Doppelbestimmung pro Ansatz durchgeführt.

2.2.8.10.4 Adhäsions- und „Damage“-Versuche mit *C. albicans*

Aus einer frischen Nabelschnur wurden Endothelzellen isoliert und in Kultur gebracht (durchgeführt von Fr. Phan; Harbor-UCLA, Los Angeles, USA). Die Zellen wurden zweimal passagiert, bevor sie in Adhäsions- und „Damage“-Versuchen zum Einsatz kamen.

Vor der Isolierung der Endothelzellen wurde die Nabelschnur mit EF-PBS gewaschen. Anschließend wurde die Hauptvene mit mindestens 30 ml EF-PBS durchgespült. Danach wurde sie mit einer Kollagenase-Lösung gefüllt und zugebunden. Die Nabelschnur wurde für 6 min bei 37 °C inkubiert. Dann wurde die Lösung in ein Falcon-Röhrchen überführt und die Nabelschnur ein zweites Mal gewaschen, wobei das zweite Eluat zum ersten gegeben wurde. Die Zellen wurden für 5 min mit 1050 rpm bei 25 °C pelletiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Endothelzellen in 4 ml M199 resuspendiert. Daraufhin wurden sie in einem gelatineüberzogenen Gefäß für 20 min inkubiert. Anschließend wurde das Medium entfernt und frisches hinzupipettiert. Die Zellen wurden am nächsten Tag erneut mit frischem Medium versorgt.

Danach erfolgte die Vorbereitung der Endothelzellen für den Adhäsionsversuch (Jaffe *et al.*, 1973; modifiziert). Hierzu wurden konfluente Endothelzellen nach der zweiten Passage mikroskopisch überprüft. Danach wurde das Nähr-Medium mit einer Pasteur-Pipette abgesogen und 1 ml 1 x Trypsin-EDTA hinzugegeben, geschüttelt und ebenfalls abgesogen. Der Vorgang wurde wiederholt, um die Zellen endgültig von der subendothelialen Matrix zu lösen, was mikroskopisch verfolgt wurde. Die Reaktion wurde mit 4 ml vorgewärmtem (37 °C) M199 abgestoppt.

Die Zellsuspensionen wurden gesammelt und für 5 min mit 1000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand bis kurz vor dem Zellpellet abgesogen. Die Zellen wurden in 2 ml frischen M199 pro Well resuspendiert und auf die Wells einer 6-Well-Zellkulturplatte verteilt.

Jeder Well der 6-Well-Zellkulturplatten aus Polypropylen wurde mit 1,5 ml 0,2 % Gelatine versetzt. Anschließend wurden die Platten ÜN bei 37 °C unter einer 5 %igen CO₂-Atmosphäre inkubiert oder es wurde nach mindestens 1 h Inkubation (37 °C unter einer 5 %igen CO₂-Atmosphäre) der flüssige Überstand mit einer Pasteur-Pipette (mittels Vakuumpumpe) abgesogen. Danach wurde die Suspension von Endothelzellen in M199 hinzupipettiert. Pro Platte wurden etwa zwei Gefäße mit konfluenten Passage 2 (P2)-Endothelzellen benötigt. Es folgte eine Inkubation ÜN, um die Zellanheftung zu gewährleisten. Am folgenden Tag wurden die Platten mikroskopisch überprüft. Abhängig von der Konfluenz wurde der Adhäsionsversuch am nächsten oder übernächsten Tag durchgeführt. Das alte Medium wurde entfernt und 1,5 ml frisches vorgewärmtes M199 hinzupipettiert.

Für den Adhäsionsversuch an Gelatine oder Endothelzellen (Ibrahim *et al.*, 1995) wurde eine ÜN-Kultur von verschiedenen *Candida*-Stämmen in 5 ml YPG angeimpft und bei 30 °C mit 200 rpm geschüttelt. Am nächsten Tag wurden die Zellen pelletiert (6 min, RT, 2500 rpm) und einmal mit 5 ml HBSS gewaschen. Anschließend wurde das Pellet in 10 ml HBSS ohne Phenolrot aufgenommen und für 5-10 s mit Ultraschall behandelt. Hiervon wurde eine 200fache Verdünnung in HBSS angesetzt. Nach einer Zellzahlbestimmung wurde eine weitere Verdünnung (100fach) durchgeführt. Abschließend wurde eine Konzentration von $1,8 \times 10^3$ Zellen/6 ml eingestellt.

Nun wurden die vorbereiteten 6-Well-Platten, die mit Gelatine oder Endothelzellen überzogen waren, für den Versuch vorbereitet. Im Falle der Endothelzellen erfolgte zuerst die mikroskopische Kontrolle, ob die Zellen konfluent gewachsen waren. Die Platten wurden nach Entfernen des Überstandes einmal mit 1,5 ml HBSS pro Well gewaschen. Danach wurden drei Wells pro *Candida*-Stamm mit je 1 ml der eingestellten Zellsuspension beimpft. Nach 30 min Inkubation (37 °C, 5 % CO₂) wurde jedes Well zweimal mit 10 ml HBSS gewaschen, um nicht-adhärenente Zellen wegzuspülen. Es wurde gleichzeitig gespült und mit einer Pasteur-Pipette abgesogen. Dann wurden 1,5 ml YPG-Agar (55 °C) pro Well hinzupipettiert. Die Platten wurden anschließend bis zur Auszählung der adhärenenten *Candida*-Zellen für zwei Tage bei 30 °C inkubiert.

Zusätzlich wurden dreimal 500 µl der endgültigen Zellsuspension in Petrischalen mit flüssigem YPG-Agar versetzt, um die „colony forming unit“ (CFU) bestimmen zu können. Die Adhäsion wurde in Prozent des ursprünglichen Inokulums ausgedrückt. Jeder Adhäsionsversuch wurde mindestens dreimal an unterschiedlichen Tagen durchgeführt.

Zur Durchführung des „Damage“-Versuches wurden pro *Candida*-Stamm drei Wells einer 96-Well-Mikrotiter-Platte (mit herausnehmbaren Streifen, die jeweils acht Wells besitzen) vorbereitet. Des weiteren wurden drei Wells für eine Kontrolle vorgesehen. Jedes Well wurde mit 150 µl Fibronectin (0,01 mg/ml) für 1 h bei 37 °C, 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend wurde der Überstand entfernt und 250 µl M199 mit Endothelzellen pro Well hinzugegeben. Nach einer Inkubation ÜN wurde das Medium entfernt und 200 µl M199 mit 30 µCi/ml Na₂⁵¹CrO₄ (ICN Biomedicals, Irvine, CA, USA) hinzupipettiert. Die Zellen wurden eine weitere Nacht mit dem radioaktiven Chromium inkubiert.

Von verschiedenen *Candida*-Stämmen wurde eine ÜN-Kultur in 5 ml YPG angeimpft und bei 30 °C mit 200 rpm geschüttelt. Am nächsten Tag wurden die Zellen pelletiert (6 min, RT, 2500 rpm) und zweimal mit 10 ml EF-PBS gewaschen. Anschließend wurde das Pellet in 10 ml HBSS ohne Phenolrot aufgenommen. Dann wurden 2 ml RPMI 1640 ohne L-Glutamin (Gibco BRL, Karlsruhe) mit 2,67 x 10⁵ Zellen/ml angesetzt.

Das Medium der vorbereiteten 96-Mikrotiter-Platte wurde mit einer Pasteurpipette abgesogen und anschließend jedes Well zweimal vorsichtig mit warmen HBSS gewaschen. Als Kontrolle wurden drei Wells mit 150 µl RPMI ohne Zellen versehen, um die spontane Freisetzung von ⁵¹Cr zu bestimmen, die ohne Einfluß von *C. albicans* freigesetzt wird. Pro *Candida*-Stamm wurden drei Wells mit der eingestellten Zellsuspension inokuliert. Nach 3 h Inkubation bei 37 °C wurden von jedem Well 75 µl des Überstandes abgenommen und in ein Glas-Teströhrchen gegeben. Das restliche Medium wurde in ein zweites Teströhrchen pipettiert, in welches anschließend das gesamte Well plaziert wurde. Danach wurde die Radioaktivität mit einem Gamma-Zähler bestimmt.

Die spezifische Freisetzung von ⁵¹Cr wurde nach folgender Formel berechnet:

$$^{51}\text{Cr} = \frac{(2 \times \text{Freisetzung im Experiment} - 2 \times \text{Spontane Freisetzung})}{(\text{Gesamte Inkorporation} - 2 \times \text{Spontane Freisetzung})}$$

2.2.8.10.5 Mauseinfektionen mit *C. albicans*-Mutanten

Generierte Lipase-Mutanten von *C. albicans* wurden in verschiedenen Mauseinfektionsmodellen bezüglich ihrer Virulenz getestet (durchgeführt von Frau Dr. M. Kretschmar).

Die intraperitoneale Mauseinfektion erfolgte wie unter 2.2.8.4 beschrieben. Es wurde die CFU vom wt in den Organen bestimmt. Des Weiteren wurde als Maß der Gewebeschädigungen die Aktivität der Alaninaminotransferase (ALT) der Leber im Blut gemessen.

Für eine intravenöse Mauseinfektion wurden die *Candida*-Zellen, wie unter 2.2.8.4 beschrieben, vorbereitet. Anschließend wurden Balb/c-Mäusen 2×10^5 Pilzzellen (wt oder Mutante) in die Schwanzvene injiziert.

Nach drei Tagen wurde die CFU in der Leber und nach drei bzw. sieben Tagen in den Nieren festgehalten. Zusätzlich wurde die Zahl letal infizierter Tiere während des Versuchs bestimmt.

Bei einer weiteren Mauseinfektion wurden 10^8 *Candida*-Zellen über eine Schlund-Sonde direkt in den Ösophagus von Balb/c-Mäusen appliziert. Nach 24 h wurden die Organproben in 10 % Formalin fixiert. Der Epithel-Übergang der Kardial-Antrum-Falte wurde genauer untersucht. Die histologischen Schnitte dieser Region wurden einer „Periodic acid-Schiff“ (PAS)-Färbung unterzogen. Eine leichte Gegenfärbung erfolgte mit Hemalaun (Staib *et al.*, 2002b).

2.2.8.11 Wachstumsstudien von *C. albicans* nach Applikation von Antisense-Oligonukleotiden

Antisense-Oligomere wurden gegen konservierte und genspezifische Bereiche der *LIP*-Gene entworfen (Tab. 6 und 7). Diese Oligonukleotide wurden in Wachstumsversuchen verwendet, um festzustellen, ob sie die Proliferation von *C. albicans* in einem Lipid-Medium hemmen können.

Zum einen wurden einfache Oligonukleotide sowie degenerierte Oligonukleotide eingesetzt, zum anderen Antisense-Oligonukleotide, die sogenannte Phosphothioat-Bindungen an ihren Enden haben. Eine Phosphothioat-Gruppe ist eine modifizierte Phosphatgruppe, in der ein Sauerstoff-Atom gegen ein Schwefel-Atom ausgetauscht wurde. Dieses modifizierte Rückgrat eines Phosphothioat-Oligonukleotids ist vor dem Abbau der meisten Endo- und Exonukleasen geschützt. Daher haben solche Oligonukleotide eine wesentlich längere Halbwertszeit (HWZ) als die herkömmlichen Oligonukleotide. Die verwendeten Oligonukleotide besaßen an ihren 5'- und 3'-Enden Phosphothioat-Bindungen. Somit waren die Oligomere gegen Exonukleasen resistent und hatten gleichzeitig ein natürliches DNA-Zentrum (Rozovskaia *et al.*, 1989).

Mit dem wt wurden Wachstumsversuche in Mikrotiter-Platten bei 37 °C durchgeführt. Als Medien wurden YPG, YNB-Tween 40 und YNB-Olivenöl eingesetzt, wobei eine Zellkonzentration von 5×10^6 Zellen/ml eingestellt wurde. Die Oligonukleotide wurden einzeln oder in verschiedenen Kombinationen direkt zum Kulturmedium gegeben, wobei das endgültige Volumen 150 µl bzw. 200 µl betrug. Als Kontrolle wurde nur H₂O zugegeben. Die Antisense-Phosphothioate wurden mit einer Ausgangskonzentration von 1000 pmol/µl eingesetzt und die restlichen Oligonukleotide wurden auf eine Konzentration von 100 pmol/µl eingestellt. Das Wachstum wurde mittels OD-Bestimmung bei einer Wellenlänge von 595 nm an einem ELISA-Reader verfolgt. Von jedem Ansatz wurde mindestens eine Dreifachbestimmung des Wachstums durchgeführt.

2.2.8.12 Aktivator- und Inhibitor-Studien

Lipase-Inhibitoren und -Aktivatoren (2.1.6) wurden bezüglich ihres Einflusses auf das Wachstum von *C. albicans* in Lipid-Medien (NuTRIflex[®] Lipid, YNB-Tween 40 und -Olivenöl) getestet.

Hierfür wurde eine Kolonie des klinischen Isolates SC5314 von *C. albicans* in 50 ml YPG-Medium angeimpft und ÜN bei 37 °C, 180 rpm inkubiert. Das Hauptkultur-Medium wurde mit einer definierten Zellzahl angeimpft. Anschließend wurde der Versuch entweder im Mikrotiter-Maßstab oder in einem Endvolumen von maximal 50 ml durchgeführt. Im Falle des Mikrotiter-Ansatzes wurden die Zellen in einer Mikrotiter-Platte mit Medium, Lösungsmittel oder verschiedenen Konzentrationen der zu untersuchenden Substanz versetzt. Das Endvolumen betrug 200 µl. Es wurde jeweils eine vierfache Bestimmung durchgeführt. Die Mikrotiter-Platte wurde bei 37 °C, 180 rpm inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurde die Zelldichte mittels ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 595 nm bestimmt. Falls das Medium selbst oder der eingesetzte Inhibitor das Auslesen am ELISA-Reader störte, wurde der Versuch in 50 ml-Kolben mit Schikane durchgeführt. Die Zellzahl wurde dann mikroskopisch ermittelt. Zur Kontrolle wurden alle Substanzen auch in einem Vollmedium (YPG) getestet.

Um den Einfluß von verschiedenen Substanzen, die eine Wirkung im Wachstumstest zeigten, auf die sekretierte lipolytische Aktivität von *Candida*-Kulturen zu untersuchen, wurde ein lipolytischer Aktivitätstest (Ran *et al.*, 1993; modifiziert) durchgeführt. Hierzu wurde zunächst eine YNB-Olivenöl-Hauptkultur angesetzt. Nach 24-48 h wurde die Kultur pelletiert. Es wurde mit dem Überstand, der auf Eis gelagert wurde, weiter gearbeitet. 450 µl des Überstandes wurden in einem 1,5 ml-Safelock-Reaktionsgefäß mit 50 µl Probe (H₂O, Lösungsmittel, Inhibitor oder Aktivator in verschiedenen Konzentrationen) versetzt. Als Kontrolle wurden ebenfalls Verdünnungen der Lipase von *Rhizopus arrhizus* (Sigma, Deisenhofen) mit den verschiedenen Substanzen (2.1.6) inkubiert. Nach 30 min Inkubation unter Schütteln bei 37 °C wurden 200 µl des Reaktionsgemisches hinzupipettiert. Es wurde mindestens eine Doppelbestimmung pro Probe durchgeführt.

Reaktionsgemisch

- 73 μl 10 mM α -Naphthylpalmitat (Sigma, Deisenhofen) in Dimethylformamid
- 30 μl 500 mM Citronensäure
- 83 μl 1 M Tris
- 17 μl H_2O
(pH 5,5; mit Tris bzw. Citronensäure einstellen)

Die Proben wurden für 1,5 h bei 37 °C geschüttelt. Die Reaktion wurde dann mit 325 μl 0,5 M NaOH gestoppt. Zur Detektion des freigewordenen Naphthols wurden 65 μl Fast Violet B-Lösung zugefügt. Die Lösung verfärbt sich bei vorhandener Lipaseaktivität orange bis rot. Die Lösung wurde anschließend für weitere 5 min bei 37 °C geschüttelt. Danach wurden 40 μl 20 % Triton X-100 zugegeben und erneut für 5 min bei 37 °C geschüttelt, um die Lösung aufzuklären. Es folgte eine fünfminütige Zentrifugation mit 12000 x g bei RT. Der Überstand wurde dann photometrisch in Kunststoffküvetten bei einer Wellenlänge von 520 nm vermessen.

3 Ergebnisse

3.1 Analyse der aus *LIP1-10* abgeleiteten Proteinsequenzen (Lip1-10)

C. albicans besitzt eine Genfamilie mit mindestens zehn Mitgliedern (*LIP1-10*), die für sekretierte Lipasen kodieren. Das erste Mitglied, Lipase-Gen1 (*LIP1*), wurde 1997 identifiziert (Fu *et al.*, 1997), drei weitere (*LIP2-4*) wurden 1998 durch Bossenz identifiziert. 2002 wurde das Genomprojekt (<http://www-sequence.stanford.edu:8080/contigs-to-blast6.html>) von *C. albicans* abgeschlossen. Durch Homologie-Vergleichsstudien konnten *LIP5-10* entdeckt werden. Diese Sequenzen wurden bereits 1999 als mögliche Lipase-Gene identifiziert und anhand von *in vitro* Expressionsstudien genauer charakterisiert. Außerdem wurden die Lipase-Gene *LIP5* und *LIP8* kloniert und sequenziert (Stehr, 1999).

Die Lipase-Gene *LIP6*, *LIP7*, *LIP9* und *LIP10* wurden mit den genspezifischen Primern LIP6pa-LIP6pb, LIP7pa-LIP7pb, LIP9pa-LIP9pb und LIP10pa2-LIP10pb (2.1.5, Tab. 8) mittels PCR aus genomischer DNA von SC5314 amplifiziert und in pGEM[®]-T kloniert (B112, B113, B114 und B115). Die anschließenden Sequenzierungen bestätigten die in der Stanford-Datenbank geführten Sequenzen für den in dieser Arbeit eingesetzten *C. albicans*-Stamm. Des Weiteren wurde *LIP3* nochmals mit neuen Primern (LIP3b und LIP3c; Melzer, 2002) mittels PCR amplifiziert und in den Vektor pCR-BluntII-TOPO kloniert (B42). Erneute Sequenzierungen der Lipase-Gene *LIP3* (AF191316) und *LIP8* (AF191321; B103) ergaben, dass bei den bereits publizierten Sequenzen Abweichungen vorlagen. Dementsprechend verändern sich die aus den DNA-Sequenzen abgeleiteten Proteinsequenzen.

Verglichen mit den Sequenzen der anderen Mitglieder der Lipase-Genfamilie von *C. albicans* ergibt sich nach dem derzeitigen Wissensstand folgendes überarbeitete Protein-Alignment (Abb. 8):

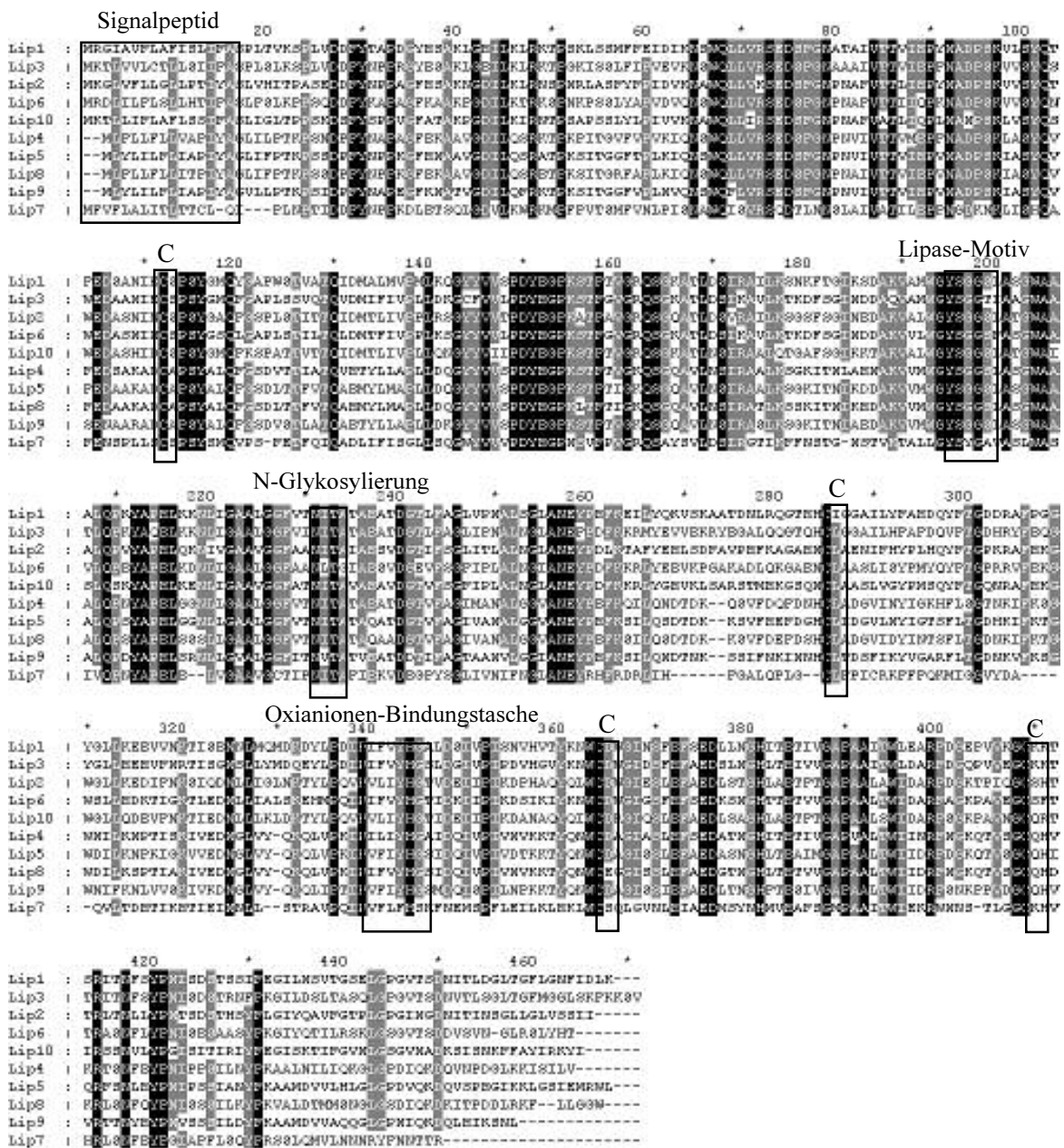


Abb. 8: Protein-Sequenzvergleich der aus den DNA-Sequenzen der zehn Lipase-Gene von *C. albicans* abgeleiteten Proteine, welcher mit dem Programm ClustalW erstellt und in dem Programm GeneDoc 2.1. (Nicholas & Nicholas, 1997) weiter bearbeitet wurde.

Signalpeptide, konservierte Lipase-Motive („GXSXG“-Motiv und Oxianionen-Bindungstasche), Cysteinreste sowie eine potentielle N-Glykosylierungsstelle sind mit einem Rahmen hervorgehoben. 100 % homologe Bereiche sind schwarz und 80-90 % homologe sind grau unterlegt.

Alle Lipase-Gene kodieren ein putatives Signalpeptid (von Heijne, 1986). Des weiteren zeigen die abgeleiteten Proteine vier positionell konservierte Cysteinreste und eine konservierte N-Glykosylierungsstelle. Ein weiteres wichtiges Sequenzmerkmal ist das „GXSXG“-Motiv der Serin-Hydrolasen, welches das nukleophile Serin der katalytischen Triade enthält.

Außerdem wurde die mögliche Oxianionen-Bindungstasche identifiziert, die sich nach der Konsensus-Sequenz „[PNTSVL]-[VIF]-[VIFL]-[VIFLM]-[VLCAISQ]-H-G“ ergibt (Bell *et al.*, 2002).

Die Isoenzym-Familie weist hohe Homologien unter den einzelnen Mitgliedern auf, was die relativen Verwandtschaftsverhältnisse im folgenden Dendrogramm widerspiegeln (Abb. 9).

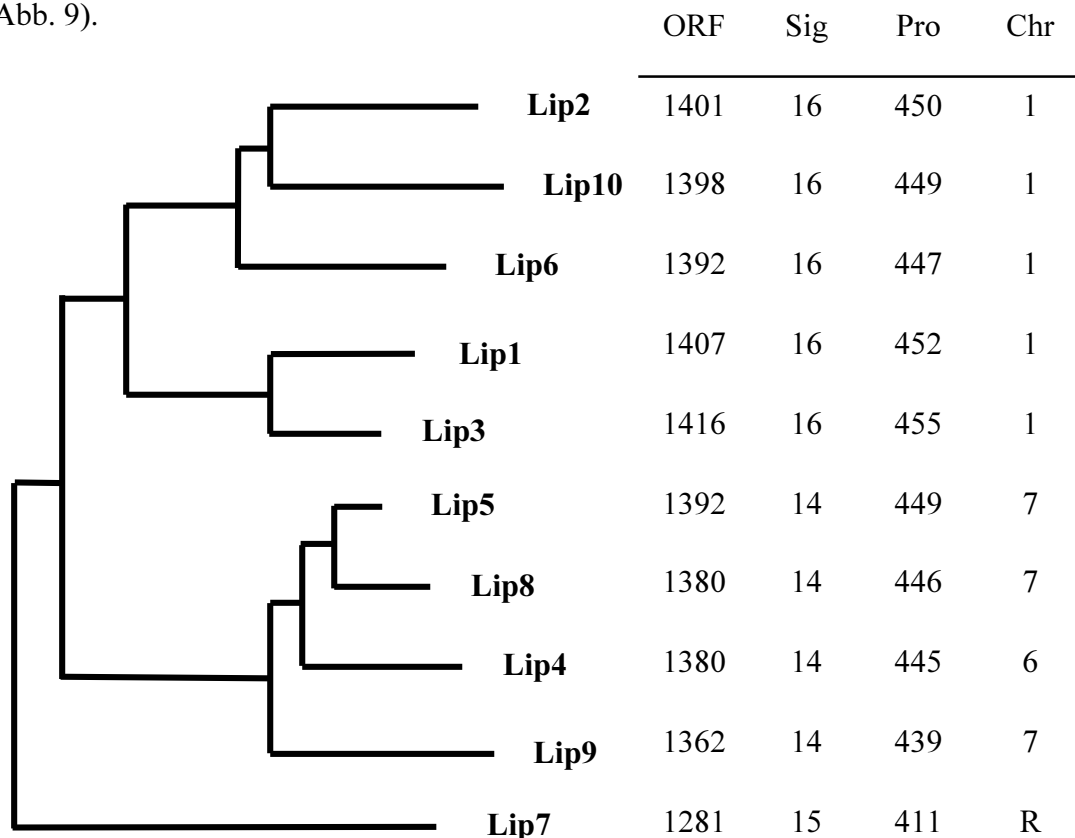


Abb. 9: Dendrogramm mit den abgeleiteten Lipasen von *C. albicans* (Lip1-10).

ORF: „Open reading frame“ der Lipase-Gene von *C. albicans* in Basenpaaren, Sig: Zahl der Aminosäuren des Signalpeptids bestimmt nach den „von Heijne Regeln“ (1986), Pro: Zahl der Aminosäuren des reifen Proteins, Chr: wahrscheinliche Chromosomenlokalisierung.

Die Lipase-Gene sind auf vier Chromosomen (1, 6, 7 und R) lokalisiert (Stehr, 1999). *LIP2* wurde im Fosmid 18D4 lokalisiert, welches sich auf Chromosom 1 befindet. *LIP9* liegt im gleichen Contig (6-2478) wie *LIP5* und ist somit wahrscheinlich auf Chromosom 7 lokalisiert.

Aufgrund der Homologien auf der Aminosäure-Ebene ist es möglich, die Isoenzym-Familie in drei Untergruppen aufzuteilen. Die erste Untergruppe mit *LIP1-3*, *LIP6* und *LIP10* weist Ähnlichkeiten der Aminosäure-Sequenz von mindestens 74 % auf (*LIP3* und *LIP10*; Anhang 2). Die zweite Gruppe beinhaltet *LIP4*, *LIP5*, *LIP8* und *LIP9* mit einer Ähnlichkeit von mindestens 85 % (*LIP8* und *LIP9*). Das Lipase-Gen *LIP7* bildet eine eigene Untergruppe. Nach den „von Heijne-Regeln“ (1986) besitzt dieses Protein ein Signalpeptid von 15 Aminosäuren. Das Signalpeptid der ersten Gruppe ist hingegen 16 Aminosäuren und das der zweiten Gruppe 14 Aminosäuren groß.

Für weitere Sequenzanalysen wurden mit dem Programm WinPep Version 1.2 (Hennig, 1999) Hydrophobizitäts-Plots von Lip1-10 erstellt, die nach Kyte und Doolittle (1982) berechnet wurden. Diese putativen sekretierten Lipasen besitzen am Anfang ihrer Sequenz einen hohen hydrophoben Peak (Abb. 10).

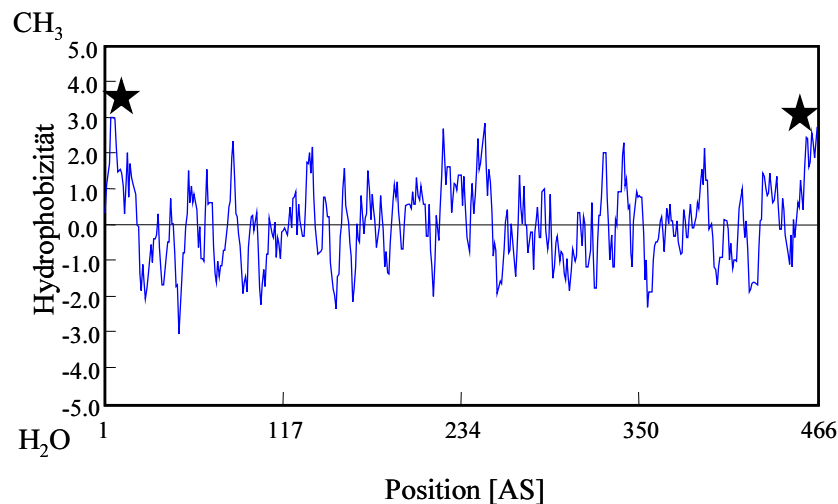


Abb. 10: Hydrophobizitäts-Plot von Lip2 nach Kyte und Doolittle (1982) berechnet. Die y-Achse zeigt die relative Hydrophobizität an. In der x-Achse ist die Position der jeweiligen Aminosäure (AS) angegeben. Peaks für das mögliche Signalpeptid und die GPI-Ankersequenz sind jeweils mit einem Stern gekennzeichnet.

Der Hydrophobizitäts-Plot von Lip2 weist im Gegensatz zu den Plots der anderen Lipasen zusätzlich am C-Terminus einen hydrophoben Peak auf.

3.2 Putative Gene im Genom von *C. albicans*, die für lipolytische Enzyme kodieren

Die Analyse des bis zum jetzigen Zeitpunkt veröffentlichten *C. albicans*-Genoms (<http://www-sequence.stanford.edu:8080/contigs-to-blast6.html>) ergab eine Vielzahl von möglichen, bisher nicht charakterisierten lipolytischen Enzymen des Pathogens (Tab. 14).

Tab. 14: Zusammenstellung von putativen bisher nicht-charakterisierten ORFs im Genom von *C. albicans*, welche möglicherweise für Proteine mit lipolytischen Eigenschaften kodieren.

Es sind die Nummer des Datenbankeintrags (contig) und die Lage im jeweiligen Abschnitt (Basenpaare) angegeben. Des Weiteren ist das „GX SXG“-Motiv aufgeführt, welches das nukleophile Serin enthalten könnte. Außerdem wird das Enzym mit „Accession“-Nummer genannt, welches die höchste Homologie zu dem untersuchten *C. albicans*-Protein aufweist. Es wird ebenfalls der E-Wert angegeben. Falls die höchste Homologie zu einem nicht-charakterisierten ORF von *S. cerevisiae* bestand, wurde zusätzlich das im Homologiegrad folgende charakterisierte Enzym mit aufgeführt.

Lipase-Motiv (GX SXG)	Contig (Basenpaare)	Homologie (Organismus, Accession-Nummer)	E-Wert	
GHSMG	6-1375 (1733-2476)	YOR3120w (<i>S. cerevisiae</i> , X94335) Triacylglycerol Lipase (lip) 2 (<i>Mycoplasma pneumoniae</i> , AE000035)	7,2e-30 0,0049	
	6-1898 (1271-2476)	YOR3120w (<i>S. cerevisiae</i> , X94335) Triacylglycerol Lipase (lip) 2 (<i>M. pneumoniae</i> , AE000035)	1,0e-39 0,019	
	6-2113 (3885-5294)	YGR110w (<i>S. cerevisiae</i> , Z72895) Acetyltransferase (<i>Caenorhabditis elegans</i> , U88315)	7,7e-47 1,2e-09	
	6-2236 (14397-13525)	YKL441 (<i>S. cerevisiae</i> , X71133) Putative Phospholipase (<i>Schizosaccharomyces pombe</i> , AL033406)	5,1e-20 9,7e-18	
	6-2322 (2952-3926)	YGR031w (<i>S. cerevisiae</i> , Z72816) Hypothetisches alpha/beta-Hydrolase Faltungsdomänen Protein (<i>S. pombe</i> , AL034565)	3,2e-50 5,4e-41	
	6-2446 (28145-27084)	YGR031w (<i>S. cerevisiae</i> , Z72816) Esterase (<i>Haemophilus influenzae</i> Rd, U32704)	7,0e-32 2,1e-24	
	6-2449 (14661-15572)	Homologie zur humanen Esterase D (<i>S. cerevisiae</i> , Z34288)	1,4e-74	
	6-2491 (8205-9119)	YJU3 (<i>S. cerevisiae</i> , X66245) Putative Lipase (<i>Deinococcus radiodurans</i> , AE001997)	9,7e-58 2,8e-19	
	GHSLG	6-1578 (1233-181)	Lösungsmittel-tolerante Lipase (<i>Fusarium heterosporum</i> , S77816)	2,7e-10
		6-2050 (3820-5613)	Konserviertes hypothetisches Protein (<i>C. albicans</i> , AL033391)	0,0
6-2370 (10971-13226)		OR26.12 (<i>S. cerevisiae</i> , X87331) Putative Phospholipase (<i>S. pombe</i> , AL023518)	1,1e-63 2,2e-37	
6-2401 (16488-14338)		Ydr444wp (<i>S. cerevisiae</i> , U33007)	3,4e-92	
6-2408 (25073-24072)		YJR107w (<i>S. cerevisiae</i> , Z49607) Lipase (<i>Thermomyces lanuginosus</i> , A74251)	7,2e-46 5,9e-19	
6-2483 (32479-31397)		Putative Methyltransferase (<i>S. pombe</i> , AL162692)	2,5e-43	
6-2493 (10091-7842)		YGL144c (<i>S. cerevisiae</i> , X99960)	4,4e-133	
GDSAG		6-1997 (4993-3650)	YGR263c (<i>S. cerevisiae</i> , Z73048) Acetylhydrolase (<i>Streptomyces hygroscopicus</i> , M64783)	2,1e-11 1,6e-07
	6-2028 (9289-8144)	YGR263c (<i>S. cerevisiae</i> , Z73048) lipF (<i>M. tuberculosis</i> , Z95390)	4,3e-09 0,00044	
	6-2218 (3605-2334)	Putative Esterase (<i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2), AL049841)	0,0097	
	6-2308 (7223-8458)	YGR263c (<i>S. cerevisiae</i> , Z73048) Acetylhydrolase (<i>S. hygroscopicus</i> , M64783)	6,3e-11 1,7e-08	

Lipase-Motiv (GX SXG)	Contig (Basenpaare)	Homologie (Organismus, Accession-Nummer)	E-Wert
GDSAG	6-2472 (32520-31270)	YGR263c (<i>S. cerevisiae</i> , Z73048) Putative Esterase (<i>S. coelicolor</i> A3(2), AL049841)	8,1e-12 1,1e-06
	6-2472 (40612-41856)	YGR263c (<i>S. cerevisiae</i> , Z73048) Putative Esterase (<i>S. coelicolor</i> A3(2), AL049841)	4,8e-12 4,0e-06
	6-2493 (46784-48007)	YGR263c (<i>S. cerevisiae</i> , Z73048) Putative Esterase (<i>S. coelicolor</i> A3(2), AL049841)	1,8e-10 2,3e-06
	6-2272 (3292-1475)	Phospholipase B Precursor (<i>C. albicans</i>)	0,0
GLSGG	6-2395 (9991-12042)	Phospholipase B (<i>S. cerevisiae</i> , L39372)	1,5e-63
	6-2449 (8669-10567)	Phospholipase B (<i>Torulaspota delbrueckii</i> , D32134)	1,0e-172
GFSQG	6-2136 (8710-7211)	Triglyceride Lipase-Cholesterol Esterase (<i>S. pombe</i> , AL031324)	1,9e-64
	6-2437 (29033-30655)	Triglyceride Lipase-Cholesterol Esterase (<i>S. cerevisiae</i> , Z25464)	1,2e-109
	6-2466 (4361-3456)	Putativer ORF (<i>S. cerevisiae</i> , X89514) Lysophospholipase (<i>Homo sapiens</i> , AF081281)	1,7e-44 2,8e-35
	6-2471 (40630-39680)	Palmitoylprotein Thioesterase Precursor (<i>C. elegans</i> , U50313)	1,7e-44
GHSFG	6-2342 (16858-15839)	Unbekannter ORF (<i>S. cerevisiae</i> , Z48758) Acetyltransferases (<i>C. elegans</i> , U88315)	2,6e-17 5,6e-08
	6-2490 (60623-59103)	Unbekannter ORF (<i>S. cerevisiae</i> , Z48758) Acetyltransferases (<i>C. elegans</i> , U88315)	3,4e-30 2,7e-08
	6-2506 (60996-62339)	Hypothetisches Protein (<i>S. pombe</i> , Z98603) Acetyltransferase (<i>C. elegans</i> , U88315)	3,3e-57 3,8e-23
	6-2119 (12415-11111)	YOR29-10 (<i>S. cerevisiae</i> , Z70678)	1,1e-31
GYSLG	6-2497 (59735-58764)	Carboxylesterase (est-3) (<i>Archaeoglobus fulgidus</i> , AE000943)	0,24
	6-2503 (1349-3019)	YOR29-10 (<i>S. cerevisiae</i> , Z70678)	2,7e-54
AHSMG	6-1789 (3375-4568)	YOR3120w (<i>S. cerevisiae</i> , X94335) Lysophospholipase Homolog (<i>H. sapiens</i> , U67963)	1,2e-27 4,0e-06
	6-2381 (14540-15931)	YGR110w (<i>S. cerevisiae</i> , Z72895) Acetyltransferase (<i>C. elegans</i> , U88315)	6,4e-61 3,1e-14
GFSYG	6-1295 (1479-232)	1,4-Butanediol Diacrylat Esterase (<i>Brevibacterium linens</i> , AB020733)	3,5e-60
	6-2044 (10092-8845)	1,4-Butanediol Diacrylat Esterase (<i>B. linens</i> , AB020733)	1,0e-60
GSSGG	6-1609 (1892-3946)	Phospholipase B (<i>S. cerevisiae</i> , L39372)	5,5e-66
GLSGS	6-1707 (964-3073)	Phospholipase B (<i>C. albicans</i> , AF045558)	3,7e-58
GGSYG	6-2117 (5008-4283)	YGR036c (<i>S. cerevisiae</i> , Z72821) Palmitoyl-Protein Thioesterase Precursor (<i>S. pombe</i> , AL023634)	2,6e-41 5,1e-22
	6-2118 (7477-6425)	YJR107w (<i>S. cerevisiae</i> , Z49607) Lipase (<i>F. heterosporum</i> , S77816)	3,2e-11 1,5e-10
GASMG	6-2209 (9102-10622)	Putative Serine O-Acetyltransferase (<i>Emericella nidulans</i> , AF029885)	9,8e-152
GSSSG	6-2471 (36528-35731)	Interaptin (<i>Dictyostelium discoideum</i> , AF057019) Phospholipase C (<i>Bos taurus</i> , J03137)	0,00028 0,00037

Lipase-Motiv (GX SXG)	Contig (Basenpaare)	Homologie (Organismus, Accession-Nummer)	E-Wert
GHSQG	6-2481 (29520-27817)	YLR020c (<i>S. cerevisiae</i> , Z73192) Triglyceride Lipase-cholesterol Esterase (<i>S. pombe</i> , AL021748)	6,9e-48 1,0e-26
SHSMG	6-2501 (52205-53260)	Triglyceride Lipase (<i>S. cerevisiae</i> , X98000)	7,1e-62
GHSV G	6-2507 (64353-65156)	Ydr428cp (<i>S. cerevisiae</i> , U33007) Putative Lipase/Esterase (<i>E. nidulans</i> , U34740)	3,0e-24 0,0025

Die identifizierten Proteine wiesen hohe Homologien zu bereits charakterisierten Lipasen, Phospholipasen, Transferasen und Esterasen auf.

Die im Contig 6-2370 (Basenpaare 10971-13226) identifizierte mögliche Phospholipase-Gensequenz (Tab. 14) wurde genauer untersucht (3.3). Sie wird im folgenden mit *PLA* (Phospholipase A-ORF) bezeichnet bzw., wenn das putative Protein gemeint ist, mit *Pla*.

3.3 Sequenzanalyse eines putativen Phospholipase A-Gens

Anhand der Sequenz, die in der Datenbank von Stanford geführt wird, wurden die Primer *PLAexp1* und *PLAexp2* konstruiert, um den gesamten putativen ORF des *PLA*-Gens mittels PCR zu amplifizieren und anschließend in pGEM-T[®] zu klonieren. Eine Sequenzierung des klonierten Fragments ergab die in Abb. 11 aufgeführte Sequenz. Das aus dem ORF abgeleitete theoretische Protein wurde hinsichtlich verschiedener Eigenschaften untersucht. Zunächst wurde versucht, ein mögliches Signalpeptid zu identifizieren, wie es bei sekretorischen Proteinen zu erwarten ist. Ein N-terminales Signalpeptid besteht aus drei unterscheidbaren Regionen: einer basischen N-terminalen Region, einer zentralen hydrophoben Region und einer polaren C-terminalen Region.

Die von von Heijne (1986) aufgestellten Regeln besagen, dass die Position direkt vor der Schnittstelle (-1) häufig eine kleine Aminosäure (A, S, G, C, T oder Q) darstellt, und, dass an der Position -3 keine aromatische, geladene oder große polare Aminosäure anzutreffen sein darf. Zusätzlich wurde die Sequenz nach Kex2-Schnittstellen überprüft. Die Erkennungssequenzen der prozessierende Kex2-Protease zeichnen sich durch ein dibasisches Aminosäure-Motiv (KR, KK oder RR) aus (Fuller *et al.*, 1988). Außerdem wurde das abgeleitete Protein auf mögliche N-Glykosylierungsstellen „NXS/T“ (Steiner *et al.*, 1980) und konservierte Sequenzmotive von lipolytischen Enzymen untersucht.

```

1      ATGAAAGTTCATTAGCCACCTTCTCAAATCTATCTGGGTATACTACTTTAAGACGTTCA
1      M K V L L A T F S N L S G Y T T L R R S
61     TGGAGTCTACAGTATACATTTTGGAGGTTATTTCCATTTCCACGCGTCACGTTCTGCT
21     W S L Q Y T F L R L F S I S P A S R S A
121    AAAGAACTACTACA CTGCAAACAGTTAAACATAAAGTTCGATGGTTTTATGCG CTG GAC
41     K E T T T S Q T V K H K V R W F Y A S D
181    GTTCCCATTTCTAAGCCCCGAATGGTACAAATACGAGAAAGTCAAAGAGCCAGAATCTTTT
61     V P I S K P E W Y K Y E K V K E P E S F

```

241 ATACCATTTTCAGAGTATGATTCAAAGCAACTTGAACGTGAATTCTCAAAAACAGAACGC
81 I P F S E Y D S K Q L E R E F S K T E R

301 AATCTTGTGGAAGTAAATGAAGACAAATGTTTCAAGTTGATTTAAAGAATTTTGTAGCTA
101 N L V E V N E D K L F Q V D L K N F E L

361 TCACCAATATACTGGGATGGACCAATTTACGAAGTTCGAAGAGGCTTATGGTTTAATTCA
121 S P I Y W D G P I Y E V **R R** G L W F N S

421 GATGGAATGCCCTTGAAGGCAGAATTAAGTAAAGAAATCGAAGAAGGGTTTCAGAGATTA
141 D G M P L K A E L T K E I E E G F Q R L

481 AAACCGTACACTTATGAAAGCGCAAATGAAGAACAATAAAAAACGACAAAAGTAATAAA
161 K P Y T Y E S A N E E Q I K T T K S N K

541 GAGAAAATCTCCACATTCAACAAATTGAAACAAGACACGCAACAGAGATAAAAATTGAT
181 E K I S T F N K L K Q D T Q T E I K I D

601 TTAGATAAGCAAAAGGATGTTATCAGATTGAGTAACGGCGAATTAGTGTGTACTTTAAC
201 L D K Q K D V I R L S N G E L V L Y F N

661 AAAGATCAAGCTGTAATGTTTCCCGGAGATTATGATTCTGAATTCCAAATTGATGTAATT
221 K D Q A V M F P G D Y D S E F Q I D V I

721 CGATATTTTGGACCAAAGCCAGTCTCTTTGTTGGGAGTTAATCATATTCAACGTGGGTAT
241 R Y F G P K P V S L L G V N H I Q R G Y

781 TCAGAAGAACTCAAAGAATCATTTTTTGACAACTATCTAAAAACCTCTACCGGAATA
261 S E E L K E S F F D K L S K N P L P G I

841 TCTGATGCATTTAAAGAAGATTTTGGTTCAATAATTGGAGGC AAAAGGATTCAAACAAG
281 S D A F K E D F G S I I G G **K K** D S **N K**

901 ACCAACGAGGATGAAATGAGTGATGTTAATGAATTGGATGACATAAATATGCAGAAGTAT
301 **T** N E D E M S D V N E L D D I N M Q K Y

961 TTGGAGTCTGACTATGATTTAGAAACTTCAAATCAAAGTCCAATCGTGAATTTGACCAT
321 L E S D Y D L E T S K S K S N R E I D H

1021 TTAGTTTTCTGTATTCATGGAATTGGACAAGTTTTGGGAACATAAATATGAATCTGTTAAC
341 L V F **C** I H G I G Q V L G T K Y E S V **N**

1081 TTCACGCATAGTATAAATGTGTTGAGGAACACAATGAAGGGTGTTTTTGAACAAAATGAG
361 **F T** H S I N V L R N T M K G V F E Q N E

1141 GAATACCAAAAAGTTGGCAAATCTAACTCAGAAGAGCACGATAACACTAACAACAGAATT
381 E Y Q K L A N S N S E E H D N T N N R I

1201 CAGGTCTTACCCATCTCGTGGAGACATCGTATTGGTTTCAATCCTCAACAAGAAATTAAT
401 Q V L P I S W R H R I G F N P Q Q E F N

1261 GCTCAAC**CTG**CCCTCTAGATTGCCAACATTATCTCAGATAAACGTCGAAGGTATT**CTG**GCT
421 A Q **S** P S R L P T L S Q I N V E G I **S** A

1321 TTGCGAGATGTTGTGGTGACGTAGTATTGGATGTTCTATTGTTTTACCAACCTAGGTAT
441 L R D V V G D V V L D V L L F Y Q P R Y

1381 TTAAAAGAAATCATGAGTACAGTAACTTCGGAATTGAATCGTGTGTACAACTATATCTT
461 L K E I M S T V T S E L N R V Y K L Y L

1441 GAAAAGAATCCAGATTTTAAAGGGAAGGTTTCATATCTTGGGACATTCTTTAGGTTFCAGCG
481 E K N P D F K G K V H I L **G H S L G** S A

1501 ATTGCGTTTGATATTTTATCTAAGCAAAGTAGTTCGTTGGACGGGCCACTTAAAATTGAT
501 I A F D I L S K Q S S S L D G P L K I D

1561 AAAGACTTGGCTTTCGATGTTAACAGTTTATTTCTTGTGGGTCTCCAGTTGGTATGTTTC
521 K D L A F D V N S L F L V G S P V G M F

1621 AAATTGTTGGAAGAGAAGAATATTGTGGGAAGAGACTCCAAAAGTTTTGTACCCCTCACAA
541 K L L E E K N I V G R D S K S F V P S Q


```

1681      GATGATACTTTCGCTTCCCCTAAATGTGTGAATTTGTACAACATCTTCCATCCATGCGAT
561      D D T F A S P K C V N L Y N I F H P C D

1741      CCAGTTGCATATAGAATCGAGCCTTTAGCTTCACCATCATTGGAAATTATAAACCCGTT
581      P V A Y R I E P L A S P S F G N Y K P V

1801      GATATTCAATCTGCAGTAAAGGGGCTCAACTCAATTCAAGGAATTGTCAAATTTTGG
601      D I Q S A V K G L N T Q F K E L S N F G

1861      GACGAAATATCAGAAAAGATTTCAATTTGCAACAAAATGGTTGGCTTCCAGTAAAAGTGAT
621      D E I S E K I S F A T K W L A S S K S D

1921      GAAACTGAAAAAATATTGAAGAAAGAACAACAAAGAAAATGCTCTCGGTGATATAATT
641      E T E K T I E E R T N K E N A L G D I I

1981      AAGGGGGTTGTAATGTCCGATGAGACTGACCAGGATCAAAAAGGGTTGAAGAAAAGGTT
661      K G V V M S D E T D Q D Q K G L K K K V

2041      ATTCTGGGGGGAGCTTTGTCCAAAATGACAAGCTTAAATATGACTGGAAGAATGGATTAT
681      I S G G A L S K M T S L N M T G R M D Y

2101      AGCTTGCCTCTTGGGGTATTCGATGTTTCATTAGTATCGGCTATCAGTGCCCATATCTCC
701      S L P L G V F D V S L V S A I S A H I S

2161      TACTTTGAAGATGAAAATACCGCTGGATTTATTCTAAAGGAATTATTGGCTAACAGAAGT
721      Y F E D E N T A G F I L K E L L A N R S

2221      ACCCCCGTAGAAGAAACTACTGTTACATCAAAGTAG
741      T P V E E T T V T S K *

```

Abb. 11: Die Nukleotidsequenz des ORFs des *PLA*-Gens von *C. albicans* und die abgeleitete Aminosäuresequenz.

Ein Balken kennzeichnet das putative Signalpeptid. Die mögliche Schnittstelle für die Abspaltung des Peptids ist mit einem Pfeil markiert. Für die Charakterisierung von *PLA* wichtige Sequenzabschnitte (z.B. korrigierte CTG-Codons und Cysteine), sind kursiv und fett gedruckt. Das Lipase-Motiv „GXSXG“ ist eingerahmt. Mögliche N-Glykosylierungsstellen sind fett und unterstrichen dargestellt. Putative Erkennungssequenzen für Kex2 sind mit fettgedruckten Buchstaben gekennzeichnet.

Der ORF von *PLA* besitzt insgesamt 2256 bp mit einem G+C-Gehalt von 36 % und kodiert für ein theoretisches Protein mit 751 Aminosäuren und einem theoretischen Molekulargewicht von 85,4 kDa. Der kalkulierte isoelektrische Punkt liegt bei pH 5,25. Die ersten 39 Aminosäuren stellen ein mögliches Signalpeptid dar (von Heijne, 1986), nach dessen Abspaltung ein reifes Protein von 712 Aminosäuren und einem theoretischen Molekulargewicht von 80,9 kDa vorliegt. Der isoelektrische Punkt würde sich auf einen Wert von pH 5,03 verändern. Die Cysteinreste liegen an den Positionen 344, 569 und 579. Insgesamt wurden fünf CTG-Codons in Serin übersetzt (2.2.1). Des Weiteren konnten vier mögliche N-Glykosylierungsstellen identifiziert werden. Das Lipase-Motiv „GXSXG“ (GHSLG) befindet sich am Sequenzabschnitt 484-488.

Eine Protein-Blast-Suche hat gezeigt, dass das vom *PLA*-Gen abgeleitete Protein (Pla) hohe Sequenzhomologien zu Phospholipasen aufweist. Die Proteine mit den höchsten Homologien werden im folgenden Alignment gezeigt (Abb. 12):

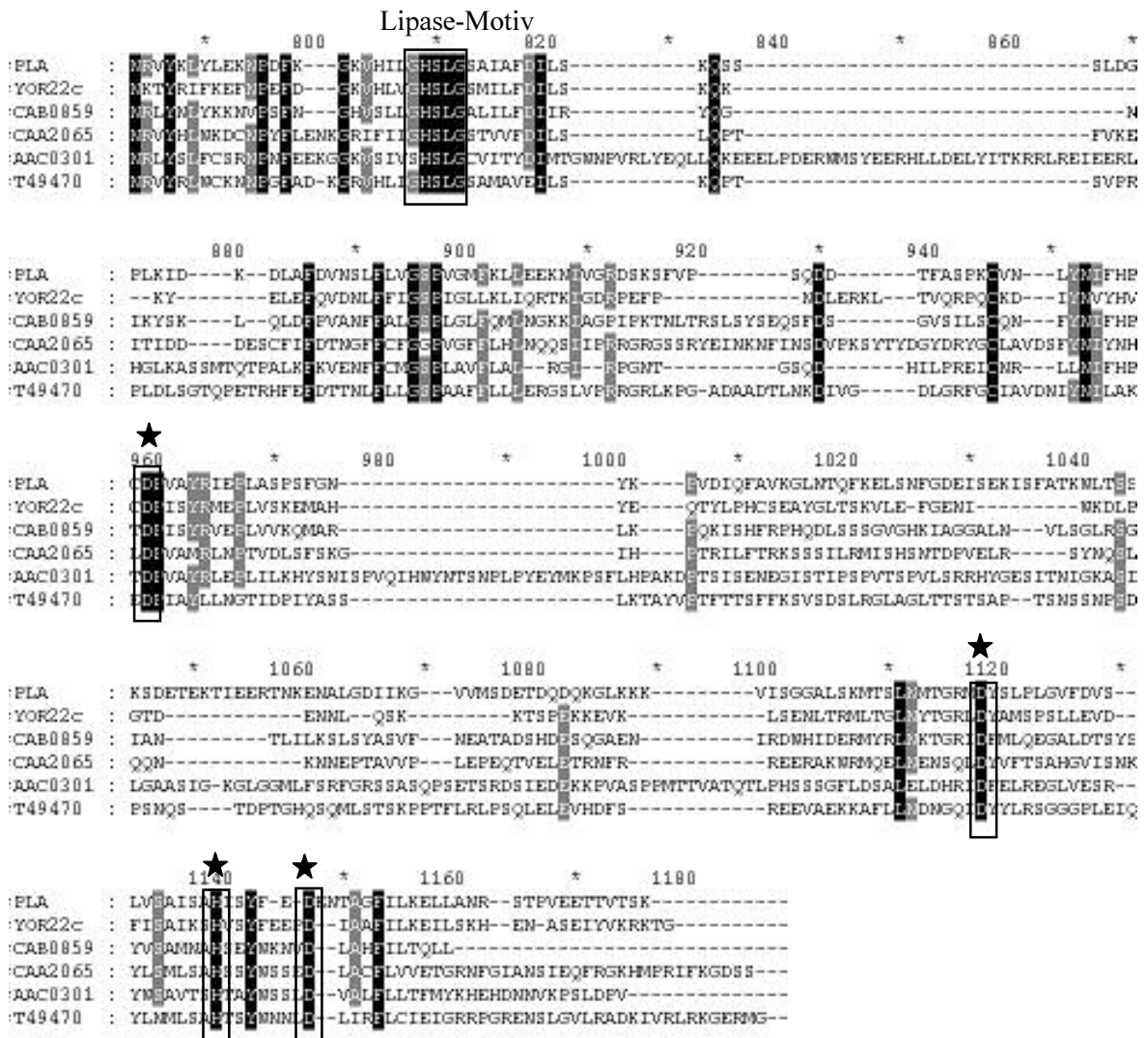


Abb. 12: Sequenzvergleich des aus der PLA-Sequenz von *C. albicans* abgeleiteten Proteins mit homologen Proteinen, welche in einer Protein-Blast-Suche identifiziert wurden.

Es wird hier der C-Terminus der Proteine gezeigt. Das Lipase-Motiv „GX SXG“ ist mit einem Rahmen hervorgehoben. Aminosäuren, die möglicherweise eine Metall-Bindungsstelle bilden (DDHD-Domäne), sind umrahmt und mit einem Stern gekennzeichnet. 100 % homologe Bereiche sind schwarz und 80-90 % sind grau unterlegt. PLA: vom PLA-Gen abgeleitetes *C. albicans*-Protein, YOR22c: putatives Protein von *S. cerevisiae*, CAB0859: hypothetisches Protein von *Schizosaccharomyces pombe*, CAA2065: hypothetisches Protein von *S. pombe*, AAC0301: PA-Pla₁ von *Bos taurus*, T49470: putatives Protein von *Neurospora crassa*.

Die höchste Ähnlichkeit mit 51 % (und 33 % Identität) besteht zu einem putativen Protein von *S. cerevisiae* (YOR22c). Des Weiteren gehören zu dieser putativen Phospholipase-Familie die hypothetischen Proteine CAB0859 und CAA20658 von *Schizosaccharomyces pombe* sowie die Phosphatidat-bevorzugende Phospholipase A₁ von *Bos taurus* (AAC0301) sowie das verwandte putative Protein von *Neurospora crassa* (T49470).

Weiterhin konnte in der Aminosäuresequenz eine putative DDHD-Domäne (PF02862) identifiziert werden (Lev *et al.*, 1999). Diese Domäne ist ca. 180 Aminosäuren lang und besitzt vier konservierte Reste, nämlich drei Aspartatreste und einen Histidinrest, welche eine mögliche Metall-Bindungsstelle bilden könnten. Die DDHD-Domäne kommt bei „Retinal degeneration B“-Proteinen und putativen Phospholipasen vor.

3.4 Southern Blot-Nachweis des *PLA*-Gens bei *C. albicans* und anderen *Candida*-Arten

Um festzustellen, ob außer dem *PLA*-Gen noch weitere Isogene in dem Genom von *C. albicans* existieren, wurde zusätzlich zu den *in silico* Analysen eine Southern Blot-Analyse (2.2.8.10.2) durchgeführt. Eine solche Überprüfung erschien sinnvoll, da bereits mehrere Genfamilien im Genom entdeckt wurden: die der sekretorischen Lipasen (Stehr, 1999), der sekretorischen Aspartat-Proteasen (Hube & Naglik, 2001), der „Multidrug Resistance Genes“ (*MDR*) (Morschhäuser, 2002), der Glucose-Transporter (Fan *et al.*, 2002) und der „Agglutinine-like Sequences Genes“ (*ALS*) (Magee & Scherer, 1998).

Anhand der *PLA*-Sequenz wurden spezifische Primer entwickelt (*PLA1* und *PLA2*; 2.5.1; Tab. 8), mit denen eine DIG-markierte Sonde hergestellt wurde (2.2.8.10.2). Die Sequenz der Gensonde entsprach dem Bereich Basenpaar-Nummer 997 bis 1623 des ORFs von *PLA*. Die *PLA*-Sonde sollte sowohl unter hochstringenten, als auch unter niedrigstringenten Bedingungen eingesetzt werden. So konnte zum einen festgestellt werden, ob die Sonde spezifisch war, und zum anderen ob homologe Gene bei *C. albicans* und anderen *Candida*-Arten vorhanden sind.

Für die Restriktionen der genomischen DNA verschiedener Pilzspezies wurde *HindIII* ausgewählt, da eine Überprüfung der *PLA*-Sequenz ergab, dass dieses Enzym außerhalb des Gens schneidet und somit eine einzige Bande für *C. albicans* erwartet wurde. Die Southern Blot-Analyse, die unter hochstringenten Bedingungen erfolgte (Abb. 13A), führte zu dem Ergebnis, dass nur die Restriktionen der genomischen DNA von *C. albicans* und *C. dubliniensis* ein Signal aufwiesen. Diese einzeln vorkommenden Fragmente besaßen die gleiche Laufhöhe. Somit wurde gezeigt, dass die Sonde spezifisch war. Anschließend wurde die Membran unter niedrigstringenten Bedingungen hybridisiert (Abb. 13B).

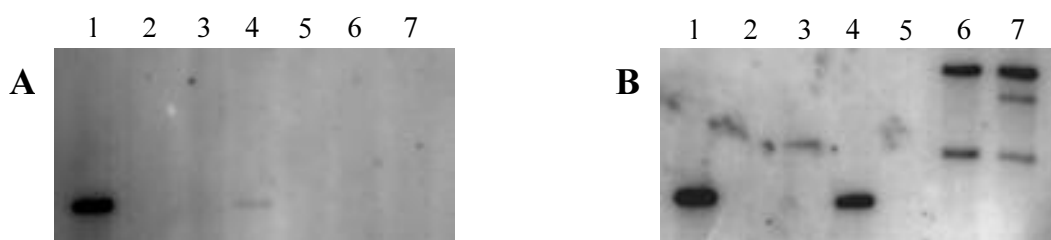


Abb. 13A&B: Southern Blot-Analyse vom *PLA*-Gen in verschiedenen *Candida*-Arten.

Die DNA-Restriktionsverdau wurden mit der *PLA*-Sonde unter hochstringenten Bedingungen (A) und unter niedrigstringenten Bedingungen (B) hybridisiert. *HindIII*-Verdau von: *C. albicans*-wt (Spur 1), *C. krusei* 1900 (Spur 2), *C. parapsilosis* 4237 (Spur 3), *C. dubliniensis* CBS 8501 (Spur 4), *C. glabrata* 332 (Spur 5), *C. tropicalis* C8 (Spur 6) und *C. tropicalis* C31 (Spur 7).

Erneut konnte bei den Restriktionsverdauen von *C. albicans* und *C. dubliniensis* jeweils nur ein Signal detektiert werden. Ferner ließ sich auch im Genom von *C. parapsilosis* ein Fragment nachweisen, wobei diese Bande jedoch auf einer anderen Laufhöhe lag. Bei den Restriktionen von *C. glabrata* und *C. krusei* konnten mit der *PLA*-Sonde keine Signale detektiert werden. Abhängig vom Stamm wurden bei *C. tropicalis* zwei bzw. drei *HindIII*-Banden nachgewiesen.

3.5 *In vitro* und *in vivo* Expressionsstudien des *PLA*-Gens von *C. albicans*

3.5.1 Untersuchung der Transkription des *PLA*-Gens von *C. albicans* während des Wachstums in Urea-Medium

Um die Expression des möglichen Phospholipase A-Gens im Urea-Medium zu ermitteln, wurde das genspezifische Primer-Paar PLA1-PLA2 eingesetzt. Der Wachstumsversuch von *C. albicans* und die Probenentnahme zur Erstellung des Expressionsprofils mittels RT-PCR (Abb. 14) erfolgten wie unter 2.2.8.2 beschrieben.

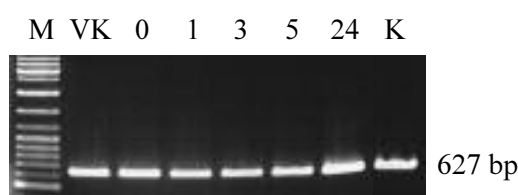


Abb. 14: RT-PCR-Analyse der Expression von *PLA* von *C. albicans* im Urea-Medium. M: Molekulargewichtsmarker, VK: Probe der Vorkultur und K: genomische DNA von *C. albicans*. Die Angaben über den restlichen Spuren entsprechen den Zeitpunkten der Probenentnahmen in Stunden.

Das *PLA*-Gen wurde über den gesamten untersuchten Zeitraum von *C. albicans* im Urea-Medium konstitutiv exprimiert.

3.5.2 Untersuchung der Transkription des *PLA*-Gens von *C. albicans* während der Infektion von künstlicher oraler und vaginaler Schleimhaut und in Patientenproben

Um festzustellen, ob die putative Phospholipase A von *C. albicans* an der Besiedlung und Invasion unterschiedlicher humaner Gewebe beteiligt sein könnte, wurden experimentelle Infektionen an künstlichen Hautmodellen durchgeführt. Die Infektion erfolgte wie unter 2.2.8.3 beschrieben. Die zeitliche Regulation der Transkription des Phospholipase-Gens *PLA* wurde während dieser Infektionen mittels RT-PCR analysiert (Abb. 15A&B). Um den Expressionsstatus von *PLA* zu ermitteln, wurden während der RHE-Infektion nach 12 h, 36 h und 48 h Proben genommen. Beim vaginalen Schleimhaut-Modell wurden nach 12 h und 24 h Proben analysiert.

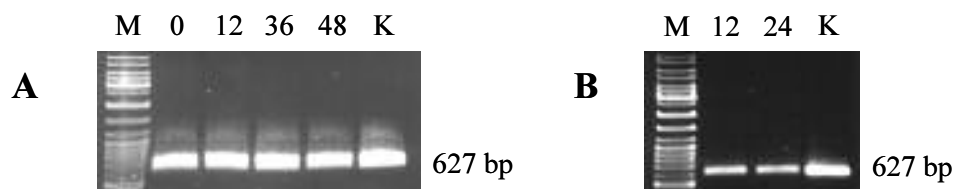


Abb. 15A&B: RT-PCR-Analyse der Expression des *PLA*-Gens von *C. albicans* während einer Infektion des RHE-Modells und des vaginalen Schleimhaut-Modells. Das Epithel wurde mit dem klinischen Isolat SC5314 inokuliert. Proben wurden nach 12 h, 36 h und 48 h vom RHE-Modell (A) und nach 12 h und 24 h vom vaginalen Schleimhaut-Modell (B) genommen. M: Molekulargewichtsmarker und K: genomische DNA von *C. albicans* (Kontrolle). Die Angaben über den restlichen Spuren entsprechen den Zeitpunkten der Probenentnahmen in Stunden.

In beiden Schleimhaut-Modellen wurden während der gesamten Infektionszeit Transkripte des *PLA*-Gens nachgewiesen.

Zwei Zellproben von Patienten mit Candidose wurden bezüglich der Transkription des *PLA*-Gens von *C. albicans* untersucht (2.2.8.5). Eine analysierte Stuhl-Probe ergab keine nachweisbare Expression des *PLA*-Gens. Dafür zeigte eine Probe von vaginaler Schleimhaut bezüglich der Transkription von *PLA* ein positives Ergebnis. Beide Proben ergaben ein deutliches Signal in einer Kontroll-PCR (Tab. 13) in der Transkripte des *EFB1*-Gens nachgewiesen wurden.

3.6 Expression der Lipase-Genfamilie von *C. albicans* unter verschiedenen *in vitro* Bedingungen

Um die Expression der Lipase-Genfamilie in bisher nicht getesteten Flüssigmedien zu ermitteln, wurden genspezifische Primer-Paare (LIP1a-LIP1b, LIP2a1-LIP2b1, LIP3a2-LIP3b2, LIP4a-LIP4b, LIP5a2-LIP5b2, LIP6a-LIP6b, LIP7a2-LIP7b, LIP8a-LIP8b, LIP9a-LIP9b und LIP10a2-LIP10b2; 2.5.1, Tab. 8) eingesetzt.

3.6.1 Untersuchung der Transkription der Gene *LIP1-10* von *C. albicans* während des Wachstums in Urea-Medium

Es wurden 50 ml Urea-Medium mit semisynchronisierten wt-Zellen auf eine Konzentration von 5×10^6 Zellen/ml eingestellt. Dieses Medium entspricht in seiner Zusammensetzung dem menschlichen Harn (persönliche Mitteilung von Frau Prof. M. Hostetter). Während einer systemischen Infektion ist *C. albicans* in der Lage, die Nieren zu befallen. Dabei wird der Pilz u.a. auch dem Harn ausgesetzt. Zur Analyse der zeitlichen Regulation der Lipase-Gene in diesem Medium wurden in bestimmten Zeitabständen unter sterilen Bedingungen Proben von der Kultur entnommen, welche anschließend pelletiert wurden. Aus den Pellets wurde die RNA isoliert und die Konzentration ermittelt (2.2.8.7). Im Rahmen einer RT-PCR wurde von der RNA cDNA synthetisiert und amplifiziert (2.2.8.8). Zunächst wurde eine PCR mit Primern durchgeführt, die flankierend zu einem Intron spezifisch im Gen *EFB1* (Maneu *et al.*, 1996) hybridisierten, um festzustellen, ob eine genomische DNA-Verunreinigung vorlag. Zusätzlich lieferte die Kontroll-PCR die Information, inwieweit die RT-PCR erfolgreich war, da mit dem Elongationsfaktor ein konstitutiv exprimiertes Gen nachgewiesen wurde. Da keine genomischen DNA-Verunreinigungen nachgewiesen wurden, konnten die Proben mit sequenzspezifischen Primern auf die verschiedenen Lipase-Transkripte getestet werden (Abb. 16A-K).

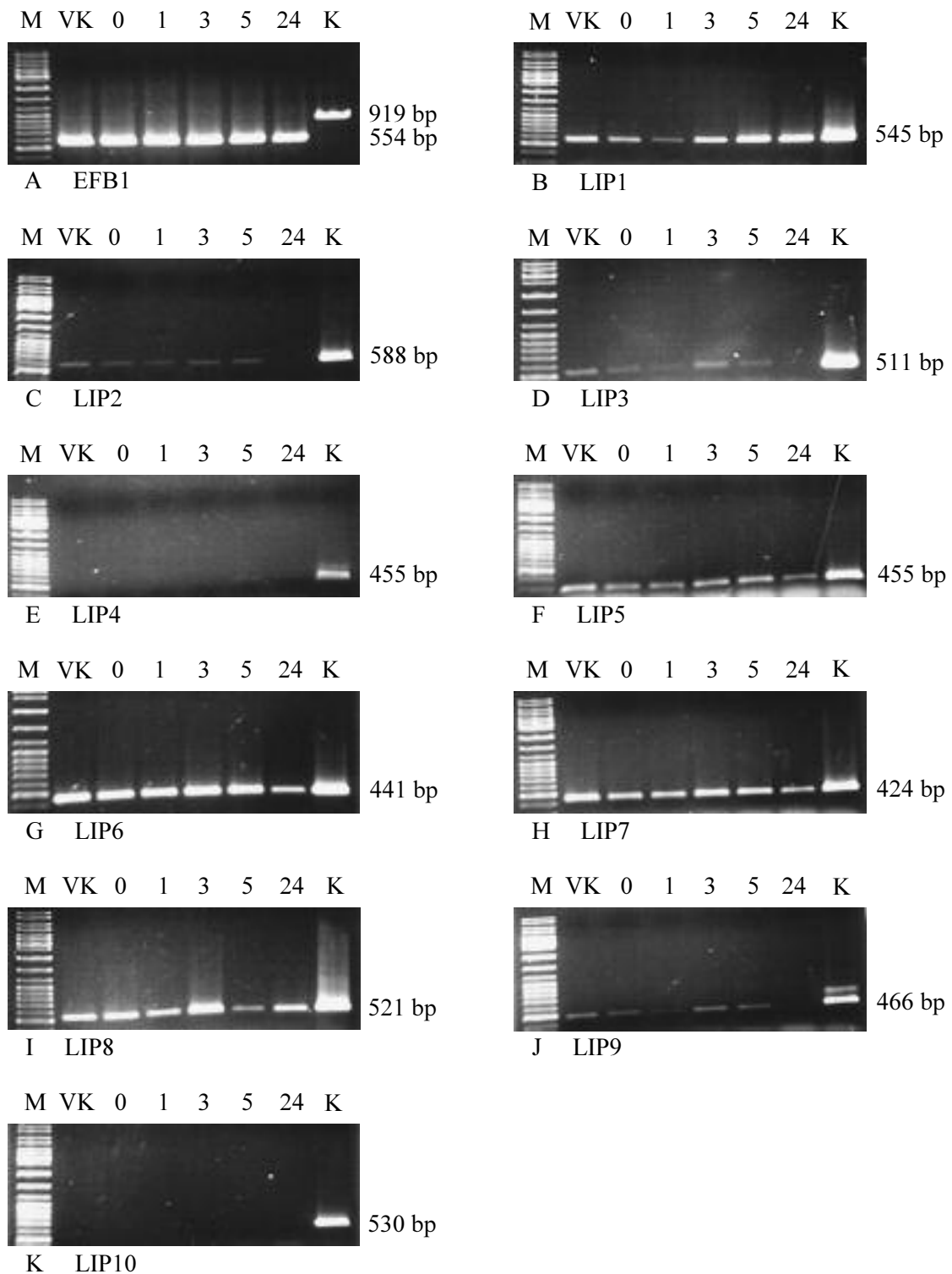


Abb. 16A-K: RT-PCR-Analyse der Expression von *EFB1* und *LIP1-10* von *C. albicans* im Urea-Medium.

M: Molekulargewichtsmarker, VK: Probe der Vorkultur und K: genomische DNA von *C. albicans* (Kontrolle). Die Angaben oberhalb der restlichen Spuren entsprechen den Zeitpunkten der Probenentnahmen in Stunden. Der Versuch wurde zweimal durchgeführt.

Die Lipase-Gene *LIP1* und *LIP5-8* wurden über den gesamten untersuchten Zeitraum von *C. albicans* im Urea-Medium exprimiert. Von *LIP10* konnten keine Transkripte nachgewiesen werden.

Nach 24 h konnte keine Expression der Lipase-Gene *LIP2*, *LIP3* und *LIP9* mehr beobachtet werden, die bis zu diesem Zeitpunkt exprimiert wurden. Von *LIP4* war erst nach 5 h ein schwaches Transkriptionssignal detektierbar. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Lipase-Genfamilie zeitlich und differentiell reguliert wird.

3.6.2 Untersuchung der Transkription der Gene *LIP1-10* von *C. albicans* während des Wachstums in YNB-Olivenöl

Um zu untersuchen, welche Lipase-Gene zu welchem Zeitpunkt in einem Lipid-Medium exprimiert werden, wurde eine YNB-Olivenöl-Kultur mit SC5314-Zellen auf eine Konzentration von 5×10^7 Zellen/ml eingestellt. Um nach einer RNA-Isolierung aus den Zellpellets das Expressionsmuster mittels RT-PCR erstellen zu können, wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten Proben genommen (Tab. 15).

Tab. 15: RT-PCR-Analyse der Expression der Lipase-Gene von *C. albicans* im YNB-Olivenöl-Medium.

Das Medium wurde mit SC5314-Zellen aus einer YPG-Vorkultur (0 h) inokuliert. Nach 4,5 h, 46 h und 76 h wurden Proben genommen. Die Expression der Lipase-Gene wurde mittels RT-PCR überprüft. +: Expression des Gens; (+): mRNA-Expression an der Nachweisgrenze; -: keine mRNA nachweisbar.

	0 h	4,5 h	46 h	76 h
<i>LIP1</i>	+	+	+	+
<i>LIP2</i>	(+)	-	-	(+)
<i>LIP3</i>	-	-	-	-
<i>LIP4</i>	+	+	(+)	+
<i>LIP5</i>	+	-	-	(+)
<i>LIP6</i>	+	(+)	(+)	+
<i>LIP7</i>	+	+	+	+
<i>LIP8</i>	+	+	+	+
<i>LIP9</i>	+	(+)	(+)	(+)
<i>LIP10</i>	-	-	-	-

Die Lipase-Gene *LIP1*, *LIP4* und *LIP6-LIP9* wurden im YNB-Olivenöl-Medium vom wt konstitutiv exprimiert, wobei die Expression von *LIP9* bereits nach 4,5 h nur noch knapp oberhalb der Nachweisgrenze lag. *LIP2*, *LIP3* und *LIP10* wurden während des Versuchs nur schwach bzw. gar nicht exprimiert. *LIP5* wurde nur zu Anfang des Versuchs stark exprimiert.

3.7 Expression der Lipase-Genfamilie von *C. albicans* unter verschiedenen *in vivo* Bedingungen

3.7.1 Zeitlicher Verlauf der *in vivo* Expression der Lipase-Genfamilie in intraperitoneal infizierten Mäusen

Von Frau Dr. M. Kretschmar (Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Klinikum Mannheim) wurden Infektionsstudien in Mäusen durchgeführt. Balb/c-Mäuse wurden mit dem Isolat SC5314 intraperitoneal infiziert (2.2.8.4). Um die zeitliche Regulation der Lipase-Genexpression während einer systemischen Infektion zu untersuchen, wurden zu zwei verschiedenen Zeitpunkten (4 und 72 h) die Leber von infizierten Mäusen entnommen (durchgeführt von Frau Dr. M. Kretschmar) und auf die verschiedenen *LIP*-Transkripte analysiert. Für die Erstellung des zeitlichen Lipase-Expressionsprofils wurden mindestens sechs Organe mit anhaftenden *Candida*-Zellen pro Zeitpunkt untersucht (Abb. 17). Nach der von mir durchgeführten Isolierung der Gesamt-RNA wurde die cDNA mittels RT-PCR amplifiziert. Alle cDNA-Proben wurden mit einer PCR überprüft, in der das Haushaltsgen *EFBI* nachgewiesen wurde, um zu zeigen, dass keine genomische DNA-Kontamination vorlag und gleiche Mengen an RNA in der RT-PCR eingesetzt wurden.

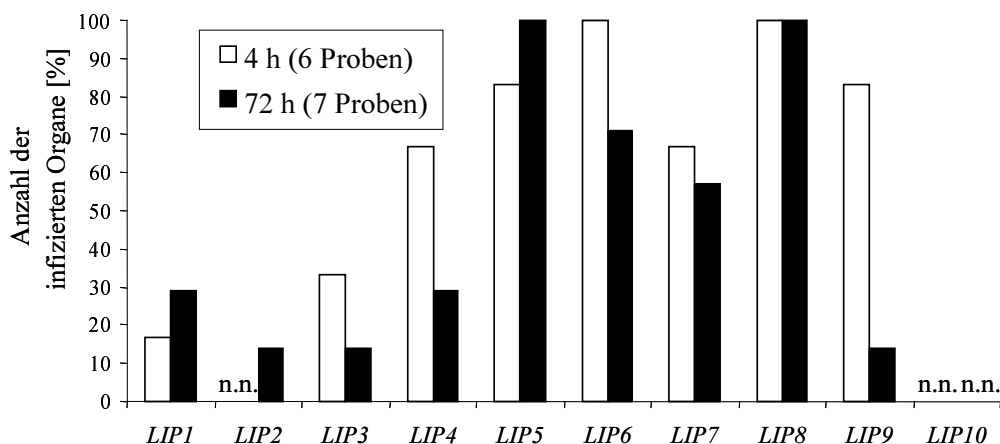


Abb. 17: Zeitlicher Verlauf der *in vivo* Expression der *LIP*-Genfamilie von *C. albicans* in intraperitoneal infizierten Mäusen.

Mäuse wurden mit 1×10^8 wt-Zellen inokuliert. Infizierte Lebern der Mäuse wurden nach 4 h (6 Organe) und 72 h (7 Organe) entnommen (durchgeführt von Frau Dr. M. Kretschmar). Das Expressionsprofil wurde mittels RT-PCR erstellt. Die Balken entsprechen dem Prozentsatz infizierter Organe mit entsprechender Lipase-Genexpression; n.n.: nicht nachweisbar.

Vier Stunden nach der intraperitonealen Infektion begannen die wt-Zellen, an Lebergewebe zu adhären und dieses zu penetrieren. Nachdem die Pilzzellen den Blutstrom erreicht hatten, disseminierten sie und befielen weitere Organe, wie z.B. die Nieren (persönliche Mitteilungen, Frau Dr. M. Kretschmar). Nach drei Tagen wiesen diese Organe hohe Gewebeschädigungen auf. Mit Ausnahme von *LIP10* wurden alle Lipase-Gene mindestens zu einem untersuchten Zeitpunkt der Infektion exprimiert.

Während der frühen Phase der Infektion wurden *LIP4-9* in mehr als 50 % der untersuchten Organe exprimiert. Im späten Stadium der Infektion wiesen weniger Organ-Proben eine Expression der Lipase-Gene *LIP3*, *LIP4*, *LIP6*, *LIP7* und *LIP9* auf als im frühen Stadium. Für *LIP3* und *LIP4* nahm die Zahl der Proben um die Hälfte ab. Bei *LIP9* lag eine Reduktion um den Faktor 6 vor. Mit zunehmender Infektionszeit konnte für *LIP1* und *LIP5* ein leichter Anstieg an Proben, die nachweisbare Transkripte enthielten, verzeichnet werden. *LIP2*-mRNA konnte nach drei Tagen Infektion in einer der Proben detektiert werden. Die Expression von *LIP8* wurde, unabhängig vom Zeitpunkt der Infektion, in allen untersuchten Organproben nachgewiesen.

3.7.2 Vergleich der Lipase-Genexpression einer systemischen Infektion der Leber und Nieren in Mäusen

Um festzustellen, ob die Expression der *LIP*-Genfamilie vom Ort der Infektion abhängt, wurden die Expressionsprofile der zehn Lipase-Gene von wt-Zellen miteinander verglichen, welche Leber und Nieren von Mäusen während einer systemischen Infektion befielen (Abb. 18). Nach der Isolierung der Gesamt-RNA aus den Organproben wurde cDNA mittels RT-PCR hergestellt. Das Expressionsprofil wurde mit den *LIP*-spezifischen Primern generiert.

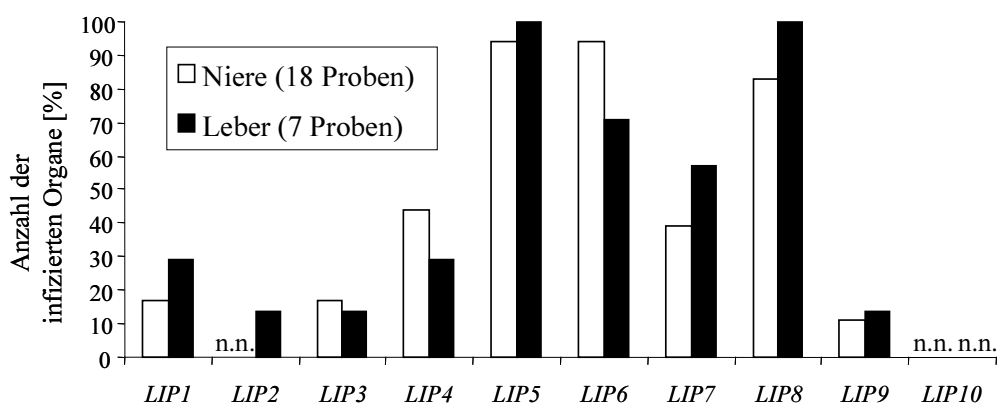


Abb. 18: *In vivo* Expression der *LIP*-Genfamilie von *C. albicans* bei der Infektion von Mäusen. Das Expressionsprofil wurde mittels RT-PCR analysiert, nachdem Mäuse intraperitoneal mit 1×10^8 *C. albicans*-Zellen infiziert wurden. Die Nieren (18 Organe) und Lebern (7 Organe) wurden nach drei Tagen Infektion entnommen (durchgeführt von Frau Dr. M. Kretschmar). Die Balken entsprechen dem Prozentsatz infizierter Organe mit der jeweiligen Lipase-Genexpression; n.n.: nicht nachweisbar.

Zum untersuchten Zeitpunkt der Infektion (72 h) wiesen die wt-Zellen, die sowohl Leber als auch Nieren infizierten, ein ähnliches Expressionsprofil der Lipase-Gene auf. Prozentuale Unterschiede der infizierten Organe mit entsprechender *LIP*-Expression überstiegen nie einen Faktor von 1,5. *LIP2* stellte die einzige Ausnahme dar: Transkripte dieses Lipase-Gens wurden in einer von sieben Leber-Proben nachgewiesen, es konnte jedoch keine Expression in den 18 Nieren-Proben detektiert werden.

Außer *LIP10* wurden nachweislich alle *LIP*-Gene in mindestens einer Organprobe exprimiert. *LIP1-3* und *LIP9* wurden in weniger als 30 % der untersuchten Proben exprimiert. Nach drei Tagen Infektion bildeten die Transkripte von *LIP5*, *LIP6* und *LIP8* den Hauptanteil.

3.7.3 Infektionsverlauf und Expressionsstudie von *C. albicans* während der Infektion verschiedener künstlicher Hautmodelle

Um feststellen zu können, ob die *LIP*-Genfamilie auch an der Besiedlung unterschiedlicher humaner Gewebe beteiligt ist, wurden experimentelle Infektionen an künstlichen Hautmodellen durchgeführt (2.2.8.3). Hierfür wurde die zeitliche Regulation der Transkription der zehn bekannten Lipase-Gene während dieser Infektionen mittels RT-PCR analysiert (Abb. 20A-K; Tab. 16). Der Infektionsverlauf wurde anhand von histologischen Untersuchungen verfolgt (Abb. 19A-D; 21A-C).

3.7.3.1 Untersuchung der Transkription der Gene *LIP1-10* von *C. albicans* während der Infektion eines künstlichen oralen Epithels (RHE)

Das RHE-Modell einer oralen Mykose (Schaller *et al.*, 1999) wurde genutzt, um festzustellen, ob Gene, die für lipolytische Enzyme kodieren, während dieser Art von Infektion exprimiert und zeitlich reguliert werden. Proben des Hautmodells wurden mit wt-Zellen infiziert (2.2.8.3). Um histologische Untersuchungen zur Dokumentation des Infektionsverlaufs durchführen zu können, wurden zu drei verschiedenen Zeitpunkten Hautproben genommen (durchgeführt von SkinEthic; Abb. 19A-D). Vom restlichen epithelialen Gewebe wurde die RNA isoliert, um die zeitliche Regulation der *LIP*-Expression zu bestimmen. Die Transkription der Lipase-Gene wurde mittels RT-PCR bestimmt (Abb. 20A-K). Als Negativ-Kontrolle wurde ebenfalls nicht-infiziertes RHE-Gewebe, welches nur mit dem Puffer PBS versetzt wurde, aufgearbeitet. Mit den *EF*- und *LIP1-10*-Primern wurde kein Amplifikat von dieser Probe erhalten (nicht dargestellt).

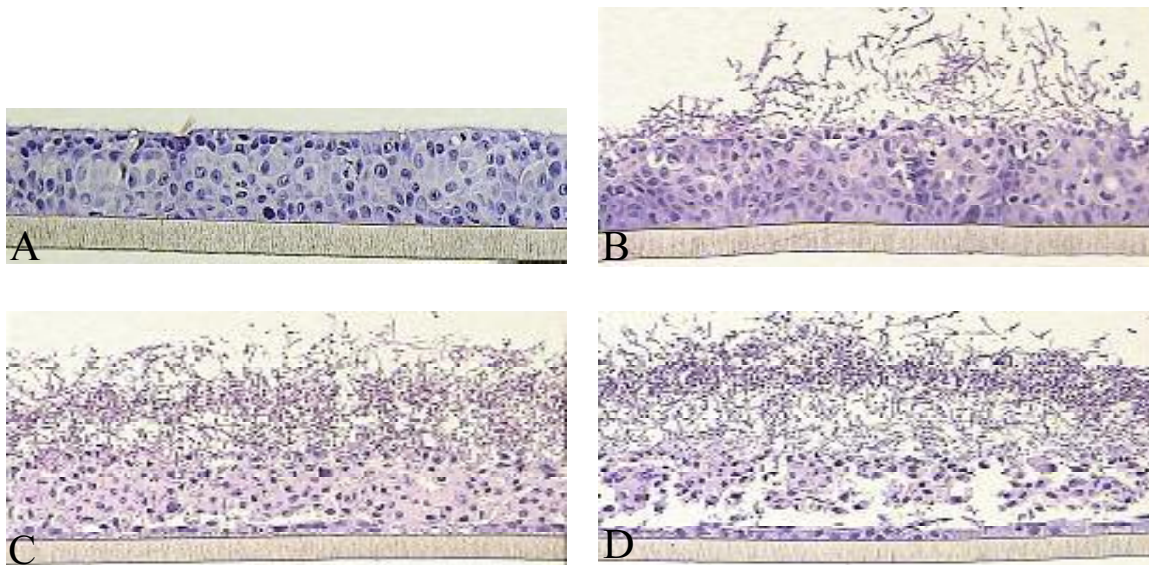


Abb. 19A-D: Lichtmikroskopische Aufnahmen mit 400facher Vergrößerung von histologischen Präparaten des RHE-Modells („Reconstituted Human Epithelium“) während einer künstlichen Infektion mit *C. albicans*.

Dieses Hautmodell entspricht der humanen oralen Mucosa. Das Epithel besteht aus Keratinozyten ohne Stratum corneum. Die künstliche Haut wurde mit 2×10^6 wt-Zellen infiziert. Zu drei verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben für die histologische Untersuchung und Gesamt-RNA-Isolierung genommen. Die Histologie wurde von der Firma SkinEthic durchgeführt. (A): Nicht-infiziertes RHE-Modell. (B): 12 h nach der Inokulation mit *C. albicans*. Hefezellen und Myzel adhären an das Gewebe. Zum Teil fängt der Pilz an, die Hautschicht zu penetrieren. Es sind bereits leichte cytotoxische Effekte an der Oberfläche zu erkennen. (C): Nach 36 h Infektion hat sich der Pilz vermehrt. Außerdem hat er Gewebeschädigungen der suprabasalen Schichten verursacht. (D): Nach 48 h bilden Myzelzellen eine membranähnliche Schicht (Pseudomembran) aus. Es ist eine partielle Nekrose der Mucosa zu beobachten.

Bereits 12 h nach der Infektion verursachten die SC5314-Zellen, die sowohl als Hefe- als auch Myzelzellen vorlagen, leichte Oberflächenschädigungen am RHE. Nach 36 h waren vor allem Myzelzellen nachweisbar. Zu diesem Zeitpunkt zeigte das Gewebe der suprabasalen Schichten vergrößerte interzelluläre Räume und partielle Nekrosen. Mit fortschreitender Infektion tauchten schwerere Erosionen der Mucosa auf, die von Vakuolenbildungen begleitet wurden (48 h).

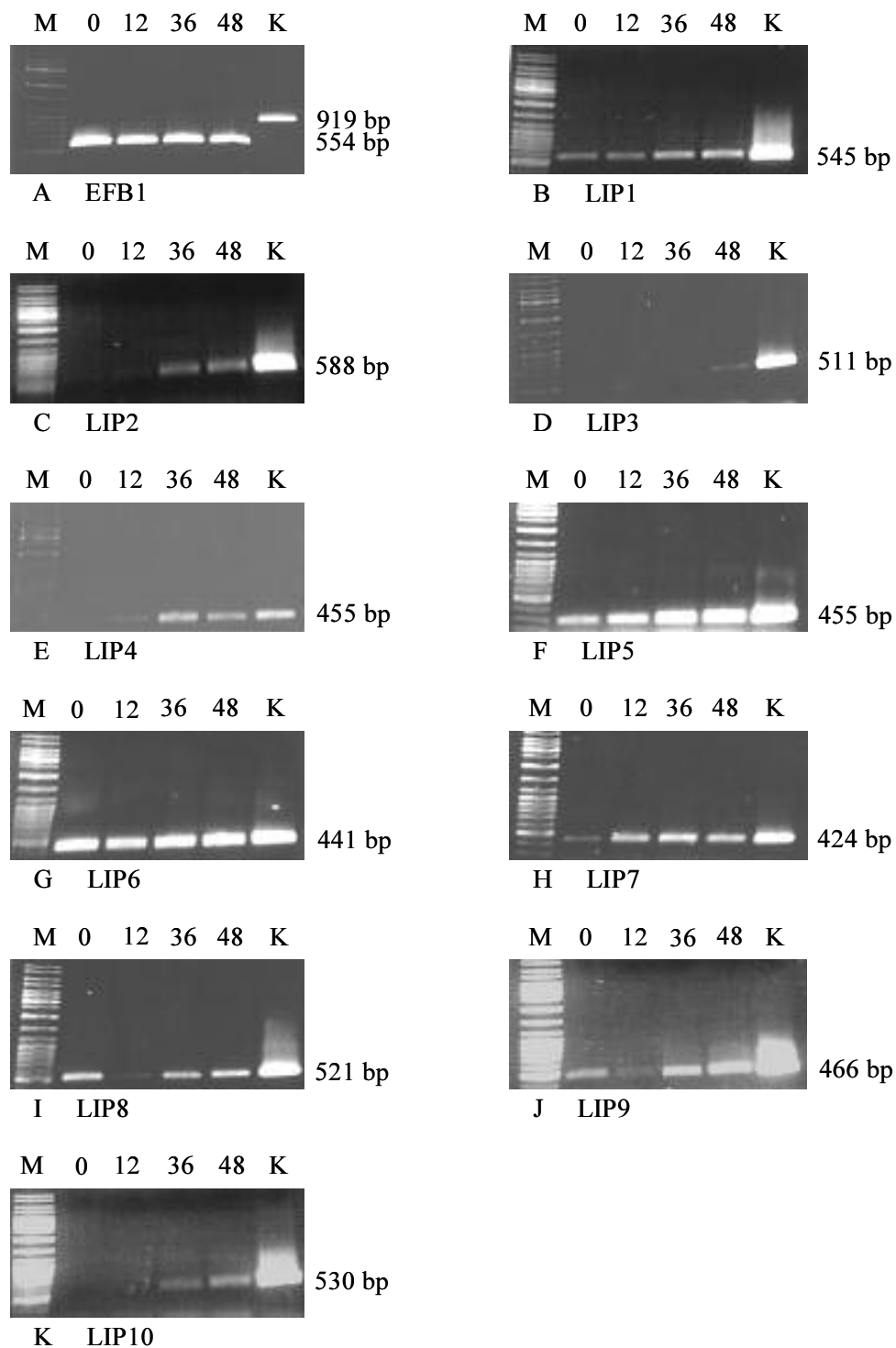


Abb. 20A-K: RT-PCR-Analyse der Expression des *EFBI*-Gens und der Lipase-Gene von *C. albicans* während einer Infektion des RHE-Modells.

Das Epithel wurde mit 2×10^6 SC5314-Zellen in 50 μ l PBS inokuliert. Nach 12 h, 36 h und 48 h wurden Proben genommen. M: Molekulargewichtsmarker und K: genomische DNA von *C. albicans* (Kontrolle). Die Angaben oberhalb der restlichen Spuren entsprechen den Zeitpunkten der Probenentnahmen in Stunden. Der Versuch wurde zweimal durchgeführt.

Während der gesamten Infektionszeit wurden von den Lipase-Genen *LIP1* und *LIP4-9* Transkripte nachgewiesen. Eine schwache Expression von *LIP2*, *LIP3* und *LIP10* war erst zu einem späteren Zeitpunkt (36 h) detektierbar. Nach anfänglich schwachen Signalen (12 h) zeigten die Lipase-Gene *LIP4*, *LIP8* und *LIP9* bis zum Versuchsende eine deutliche Expression.

3.7.3.2 Untersuchung der Transkription der Gene *LIP1-10* von *C. albicans* während der Infektion eines künstlichen vaginalen Epithels

Ein vaginales Schleimhaut-Modell wurde mit *C. albicans* infiziert (2.2.8.3). Um die zeitliche Regulation der Lipase-Gene *LIP1-10* zu analysieren, wurde das Expressionsmuster dieser Gene während der Infektion erstellt (Tab. 16). Die Zeitpunkte 12 h und 24 h nach Infektionsstart wurden genauer untersucht. Die 48 h-Probe konnte wegen einer mikrobiellen Kontamination nicht ausgewertet werden. Eine Gefahr solcher Kontaminationen besteht fortwährend, da keine Antibiotika und Antimykotika eingesetzt werden können. Sie würden möglicherweise das Infektionsverhalten von *C. albicans* beeinflussen.

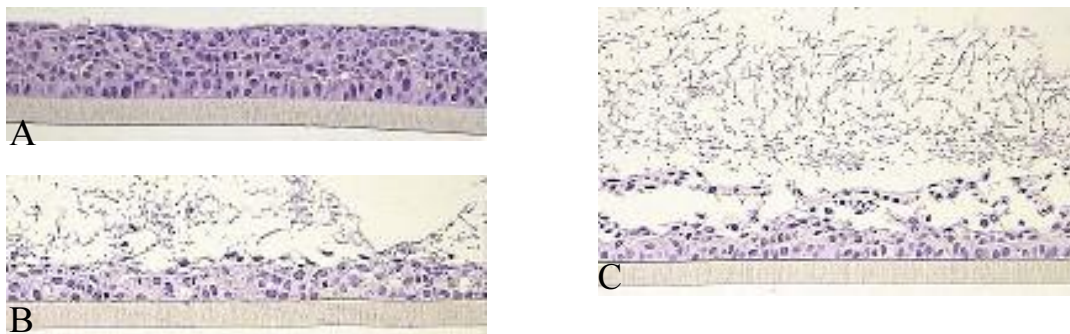


Abb. 21A-C: Lichtmikroskopische Aufnahmen mit 400facher Vergrößerung von histologischen Präparaten des vaginalen Schleimhaut-Modells während einer künstlichen Infektion mit *C. albicans*.

Dieses Hautmodell entspricht der humanen vaginalen Mucosa. Die künstliche Haut wurde mit 2×10^6 wt-Zellen infiziert. Zu zwei verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben für die histologische Untersuchung und Gesamt-RNA-Isolierung genommen. Die Histologie wurde von der Firma SkinEthic durchgeführt. (A): Nicht-infiziertes vaginales Schleimhaut-Modell. (B): 12 h nach der Inokulation mit *C. albicans*. Hefezellen und Myzel adhären an das Gewebe. Der Pilz fängt an, die Hautschichten zu penetrieren. Es sind bereits cytotoxische Effekte an der Oberfläche zu erkennen. (C): Nach 24 h Infektion hat der Pilz Gewebeschädigungen der suprabasalen Schichten verursacht. Myzelzellen fangen an, eine membranähnliche Schicht (Pseudomembran) auszubilden. Es ist eine partielle Nekrose der Mucosa zu beobachten.

Die Gene *LIP4-8* wurden über den untersuchten Zeitraum konstitutiv exprimiert. *LIP2* wurde ebenfalls zu beiden Zeitpunkten transkribiert, wobei nur sehr schwache Transkriptionssignale detektiert werden konnten. Nach 12 h Infektion hatten die wt-Zellen bereits Myzel gebildet (Abb. 21B). Zu diesem Zeitpunkt wurden auch *LIP1*, *LIP3* und *LIP9* exprimiert, wobei nach 24 h keine mRNA von diesen Genen mehr nachweisbar war. Nach einem Tag waren bereits partielle Nekrosen und Vakuolenbildungen vorhanden (Abb. 21C). Die Pilzzellen formierten eine Pseudomembran. Als einziges Lipase-Gen wurde *LIP10* zu keinem der untersuchten Zeitpunkte nachweislich exprimiert.

Tab. 16: Zusammenfassung der Expression der *LIP*-Gene während einer Infektion des vaginalen Schleimhaut-Modells.

Das Epithel wurde mit dem klinischen Isolat SC5314 inokuliert. Nach 12 h und 24 h wurden Proben entnommen. Die Expression der Lipase-Gene wurde mittels RT-PCR überprüft.

+: Expression des Gens; (+): mRNA-Expression an der Nachweisgrenze; -: keine mRNA nachweisbar.

<i>LIP</i>	Zeit nach der Infektion	
	12 h	24 h
1	+	-
2	(+)	(+)
3	+	-
4	+	+
5	+	+
6	+	+
7	+	+
8	+	+
9	(+)	-
10	-	-

3.7.4 Lipase-Genexpression in Proben von Patienten mit Candidose

Um feststellen zu können, ob die zehn Lipase-Gene von *C. albicans* während humaner Candidosen exprimiert werden, wurden im Universitätskrankenhaus Eppendorf (UKE, Hamburg) Proben verschiedener Infektionsorte von Patienten gesammelt. Diese Proben wurden genutzt, um das Transkriptionsprofil der Lipase-Genfamilie zu analysieren (2.2.8.5). Von jedem Patienten wurden zwei Proben genommen, wobei die eine zur Bestimmung der pathogenen Pilz-Spezies und die andere zur Expressionsanalyse diente.

3.7.4.1 Molekularbiologische Unterscheidung von *C. albicans* und *C. dubliniensis*

Die phänotypische Analyse zur Bestimmung des Erregers wurde im UKE durchgeführt. Dort wurde ein Reis-Extrakt-Agar eingesetzt, auf dem *C. albicans* als einzige *Candida*-Art Chlamydosporen bildet (Casal & Linares, 1981). Die Chlamydosporen-Bildung ist normalerweise ein eindeutiger Hinweis auf *C. albicans*. Wie aber neueste Untersuchungen gezeigt haben, kann die mit *C. albicans* sehr nah verwandte *Candida*-Art *C. dubliniensis* ebenfalls Chlamydosporen unter diesen Bedingungen bilden. Diese ebenso Keimschlauch-positive Hefe wurde 1995 von Sullivan und Mitarbeitern entdeckt. Um die Spezifität aller *LIP*-Primer zu überprüfen und etwaige Kreuzreaktionen auszuschließen, wurden PCR-Reaktionen mit genomischer DNA von zwei verschiedenen *C. dubliniensis*-Stämmen (CBS 7987 und CBS 8501) als DNA-Template durchgeführt (Abb. 22). Es werden nur die Ergebnisse der PCR-Reaktionen gezeigt, die sowohl bei *C. albicans* als auch bei *C. dubliniensis* ein Signal ergaben.

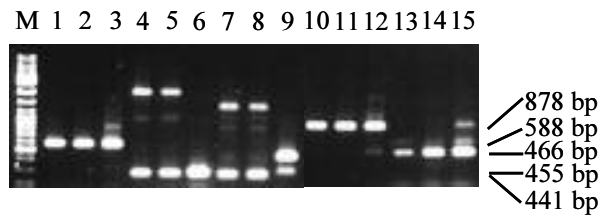


Abb. 22: PCR-Analyse mit LIP-Primern und genomischer DNA von *C. albicans* und *C. dubliniensis*.

M: Molekulargewichtsmarker; PCR mit den Primern LIP2a1-LIP2b1: *C. dubliniensis* CBS 7987 (Spur 1), *C. dubliniensis* CBS 8501 (Spur 2) und *C. albicans*-wt (Spur 3); PCR mit den Primern LIP5a2-LIP5b2: *C. dubliniensis* CBS 7987 (Spur 4), *C. dubliniensis* CBS 8501 (Spur 5) und *C. albicans*-wt (Spur 6); PCR mit den Primern LIP6a-LIP6b: *C. dubliniensis* CBS 7987 (Spur 7), *C. dubliniensis* CBS 8501 (Spur 8) und *C. albicans*-wt (Spur 9); PCR mit den Primern LIP7a-LIP7b: *C. dubliniensis* CBS 7987 (Spur 10), *C. dubliniensis* CBS 8501 (Spur 11) und *C. albicans*-wt (Spur 12); PCR mit den Primern LIP9a-LIP9b: *C. dubliniensis* CBS 7987 (Spur 13), *C. dubliniensis* CBS 8501 (Spur 14) und *C. albicans*-wt (Spur 15).

Banden, die zum Teil auf Höhe der *C. albicans*-Banden lagen, konnten in PCR-Reaktionen mit genomischer DNA von zwei verschiedenen *C. dubliniensis*-Stämmen und den Primer-Kombinationen LIP2a1-LIP2b1, LIP5a2-LIP5b2, LIP6a-LIP6b, LIP7a-LIP7b und LIP9a-LIP9b gefunden werden. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass *C. dubliniensis* eine zu *C. albicans* homologe Lipase-Genfamilie besitzt.

Da Kreuzreaktionen auftreten und phänotypische Untersuchungen ebenfalls zu falschen Ergebnissen führen könnten, wurde eine molekularbiologische Strategie entwickelt, um *C. albicans* und *C. dubliniensis* zu differenzieren. Hierfür wurden zwei bereits publizierte PCR-Strategien miteinander kombiniert (2.2.8.6). Die eine Strategie basiert darauf, dass sich die beiden *Candida*-Arten bezüglich des Actin-Introns unterscheiden (Donnelly *et al.*, 1999), wobei nur genomische DNA von *C. dubliniensis* ein spezifisches 288-bp Amplifikat mit den Primern CdAct1f und CdAct1r ergibt (Tab. 11). Die zusätzlich eingesetzten Primer Unif und Unir signalisieren, dass die PCR-Reaktion erfolgreich war, indem sie ein 610 bp-Fragment der pilzlichen großen Untereinheit des rRNA Gens amplifizieren (Fell, 1993).

Die zweite PCR-Strategie ist hingegen spezifisch für *C. albicans*. In dieser PCR werden die Primer PHR1f und PHR1r verwendet (Tab. 12), die nur mit genomischer DNA von *C. albicans* als Template den ORF des *PHR1*-Gens amplifizieren (Kurzai *et al.*, 1999).

Es wurden 100 klinische *Candida*-Isolate, welche im Chlamydosporen-Test positiv getestet wurden, mit der kombinierten PCR-Methode überprüft. Beispielhaft wird eine Actin-Intron-PCR von fünf klinischen Isolaten gezeigt (Abb. 23).

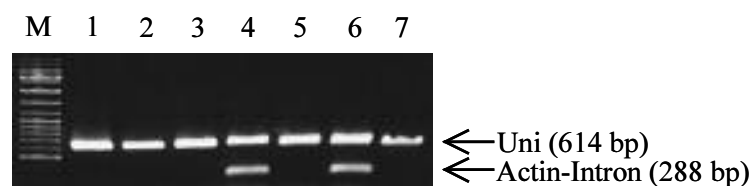


Abb. 23: Actin-Intron-PCR von klinischen Isolaten zur Unterscheidung von *C. albicans* und *C. dubliniensis*. M: Molekulargewichtsmarker, Spur 1: klinisches Isolat 2763, Spur 2: klinisches Isolat 3354, Spur 3: klinisches Isolat 2944, Spur 4: klinisches Isolat 2476, Spur 5: klinisches Isolat 2694, Spur 6: genomische DNA von *C. dubliniensis* CBS 7987 (Kontrolle 1), Spur 7: genomische DNA von *C. albicans* SC5314 (Kontrolle 2).

Nach dem Ergebnis der Actin-Intron-PCR zu urteilen, handelt es sich beim klinischen Isolat 2476 um einen *C. dubliniensis*-Stamm, da sowohl die Uni-Primer als auch die Actin-Intron-Primer ein Amplifikat ergaben. Mit der genomischen DNA der restlichen Isolate konnte nur mit den Uni-Primern ein Signal erhalten werden.

Insgesamt sechs der 100 überprüften Isolate wiesen eine positive Actin-Intron-Bande auf. Mit genomischer DNA dieser Stämme als Template konnte mit einer PHR1-PCR kein Amplifikat erhalten werden. Fünf der nachgewiesenen *C. dubliniensis*-Isolate stammten aus der Mundhöhle und ein Isolat aus dem Zehen-Zwischenraum.

3.7.4.2 Untersuchung der Transkription der Gene *LIP1-10* von *C. albicans* in Proben von Patienten mit Candidose

Die RT-PCR-Analyse zeigte, dass während einer humanen oralen Candidose Lipase-Gene exprimiert und differentiell reguliert werden (Abb. 24).

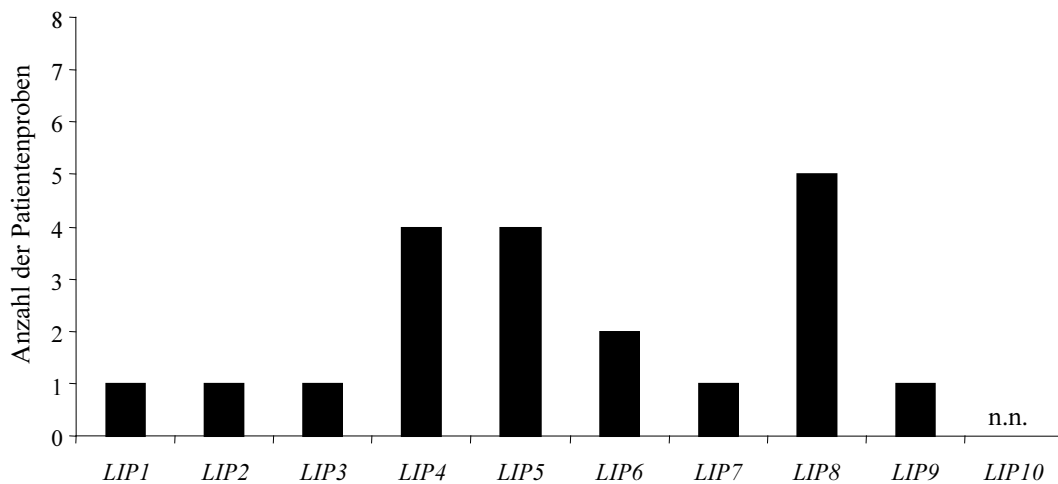


Abb. 24: Zusammenfassung der *in vivo* Expression der *LIP*-Gene in acht Proben von Patienten, die an oraler Candidose erkrankt waren.

Die Transkription wurde mittels RT-PCR bestimmt. Die Balken entsprechen der Zahl oraler Proben mit entsprechender Lipase-Genexpression; n.n.: nicht nachweisbar.

LIP10-mRNA konnte in keiner klinischen Probe nachgewiesen werden. Von *LIP1-9* wurden Transkripte in mindestens einer Probe detektiert. *LIP1-3*, *LIP7* und *LIP9* wurden in einer Probe und *LIP6* in zwei Proben exprimiert. Die Hälfte der Proben wies eine Expression der Lipase-Gene *LIP4* und *LIP5* auf. Am häufigsten konnten Transkripte von *LIP8* nachgewiesen werden (fünf von acht untersuchten Proben).

Zusätzlich zu den oralen Proben wurden noch weitere Infektionsorte überprüft (Tab. 17).

Tab. 17: Zusammenfassung der *in vivo* Expression der *LIP*-Gene in Proben von Patienten, die an Candidose erkrankt waren. Es handelt sich um eine Stuhl-Probe (Stuhl) und zwei vaginale Proben (Vag-1 und Vag-2). Die Transkription wurde mittels RT-PCR bestimmt. +: Expression des Gens; (+): mRNA-Expression an der Nachweisgrenze; -: keine mRNA nachweisbar.

<i>LIP</i>	Isolierungsort		
	Stuhl	Vag-1	Vag-2
1	(+)	-	-
2	(+)	-	-
3	-	+	-
4	-	+	-
5	-	+	+
6	+	+	-
7	+	+	-
8	+	+	+
9	-	-	(+)
10	-	-	-

In einer Stuhl-Probe wurden die Lipase-Gene *LIP6-8* exprimiert. *LIP1*- und *LIP2*-Transkripte ergaben nur schwache Signale. Die restlichen *LIP*-Gene wurden nicht exprimiert. In zwei Zellproben der vaginalen Schleimhaut (Vag-1 und Vag-2) wurde keine Expression von *LIP1*, *LIP2* und *LIP10* nachgewiesen. Dafür wurden *LIP5* und *LIP8* in beiden Proben exprimiert. Die Lipase-Gene *LIP3*, *LIP4*, *LIP6* und *LIP7* wurden nur in einer vaginalen Probe (Vag-1) exprimiert. Im Gegensatz dazu wurde eine schwache Expression von *LIP9* in der anderen Probe (Vag-2) festgestellt.

3.8 Suche nach *LIP8*-ähnlichen Genen in den Genomen anderer *Candida*-Arten

Wie die *in vitro* und *in vivo* Expressionsstudien gezeigt haben, wird das Lipase-Gen *LIP8* von *C. albicans* konstitutiv exprimiert. Um zu testen, ob andere *Candida*-Arten, speziell *C. dubliniensis*, homologe Gene zu *LIP8* von *C. albicans* besitzen, wurde eine Southern Blot-Analyse unter niedrigstringenten Bedingungen durchgeführt (2.2.8.10.2; Abb. 25). Als Sonde wurde ein DIG-markiertes PCR-Fragment von *LIP8* eingesetzt. Hierfür wurden die Primer *LIP8a* und *LIP8b* verwendet.

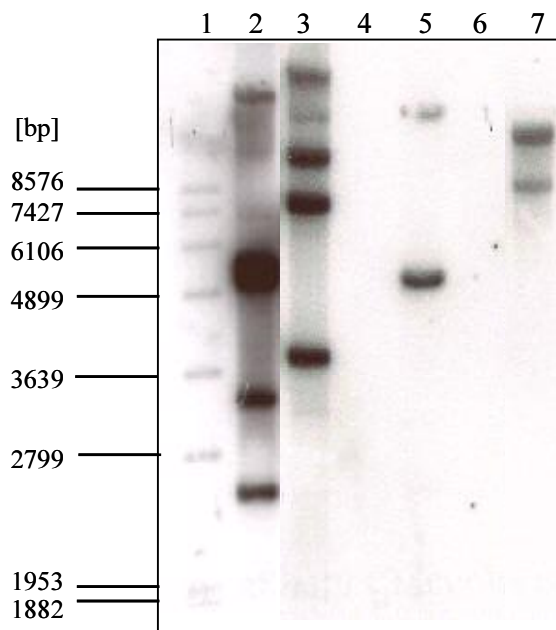


Abb. 25: Southern Blot-Analyse von Lipase-Genen in verschiedenen *Candida*-Arten. Genomische DNA-Restriktionsverdau verschiedener *Candida*-Arten wurden mit einer LIP8-Sonde (521 bp) unter niedrigstringenten Bedingungen hybridisiert. DIG-Größenmarker (Spur 1), *Bst*1107I-Verdau von genomischer DNA von: *C. albicans* (Spur 2), *C. dubliniensis* (Spur 3), *C. krusei* (Spur 4), *C. parapsilosis* (Spur 5), *C. glabrata* (Spur 6) und *C. tropicalis* (Spur 7).

Bei einem *Bst*1107I-Verdau genomischer DNA von *C. albicans* konnten mit der LIP8-Sonde mindestens fünf distinkte Signale erhalten werden, die eine Größe von 8,7 kb, 6,3 kb, 5,9 kb, 4,1 kb und 2,6 kb besaßen. Die Größen wurden anhand der Laufweiten des DIG-Markers errechnet. Diese Resultate bestätigen, dass *C. albicans* eine Lipase-Genfamilie besitzt. Des weiteren scheinen andere medizinisch relevante *Candida*-Arten, homologe DNA-Sequenzen aufzuweisen. In *C. tropicalis* (8,4 kb und 7,6 kb) und *C. parapsilosis* (8,6 kb und 6,0 kb) hybridisierten jeweils zwei Banden. In *C. krusei* und *C. glabrata* konnten keine zum LIP8-Fragment homologen Sequenzen detektiert werden, während mindestens fünf Banden im Genom von *C. dubliniensis* nachgewiesen wurden (9,1 kb, 8,5 kb, 7,9 kb, 7,1 kb und 4,8 kb).

3.9 Suche nach Lip8-ähnlichen Proteinen in den Proteomen anderer Mikroorganismen

Zusätzlich zu den zwei Lipasen von *C. parapsilosis* (CpLip1 und CpLip2) haben Ergebnisse von Protein-Blast-Suchen gezeigt, dass weitere mikrobielle Pathogene zu Lip8 homologe Proteinsequenzen besitzen (Abb. 26).

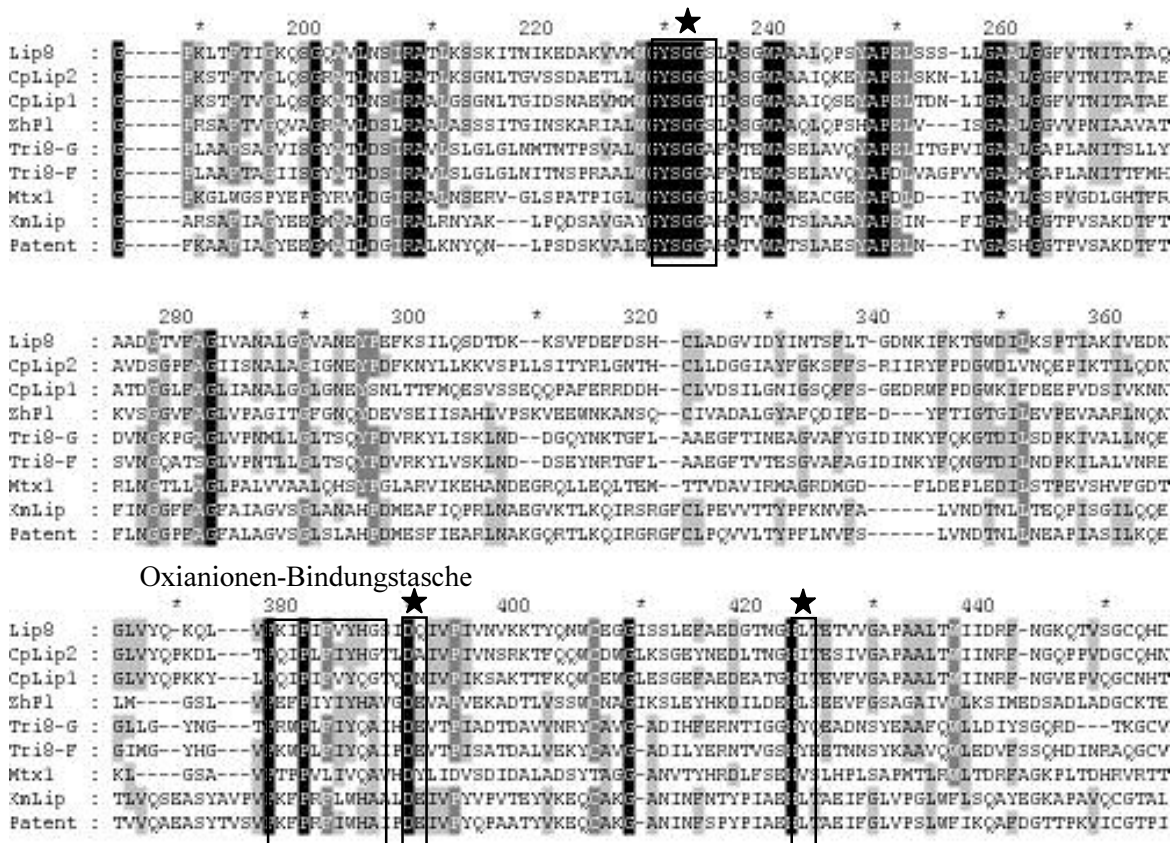


Abb. 26: Sequenzvergleich der zu Lip8 von *C. albicans* homologen Proteine.

Es ist jeweils ein zentraler Abschnitt der Proteine dargestellt. Das konservierte Lipase-Motiv „GX SXG“ und die putative Oxianionen-Bindungstasche sind mit einem Rahmen hervorgehoben. Die konservierten Aminosäuren, die möglicherweise die katalytische Triade bilden (Serin, Aspartat und Histidin), sind mit einem Stern gekennzeichnet. 100 % homologe Bereiche sind schwarz und 80-90 % sind grau unterlegt. Lip8: vom *LIP8*-Gen abgeleitete *C. albicans*-Lipase, CpLip1: *C. parapsilosis*-Lipase (CAC86399), CpLip2: *C. parapsilosis*-Lipase (CAC86400), Zhl1: Phospholipase von *Zygoascus hellenicus* (CAD35143), Tri8-F: Esterase von *Fusarium sporotrichioides* (AAD13655), Tri8-G: Esterase von *Fusarium graminearum* (AAK33086), Mtx1: putative Lipase von *Mycobacterium tuberculosis* (NP_336082), KmLip: *Kurtzmanomyces sp. I-11* Lipase (BAB91331) und Patent: *C. antarctica*-Lipase des Patents US 6074863 (AAE43263).

Mitglieder dieser putativen Interspezies-Familie sind die Esterasen Tri8 von *Fusarium graminearum* und *Fusarium sporotrichioides* (Brown *et al.*, 2001; McCormick & Alexander, 2002). Diese speziellen Enzyme sind für die Abspaltung einer Acetylgruppe von Mykotoxin-Vorstufen verantwortlich. Es wurde bereits postuliert, dass Tri8 aufgrund der Homologie zu den Lips ein lipolytisches Enzym ist (Stehr, 1999). Ferner wurde eine putative Lipase von *Mycobacterium tuberculosis* (Mtx1; Cole *et al.*, 1998) identifiziert.

Des Weiteren wurden Homologien in den Aminosäuresequenzen einer Lipase von *Kurtzmanomyces sp.* I-11, einer Phospholipase von *Zygoascus hellenicus* (Synonym für *Candida steatolytica*) und einer patentierten Lipase von *Candida antarctica* gefunden.

Aufgrund der konservierten Bereiche der Aminosäuresequenzen können folgende Schlussfolgerungen über mögliche Positionen der Aminosäuren der katalytischen Triade gezogen werden: Das nukleophile Serin befindet sich höchstwahrscheinlich im GX SXG-Motiv (GYS GG, 229-233), die saure Aminosäure könnte das Aspartat direkt nach der putativen Oxianionen-Bindungstasche sein (Position 390), und das Histidin der Triade könnte ca. 33 Aminosäuren weiter C-terminal davon liegen.

3.10 Gezielte Zerstörung des *LIP8*-Locus

Da das Lipase-Gen *LIP8* von *C. albicans* konstitutiv exprimiert wird, wurde dieses Mitglied der Genfamilie als „Target“ ausgewählt, um eine gezielte Genzerstörung durchzuführen (2.2.8.9). Die generierten *C. albicans*-Mutanten wurden mittels Southern Blot oder PCR überprüft, um sicherzustellen, dass die Genveränderungen gezielt und nicht ektopisch waren. Anschließend wurde mit Hilfe der RT-PCR festgestellt, ob keine oder eine verringerte Expression des Zielgens stattfand. Danach wurden die hergestellten Einzelmutanten bezüglich ihres Phänotyps auf unterschiedlichen Medien (2.2.8.10.3) sowie in ihrer Virulenz in verschiedenen Infektionsmodellen (2.2.8.10.5) im Vergleich zum wt untersucht.

Für das Ausschalten von *LIP8* wurde die Disruptionskassette pB25 konstruiert (Abb. 27). Als Grundlage für das „einfache Knock-out-Konstrukt“ (KO-Konstrukt) wurde das Plasmid pMB-7 gewählt, welches den *URA*-Blaster (*hisG-URA3-hisG*) enthält. Flankierend zum *URA*-Blaster wurden zu *LIP8* homologe Bereiche kloniert. Zuerst wurde ein 382-bp PCR-Fragment (Primer *LIP8*-3'-*SalI* und *LIP8*-3'-*PstI*) mit *SalI*- und *PstI*-Schnittstellen in pGEM[®]-T kloniert, welches den neuen Vektor pB9 ergab. Der gewählte Bereich war homolog zum 3'-Bereich des ORFs (169 bp) von *LIP8*, welcher in den 3'-UTR des Gens (213 bp) überlappt. Aus pB9 wurde das Fragment mit den entsprechenden Restriktionsenzymen herausgeschnitten und in pMB-7 kloniert. Das neue Plasmid pB12 war Grundlage für alle weiteren pMB-7-Konstrukte.

Anschließend wurde ein zum 5'-Bereich von *LIP8* homologes 816 bp-PCR-Fragment, welches mit den Primern *LIP8*-5'-*SacI* und *LIP8*-5'-*KpnI* amplifiziert wurde, in pGEM[®]-T kloniert. Dieses ergab den neuen Vektor pB11. Das Fragment wurde mit *SacI* und *KpnI* ausgeschnitten und in pB12 kloniert. Dieses ergab den endgültigen *LIP8*-KO-Vektor pB25 (Abb. 27).

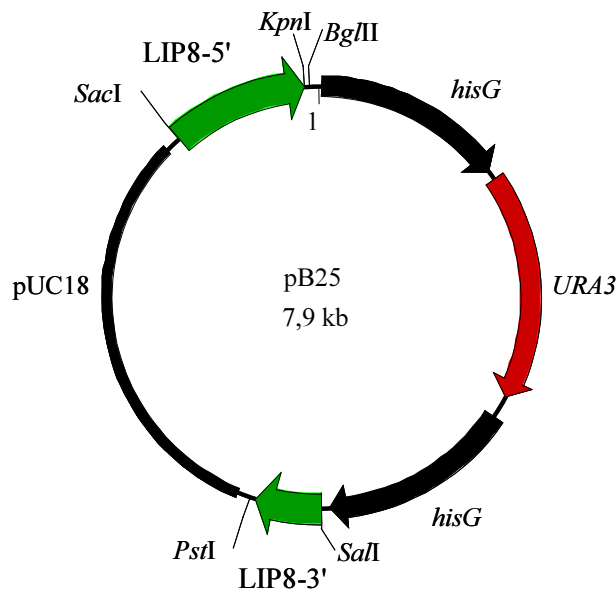


Abb. 27: Schematische Darstellung des *LIP8*-KO-Vektors (pB25).

Als Ausgangsplasmid wurde pMB-7 verwendet, welches den sogenannten *URA*-Blaster (*hisG-URA3-hisG*) enthält. Flankierend zu diesem Blaster wurden zwei homologe Bereiche von *LIP8* kloniert (*LIP8*-5' und *LIP8*-3'). Die fertige Disruptionskassette von ca. 4,9 kb wurde durch einen Verdau mit *SacI* und *PstI* erhalten; pUC18: pUC18-Rückgrat.

Vor der Transformation wurde das KO-Konstrukt mit *SacI* und *PstI* aus pB25 herausgeschnitten, um die endgültige Disruptionskassette zu erhalten. Der gesamte Restriktionsansatz wurde gefällt und in der Transformation eingesetzt (2.2.8.9.1). Das Plasmid-Rückgrat diente als zusätzliche Träger-DNA, um die Transformationseffizienz zu erhöhen. Für die Disruption wurde der *ura3*⁻-auxotrophe Stamm CAI-4, ein Derivat des klinischen Isolates SC5314 (Fonzi & Irvin, 1993), eingesetzt. Durch die Integration der Kassette in eines der beiden Zielallele von *LIP8* wurde eine Kopie des Zielgens zerstört. Positive Transformanden wurden auf SD-Agar selektiert und anschließend in einer Southern Blot-Analyse überprüft (Abb. 28). Anschließend mußte das *URA3*-Markergen in den Mutanten durch eine FOA-Behandlung (2.2.8.9.2) deletiert werden, um das verbleibende intakte Zielallel von *LIP8* in einer zweiten Transformation ebenfalls zerstören zu können. Jeder Schritt der genetischen Modifikation wurde anschließend im Southern Blot-Verfahren überprüft (Abb. 28). Eine weitere FOA-Behandlung lieferte die Ausgangsmutanten für die Retransformation.

Für den Southern Blot wurde die genomische DNA mit dem Restriktionsenzym *Bst1107I* restringiert. Anschließend erfolgte die Hybridisierung mit einer *LIP8*-KO-Sonde. Die Sonde wurde in einer PCR mit DIG-markierten dUTP hergestellt, bei der das Primerpaar KO-3-5' und KO-3-3' verwendet wurde. Als Beispiel wird die Southern Blot-Analyse einer „Mutanten-Reihe“ gezeigt (Abb. 28). Aus dem erzeugten Bandenmuster ließ sich der Erfolg der Genzerstörung ableiten.

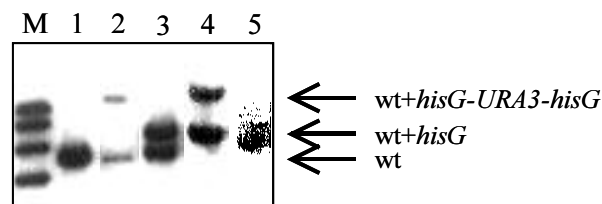


Abb. 28: Southern Blot-Analyse der KO-Einzelmutanten nach jedem Mutationsschritt. Genomische DNA-Restriktionsverdau verschiedener KO-Einzelmutanten wurden unter hochstringenten Bedingungen mit einer LIP8-KO-Sonde (354 bp) hybridisiert. M: DIG-Größenmarker, *Bst*1107I-Verdau von genomischer DNA von: CAI-4 (Spur 1), KO5 (Spur 2), 5/7nFOA (Spur 3), 5/7/5 (Spur 4), 5/7/5/5 (Spur 5). Die Höhe der wt-Bande (wt), des Allels mit inserierter Disruptionskassette (*wt+hisG-URA3-hisG*) und des Allels mit inserierter *hisG*-Sequenz nach FOA-Behandlung (*wt+hisG*) sind mit Pfeilen gekennzeichnet.

Die Größen der detektierten Banden wurden anhand der Laufweiten des DIG-Markers errechnet. Mit der LIP8-KO-Sonde wurde beim *Bst*1107I-Restriktionsansatz vom Ausgangsstamm CAI-4 ein distinktes Signal erhalten, das eine Größe von 6,0 kb besaß. Nach der Insertion der Disruptionskassette konnte beim Verdau der heterozygoten *LIP8*-Mutante neben der wt-Bande eine weitere Bande von ca. 8,3 kb nachgewiesen werden. Diese Bande ist ein *LIP8*-Allel, in welchem 430 bp in der Mitte des *LIP8*-ORF deletiert und gleichzeitig der *URA*-Blaster (*hisG-URA3-hisG*) inseriert wurde. Die FOA-Behandlung führte durch die Deletion einer der beiden *hisG*-Sequenzen und des *URA3*-Gens zu einer Größenabnahme der 8,3 kb-Bande auf 6,9 kb. Die zweite Transformation verursachte den Verlust des wt-Fragments. Nach einer weiteren FOA-Behandlung enthielten die beiden *lip8*-Allele jeweils nur noch eine *hisG*-Sequenz.

Nach Überprüfung der Mutanten auf DNA-Ebene durch die Southern Blot-Analyse wurde die Expression des Zielgens *LIP8* auf mRNA-Ebene mittels RT-PCR überprüft. Hierfür wurden die isogenen homozygoten KO-Mutanten 2/3/3 und 5/7/5 ÜN in YPG-Medium bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurde die RNA isoliert und in einer RT-PCR eingesetzt. Die produzierte cDNA wurde mit einer PCR, die *EFB1*-Transkripte nachweist, auf eventuelle genomische DNA-Verunreinigungen überprüft (nicht dargestellt).

Da der Primer LIP8a seine Zielsequenz im deletierten Bereich des *LIP8*-Gens besitzt, konnte die erfolgreiche Genzerstörung durch eine LIP8-PCR (Primer LIP8a und LIP8b; Abb. 29) mittels eines „Negativ-Ergebnisses“ bewiesen werden. Hierzu wurde die Expression in YPG-Medium überprüft, da *LIP8* in diesem Medium normalerweise konstitutiv exprimiert wird.

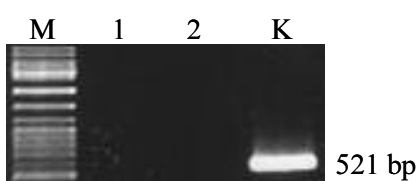


Abb. 29: RT-PCR-Analyse der Expression von *LIP8* von homozygoten KO-Mutanten in YPG-Medium.

Die Mutanten wurden ÜN bei 30 °C kultiviert. Anschließend wurde die RNA isoliert, um mittels RT-PCR die Expression von *LIP8* zu überprüfen.

M: Molekulargewichtsmarker und K: genomische DNA von *C. albicans* (Kontrolle). Spur 1: KO-Mutante 5/7/5 und Spur 2: KO-Mutante 2/3/3.

3.11 Herstellung von *lip8*-Knock-down-Mutanten

Zusätzlich zur kompletten Genausschaltung wurden zwei unterschiedliche Strategien gewählt, um die Expression von *LIP8* und ggf. weiteren *LIP*-Genen zu vermindern.

Zum einen wurde ein Vektor konstruiert, der eine Deletion in ein *LIP8*-Allel über homologe Rekombination einführen und gleichzeitig Antisense-RNA produzieren sollte. Die Antisense-RNA sollte an die vom intakten *LIP8*-Allel transkribierte mRNA binden und sie somit für den Abbau durch RNAsen markieren bzw. den Transport und die Translation stören. Um das Allel auszuschalten, wurde das einfache KO-Konstrukt (pB25) modifiziert, welches bereits homologe Sequenzen zu *LIP8* besitzt. Um den Antisense-Effekt zu erzielen, wurde der Promotor des Haushaltsgens *TEF3* (Colthurst *et al.*, 1992) flankierend mit *KpnI*-Erkennungssequenzen mit Hilfe der Primer TEF3-*KpnI*-2 und TEF3-*KpnI* amplifiziert und in den Vektor pGEM[®]-T kloniert (pB22). Anschließend wurde das Fragment mit *KpnI* herausgeschnitten und 3' vom homologen *LIP8*-5'-Fragment in pB25 kloniert. Der Promotor sollte eine konstitutive Expression des Antisense-Fragments gewährleisten. Das neue „Antisense“-Konstrukt wurde pB29 genannt (Abb. 30). Um die endgültige Disruptionskassette für die Transformation zu erhalten, wurde mit den Enzymen *SacI* und *PstI* restringiert.

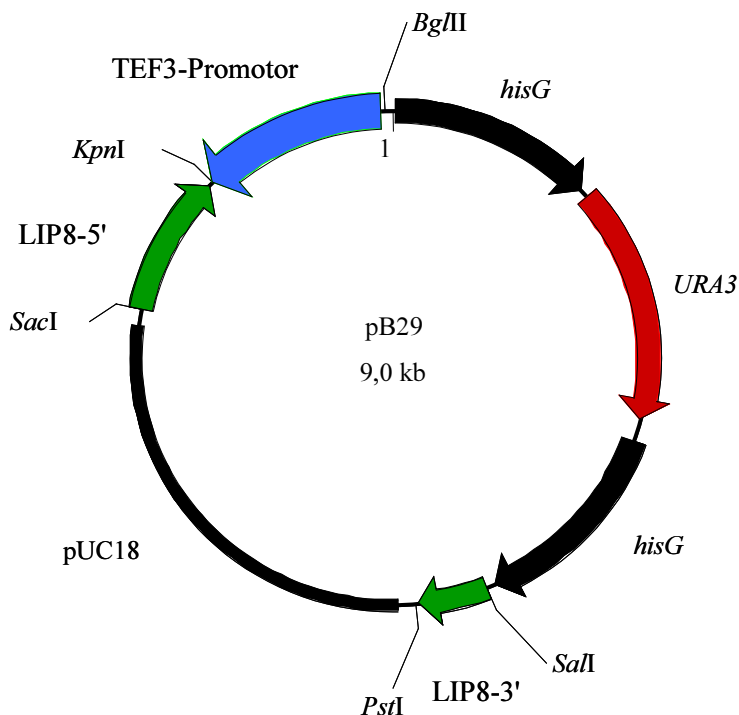


Abb. 30: Schematische Darstellung des Antisense-Konstruktes pB29.

Als Ausgangsplasmid wurde der „einfache KO-Vektor“ pB25 verwendet. Direkt hinter das *LIP8*-5'-Fragment wurde der *TEF3*-Promotor kloniert. Die fertige Disruptionskassette von ca. 5,9 kb konnte durch einen Verdau mit *SacI* und *PstI* erhalten werden.

Zum anderen wurde ein Konstrukt generiert, welches sowohl ein Allel ausschalten als auch die Expression des anderen Allels über dsRNA, die homolog zum 5'-Bereich von *LIP8* ist, inhibieren. Ein 1005 bp langes *LIP8*-Sense-Fragment, welches *SacI*- und *KpnI*-Schnittstellen besitzt, wurde mit den Primern LIP8-5'-*SacI* und LIP8-5'-*KpnI*-2 amplifiziert und in pGEM[®]-T kloniert (pB14). Zusätzlich wurde ein 816 bp-*LIP8*-Antisense-Fragment, welches komplementär zu den ersten 816 bp des Sense-Stückes ist, mit den Primern LIP8anti-*BglII* und LIP8anti-*KpnI* amplifiziert und in pGEM[®]-T kloniert (pB15). Sense- und Antisense-Fragment wurden in pGEM[®]-T zusammengefügt (pB24) und anschließend in pB12 kloniert (pB28). Zusätzlich wurde ein 216 bp-Fragment des 3'-UTRs von *LIP8* mit möglichem Transkriptionsterminations- und Polyadenylierungssignal mit *BglII*-Erkennungssequenzen amplifiziert („PolyA“). Hierfür wurden die Primer PolyA-5'-*BglII* und PolyA-3'-*BglII* genutzt. Nach der Klonierung in pGEM[®]-T (pB22) wurde das Fragment mit *BglII* herausgeschnitten und in pB28 kloniert. Das fertige „RNAi“ (RNA-Interferenz)-Konstrukt pB30 (Abb. 31) wurde nach einem *SacI/PstI*-Doppelverdau für die Transformation von CAI-4 eingesetzt.

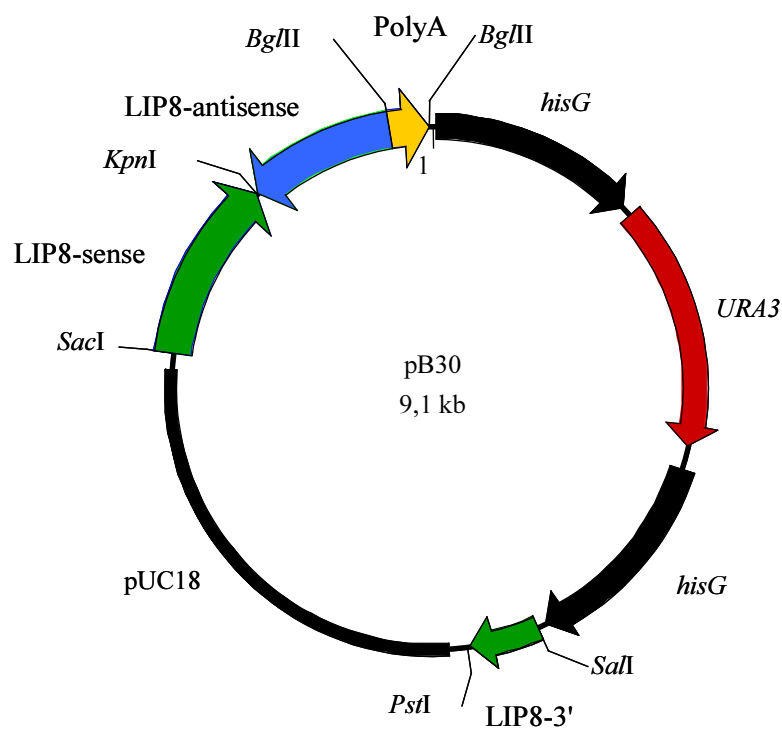


Abb. 31: Schematische Darstellung des RNAi-Konstruktes pB30.

Als Ausgangsplasmid wurde pB12 verwendet. Zusätzlich wurden ein *LIP8*-Fragment in entgegengesetzter Richtung (LIP8-antisense) und ein Polyadenylierungssignal (PolyA) direkt hinter das LIP8-5'-Fragment (LIP8-sense) kloniert. Die fertige Disruptionskassette von ca. 6,1 kb konnte durch einen Verdau mit *SacI* und *PstI* erhalten werden.

Die Transformation und Selektion, um Antisense- und RNAi-Mutanten (Knock-down-Mutanten) zu erhalten, erfolgten analog zur Herstellung der KO-Mutanten (2.2.8.9). Da die Disruptionskassette nur in ein Allel inserieren mußte, wurde jedoch nur eine Transformation durchgeführt.

Für den Southern Blot wurde die genomische DNA der Knock-down-Mutanten (KD-Mutanten) mit dem Restriktionsenzym *Bst*1107I behandelt. Es erfolgte eine Hybridisierung unter hochstringenten Bedingungen mit der LIP8-KO-Sonde (2.2.8.10.2). Der Röntgenfilm der Antisense- und RNAi-Mutanten wird in Abb. 32 gezeigt.

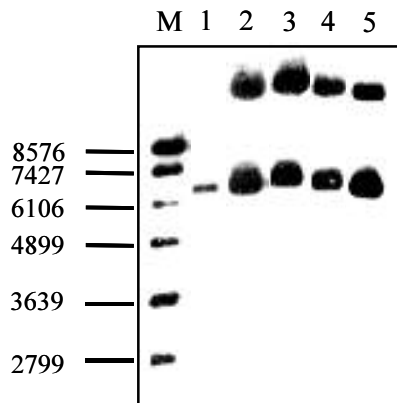


Abb. 32: Southern Blot-Analyse der *lip8*-KD-Mutanten.

Genomische DNA-Restriktionsverdau verschiedener Knock-down-Mutanten wurden mit der LIP8-KO-Sonde (354 bp) unter hochstringenten Bedingungen hybridisiert.

M: DIG-Größenmarker, *Bst*1107I-Verdau von genomischer DNA: SC5314 (Spur 1), AS2 (Spur 2), AS4 (Spur 3), RNAi1 (Spur 4) und RNAi5 (Spur 5).

Die Größen der detektierten Banden wurden anhand der Laufweiten des DIG-Markers abgeschätzt. Mit der LIP8-KO-Sonde wurde beim *Bst*1107I-Restriktionsansatz vom wt ein einziges Signal erhalten, das eine Größe von 5,7 kb aufwies. Nach der Insertion der Antisense-Kassette konnte neben der wt-Bande eine weitere Bande von ca. 10,1 kb (AS2) bzw. 10,7 kb (AS4) detektiert werden. Die RNAi-Mutanten RNAi1 und RNAi5 wiesen ebenfalls eine zusätzliche Bande zur wt-Bande auf. Diese besaß eine Größe von 10,6 kb bzw. 10,0 kb.

Zur Überprüfung, ob *LIP8* von den KD-Mutanten weiterhin exprimiert wird, wurde eine RT-PCR-Analyse durchgeführt. Hierfür wurden die verschiedenen Stämme in YPG kultiviert. Anschließend wurde die Expression von *LIP8* und *LIP5* analysiert (Abb. 33A&B). *LIP5* ist das Lipase-Gen, welches die höchste Homologie zu *LIP8* aufweist.

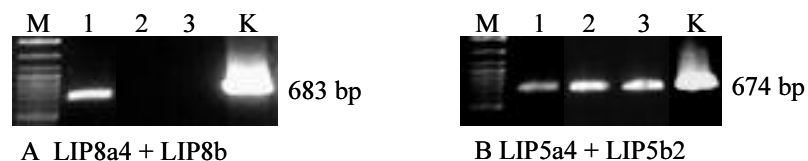


Abb. 33A&B: RT-PCR-Analyse der KD-Mutanten.

CAI-2 und die Antisense-Mutanten (AS2 und AS4) wurden ÜN in YPG kultiviert. Die Expression von *LIP8* und *LIP5* wurde mit den Primern (A) LIP8a4 und LIP8b bzw. (B) LIP5a4 und LIP5b2 überprüft. M: Molekulargewichtsmarker und K: genomische DNA von *C. albicans* (Kontrolle). CAI-2: (Spur 1), AS2 (Spur 2) und AS4 (Spur3).

Mit der Primer-Kombination LIP8a4 und LIP8b wurde in CAI-2 ein Transkriptionssignal erhalten. Es konnte keine *LIP8*-Expression in den Mutanten festgestellt werden. Die Antisense-Mutanten exprimierten weiterhin *LIP5*.

Die RNAi-Mutanten besaßen das gleiche Expressionsmuster wie die Antisense-Mutanten (nicht gezeigt).

3.12 Herstellung einer *LIP8*-Überexpressionsmutante und einer *LIP8*-Retransformande

Um zu zeigen, dass eventuelle Phänotypen der Mutanten auf das ausgeschaltete Gen zurückzuführen sind, und nicht aufgrund von unspezifischen Ereignissen verursacht werden, müssten für eine vollständige Knock-out-Analyse ebenfalls Retransformanden hergestellt werden. Für die Retransformation wurde der Vektor pCip10 (Murad *et al.*, 2000) gewählt. Dieser Vektor beinhaltet u.a. die Gene *URA3* und *RP10*, wobei in das *RP10*-Gen künstliche *NcoI*- und *StuI*-Schnittstellen eingefügt wurden. An der *NcoI*-Stelle sollte das zu retransformierende Gen kloniert werden, welches dann nach der Transformation über homologe Rekombination in den *RP10*-Locus inserieren sollte.

Ligationsversuche ergaben jedoch, dass diese Schnittstelle nicht geeignet ist. Daher wurde eine andere Schnittstelle (*SacI*) außerhalb des *RP10*-Gens gewählt, in welche der ORF und der 3'-UTR von *LIP8* mit dem Actin-Promotor (Leuker *et al.*, 1992; Uhl & Johnson, 2001) kloniert wurden (pB44). Der Actin-Promotor wurde mit den Primern Actin-5' und Actin-3' aus genomischer DNA von *C. albicans* mit flankierenden *KpnI*-Schnittstellen amplifiziert und in pGEM[®]-T kloniert (pB40). Das gleiche wurde mit dem ORF plus 3'-UTR von *LIP8* mit den Primern LIP8-Re-5' (mit *KpnI*-Schnittstelle) und LIP8-Re-3' (mit *NcoI*-Schnittstelle) durchgeführt (pB39). Der mit *KpnI* restringierte Actin-Promotor wurde 5' vom LIP8-Fragment kloniert (pB41). Wegen der bereits erwähnten Schwierigkeiten mit der Schnittstelle wurde mit den Primern Actin-5'-2 und LIP8-Re-3'-2 ein Fusionsprodukt mit neuen Schnittstellen für das Restriktionsenzym *SacI* amplifiziert und erneut in pGEM[®]-T kloniert (pB43), wobei pB39 hierfür als DNA-Template diente. Anschließend wurde das neue Fusions-Fragment mit *SacI* aus dem pGEM[®]-T-Vektor herausgeschnitten und in pCip10 kloniert (pB44, Abb. 34).

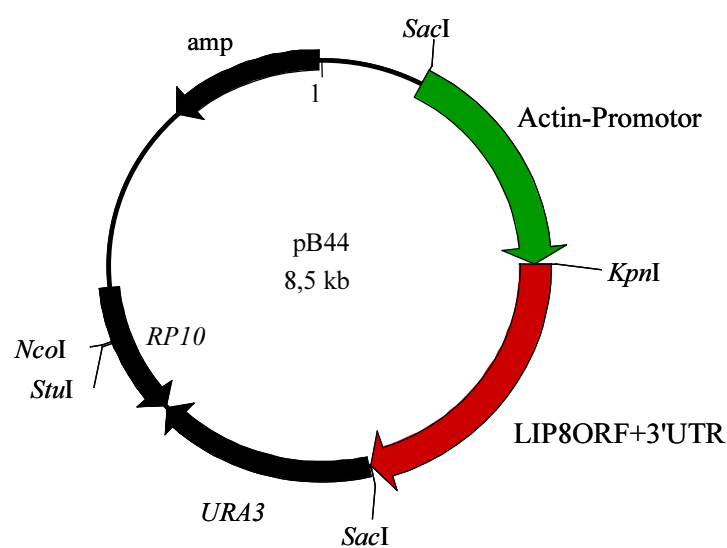


Abb. 34: Schematische Darstellung des Konstruktes pB44, das für die Retransformation und Überexpression von *LIP8* eingesetzt wurde. Als Ausgangsplasmid wurde pCip10 verwendet, in welches der *LIP8*-ORF mit angrenzenden 3'-UTR kloniert wurde. Als Promotor für die *LIP8*-Expression wurde der Promotor des Haushaltsgens Actin eingesetzt.

Das neue Konstrukt wurde für zwei verschiedene Anwendungen eingesetzt. Zum einen wurde es für die Retransformation der FOA-behandelten heterozygoten und homozygoten *lip8*-Mutanten (*ura3⁻*-auxotroph) genutzt, wobei das pCip10-Konstrukt ungeschnitten, also im zirkulären Zustand, in der Transformation eingesetzt wurde.

Die Retransformanden der heterozygoten (2/3/R2 und 5/7/R1) und der homozygoten KO-Mutanten (2/3/3/4/R1 und 5/7/5/7a) wurden mittels RT-PCR daraufhin überprüft, ob das eingebrachte Konstrukt *LIP8* exprimierte (Abb. 35).

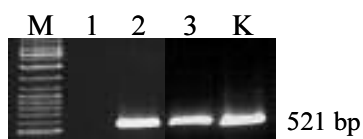


Abb. 35: Expressionsanalyse der Retransformanden der KO-Mutanten.

Mit den Primern LIP8a und LIP8b wurde eine PCR durchgeführt. Als Template diente hergestellte cDNA der Retransformanden. M: Molekulargewichtsmarker und K: genomische DNA von SC5314 (Kontrolle). Homozygote KO-Mutante 5/7/5 (Spur 1), Retransformande der homozygoten KO-Mutante 5/7/5/7a (Spur 2) und Retransformande der heterozygoten KO-Mutante 5/7/R1 (Spur 3).

Im Gegensatz zu der KO-Mutante 5/7/5 exprimierten die Retransformanden *LIP8*.

Zum anderen wurde pB44 für die Herstellung von Überexpressionsmutanten verwendet. Hierbei wurde der Grundgedanke verfolgt, in CAI-4 einen dritten *LIP8*-ORF in den *RP10*-Locus einzuführen. Mit dem Actin-Promotor sollte gewährleistet werden, dass dieser ORF konstitutiv exprimiert wird. Es wurde eine Expressionsanalyse mit den Überexpressionsmutanten durchgeführt (Abb. 36).

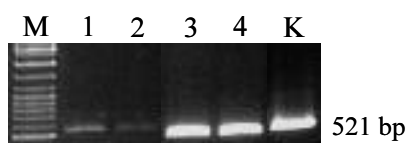


Abb. 36: RT-PCR-Analyse der Expression von *LIP8* von Überexpressionsmutanten in YPG-Medium.

Die Mutanten wurden ÜN bei 30 °C kultiviert. Anschließend wurde die RNA isoliert, um mittels RT-PCR die Expression von *LIP8* zu überprüfen. M: Molekulargewichtsmarker und K: genomische DNA von SC5314 (Kontrolle). SC5314 (Spur 1), heterozygote KO-Mutante KO2 (Spur 2), Überexpressionsmutante Ü12 (Spur 3) und Überexpressionsmutante Ü15 (Spur 4).

Nach der RNA-Isolierung wurden gleiche Mengen an RNA für die cDNA-Herstellung eingesetzt, was mit einer EF-PCR überprüft wurde. Die Expressionsanalyse hat gezeigt, dass die heterozygote Mutante (KO2) *LIP8* schwächer exprimiert als der wt. Die beiden Überexpressionsmutanten hingegen wiesen stärkere Transkript-Signale von *LIP8* auf als der wt.

3.13 Phänotypische Analyse der *LIP8*-Mutanten und – Retransformanden von *C. albicans*

Im folgenden werden die generierten KO-Mutanten (KO2, KO5, 2/3/3 und 5/7/5), KD-Mutanten und Überexpressionsmutanten (Ü12 und Ü15) unter dem Oberbegriff „*LIP8*-Mutanten“ geführt. Die KD-Mutanten werden außerdem in „Antisense“ (AS2 und AS4)- und „RNAi“-Mutanten (RNAi1 und RNAi5) unterteilt. Des weiteren gibt es die Retransformanden der heterozygoten KO-Mutanten (2/3/R2 und 5/7/R1) und der homozygoten KO-Mutanten (2/3/3/4/R1 und 5/7/5/7a).

3.13.1 Wachstum der *LIP8*-Mutanten in verschiedenen Flüssigmedien

Die generierten *LIP8*-Mutanten wurden verschiedenen phänotypischen Tests unterzogen (2.2.8.10.3). Zuerst wurde das Wachstum in einem Vollmedium (YPG) und zwei verschiedenen Lipid-Medien (YNB-Tween 40 und NuTRiflex[®] Lipid-Lösung) überprüft. Anschließend wurde das Flockungsverhalten in YPG-Medium bestimmt.

3.13.1.1 YPG-Medium

Das Wachstum der Mutanten in einem Vollmedium sollte darüber Aufschluß geben, ob ein allgemeiner Protein-Defekt vorliegen könnte.

Die Hauptkulturmedien wurden mit semisynchronisierten Pilzzellen in Mikrotiter-Platten angeimpft. Die Kultivierung erfolgte bei 30 °C, da die KO- und KD-Mutanten bei höheren Temperaturen zur Myzel- und Aggregatbildung neigen. Die Wachstumskurven wurden an einem ELISA-Reader erstellt. Als Beispiel werden die Wachstumskurven der heterozygoten und homozygoten KO-Mutanten sowie der KD-Mutanten gezeigt (Abb. 37A&B).

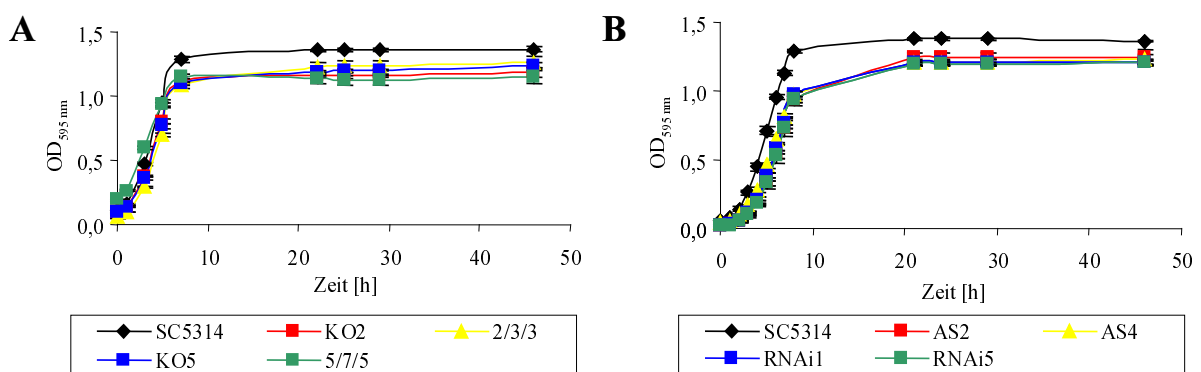


Abb. 37A&B: Wachstumskurven von *C. albicans*-wt und *lip8*-Mutanten in YPG.

Es wurden 10^6 Zellen in 200 μ l YPG in Mikrotiterplatten bei 30 °C kultiviert. Die OD-Messung erfolgte bei einer Wellenlänge von 595 nm am ELISA-Reader. (A) Wachstumskurven von SC5314, heterozygoten (KO2 und KO5) und homozygoten KO-Mutanten (2/3/3 und 5/7/5), (B) Wachstumskurven von SC5314, Antisense-Mutanten (AS2 und AS4) und RNAi-Mutanten (RNAi1 und RNAi5) in YPG. Zu jedem Zeitpunkt wurden vier Werte gemessen.

In YPG-Medium zeigten die KO- und KD-Mutanten eine etwas geringere Wachstumszunahme als der wt. Der wt besaß nach 46 h eine OD von 1,37. Zu diesem Zeitpunkt lag die OD der KO-Mutanten zwischen 1,15 (5/7/5) und 1,23 (2/3/3) und die der KD-Mutanten zwischen 1,21 (RNAi5) und 1,24 (AS2). Die Überexpressionsmutanten zeigten mit dem wt vergleichbare Wachstumskurven (nicht dargestellt).

3.13.1.2 YNB-Tween 40

Das Lipid-Medium YNB-Tween 40 wurde genutzt, um festzustellen, ob die ausgeschaltete bzw. runterregulierte Lipase wichtig für das Wachstum in einer lipidreichen Umgebung ist, in der Glucose fehlt. Die Durchführung erfolgte analog zum Versuch mit YPG (3.13.1.1). Die Wachstumskurven sind in Abb. 38A&B dargestellt.

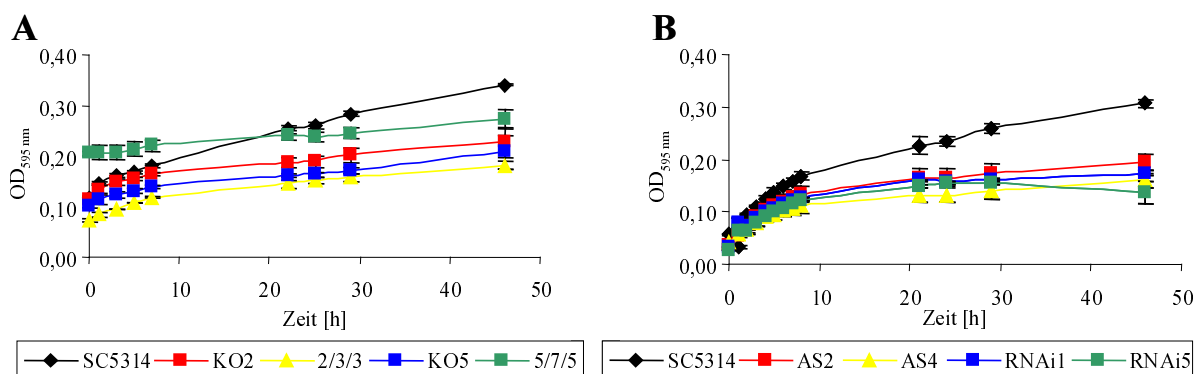


Abb. 38A&B: Wachstumskurven von wt und *lip8*-Mutanten in YNB-Tween 40.

Die Durchführung des Versuchs erfolgte analog zum vorigen Versuch (Abb. 37A&B). Wachstumskurven von (A) wt, heterozygoten und homozygoten KO-Mutanten (B) wt, Antisense- und RNAi-Mutanten in YNB-Tween 40. Zu jedem Zeitpunkt wurden vier Werte gemessen.

Die KO- und KD-Mutanten wuchsen im YNB-Tween 40 Medium schlechter als der wt. Die heterozygoten und homozygoten KO-Mutanten erreichten nach 46 h eine OD von maximal 0,27. Die OD des wt lag bei 0,34. Vor allem die KD-Mutanten wuchsen in dem eingesetzten Lipid-Medium schlechter als der wt. Über den untersuchten Zeitraum lag die OD nie über einem Wert von 0,20. Bei der RNAi5-Mutante wurde am Ende des Versuchs eine OD von 0,14 gemessen.

3.13.1.3 NuTRiflex® Lipid-Lösung

Als zweites Lipid-Medium wurde in Wachstumsversuchen die NuTRiflex® Lipid-Lösung verwendet. Diese spezielle Lösung wird in der parenteralen Ernährung eingesetzt. Mikrobielle Kontaminationen, z.B. durch *C. albicans*, stellen ein großes Problem dar, da sie über den eingesetzten Katheter direkt in das Blut des Patienten gelangen können. Die parenterale Ernährungslösung enthält Glucose, Aminosäuren, verschiedene Salze und Lipide, wie z.B. Sojabohnenöl, mittelkettige Triacylglycerole, Eilecithin und Natriumoleat. Ihr pH-Wert liegt zwischen 5 und 6. Der wt und die beiden homozygoten KO-Mutanten (2/3/3 und 5/7/5) wurden in diesem Medium bei 37 °C kultiviert (Abb. 39). Das Wachstum wurde über einen Zeitraum von drei Tagen bestimmt.

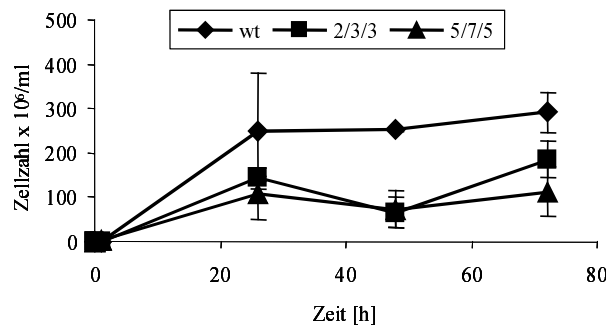


Abb. 39: Wachstumskurven von wt und KO-Mutanten in der NuTRiflex® Lipid-Lösung. Es wurde eine Zellkonzentration von 10^6 Zellen/ml eingestellt. Die Kultivierung erfolgte bei 37 °C. Die KO-Mutanten 2/3/3 und 5/7/5 wurden mit dem wt verglichen. Die Zellzahl wurde mikroskopisch mit einer Zählkammer bestimmt. Der Versuch wurde dreimal durchgeführt.

Nach einem anfänglichen Zellanzug (bis 24 h) stagnierte das Wachstum der *lip8*-KO-Mutanten. Nach zwei Tagen Wachstum erreichte der wt eine Zellkonzentration von $2,2 \times 10^8$ Zellen/ml. Zu diesem Zeitpunkt hatten die beiden KO-Mutanten eine Konzentration von $8,2 \times 10^7$ Zellen/ml (2/3/3) bzw. $8,8 \times 10^7$ Zellen/ml (5/7/5). Dies entspricht 37 % bzw. 40 % des wt-Wertes. Die Zellkonzentration der Mutanten überstieg zu keiner Zeit einen Wert von $1,6 \times 10^8$ Zellen/ml (72 h). Der wt erreichte am Ende des Versuchs eine Zellkonzentration von $2,7 \times 10^8$ Zellen/ml (72 h).

3.13.1.4 Flockung in YPG

CAI-2 und *LIP8*-Mutanten wurden ÜN in YPG bei 37 °C kultiviert. Am nächsten Tag wurde die Flockung der Ansätze überprüft (Abb. 40A&B).

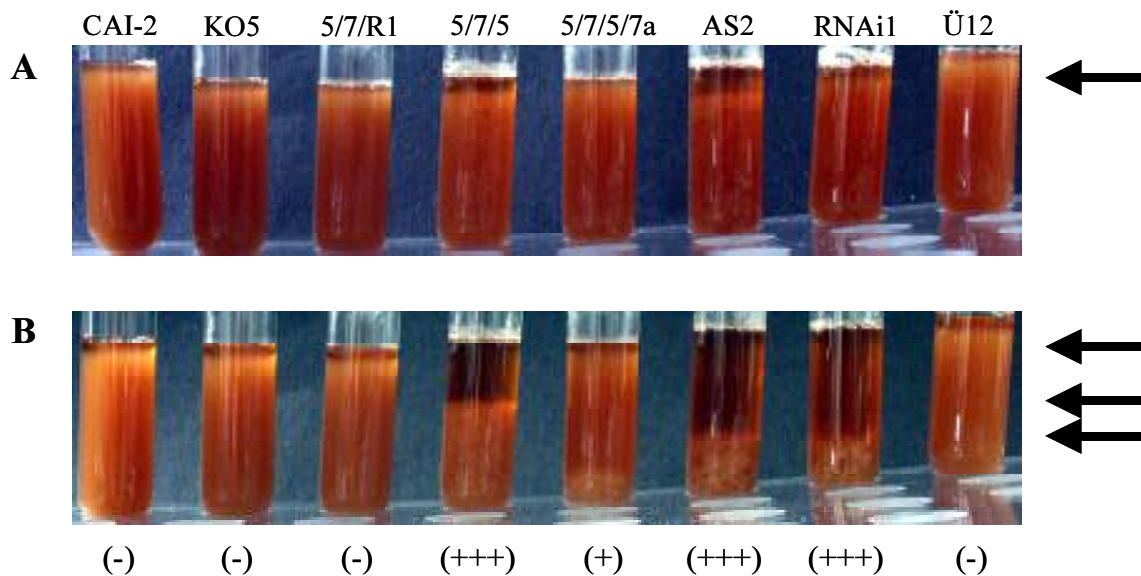


Abb. 40A&B: Flockung der *LIP8*-Mutanten.

CAI-2, verschiedene *LIP8*-Mutanten (KO5, 5/7/5, AS2, RNAi1 und Ü12) und Retransformanten (5/7/R1 und 5/7/5/7a) wurden ÜN in YPG bei 37 °C inkubiert. Nach 24 h wurden direkt nach dem Vortexen der Kultur (A) und 1 min nach dem Vortexen (B) Aufnahmen gemacht. (+++): starke Flockung, (+): leichte Flockung, (-): keine Flockung nachweisbar.

CAI-2, KO5, 5/7/R1 und Ü12 zeigten auch 1 min nach dem Vortexen noch eine gleichmäßig trübe Kulturlösung. Bei 5/7/5/7a war bereits eine leichte Sedimentbildung zu beobachten. Vor allem die KO-Mutante 5/7/5 und die KD-Mutanten AS2 und RNAi1 wiesen eine starke Flockung auf. Sie fiel durch eine Aufklärung der Kulturlösung und ein „Ausfallen“ von Zellaggregaten auf.

3.13.2 Wachstum der *LIP8*-Mutanten auf verschiedenen Festmedien

Zusätzlich zu den Flüssigmedien wurden auch verschiedene Festmedien getestet. Dafür wurden der wt und die Mutanten bei 25 °C in YPG ÜN kultiviert. Nach Bestimmung der Zellzahl wurden Verdünnungen der zu untersuchenden Stämme mit H₂O angesetzt und auf verschiedene Platten pipettiert. Diese Platten wurden, falls nicht etwas anderes angegeben wird, bei 25 °C inkubiert.

3.13.2.1 pH-Sensitivität der *LIP8*-Mutanten

Das Verhalten der *LIP8*-Mutanten wurde auf YPG-Platten mit unterschiedlichen pH-Werten untersucht (Abb. 41A-C). Eine pH-Sensitivität kann mit einem Defekt in der Vakuole korrelieren. Interessanterweise wurden bereits Lipasen beschrieben, die in der Vakuolenmembran lokalisiert sind (Epple *et al.*, 2001).

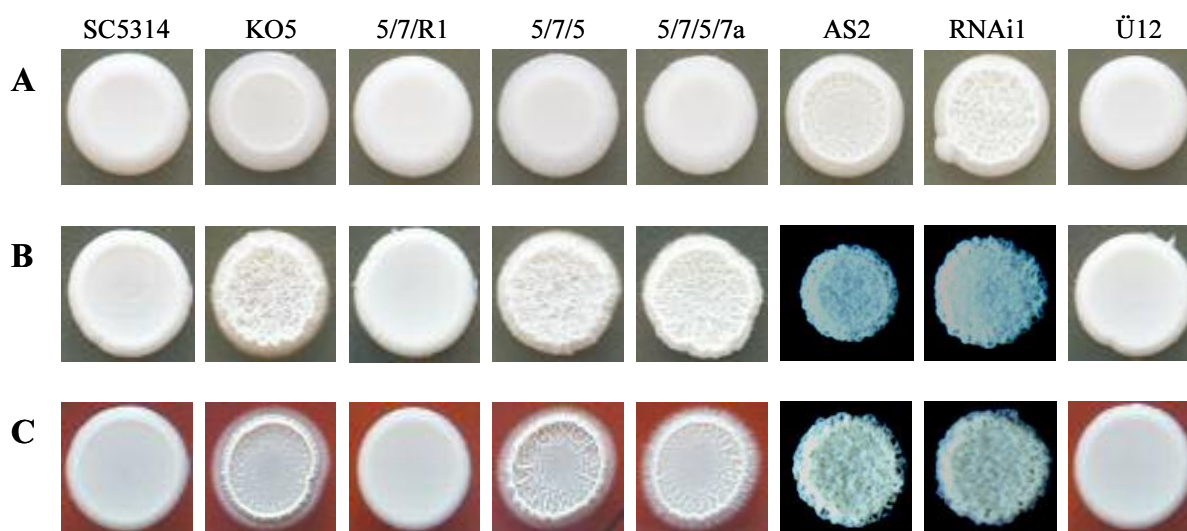


Abb. 41A-C: Wachstum von wt und verschiedenen *LIP8*-Mutanten und -Retransformanden auf YPG-Platten mit unterschiedlichen pH-Werten.

Jeweils 10⁶ *Candida*-Zellen wurden in einem Volumen von 10 µl H₂O auf eine Platte pipettiert. Der wt wurde mit den Mutanten KO5, 5/7/5, AS2, RNAi1 und Ü12 und den Retransformanden 5/7/R1 und 5/7/5/7a verglichen. Der Versuch wurde mit den pH-Werten (A) 4, (B) 7 und (C) 10 durchgeführt.

Die heterozygoten und homozygoten KO-Mutanten sowie die Retransformante der homozygoten Mutante (5/7/5/7a) zeigten bei pH 7 und pH 10 einen anderen Phänotyp als der wt. Dieser Phänotyp wird im folgenden mit „rau“ bezeichnet. Die mikroskopische Untersuchung der Probe einer rauhen Kolonie ergab, dass bei diesem Phänotyp vor allem Myzelzellen vorlagen. Die KD-Mutanten zeigten ab pH 7 einen „rauen“ Phänotyp. Bei pH 4 war dieser Phänotyp nur sehr schwach ausgeprägt.

Die Retransformante der heterozygoten KO-Mutante (5/7/R1) und die Überexpressionsmutante (Ü12) wiesen bei allen untersuchten pH-Werten den „glatten“ Phänotyp des wt auf. Diese Kolonien bestanden zum großen Teil aus Hefezellen.

3.13.2.2 Temperatur-Sensitivität der *LIP8*-Mutanten

Neben dem pH-Wert wurde ebenfalls der Einfluß der Temperatur (18, 30, 37 und 42 °C) auf Wachstum und Kolonieform der Mutanten getestet (Abb. 42).

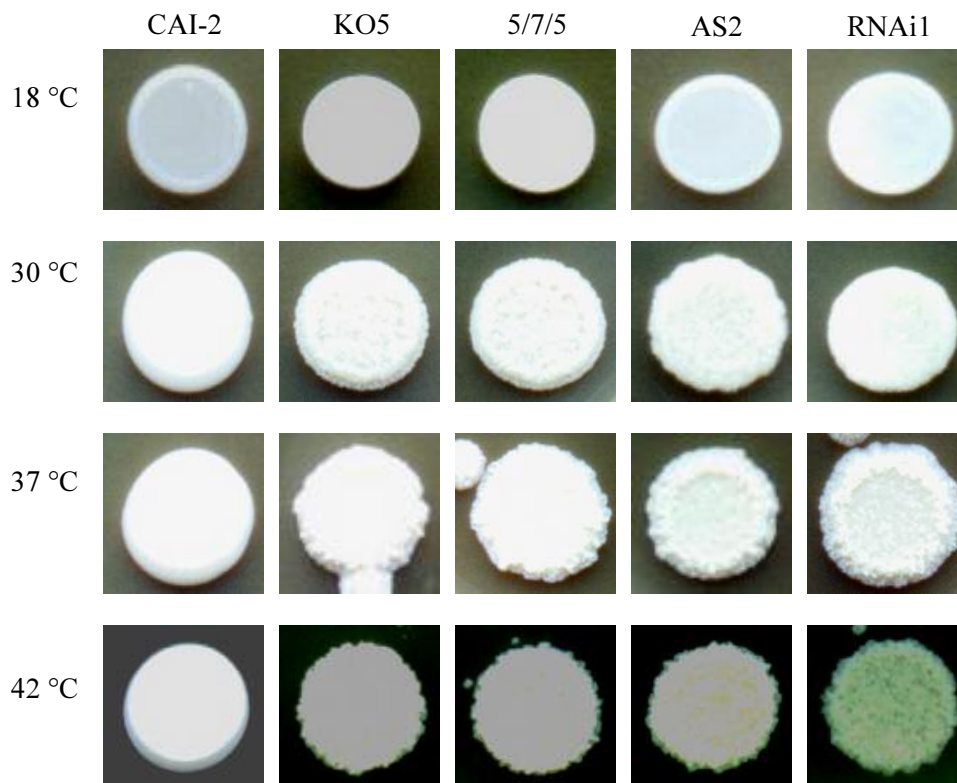


Abb. 42: Wachstum von CAI-2 und verschiedenen *LIP8*-Mutanten auf YPG-Platten, welche bei unterschiedlichen Temperaturen inkubiert wurden.

Es wurden jeweils 10 µl H₂O mit 10⁶ *Candida*-Zellen auf eine Platte pipettiert. CAI-2 wurde bei 18, 30, 37 und 42 °C mit den Mutanten KO5, 5/7/5, AS2 und RNAi1 verglichen.

Bei 18 °C zeigten alle getesteten Mutanten den gleichen „glatten“ Phänotyp wie CAI-2. Bei höheren Temperaturen wiesen die Mutanten aber einen „rauhem“ Phänotyp auf, der sich mit zunehmender Inkubationstemperatur verstärkte.

3.13.2.3 Myzel- und Chlamydosporenbildung der *LIP8*-Mutanten

Es wurde überprüft, ob die hergestellten *LIP8*-Mutanten einen Defekt in der Myzel- oder Chlamydosporenbildung aufwiesen. Für die Myzelbildung sind verschiedene Induktoren bekannt, wobei Serum als stärkster Induktor in der Literatur geführt wird (Ernst, 2000). Die Mutanten wurden auf dem serumhaltigen Medium FCS-Agar getestet, wo sie keinen erkennbaren Unterschied zum wt zeigten (nicht dargestellt).

Ein weiteres Medium zur Induktion von Myzel ist das sogenannte Spider-Medium (Liu *et al.*, 1994). Alle getesteten Mutanten konnten auf diesem Medium Myzel bilden (Abb. 43), wobei sich jedoch die Phänotypen der Kolonien vom wt unterschieden.



Abb. 43: Wachstum von wt und verschiedenen Mutanten auf Spider-Medium.

Es wurden jeweils 100 μl H_2O mit 10-100 *Candida*-Zellen auf eine Platte ausgestrichen. Der wt (SC5314) wurde mit den Mutanten KO5, 5/7/5 und Ü12 und den Retransformanten 5/7/R1 und 5/7/5/7a bezüglich des Wachstums auf Spider-Platten verglichen. Die Inkubation erfolgte bei 25 °C.

Die einzelne Kolonie aller Stämme konnte in zwei Bereiche unterteilt werden: in eine zentrale Region und eine sich davon radial ausbreitende Region. Vor allem die Retransformante 5/7/R1 und die Überexpressionsmutante zeigten eine sehr stark ausgeprägte Myzelbildung in der äußeren Region. Die homozygote KO-Mutante (5/7/5) wies eine kräuselige zentrale Region auf, welche bei den restlichen Mutanten und dem wt eine glatte Ausprägung hatte.

Neben der Myzelbildung wurde ebenfalls die Fähigkeit von *C. albicans* untersucht, Chlamydosporen zu erzeugen. Um diese Sporen zu induzieren, wurden die Zellen für mehrere Tage bei einer niedrigen Temperatur (25 °C) sowie unter Lichtausschluß und mikroaeroben Bedingungen auf Reisextrakt-Agar inkubiert (Abb. 44).

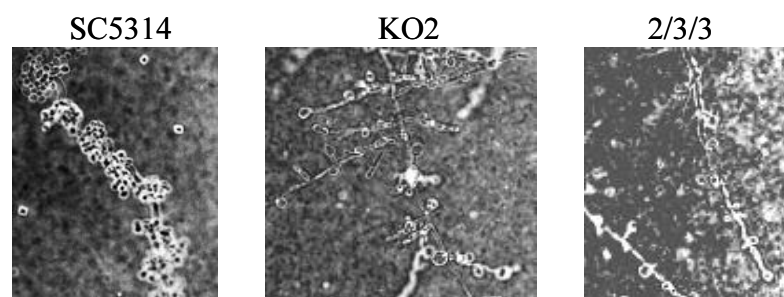


Abb. 44: Wachstum von wt und KO-Mutanten auf einem Chlamydosporen-induzierendem Medium. Der wt (SC5314) wurde mit den KO-Mutanten KO2 und 2/3/3 bezüglich der Chlamydosporenbildung auf Reisextrakt-Agar verglichen. Die Inkubation erfolgte für fünf Tage bei 25 °C unter Lichtausschluß.

Die *lip8*-Mutanten konnten wie der wt Chlamydosporen auf Reisextrakt-Agar formieren. Die Überexpressionsmutanten und die KD-Mutanten bildeten ebenfalls Chlamydosporen unter den gewählten Bedingungen (nicht dargestellt).

3.13.2.4 Analyse des Phänotyps der *LIP8*-Mutanten auf S4D-Agar

Der *C. albicans*-Stamm WO-1 besitzt zwei unterschiedliche Phänotypen, die sich auch in ihrer Genexpression unterscheiden. Sie werden als „opaque“- und „white“-Form bezeichnet. Diese beiden Typen lassen sich durch einen Temperaturwechsel ineinander überführen. Bei 25 °C liegt WO-1 als „opaque“-Form vor, welche ovale Zellen ausbildet. Bei Erhöhung der Temperatur auf 37 °C wechselt dieser Stamm zur „white“-Form, die sich durch kleinere, runde Zellen auszeichnet. Dieser durch Temperatur induzierbare Wechsel der Phänotypen wird als „phenotypic switching“ bezeichnet.

Die Phänotypen lassen sich auf einem speziellen Medium (S4D-Agar) (Andersen & Soll, 1987), dem der Farbindikator Phloxine B zugesetzt wurde, unterscheiden. Die *LIP8*-Mutanten und -Retransformanden wurden auf diesem Medium getestet (Abb. 45).



Abb. 45: Wachstum von wt und *LIP8*-Mutanten auf S4D-Agar, der zum Sichtbarmachen der verschiedenen Phänotypen des „Switching“-Stammes WO-1 eingesetzt wird.

Es wurden 10 μ l H₂O mit 10⁶ *Candida*-Zellen auf die Platten pipettiert. Der wt (SC5314) wurde bezüglich des Wachstums und der phänotypischen Ausprägung auf S4D-Agar mit den Mutanten KO5, 5/7/5, AS2, RNAi1 und Ü12 sowie den Retransformanden 5/7/R1 und 5/7/5/7a verglichen. Die Inkubation erfolgte für 12 Tage bei 25 °C.

Heterozygote und homozygote Mutante sowie die Retransformante der homozygoten Mutante wiesen eine Trübung auf, welche die zentrale Region der Kolonie umgab. Die Überexpressionsmutante und die Retransformante der heterozygoten Mutanten zeigten nur partiell diese Trübung. Auffällig bei diesen beiden Stämmen war die vermehrte Myzelbildung gegenüber dem wt und den restlichen Mutanten. Außerdem besaßen ihre Kolonien am Rand markante rote Regionen, die bei den anderen Mutanten nicht so stark ausgeprägt und beim wt überhaupt nicht sichtbar waren.

3.13.2.5 Einfluß von anderen Kohlenstoff-Quellen als Glucose auf das Wachstum der *LIP8*-Mutanten

Um dem Pilz eine andere Kohlenstoff (C)-Quelle als Glucose zu bieten, wurden Medien getestet, die Galactose oder Kaliumacetat enthielten. Hiermit sollte der Einfluß einer Veränderung der Lipase-Genexpression auf die Zuckeraufnahme oder -verarbeitung überprüft werden. CAI-2 wurde mit verschiedenen *LIP8*-Mutanten diesbezüglich verglichen (Abb. 46A&B).

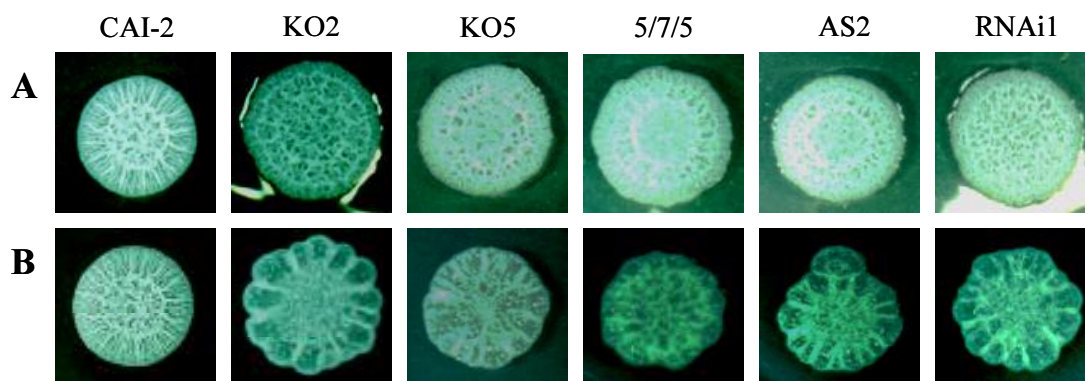


Abb. 46A&B: Wachstum von CAI-2 und verschiedenen *lip8*-Mutanten auf SD-Platten mit alternativen C-Quellen. Es wurden jeweils 10 μ l H₂O mit 10⁶ *Candida*-Zellen auf eine Platte pipettiert. CAI-2 wurde mit den *LIP8*-Mutanten KO2, KO5, 5/7/5, AS2 und RNAi1 bezüglich des Wachstums auf (A) SD-Glycerol/K-Ac- und (B) SD-Glycerol/Galactose-Platten verglichen. Die Inkubation erfolgte bei 25 °C.

Die *lip8*-Mutanten zeigten einen von CAI-2 abweichenden Phänotyp. Im galactosehaltigen Medium wiesen die Mutanten am Rand der Kolonie Ausbuchtungen auf, die bei CAI-2 in dieser Form nicht vorlagen. Bei den heterozygoten isogenen KO-Mutanten KO2 und KO5 war dieser Phänotyp jedoch unter gleichen Bedingungen verschieden stark ausgeprägt. CAI-2 zeigte auf beiden Medien einen „sonnenförmigen“ Phänotyp, der zwei unterscheidbare Regionen aufwies. Es gab eine zentrale „kräuselige“ Region, von der feine Linien radial nach außen liefen, die die äußere Region bildeten. Die *lip8*-Mutanten wuchsen auf den K-Ac-Platten kräuselig, jedoch nicht sonnenförmig.

3.13.2.6 Einfluß von hohem osmotischen Druck auf das Wachstum der *LIP8*-Mutanten

Zur Überprüfung des Einflusses von hohem osmotischen Druck auf das Wachstum der *LIP8*-Mutanten wurden hohe Konzentrationen an Sorbitol oder Glycerol eingesetzt. Diese Untersuchung sollte etwaige Defekte in der Zellwand oder im Cytoskelett aufdecken. Der wt wurde mit den *LIP8*-Mutanten und -Retransformanden verglichen (Abb. 47A&B).

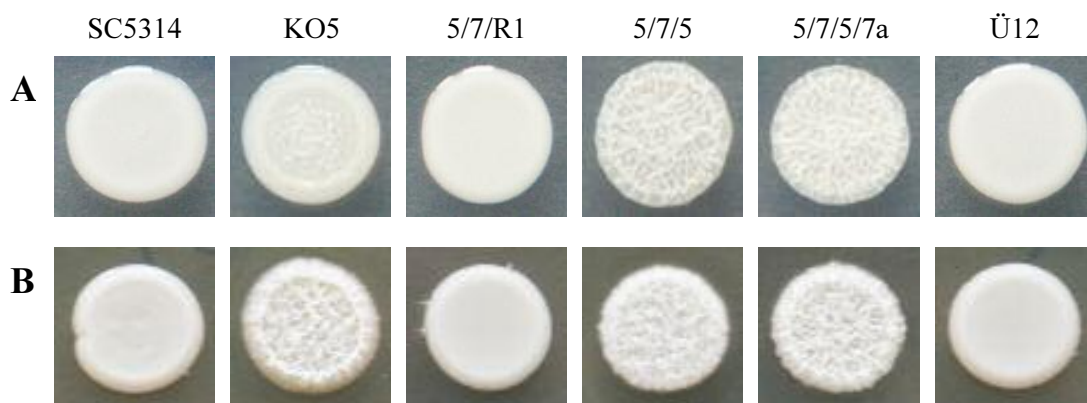


Abb. 47A&B: Um den Einfluß von hohem osmotischen Druck zu testen, wurden wt und *LIP8*-Mutanten auf Glycerol- bzw. Sorbitol-haltigen Platten inkubiert.

Es wurden 10 µl H₂O mit 10⁶ *Candida*-Zellen auf die Platten pipettiert. Der wt (SC5314) wurde mit den Mutanten KO5, 5/7/5 und Ü12 sowie den Retransformanden 5/7/R1 und 5/7/5/7a bezüglich der Sensitivität auf hohen osmotischen Druck ausgelöst durch hohe Konzentrationen an (A) Glycerol (YPG-7-Glycerol) oder (B) Sorbitol (SD-7-Sorbitol) verglichen. Die Inkubation erfolgte bei 25 °C.

Im Wachstum unterschieden sich die Überexpressionsmutante Ü12 und die Retransformande 5/7/R1 der heterozygoten KO-Mutante nicht vom wt. Die übrigen Mutanten und die Retransformande der homozygoten Mutante konnten ebenfalls auf diesen Medien wachsen, zeigten jedoch einen anderen Phänotyp als der wt. Der wt wies einen glatten Phänotyp auf, die übrigen Mutanten und die Retransformande zeigten einen kräuseligen Phänotyp.

3.13.2.7 Lipolytische Aktivität der *LIP8*-Mutanten auf Festmedium

Da eine von zehn sekretierten Lipasen ausgeschaltet wurde, stellte sich die Frage, inwieweit sich dies auf die gesamtlipolytische Aktivität auswirken könnte. Es wurden verschiedene Tween-Medien getestet, die sich in der Kettenlänge des Substrats unterschieden (Abb. 48A&B).

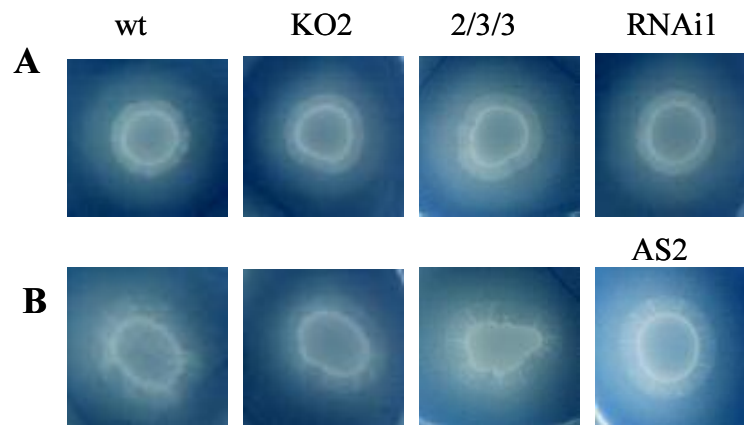


Abb. 48A&B: Wachstum und lipolytische Aktivität von wt und *lip8*-Mutanten auf verschiedenen Tween-haltigen Medien.

Der wt wurde mit den Mutanten KO2, 2/3/3, AS2 und RNAi1 bezüglich der lipolytischen Aktivität auf (A) Tween 40- und (B) Tween 60-Agar verglichen. Die Inkubation erfolgte bei 25 °C.

Der wt und alle überprüften Mutanten zeigten eine vergleichbar starke lipolytische Aktivität, die sich durch eine die Kolonie umgebende Trübung des Mediums auszeichnete. Auf Tween 20- und Tween 80-haltigen Agar-Platten konnte ebenfalls kein Unterschied bzw. verminderte lipolytische Aktivität zwischen Mutanten und wt detektiert werden (nicht dargestellt).

3.13.3 Lipolytische Aktivität der *LIP8*-Mutanten im Kulturüberstand

Die *LIP8*-Mutanten wurden auf sekretierte lipolytische Aktivität überprüft. Hierfür wurden sie in NuTRIflex[®] Lipid-Medium für 24 h bei 37 °C kultiviert. Anschließend wurde der Überstand in einem Lipase-Aktivitätstest eingesetzt (2.2.8.12). Die KO-, KD- und die Überexpressionsmutanten sowie die Retransformanden wurden untersucht (Abb. 49A&B).

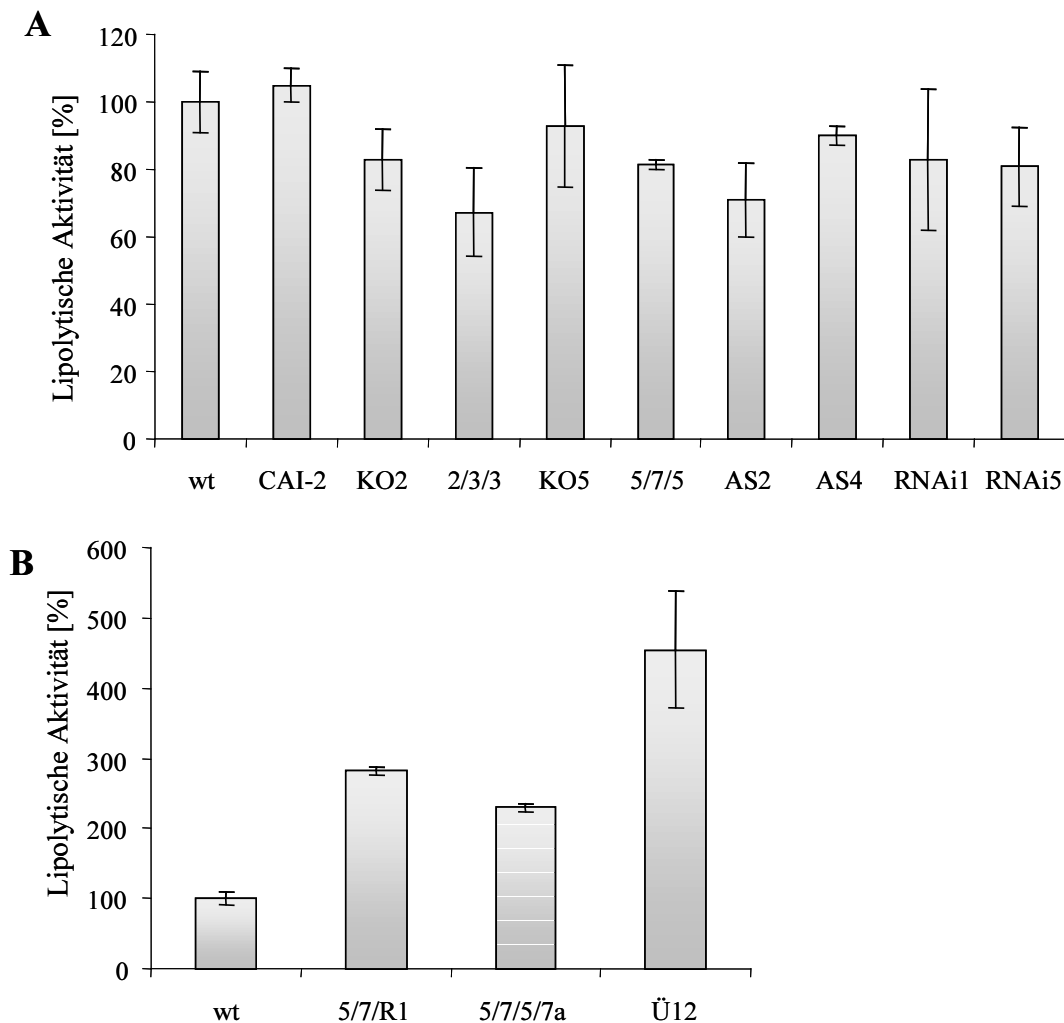


Abb. 49A&B: Lipolytischer Aktivitätstest verschiedener *LIP8*-Mutanten und -Retransformanden im Vergleich zum wt.

(A) Wt, KO-Mutanten (KO2, 2/3/3, KO5 und 5/7/5), KD-Mutanten (AS2, AS4, RNAi1 und RNAi5) und (B) Retransformanden (5/7/R1 und 5/7/5/7a) und eine Überexpressionsmutante (Ü12) wurden in NuTRIflex® Lipid-Medium für 24 h inkubiert. Anschließend wurde die lipolytische Aktivität des Überstandes gemessen. Es wurde mindestens eine Doppelbestimmung durchgeführt.

Die heterozygote *ura3*⁻-Mutante CAI-2 zeigte eine mit dem wt vergleichbare lipolytische Aktivität. Die KO- und KD-Mutanten wiesen nach Kultivierung im NuTRIflex® Lipid-Medium im Durchschnitt eine geringere extrazelluläre lipolytische Aktivität auf als der wt. Verglichen mit dem wt erreichten die Mutanten Werte von 65 % (2/3/3) bis maximal 90 % (AS4) seiner Aktivität, wobei nur bei den beiden homozygoten KO-Mutanten und bei einer Antisense-Mutante (AS2) eine signifikante Abweichung festgestellt wurde.

Bei der Überexpressionsmutante Ü12 wurde eine sekretierte lipolytische Aktivität von 450 % des wt-Wertes gemessen. Die heterozygote und die homozygote *LIP8*-Retransformande (5/7/R1 und 5/7/5/7a) erreichten Werte von 282 % bzw. 230 %.

3.14 Infektionsverhalten der *LIP8*-Mutanten

Nach der phänotypischen Analyse wurden die *LIP8*-Mutanten in verschiedenen Maus- und Haut-Infektionsmodellen auf ihre Virulenz getestet (2.2.8.3; 2.2.8.10.5). Des Weiteren wurde die Adhäsion an Gelatine sowie die Interaktion mit Endothelzellen (Adhäsion und „Damage“) analysiert (2.2.8.10.4).

3.14.1 Untersuchung der Adhäsion der *LIP8*-Mutanten

Es ist denkbar, dass die Lipasen eine eigene Domäne für die Adhäsion besitzen bzw., dass die Freisetzung von hydrophoben Produkten, wie den freien Fettsäuren, zur Adhäsion beiträgt. Um diese direkte oder indirekte Beteiligung zu überprüfen, wurden mit den *Candida*-Mutanten Adhäsions-Versuche an Gelatine und Endothelzellen durchgeführt (2.2.8.10.4).

3.14.1.1 Untersuchung der Adhäsion der *LIP8*-Mutanten an Gelatine

Der wt und CAI-2 wurden bezüglich der Adhäsion an Gelatine mit den verschiedenen KO-, KD-Mutanten und Überexpressionsmutanten verglichen. Hierfür wurden mit Gelatine überzogene 6-Well-Platten eingesetzt. Die *Candida*-Stämme wurden ÜN in YPG bei 30 °C kultiviert. Am nächsten Tag wurde die Zellzahl bestimmt und eine definierte Zellkonzentration in HBSS eingestellt. Die Hefezellen wurden auf die Gelatine pipettiert und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden nicht-adhärente Zellen abgespült. Das Well wurde dann mit YPG überzogen und nach zwei Tagen die Zahl der Zellen bestimmt, die an Gelatine adhärten (Abb. 50).

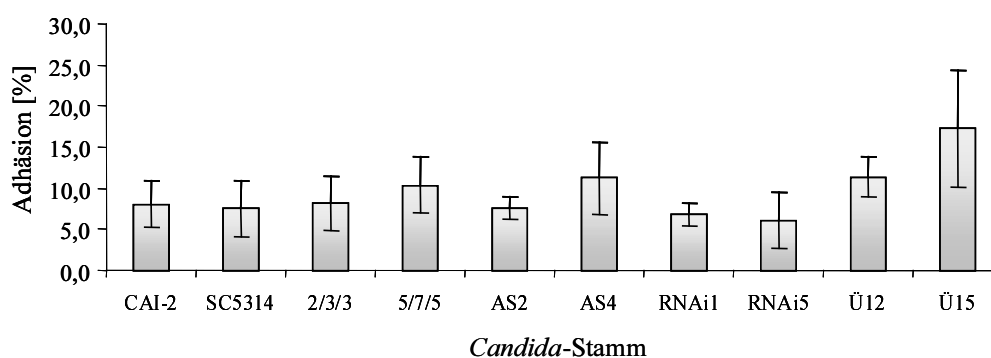


Abb. 50: Adhäsion von wt und *LIP8*-Mutanten an Gelatine.

Es wurde die Adhäsion von wt (SC5314), CAI-2 und *LIP8*-Mutanten an Gelatine untersucht. Der Prozentsatz an *Candida*-Zellen, die innerhalb von 30 min bei 37 °C an Gelatine adhärten, ist angegeben. Der Versuch wurde als Dreifachbestimmung an mindestens drei verschiedenen Tagen durchgeführt.

CAI-2 und wt zeigten eine vergleichbare Adhäsion von ca. 8 % an Gelatine. Auch die KO- und KD-Mutanten sowie die Überexpressionsmutanten wiesen unter diesen Bedingungen einen ähnlichen Prozentsatz an adhärenen *Candida*-Zellen auf. Es konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

3.14.1.2 Untersuchung der Adhäsion der *LIP8*-Mutanten an humane Endothelzellen

C. albicans ist dazu in der Lage, an humane Endothelzellen zu adhären und diese zu penetrieren. Es stellte sich die Frage, ob die hergestellten KO- und KD-Mutanten eine geringere bzw. die Überexpressionsmutanten eine erhöhte Adhäsion an die Endothelzellen zeigen würden als der wt.

Isolierte Endothelzellen wurden auf Gelatine-überzogene 6-Well-Platten gegeben. Nach dem Erreichen der Konfluenz wurden, wie unter 2.2.8.10.4 beschrieben, Adhäsionsversuche durchgeführt (Abb. 51).

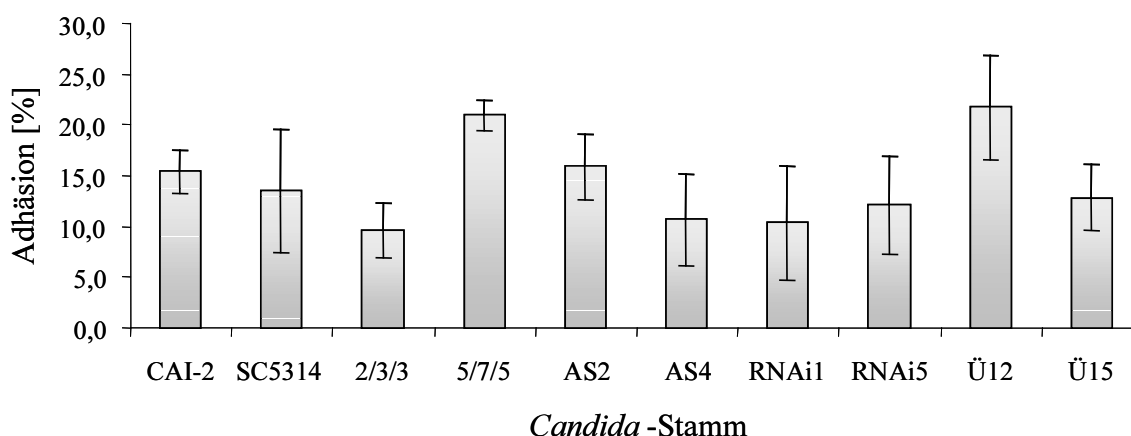


Abb. 51: Adhäsion von wt und *LIP8*-Mutanten an menschliche Endothelzellen.

Es wurde die Adhäsion von verschiedenen *LIP8*-Mutanten an Endothelzellen untersucht. Wt (SC5314) und CAI-2 wurden mit KO-Mutanten (2/3/3 und 5/7/5), KD-Mutanten (AS2, AS4, RNAi1 und RNAi5) und Überexpressionsmutanten (Ü12 und Ü15) verglichen. Der Prozentsatz an *Candida*-Zellen, die innerhalb von 30 min bei 37 °C an die humanen Endothelzellen adhärten, ist angegeben. Der Versuch wurde als Dreifachbestimmung an mindestens drei verschiedenen Tagen durchgeführt.

Wie beim Adhäsionsversuch mit Gelatine zeigten die Mutanten unter den gegebenen Bedingungen keinen Unterschied zum wt. Die Adhäsion der Mutanten an humane Endothelzellen wies, verglichen mit dem wt, keine signifikante Inhibition bzw. Erhöhung auf.

3.14.2 „Damage“-Versuch der *LIP8*-Mutanten

Um zu überprüfen, ob die *LIP*-Gene an der Penetration von Endothelzellen beteiligt sind, wurden mit den *LIP8*-Mutanten sogenannte „Damage“-Versuche an Endothelzellen durchgeführt (2.2.8.10.4). Hierfür wurden humane Endothelzellen ÜN mit radioaktivem Chrom (^{51}Cr) in Mikrotiterplatten inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Endothelzellen mit dem wt und verschiedenen *LIP8*-Mutanten inokuliert und für 3 h inkubiert. Während dieser Zeit bildeten alle Stämme Keimschläuche. Durch Zerstörung der Endothelzellen freigesetzte Radioaktivität wurde anschließend mit einem γ -Zähler bestimmt (Abb. 52). Die spezifische Freisetzung ist ein Maß der Zerstörung der Endothelzellen.

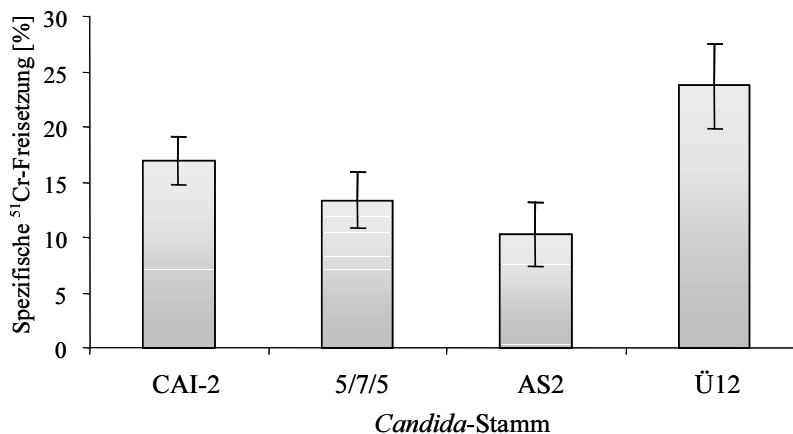


Abb. 52: „Damage“-Versuch von CAI-2 und *LIP8*-Mutanten mit menschlichen Endothelzellen. Es wurde die Invasivität von verschiedenen *LIP8*-Mutanten an Endothelzellen untersucht. CAI-2 wurde mit der KO-Mutante 5/7/5, KD-Mutante AS2 und der Überexpressionsmutante Ü12 verglichen. Die mit ⁵¹Cr behandelten Endothelzellen wurden für 3 h mit den verschiedenen *Candida*-Stämmen inkubiert. Anschließend wurde die freigesetzte Radioaktivität mit einem γ -Zähler bestimmt. Die spezifische Freisetzung von radioaktivem ⁵¹Cr ist in Prozent angegeben. Sie ist ein Maß für die Invasivität der *Candida*-Zellen. Der Versuch wurde als Dreifachbestimmung an zwei verschiedenen Tagen durchgeführt.

Die Antisense-Mutante AS2 verursachte eine geringere Freisetzung an meßbarer Radioaktivität als der wt. Die Überexpressionsmutante Ü12 bewirkte eine signifikant größere Freisetzung an radioaktivem Chrom als der wt. Die KO-Mutante 5/7/5 zeigte im Mittel eine geringere Invasivität als der wt, wobei der Unterschied nicht signifikant war.

3.14.3 Infektionsverlauf und Expressionsstudie von *LIP8*-Mutanten während der Infektion verschiedener künstlicher Hautmodelle

Es stellte sich die Frage, ob die Lipase-Genfamilie direkt an der Besiedlung und Infektion von Schleimhäuten beteiligt ist. Wie die Expressionsstudien gezeigt haben (3.7.3.1; 3.7.3.2), werden die Lipase-Gene während der Infektion von künstlichen Schleimhaut-Modellen differentiell und zeitlich reguliert. Die Expression von *LIP8* konnte zu allen untersuchten Zeitpunkten in beiden Hautmodellen nachgewiesen werden. Um festzustellen, ob diese spezielle Lipase eine wichtige Rolle während dieser Infektionen besitzt, wurden Infektionsversuche mit der KO-Mutante 5/7/5 durchgeführt.

3.14.3.1 Untersuchung der Transkription der Gene *LIP1-10* einer KO-Mutante während der Infektion eines künstlichen oralen Epithels (RHE)

Um die Rolle von Lip8 während einer RHE-Infektion zu analysieren, wurde analog zur wt-Infektion (3.7.3.1) ein Versuch mit der KO-Mutante 5/7/5 durchgeführt. Es wurden Proben für histologische Untersuchungen (Abb. 53A&B) und Expressionsstudien (Tab. 18) entnommen.

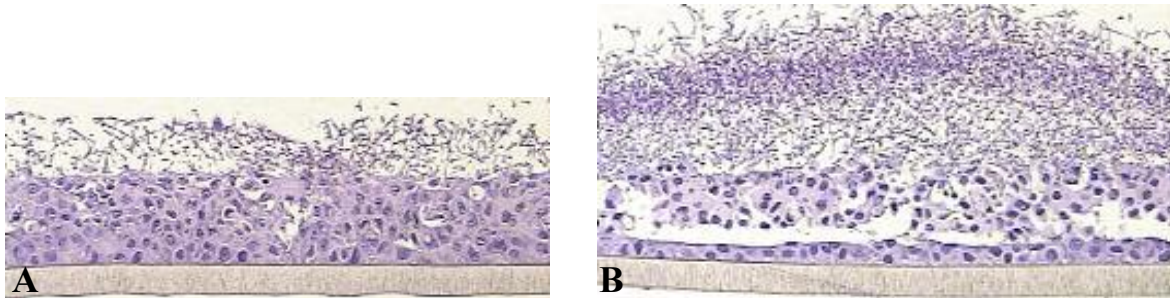


Abb. 53A&B: Lichtmikroskopische Aufnahmen mit 400facher Vergrößerung von histologischen Präparaten des RHE-Modells während der Infektion mit einer *C. albicans* KO-Mutante.

Die künstliche Haut wurde mit 2×10^6 Zellen infiziert. An zwei verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben für die histologische Untersuchung entnommen. Die Histologie wurde von der Firma SkinEthic durchgeführt. Nicht-infiziertes RHE-Gewebe ist in Abb. 19A zu sehen. (A): 12 h nach der Inokulation mit 5/7/5. *Candida*-Zellen adhäreren an das Gewebe. Es sind vor allem Myzelzellen zu beobachten. Zum Teil fängt der Pilz an, die Hautschicht zu penetrieren. Es sind bereits leichte cytotoxische Effekte an der Oberfläche zu erkennen. (B): Nach 36 h Infektion hat sich der Pilz vermehrt. Außerdem hat er Gewebeschädigungen der suprabasalen Schichten verursacht. Es liegt eine starke Myzelbildung vor und die Myzelzellen bilden eine Pseudomembran aus. Der Versuch wurde einmal durchgeführt.

Die KO-Mutante war dazu in der Lage, humane orale Epithelzellen zu infizieren. Nach 12 h war eine starke Myzelbildung sichtbar. Das Epithel zeigte zu diesem Zeitpunkt bereits cytotoxische Effekte. Weitaus deutlicher waren diese Effekte nach 36 h ausgeprägt. Es kam zu Vakuolenbildungen und partiellen Nekrosen. Die Pilzzellen bildeten eine auffällige Pseudomembran. Parallel wurde ebenfalls das Expressionsmuster der Lipase-Genfamilie bestimmt (Tab. 18).

Tab. 18: Zusammenfassung der Expression der *LIP*-Gene während einer Infektion des RHE-Modells mit einer KO-Mutante.

Das Epithel wurde mit der KO-Mutante 5/7/5 inokuliert. Nach 12 h, 36 h und 48 h wurden Proben genommen. Die Expression der Lipase-Gene wurde mittels RT-PCR überprüft. +: Expression des Gens; (+): mRNA-Expression an der Nachweisgrenze; -: keine mRNA nachweisbar.

<i>LIP</i>	Zeit nach der Infektion		
	12 h	36 h	48 h
1	-	-	-
2	(+)	(+)	(+)
3	-	-	-
4	+	+	+
5	+	+	(+)
6	+	+	+
7	+	+	+
8	-	-	-
9	-	-	-
10	-	-	-

Die Lipase-Gene *LIP2* und *LIP4-7* wurden während des gesamten untersuchten Zeitraums exprimiert, wobei die *LIP2*-Expression knapp oberhalb der Nachweisgrenze lag. Von *LIP5* konnte nach zwei Tagen Infektion nur noch ein schwaches Expressionssignal detektiert werden. Es konnten keine Transkripte von *LIP1*, *LIP3* und *LIP8-10* nachgewiesen werden. Die Lipase-Gene der KO-Mutanten wurden differentiell reguliert.

3.14.3.2 Untersuchung der Transkription der Gene *LIP1-10* einer KO-Mutante während der Infektion eines künstlichen vaginalen Epithels

Neben dem RHE-Modell wurde ebenfalls das vaginale Schleimhaut-Modell mit der KO-Mutante 5/7/5 infiziert. Wie bereits in Kapitel 3.7.3.2 gezeigt, war *C. albicans* dazu in der Lage dieses Gewebe zu befallen und zu penetrieren. Während der Infektion wurden verschiedene Lipase-Gene exprimiert und in Abhängigkeit von der Zeit reguliert. Der Infektionsversuch mit der KO-Mutante erfolgte analog zum Versuch mit dem wt. Zu drei verschiedenen Zeitpunkten (12 h, 24 h und 48 h) wurden Hautproben für histologische Untersuchungen (Abb. 54A-C) und Expressionsanalysen (Tab. 19) genommen.

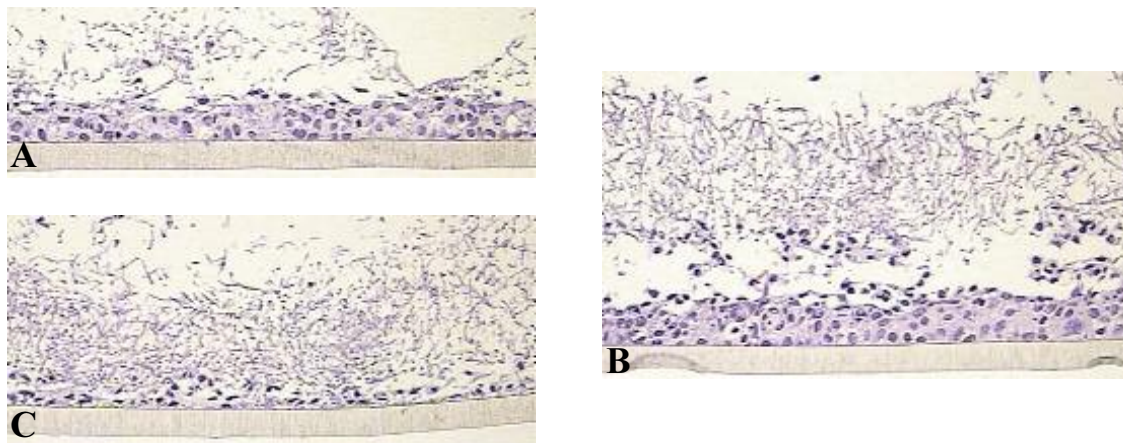


Abb. 54A-C: Lichtmikroskopische Aufnahmen mit 400facher Vergrößerung von histologischen Präparaten des vaginalen Schleimhaut-Modells während der Infektion mit einer KO-Mutante.

Zu drei verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben für die histologische Untersuchung und Gesamt-RNA-Isolierung genommen. Die Histologie wurde von der Firma SkinEthic durchgeführt. Nicht-infiziertes vaginales Schleimhaut-Modell ist unter Abb. 21A zu sehen. (A): 12 h nach der Inokulation mit der KO-Mutante 5/7/5. Hefezellen und Myzel adhäreren an das Gewebe. Der Pilz fängt an, die Hautschichten zu penetrieren. Es sind bereits cytotoxische Effekte an der Oberfläche zu erkennen. (B): Nach 24 h Infektion hat der Pilz Gewebeschädigungen der suprabasalen Schichten verursacht. Myzelzellen fangen an, eine membranähnliche Schicht auszubilden. Es ist eine partielle Nekrose der Mucosa zu beobachten. (C): 48 h nach Inokulation ist das Schleimhaut-Gewebe fast vollständig zerstört. Es ist nur eine sehr dünne Schicht an zusammenhängenden Zellen zu sehen. Der Versuch wurde einmal durchgeführt.

Nach 12 h Infektion hatte die KO-Mutante bereits Myzel gebildet. Es kam zu oberflächlichen cytotoxischen Schädigungen des Epithels. Das sich stärker ausbildende Myzel begann nach einem Tag, eine Art Pseudomembran zu formieren. Zu diesem Zeitpunkt konnten schwerere Gewebeschädigungen festgestellt werden, und nach zwei Tagen Infektion war das Schleimhaut-Gewebe fast vollständig zerstört.

Während des Versuchs konnten weder Transkripte des zerstörten *LIP8*-, noch des *LIP10*-Gens nachgewiesen werden (Tab. 19). Von den restlichen Lipase-Genen konnten zu allen drei Zeitpunkten Transkriptionssignale detektiert werden, wobei die Signale von *LIP1*-, *LIP2*- und *LIP9*-mRNA über den gesamten Zeitraum knapp oberhalb der Nachweisgrenze lagen. Von *LIP3* konnte erst nach 48 h ein deutliches Signal nachgewiesen werden (Tab. 19).

Tab. 19: Zusammenfassung der Expression der *LIP*-Gene während einer Infektion des vaginalen Schleimhaut-Modells.

Das Epithel wurde mit der KO-Mutante 5/7/5 inokuliert. Nach 12 h, 24 h und 48 h wurden Proben genommen. Die Expression der Lipase-Gene wurde mittels RT-PCR überprüft. +: Expression des Gens; (+): mRNA-Expression an der Nachweisgrenze; -: keine mRNA nachweisbar.

<i>LIP</i>	Zeit nach der Infektion		
	12 h	24 h	48 h
1	(+)	(+)	(+)
2	(+)	(+)	(+)
3	(+)	(+)	+
4	+	+	+
5	+	+	+
6	+	+	+
7	+	+	+
8	-	-	-
9	(+)	(+)	(+)
10	-	-	-

3.14.4 Analyse der *LIP8*-Mutanten in verschiedenen Maus-Infektionsmodellen

Um zu überprüfen, ob die konstitutiv exprimierte Lipase Lip8 eine wesentliche Rolle bei systemischen Infektionen und bei Candidosen des Ösophagus spielt, wurden *LIP8*-Mutanten in den entsprechenden Mausmodellen analysiert.

3.14.4.1 Intraperitoneale Infektion

Um eine systemische Infektion zu analysieren, wurden Balb/c-Mäuse intraperitoneal mit dem wt, CAI-2 und verschiedenen *lip8*-Mutanten infiziert. Die Keimzahlen, die bei den überlebenden Mäusen bestimmt wurden, zeigten keinen signifikanten Unterschied (persönliche Mitteilung, Frau Dr. M. Kretschmar).

Als Maß der Gewebeschädigung wurde die Aktivität der Alaninaminotransferase der Leber im Blut bestimmt. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen CAI-2 (210 +/- 20 U/l) und der homozygoten KO-Mutante 5/7/5 (236 +/- 143 U/l) festgestellt werden. Es wurden jeweils vier Tiere pro *Candida*-Stamm getestet.

3.14.4.2 Intravenöse Infektion

Mäuse wurden intravenös mit wt-Zellen infiziert, um eine Katheter-Infektion zu simulieren (durchgeführt von Frau Dr. M. Kretschmar). Während der Infektion wurden v.a. Leber und Nieren von dem Pathogen angegriffen. Die höchsten Keimzahlen wurden in den Nieren nachgewiesen (Abb. 55A). Die Keimzahlen in der Leber wurden ebenfalls bestimmt und dokumentiert (Abb. 55B).

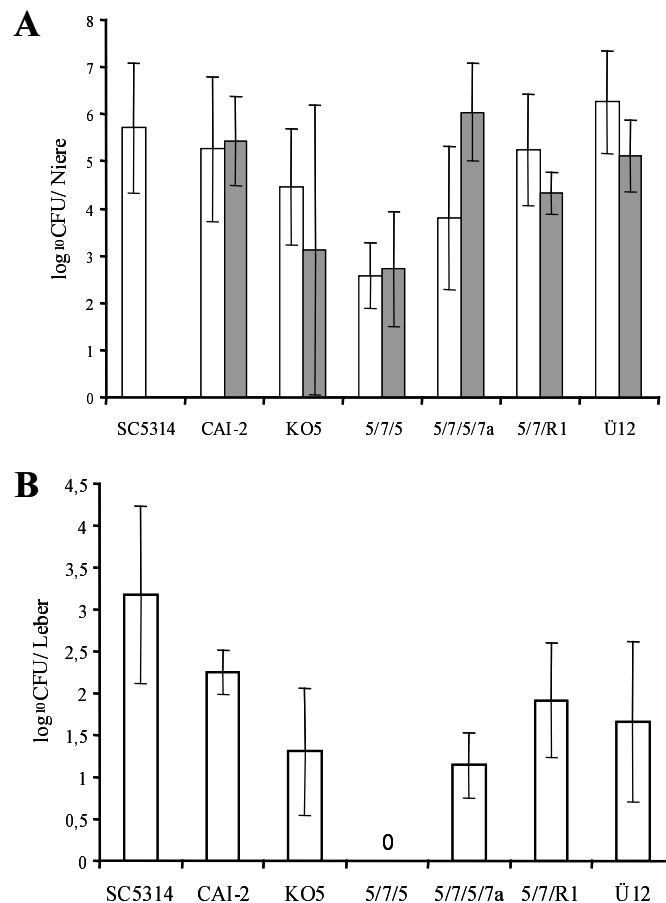


Abb. 55A&B: Intravenöse Infektion von Mäusen mit verschiedenen *LIP8*-Mutanten.

(A) CFU in den Nieren nach drei Tagen (weiße Balken) bzw. sieben Tagen (graue Balken) Infektion mit dem wt (SC5314), der heterozygoten *URA3*-Mutante (CAI-2), einer heterozygoten und einer homozygoten KO-Mutante (KO5 bzw. 5/7/5) und deren Retransformanden (5/7/R1 bzw. 5/7/5/7a) sowie einer Überexpressionsmutante (Ü12). (B) CFU in der Leber nach drei Tagen Infektion mit den entsprechenden Mutanten. Der Versuch wurde einmal mit mindestens fünf Tieren pro Zeitpunkt und zu untersuchendem *Candida*-Stamm durchgeführt.

Die homozygote KO-Mutante 5/7/5 besaß eine um die Hälfte niedrigere CFU in den Nieren als der wt. Die restlichen Mutanten wiesen in diesem Organ mit dem wt vergleichbare Keimzahlen auf.

Nach drei Tagen Infektion konnten in der Leber keine Zellen der KO-Mutante nachgewiesen werden. Zusätzlich zeigten die heterozygote KO-Mutante und die Retransformande der homozygoten KO-Mutante ebenfalls eine signifikant niedrigere CFU in der Leber als der wt.

Die Bestimmung letal infizierter Mäuse ergab die in Tab. 20 zusammengefaßten Daten.

Tab. 20: Intravenöse Infektion von Mäusen mit verschiedenen *LIP8*-Mutanten.

Die Anzahl der letal infizierten Mäuse wurde innerhalb des Versuchszeitraums von sieben Tagen festgehalten.

<i>Candida</i> -Stamm	Letal Infizierte	Prozent [%]
SC5314	5 von 10	50
CAI-2	7 von 20	35
KO5	2 von 10	20
5/7/5	0 von 20	0
5/7/5/7a	4 von 10	40
5/7/R1	2 von 10	20
Ü12	9 von 20	45

Über den untersuchten Zeitraum starb bei den Infektionen mit 5/7/5 keine einzige Maus. Bei allen anderen *Candida*-Stämmen traten letale Infektionen auf. Bei der Infektion mit dem wt starben 50 % der infizierten Tiere. Die heterozygote Mutante und deren Retransformante verursachten bei 20 % der Tiere eine tödliche Infektion. Bei der Überexpressionsmutante lag der Wert bei 45 %.

3.14.4.3 Infektion des Ösophagus

Balb/c-Mäuse wurden oral mit verschiedenen *Candida*-Mutanten infiziert (durchgeführt von Frau Dr. M. Kretschmar). Die verletzlichste Stelle dieses Infektionsmodells ist die Kardial-Antrum-Falte (Abb. 56A-C).

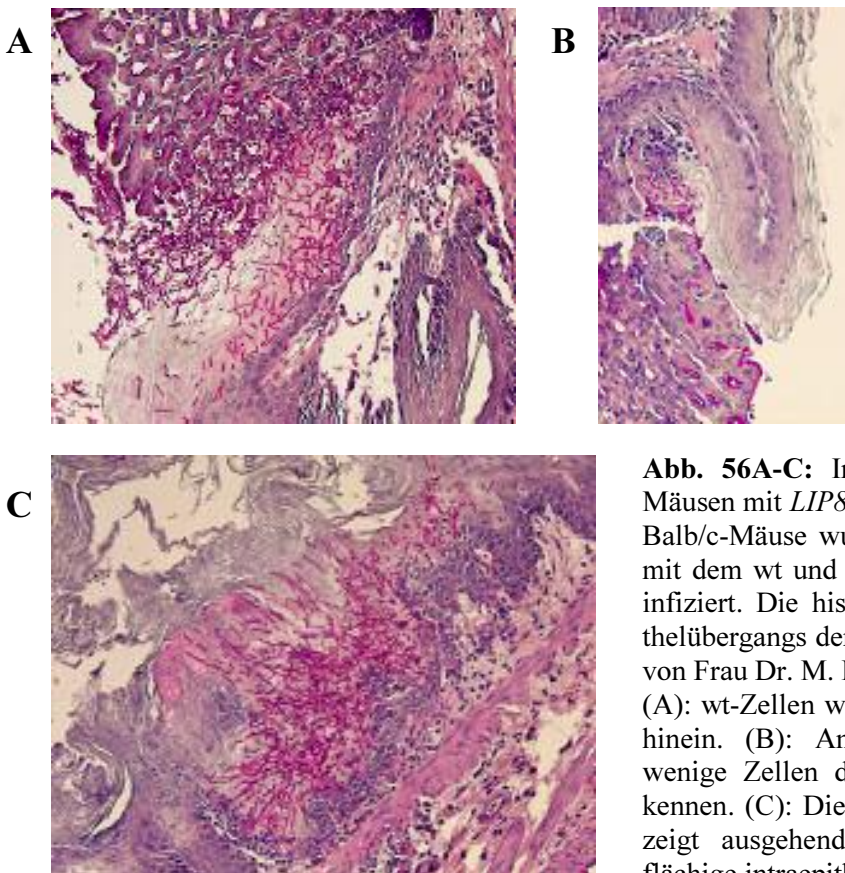


Abb. 56A-C: Infektion des Ösophagus von Mäusen mit *LIP8*-Mutanten.

Balb/c-Mäuse wurden über eine Schlundsonde mit dem wt und verschiedenen *LIP8*-Mutanten infiziert. Die histologischen Schnitte des Epithelübergangs der Kardial-Antrum-Falte wurden von Frau Dr. M. Kretschmar durchgeführt.

(A): wt-Zellen wachsen in die Epithelschichten hinein. (B): Am Epithelübergang sind nur wenige Zellen der KO-Mutante 5/7/5 zu erkennen. (C): Die Überexpressionsmutante Ü12 zeigt ausgehend vom Epithelübergang eine flächige intraepitheliale Ausbreitung.

Der Aufbau des Kardial-Bereichs der Maus ist mit dem des humanen Ösophagus vergleichbar. Die wt-Zellen befanden sich größtenteils in diesem Bereich, während Hyphenzellen vereinzelt auch in anderen Regionen vorlagen. Von der KO-Mutante 5/7/5 kamen am Epithelübergang nur wenige oberflächlich gelegene Hyphenzellen vor. Die Überexpressionsmutante Ü12 befiel den Epithelübergang und penetrierte zusätzlich an untypischen Stellen. So wurde diese Mutante z.B. auch unter dem verhornten Epithel bis zur Submucosa im Kardial-Bereich des Magens nachgewiesen.

3.15 Wachstum von *C. albicans* in lipidhaltigen Medien und YPG nach Zusatz von Antisense-Oligonukleotiden

Zusätzlich zur gezielten Genzerstörung wurde eine weitere Vorgehensweise durchgeführt, um die Proliferation von *C. albicans* in Lipid-Medien zu unterbinden. Es wurden verschiedene Antisense-Oligonukleotide entworfen und in Wachstumstests eingesetzt, um die Expression einzelner bzw. mehrerer Lipase-Gene zu hemmen. Die Antisense-Oligonukleotide waren gegen Sequenzen gerichtet, die für konservierte Lipase-Motive kodieren. Diese Oligonukleotide sollten einen sogenannten „Knock-down“-Effekt erzielen, indem sie an ihre Zielsequenz auf der mRNA binden. Diese Hybridisierung könnte anschließend zu einer Hemmung des Transports und der Translation der mRNA führen.

Die Wachstumsversuche wurden bei 37 °C in Mikrotiter-Platten durchgeführt und mit einem ELISA-Reader ausgewertet. Die Oligonukleotide wurden einzeln oder in unterschiedlichen Kombinationen zum Nährmedium gegeben. Als Lipid-Medien wurden YNB-Olivenöl und YNB-Tween 40 getestet. Zur Kontrolle wurde parallel YPG-Medium untersucht, um mögliche unspezifische Effekte durch die eingesetzten Oligonukleotide auszuschließen. Alle Wachstumsversuche wurden mit semisynchronisierten wt-Zellen gestartet (2.2.8.2).

3.15.1 Wachstum von *C. albicans* mit Antisense-Oligonukleotiden

Einfache Antisense-Oligonukleotide (FSt1, FSt2 und FSt3) wurden entworfen, welche ihre Zielsequenz in einer spezifischen Gruppe von Lipase-Genen besaßen. FSt1 besaß in *LIP5*, *LIP6* und *LIP8* eine Zielsequenz. Im Gegensatz dazu war FSt2 gegen eine Sequenz von *LIP4*, *LIP5*, *LIP8* und *LIP9* und FSt3 gegen eine Sequenz von *LIP5* und *LIP8* gerichtet. Es wurde YNB-Tween 40-Medium mit *C. albicans* auf eine Zellkonzentration von 5×10^6 Zellen/ml eingestellt. Die Zellsuspension wurde mit H₂O, in H₂O-gelösten Antisense-Oligonukleotiden oder verschiedenen Kombinationen dieser Oligonukleotide versetzt. Der Wachstumsverlauf wurde am ELISA-Reader verfolgt (Abb. 57A&B).

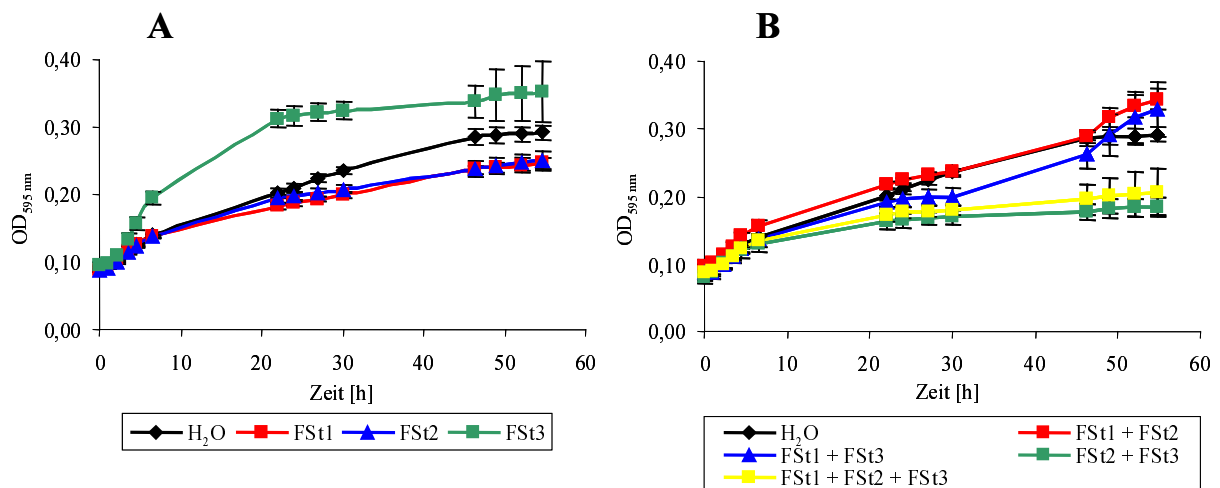


Abb. 57A&B: Wachstumsversuche in Mikrotiter-Platten mit Antisense-Oligonukleotiden. *C. albicans* wurde in YNB-Tween 40 bei 37 °C kultiviert. Zellsuspensionen mit 5×10^6 Zellen/ml wurden mit (A) H₂O, in H₂O-gelösten Antisense-Oligonukleotiden (FSt1, FSt2 und FSt3) oder (B) verschiedenen Kombinationen dieser Oligonukleotide versetzt. OD-Messungen zur Erstellung der Wachstumskurven erfolgten am ELISA-Reader. Es wurde eine Vierfachbestimmung durchgeführt.

Die Oligonukleotide FSt1 und FSt2 verursachten jeweils eine leichte Wachstumshemmung des wt in YNB-Tween 40. Im Kontrollansatz erreichte der wt nach 55 h Wachstum eine OD von 0,292. Die OD der mit FSt1 und FSt2 behandelten Ansätze lag zu diesem Zeitpunkt bei 0,247 bzw. 0,251. Die Kombination beider Antisense-Oligonukleotide hatte keinen nachweisbaren Effekt auf das Wachstum des wt. FSt3 förderte das Wachstum des wt, da diese Kultur eine OD von 0,352 erreichte. Kombinationen von FSt2-FSt3 (OD von 0,186 nach 55 h) und FSt1-FSt2-FSt3 (OD von 0,206 nach 55 h) erzielten eine deutliche Hemmung des Wachstums. In YPG- und YNB-Olivenöl-Medium konnten keine Effekte beobachtet werden.

3.15.2 Wachstum von *C. albicans* mit degenerierten Antisense-Oligonukleotiden und Antisense-Phosphothioat-Oligonukleotiden

Mit degenerierten Antisense-Oligonukleotiden (FSdga1 und FSdga2), die gegen konservierte Lipase-Motive gerichtet waren, wurden ebenfalls Wachstumsversuche durchgeführt. Wt-Zellen wurden in YNB-Olivenöl mit FSdga1, FSdga2 oder einer Kombination beider Oligonukleotide bei 37 °C in einer Mikrotiter-Platte inkubiert. Als Kontrolle diente ein Ansatz mit dem Lösungsmittel H₂O. FSdga1 war gegen eine Sequenz gerichtet, die ein hochkonserviertes Motiv der Lipasen von *C. albicans* kodiert (PDYEGPK, Abb. 8). FSdga2 war gegen die DNA-Sequenz gerichtet, welche das „GX SXG“-Motiv kodiert. Da mit den degenerierten Antisense-Oligonukleotiden keine signifikante Hemmung des Wachstums vom wt erzielt werden konnte, wurden bei weiteren Wachstumsversuchen in YNB-Olivenöl modifizierte Antisense-Oligonukleotide mit Phosphothioatbindungen eingesetzt, welche eine höhere Stabilität gegen Exonukleasen besitzen (2.2.8.11).

Der wt (5×10^6 Zellen/ml) wurde in YNB-Olivenöl mit H_2O , Antisense-Phosphothioat-Oligonukleotiden (LIP1antipro-LIP10antipro; 2.1.5, Tab. 7) oder deren Kombination versetzt und bei $37^\circ C$ inkubiert. Die modifizierten Antisense-Oligonukleotide waren gegen Sequenzen von *LIP1-10* gerichtet, wobei als Zielsequenz-Bereich das Startcodon mit umliegenden Sequenzen gewählt wurde. In Kombinationsversuchen wurden vier Oligonukleotide eingesetzt (LIP4antipro, LIP5antipro, LIP6antipro und LIP8antipro), die gegen häufig exprimierte Lipase-Gene gerichtet waren. Die Wachstumskurven der Ansätze, die mit diesen Antisense-Oligonukleotiden versetzt wurden, sind in Abb. 58 dargestellt.

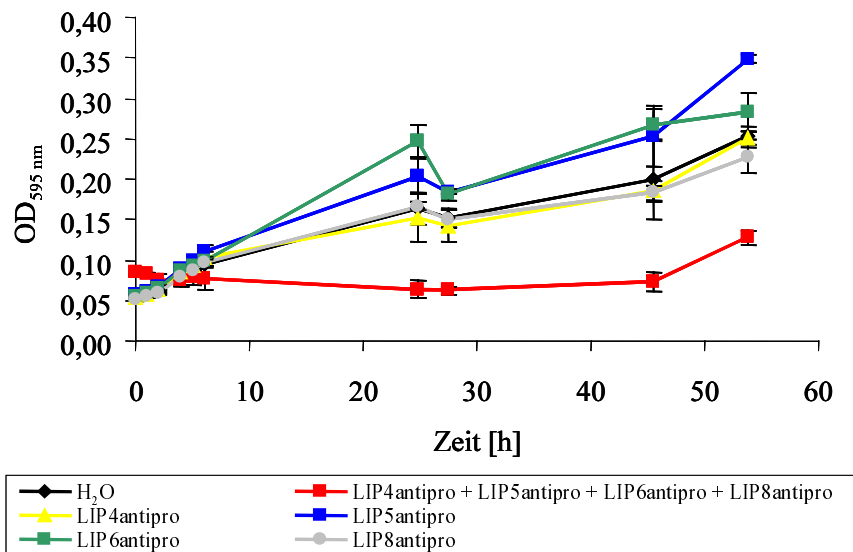


Abb. 58: Wachstumsversuche mit Antisense-Phosphothioaten in Mikrotiter-Platten. *C. albicans* wurde in YNB-Olivenöl bei $37^\circ C$ kultiviert. Zellsuspensionen mit 5×10^6 Zellen/ml wurden mit H_2O , mit in H_2O -gelösten Phosphothioaten (LIP4antipro, LIP5antipro, LIP6antipro und LIP8antipro) oder deren Kombination versetzt. OD-Messungen zur Erstellung der Wachstumskurven erfolgten am ELISA-Reader. Es wurde eine Vierfachbestimmung durchgeführt.

Der Einsatz einzelner Antisense-Phosphothioate gegen *LIP1-10* konnte das Wachstum des wt über den untersuchten Zeitraum nicht hemmen. Im Gegensatz dazu konnte die Kombination der vier Oligonukleotide, welche als „Target“ konstitutiv exprimierte Lipase-Gene besaßen, das Wachstum für über zwei Tage deutlich inhibieren. Der wt erreichte nach 54 h Wachstum eine OD von 0,253. Die OD des Ansatzes, der mit der Oligonukleotid-Kombination versetzt wurde, lag am Ende des Versuchs bei 0,128. In YPG-Medium konnte keine Wachstumshemmung detektiert werden.

3.16 Wachstum von *C. albicans* in lipidhaltigen Medien nach Zusatz von Lipase-Inhibitoren und -Aktivatoren

Neben den Antisense-Oligonukleotiden wurden auch Lipase-Inhibitoren und ein Lipase-Aktivator in Wachstumsversuchen eingesetzt. Die Inhibitoren wurden verwendet, um zu prüfen, ob dadurch die Proliferation von *C. albicans* in einer lipidreichen Umgebung gehemmt werden kann. Der Aktivator diente der weiteren Charakterisierung des lipolytischen Systems des pathogenen Pilzes.

YPG-, YNB-Olivenöl-, YNB-Tween 40- und NuTRIflex® Lipid-Medien wurden mit semi-synchronisierten Zellen (1×10^6 ml) angeimpft. Zu den einzelnen Ansätzen wurde entweder das Lösungsmittel oder die zu untersuchende Substanz gegeben. Anschließend wurde zu verschiedenen Zeitpunkten die Zellkonzentration bestimmt, um das Wachstum der Kulturen zu verfolgen.

Zum einen wurden zwei Substanzen aus der Gruppe der Kalium-Kanal-Blocker eingesetzt, zum anderen ein Cyclooxygenase-Hemmer. Die Kalium-Kanal-Blocker Quinin und Quinidin, welche in der Literatur ebenfalls als Lipase-Inhibitoren beschrieben werden (Catterall *et al.*, 1978; Stam & Hulsmann, 1982), wurden jeweils in EtOH-Lösung oder in H₂O-Lösung (nicht dargestellt) in Wachstumsversuchen von *C. albicans* in YNB-Olivenöl eingesetzt (Abb. 59A&B).

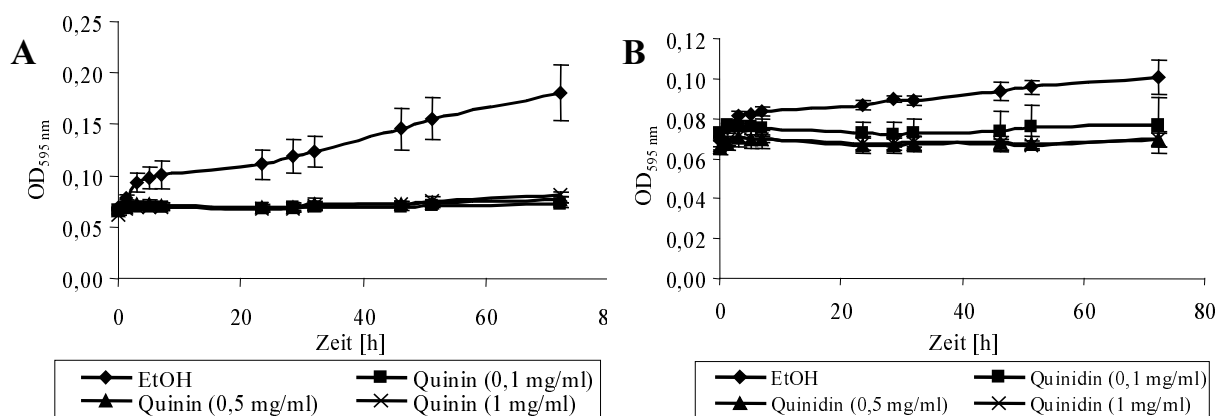


Abb. 59A&B: Wachstum mit Kalium-Kanal-Blockern.

C. albicans wurde in YNB-Olivenöl mit verschiedenen Zusätzen bei 37 °C kultiviert. Der wt wurde mit (A) Ethanol (Kontrolle) und unterschiedlichen Quinin-Konzentrationen sowie mit (B) verschiedenen Quinidin-Konzentrationen inkubiert. Der Wachstumsverlauf wurde am ELISA-Reader verfolgt. Es wurde eine Vierfachbestimmung durchgeführt.

Quinin und Quinidin in H₂O gelöst, zeigten keinen Einfluß auf das Wachstum von *C. albicans*. Die in EtOH angesetzten Konzentrationen beider Substanzen konnten jedoch das Wachstum des wt über den gesamten untersuchten Zeitraum inhibieren. Der wt-Kontrollansatz, der nur mit dem Lösungsmittel EtOH versetzt wurde, erreichte nach 72 h Wachstum eine OD von 0,181 und unterschied sich nicht von Kontrollansätzen ohne EtOH (nicht dargestellt). Die OD der Quinin-behandelten Ansätze lag am Ende des Versuchs zwischen 0,072 und 0,082. Im Quinidin-Versuch wurde beim wt-Ansatz nach drei Tagen eine OD von 0,101 gemessen.

Die restlichen Ansätze, die mit verschiedenen Inhibitor-Konzentrationen inkubiert wurden, erreichten eine OD von 0,069 bis 0,077. Beide Inhibitoren wiesen einen wachstumshemmenden Effekt auf.

Als Cyclooxygenase-Hemmer wurde Acetylsalicylsäure (ASS) in Wachstumsversuchen eingesetzt. Das Hauptkultur-Medium (YPG, YNB-Tween 40 oder NuTRIflex® Lipid) wurde mit einer definierten Zellzahl angeimpft. Danach wurden entweder EtOH oder verschiedene Konzentrationen an ASS zugegeben. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C und 180 rpm. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurde die Zelldichte mittels ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 595 nm bestimmt (Abb. 60A&B). Im Fall des NuTRIflex® Lipid-Mediums wurde die Zellkonzentration mittels Zählkammer ermittelt (Abb. 60C).

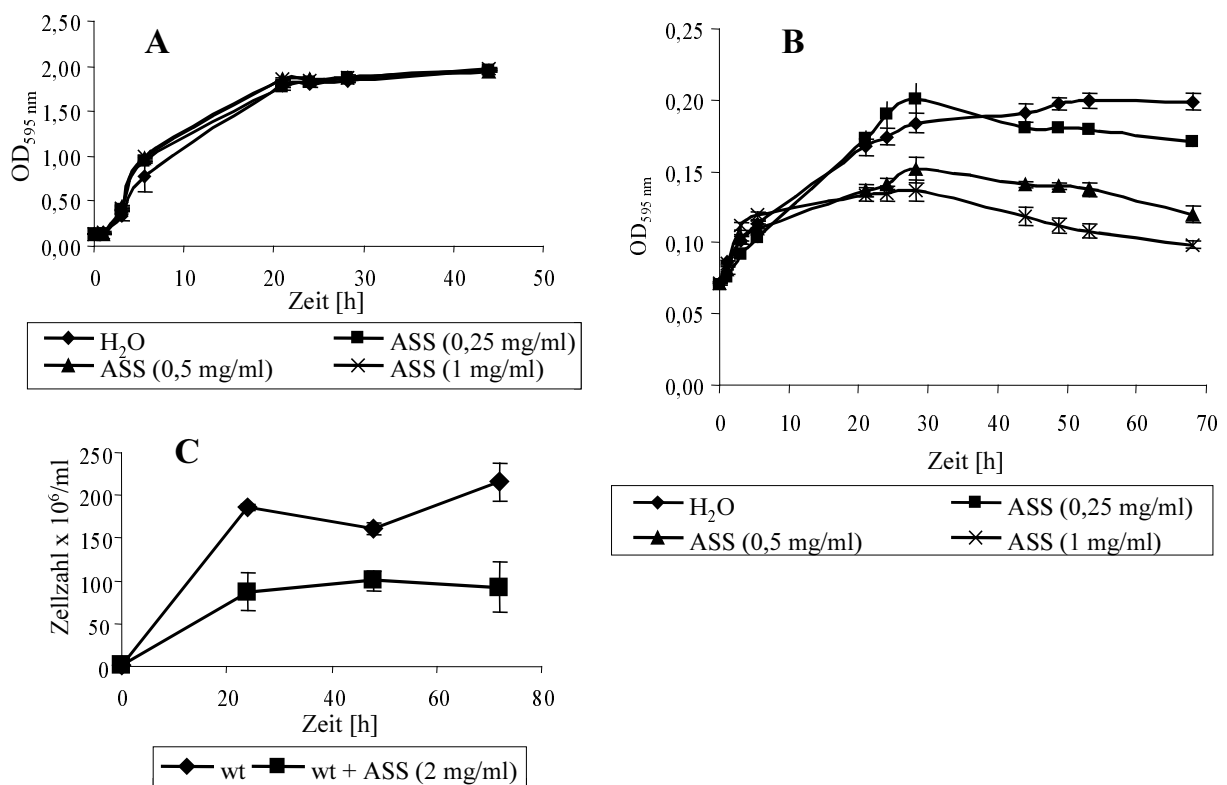


Abb. 60A-C: Wachstumskurven vom wt mit ASS in (A) YPG (B) YNB-Tween 40 und (C) NuTRIflex® Lipid bei 37 °C. Zur Kontrolle wurde jeweils eine Kultur mit EtOH inkubiert. Die anderen Kulturen wurden mit ASS in EtOH (0,25, 0,5 und 1,0 mg/ml für (A) und (B); 2,0 mg/ml für (C)) versetzt. Für (A) und (B) wurde eine Vierfachbestimmung durchgeführt. Versuch (C) wurde zweimal durchgeführt.

Die eingesetzten ASS-Mengen inhibierten nicht das Wachstum von *C. albicans* in YPG. Hingegen wurde konzentrationsabhängig durch Zugabe von ASS das Wachstum des wt in YNB-Tween 40 inhibiert. Nach 68 h hatte der unbehandelte wt-Ansatz eine OD von 0,199 erreicht. Mit steigender ASS-Konzentration nahm die gemessene OD ab. Der Ansatz mit beispielsweise 1,0 mg/ml ASS besaß am Ende des Versuchs eine OD von 0,099. In der NuTRIflex® Lipid-Lösung hatte der wt nach drei Tagen eine Zellkonzentration von $2,2 \times 10^8$ Zellen/ml erreicht. Durch die Zugabe von ASS konnte das Wachstum inhibiert werden. Die höchste Zellkonzentration in diesem Ansatz wurde nach zwei Tagen mit 1×10^8 Zellen/ml erreicht.

Neben den Inhibitionsstudien wurden auch Wachstumsversuche mit einem Lipase-Aktivator (Natriumtaurocholat) analysiert. Dieser in H₂O-gelöste Aktivator wurde in verschiedenen Konzentrationen getestet (Abb. 61). Als Medium wurde YNB-Olivenöl gewählt. Die optische Dichte wurde mittels ELISA-Reader bestimmt.

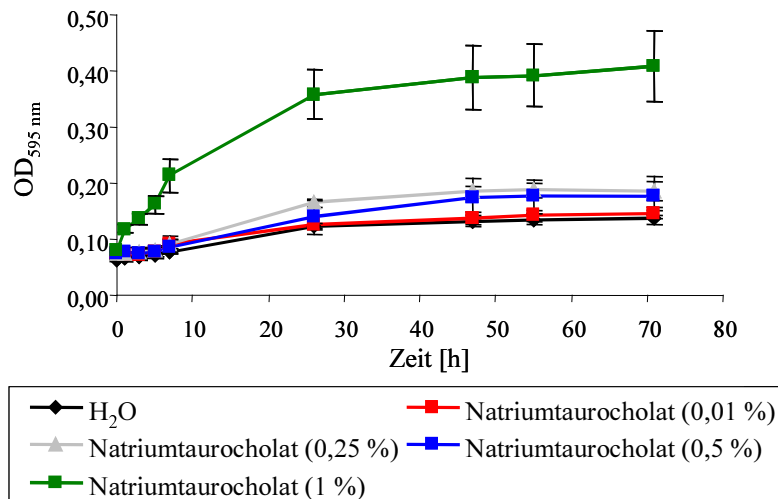


Abb. 61: Wachstumskurven vom wt in YNB-Olivenöl mit Natriumtaurocholat bei 37 °C. Zur Kontrolle wurde eine Kultur mit H₂O inkubiert. Die anderen Kulturen wurden mit Natriumtaurocholat (0,01, 0,25, 0,5 und 1,0 %) versetzt. Der Wachstumsverlauf wurde am ELISA-Reader verfolgt. Es wurde eine Vierfachbestimmung durchgeführt.

Die höchste der eingesetzten Konzentrationen an Natriumtaurocholat (1 %) konnte das Wachstum des wt in YNB-Olivenöl deutlich unterstützen. Nach drei Tagen wurde eine OD von 0,41 gemessen. Die Kulturen, die mit niedrigeren Konzentrationen inkubiert wurden, verzeichneten einen leichten Wachstumsvorteil gegenüber dem Kontroll-Ansatz. In der Kontrolle erreichte der wt am Ende des Versuchs eine OD von 0,138.

3.17 Aktivitätstests mit Lipase-Inhibitoren und -Aktivatoren

Verschiedene Substanzen wurden auf ihren Einfluß auf die extrazelluläre lipolytische Aktivität einer *C. albicans*-Kultur getestet. Hierfür wurde der wt-Stamm in YNB-Olivenöl-Medium bei 37 °C kultiviert. Nach 24-72 h wurden die Zellen pelletiert und die lipolytische Aktivität im Überstand mittels Lipase-Aktivitätstest (2.2.8.12) bestimmt. Bei ausreichender Aktivität wurden Aktivierungs- und Inhibitionsstudien durchgeführt. Der Überstand wurde für 30 min bei 37 °C nur mit Lösungsmittel oder mit verschiedenen Konzentrationen der darin gelösten Substanz inkubiert. Anschließend wurde die Reaktionslösung hinzugegeben und für weitere 90 min unter Schütteln inkubiert. Nach dem Stoppen der Reaktion wurde die Probe zentrifugiert und der Überstand photometrisch vermessen. Die Aktivität der Lösungsmittelprobe wurde mit 100 % gleichgesetzt. Die Inhibitor- und Aktivator-Proben wurden dazu in Relation gebracht.

Aktivierungsstudien ergaben, dass durch die Zugabe des Gallensalzes Natriumtaurocholat die lipolytische Aktivität des *Candida*-Überstandes noch erhöht werden konnte (Abb. 62).

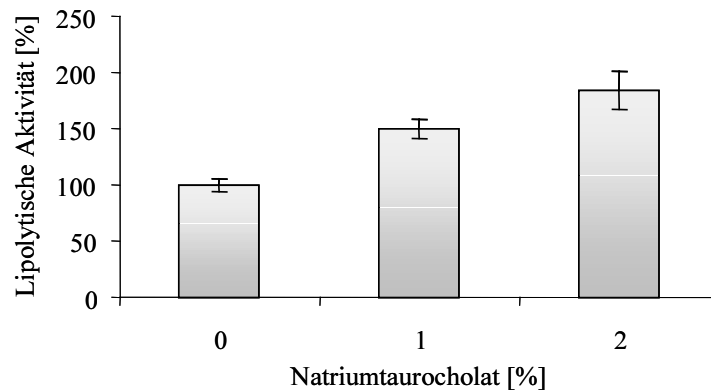


Abb. 62: Aktivierungsstudie mit dem Gallensalz Natriumtaurocholat.

Der Kulturüberstand einer YNB-Olivenöl *Candida*-Kultur wurde auf seine lipolytische Aktivität überprüft. Der Überstand wurde für 30 min bei 37 °C entweder mit Lösungsmittel (H₂O; Kontrolle) oder mit Natriumtaurocholat inkubiert. Anschließend wurde die Reaktionslösung, die α -Naphthylpalmitat als Substrat enthielt, dazugegeben. Nach 90 min Inkubation wurde das freigesetzte α -Naphthol photometrisch bei einer Absorption von 520 nm bestimmt. 100 % Aktivität entsprechen dabei der Aktivität der Kontrollprobe. Es wurde mindestens eine Doppelbestimmung durchgeführt.

Es konnte eine direkte Korrelation zwischen Gallensalzkonzentration und lipolytischer Aktivität festgestellt werden. Mit steigender Konzentration an Natriumtaurocholat nahm die lipolytische Aktivität des Überstandes zu. Mit einer Endkonzentration von 2 % Natriumtaurocholat wurde die Aktivität auf 184 % des Ausgangswertes erhöht.

Da Glycogen ebenfalls als Aktivator in der Literatur beschrieben wird (Winkler & Stuckmann, 1979), sind erste Tests mit dieser Substanz durchgeführt worden. Hierbei wurde ebenfalls eine Aktivierung der lipolytischen Aktivität detektiert. 0,74 mg/ml Glycogen steigerten die Aktivität auf 125 % der Ausgangsaktivität.

Außerdem wurde der Einfluß von Orlistat[®], einem bekannten Inhibitor humaner Lipasen (Hadvary *et al.*, 1988), untersucht (Abb. 63).

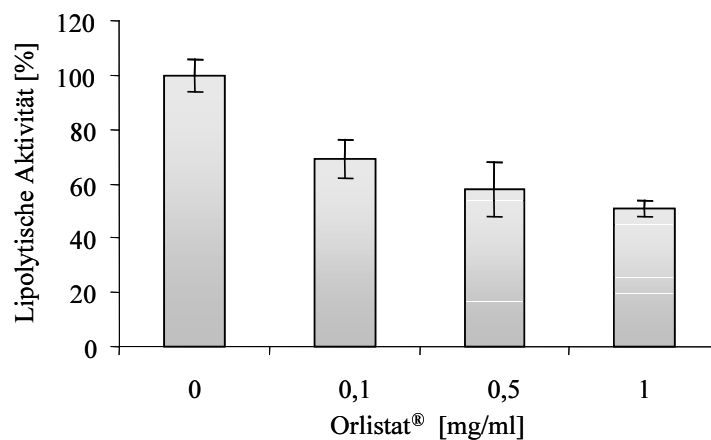


Abb. 63: Inhibitionstest mit Orlistat[®].

Der Kulturüberstand einer YNB-Olivenöl *Candida*-Kultur wurde analog zum Versuch mit Natriumtaurocholat (Abb. 62) entweder mit Lösungsmittel (DMSO) oder mit Orlistat[®] inkubiert und anschließend im lipolytischen Aktivitätstest untersucht. Es wurde mindestens eine Doppelbestimmung durchgeführt.

Mit einer Endkonzentration von 1 mg/ml Orlistat[®] wurde die extrazelluläre Aktivität vom wt fast um die Hälfte gesenkt. Die Aktivität wurde konzentrationsabhängig inhibiert.

Vorläufige Inhibitionsstudien mit den Esterase-Inhibitoren Ebelacton A und B sowie mit dem Kalium-Kanal-Blocker Quinidin konnten zeigen, dass Ebelacton B und Quinidin die extrazelluläre lipolytische Aktivität des wt mit 0,74 mg/ml auf 41 % bzw. mit 2 mg/ml auf 76 % hemmen konnten. Ebelacton A zeigte in diesem Test keine auffällige Wirkung.

Zusätzlich wurde in EtOH gelöstes Quinin getestet. Quinin ist sowohl als Kalium-Kanal-Blocker als auch als Lipase-Inhibitor beschrieben (Catterall *et al.*, 1978). Die inhibitorische Wirkung wurde zuerst mit einer kommerziellen Lipase von *R. arrhizus* überprüft. Anschließend wurde Quinin ebenfalls mit dem Kulturüberstand einer *Candida*-Kultur getestet (Abb. 64).

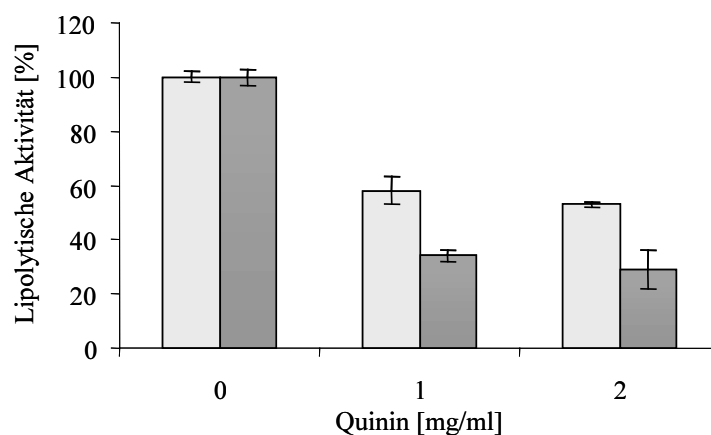


Abb. 64: Inhibitionstest mit Quinin.

Der Kulturüberstand einer YNB-Olivenöl *Candida*-Kultur wurde analog zum Versuch mit Natriumtaurocholat (Abb. 62) entweder mit Lösungsmittel (EtOH) oder mit Quinin inkubiert und anschließend im lipolytischen Aktivitätstest untersucht (hellgraue Balken). Als Kontrolle wurde die kommerziell erwerbliche Lipase von *R. arrhizus* eingesetzt, welche ebenfalls mit verschiedenen Konzentrationen von Quinin inkubiert wurde (dunkelgraue Balken). Es wurde mindestens eine Doppelbestimmung durchgeführt.

Die Aktivität der Kontroll-Lipase konnte mit einer Endkonzentration von 2 mg/ml Quinin bereits auf 29 % des Ausgangswertes gesenkt werden. Die extrazelluläre lipolytische Aktivität von *C. albicans* konnte ebenfalls inhibiert werden. Mit 2 mg/ml wurde die Aktivität auf 53 % reduziert.

Als weiterer Inhibitor wurde ASS im Lipase-Aktivitätstest eingesetzt (Abb. 65). ASS wird in der Literatur zwar als Cyclooxygenase-Hemmer (Bailey, 1989) aufgeführt, wurde aber bisher noch nicht mit Lipase-Inhibition in Verbindung gebracht.

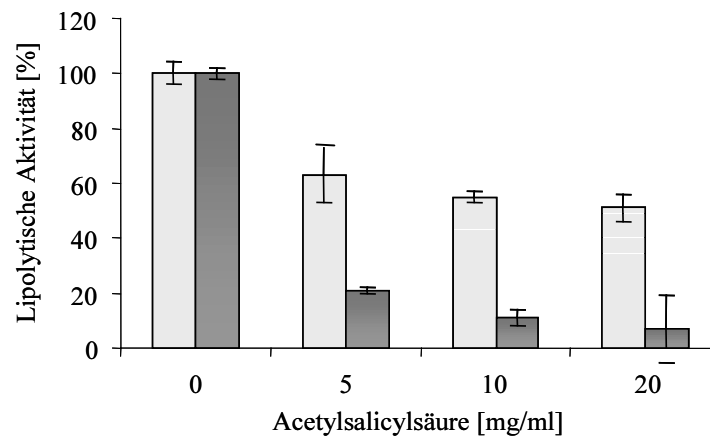


Abb. 65: Inhibitionstest mit ASS.

Der Kulturüberstand einer YNB-Olivenöl *Candida*-Kultur wurde analog zum Versuch mit Natriumtaurocholat (Abb. 62) entweder mit Lösungsmittel (EtOH) oder mit ASS inkubiert und anschließend im lipolytischen Aktivitätstest untersucht (hellgraue Balken). Als Kontrolle wurde die Lipase von *R. arrhizus* eingesetzt, welche ebenfalls mit verschiedenen Konzentrationen von ASS inkubiert wurde (dunkelgraue Balken). Es wurde mindestens eine Doppelbestimmung durchgeführt.

Die Kontroll-Lipase von *R. arrhizus* konnte mit ASS gehemmt werden. Mit 5 mg/ml ASS konnte eine lipolytische Aktivität von 21 % und mit 20 mg/ml nur noch eine Restaktivität von 7 % ermittelt werden. Eine unbehandelte Probe der Lipase, die für 10 min im Wasserbad gekocht wurde, zeigte eine Aktivität von 8 %. Die sekretierte lipolytische Aktivität von *C. albicans* konnte mit ASS ebenfalls eindeutig gehemmt werden. Eine Endkonzentration von 20 mg/ml konnte die Aktivität auf 51 % senken. Beide lipolytischen Aktivitäten (Kontrolle und Kulturüberstand) konnten konzentrationsabhängig mit ASS gehemmt werden.

4 Diskussion

Die Analyse der sekretorischen Lipase-Genfamilie bietet einen neuen Beitrag zur Aufklärung der Virulenz von *C. albicans*. Bisher lag der Schwerpunkt der Forschung auf den Virulenzfaktoren Dimorphismus, Adhäsion und Sekretion von Phospholipasen und sauren Proteasen. Zusätzlich wird in der vorliegenden Arbeit das gesamte lipolytische System dieses humanpathogenen Pilzes betrachtet und die Auswirkungen von verschiedenen Lipase-Inhibitoren auf dieses System überprüft, um einen neuen Strategieansatz für eine wirkungsvollere antimykotische Therapie zu entwickeln.

Neu identifizierte putative Komponenten des lipolytischen Netzwerkes von *C. albicans*

Eine Analyse des Genoms und der daraus abgeleiteten Proteine hat gezeigt, dass *C. albicans* eine Vielzahl von putativen lipolytischen Enzymen besitzt, obwohl dieses Humanpathogen nicht, wie z.B. *Malassezia furfur*, lipophil ist (Gupta *et al.*, 2000). Daher werden diese Enzyme sehr wahrscheinlich neben der Nährstoffbeschaffung noch weitere Aufgaben übernehmen.

Es konnten Gensequenzen identifiziert werden, die für putative Esterasen, Lipasen und Phospholipasen kodieren (3.2; Tab. 14). Zum Teil sind sie in Genfamilien organisiert. Die abgeleiteten Enzyme weisen als gemeinsames Merkmal das Serin-Hydrolase-Motiv „GXSXG“ mit dem zentralen zur katalytischen Triade gehörenden Serin auf. Durch Ausweitung der genomischen Sequenzanalyse wurde eine neue putative Genfamilie von Esterasen mit dem konservierten Motiv „GDSAG“ identifiziert. Dieses Motiv kommt z.B. bei Esterasen kälte-adaptierter Bakterien vor (Choo *et al.*, 1998). Inwieweit die Isoenzyme der neuen Genfamilie an der extrazellulären Esterase-Aktivität von *C. albicans* (Tsuboi *et al.*, 1996) beteiligt sind, muß noch geklärt werden. Es darf aber nicht außer Acht gelassen werden, dass auch einige Lipasen, wie z.B. die hormon-sensitive Lipase (HSL) des Menschen, ebenfalls Substrate von Esterasen spalten können (Yeaman *et al.*, 1994). Des Weiteren wurden auch Homologien zu intrazellulären Lipasen von *S. cerevisiae* gefunden, wie z.B. zu einer Lipase, die in der Vakuolenmembran lokalisiert ist und für den Abbau von Autophagie-Körperchen und „cytoplasm to vacuole targeting“ (Cvt)-Vesikeln mitverantwortlich ist (Teter *et al.*, 2001; Epple *et al.*, 2003). Außerdem liegen Homologien zu putativen Triacylglycerol-Lipasen (*TGL1-3*) vor. Tgl3 ist für den Abbau von Lipiden aus intrazellulären Lipid-Körperchen zuständig (Athenstaedt & Daum, 2003). Somit können diese intrazellulären Lipasen verschiedene Stoffwechselfunktionen übernehmen.

Enzyme mit möglichen pathogenen Eigenschaften, die durch die Homologiesuche entdeckt wurden (3.2; Tab. 14), waren sowohl bekannte als auch putative Phospholipasen. Seit der Identifizierung des α -Toxins von *Clostridium perfringens*, welches Phospholipase C-Aktivität besitzt, ist das Interesse an Phospholipasen erheblich gestiegen. Es konnte gezeigt werden, dass *ple*-defiziente *Clostridium*-Stämme eine verringerte Virulenz in der Gasbrand-Pathogenese aufwiesen (Titball *et al.*, 1989).

Den Phospholipasen von *C. albicans* werden vielfältige Aufgaben zugeschrieben. Zum einen spielen sie eine Rolle in der Signaltransduktion (Hube *et al.*, 2001), zum anderen können sie auch Virulenzfaktoren darstellen. So zeigte in dem Mausmodell einer hämatogen disseminierten Candidose eine Phospholipase B1-defiziente Mutante eine verringerte Virulenz (Leidich *et al.*, 1998). Phospholipasen können auch direkt die Wirtsmembran schädigen, wobei die Phospholipase A eine besondere Rolle spielen könnte. Durch ihre Katalyse entstehen Lysophospholipide, welche Wirtsmembranen auflösen können, eine Wirkung die auch für die Toxizität von Schlangengiften verantwortlich ist (Dennis *et al.*, 1981).

Bis jetzt konnte bei *C. albicans* nur die extrazelluläre Phospholipase A-Aktivität nachgewiesen werden (Barrett-Bee *et al.*, 1985; Mago & Kuller, 1990), wobei das zuständige Gen noch nicht identifiziert wurde. Durch die Suche in der Sequenz-Datenbank von *C. albicans* wurde ein Gen entdeckt (*PLA*), welches ein putatives Protein kodiert (*Pla*), das Homologien zu Phospholipasen A anderer Organismen aufweist (3.3; Abb. 12), wie z.B. zu einer Phosphatidat-bevorzugenden Phospholipase A₁ (Higgs *et al.*, 1998). Aufgrund der Sequenzvergleiche mit den homologen Enzymen wurde eine putative DDHD-Domäne erfaßt (PF02862), welche bei diesen Proteinen konserviert zu sein scheint. Es wird vermutet, dass es sich um eine Bindungsstelle für Metall-Ionen handelt, wobei die Bedeutung der Domäne noch nicht geklärt ist.

Die Resultate einer niedrigstringenten Southern Blot-Analyse deuten an, dass bei *C. albicans*, *C. dubliniensis* und *C. parapsilosis* nur ein *PLA*-Gen vorliegt und somit keine *PLA*-Genfamilie existiert (3.4; Abb. 13B). Im Genom von zwei verschiedenen *C. tropicalis*-Stämmen wurden mehrere Signale nachgewiesen, was bedeuten könnte, dass bei dieser *Candida*-Art eine entsprechende Genfamilie vorkommt. Ebenfalls möglich wäre, dass ein Restriktionslängenpolymorphismus vorliegt. In den Genomen von *C. krusei* und *C. glabrata* konnten keine homologen DNA-Bereiche detektiert werden.

Erste Expressionsstudien haben gezeigt, dass das *PLA*-Gen *in vitro* konstitutiv von *C. albicans* exprimiert wird (3.5.1; Abb. 14). Des Weiteren wurde dieses Gen in zwei verschiedenen Infektionsmodellen, dem RHE und der künstlichen vaginalen Schleimhaut, durchgehend exprimiert (3.5.2; Abb. 15A&B). In einer vaginalen Patientenprobe konnte ebenfalls die Expression von *PLA* festgestellt werden. Daher könnte die *Pla* von *C. albicans* eine Rolle bei oberflächlichen Schleimhautinfektionen spielen. Ob das identifizierte Enzym für die extrazelluläre Phospholipase A-Aktivität verantwortlich ist, muß jedoch noch geklärt werden. Hierbei liefern das Vorhandensein eines putativen Signalpeptids und der vier N-Glykosylierungsstellen erste Hinweise dafür, dass die putative Phospholipase den sekretorischen Weg durchläuft.

Die quasi konstitutive Expression von *PLA* ist ein erster Hinweis darauf, dass dieses Gen eine essentielle Funktion in *C. albicans* haben könnte und somit ein ideales „Target“ für eine antimykotische Therapie darstellt. Bei ersten Gendisruptionsexperimenten wurde ein *PLA*-Allel deletiert (Borchert, 2002).

Die heterozygote Mutante wies eine verminderte Myzelbildung auf Spider-Medium auf. Ob es sich um ein für *C. albicans* essentielles Gen handelt, muß durch die Disruption des zweiten noch intakten *PLA*-Allels überprüft werden. Die gezielte Zerstörung des zu *PLA* homologen ORFs (YOR022c) von *S. cerevisiae* war zumindest nicht letal für die nahverwandte Hefe (<http://db.yeastgenome.org/cgi-bin/SGD/genehunter>; Giaever *et al.*, 2002). Im selben Jahr war dieser ORF bei einer Suche nach humanen Genen, die bei Krankheiten eine Rolle spielen könnten, aufgefallen (Steinmetz *et al.*, 2002). Die entsprechende Deletionsmutante von *S. cerevisiae* wies Defekte in der mitochondrialen Atmung auf. Nach diesen Ergebnissen zu urteilen, wäre es daher möglich, dass die Pla von *C. albicans* nicht extrazellulär vorliegt, sondern im Mitochondrium lokalisiert ist.

Die Lipase-Genfamilie (*LIP1-10*) und deren Isoenzyme (*Lip1-10*)

Ein charakterisierter Teil des lipolytischen Netzwerkes von *C. albicans* ist die sekretorische Lipase-Genfamilie (Stehr, 1999). Die Sequenzen der Lipase-Gene wurden aufgrund der Daten des Genomprojektes und eigener Sequenzierungen vervollständigt und zum Teil korrigiert. Insgesamt gehören zehn Mitglieder zu dieser Familie. Es ist unwahrscheinlich, dass weitere homologe Lipase-Gene in *C. albicans* entdeckt werden, da eine umfangreiche Analyse des Genoms bereits 1999 lediglich diese zehn Gene aufzeigte (Stehr, 1999). Auch wurden zwischenzeitlich keine neuen Lipase-Gene veröffentlicht. Daher kann davon ausgegangen werden, dass alle *in silico*, *in vitro* sowie *in vivo* Untersuchungen der vorliegenden Arbeit ein vollständiges Bild der Isoenzym-Familie widerspiegeln. Es handelt sich ferner um die erste Genfamilie sekretierter Lipasen, die für einen humanpathogenen Pilz beschrieben wurde.

In silico Analyse

Die *LIP*-Genfamilie gliedert sich aufgrund der Homologien der Mitglieder untereinander in drei Untergruppen (3.1; Abb. 9). Diese Einteilung spiegelt sich auch in der Chromosomenlokalisierung und in einer für die jeweilige Untergruppe spezifischen Signalpeptidlänge wider, was auf entsprechende Genduplikationen hindeuten könnte. Interessanterweise befinden sich *LIP1*, *LIP6* und *LIP10*, nach den Contigs zu urteilen, in unmittelbarer Nachbarschaft zueinander. Dieser tandemartige Aufbau unterstützt die Theorie der Genduplikation. Eine analoge Clusterbildung dreier Lipase-Gene (*CrLIP3-5*) wurde bereits bei *Candida rugosa* gezeigt (Brocca *et al.*, 1995).

Die repetitive Sequenzabfolge ist im *Candida*-Genom weitverbreitet und erleichtert Rekombinationsprozesse, fördert zudem aber auch Genduplikationen. Diese genetische Flexibilität des Pilzes ist ein vieldiskutierter Virulenzfaktor von *C. albicans* (Odds, 1994). Bei spontanen morphologischen *C. albicans*-Mutanten konnte ein breites Spektrum an multiplen chromosomalen Veränderungen nachgewiesen werden. Dies ermöglicht dem Pilz, sich an die verändernden Nährstoffbedingungen anzupassen (Rustchenko *et al.*, 1997).

Eventuell werden gerade die Gene dupliziert und erhalten, die dem Pilz z.B. gegenüber nicht lipaseproduzierenden Mikroorganismen einen Selektionsvorteil verschaffen. Durch die Zunahme der homologen Lipase-Gene ist die Möglichkeit gegeben, dass sie sich nicht nur divergent entwickeln, sondern auch den Ausfall eines einzelnen Lipase-Gens kompensieren könnten.

Die katalytische Triade aller bisher bekannten Lipasen besteht aus den Aminosäuren Serin, Histidin und Aspartat bzw. Glutamat. Das nukleophile Serin von Lip1-10 befindet sich höchstwahrscheinlich im konservierten Gly-Tyr-Ser-Gly/Tyr-Gly-Motiv (3.1; Abb. 8). Das Histidin liegt vermutlich nicht, wie bisher angenommen, in der Sequenz „YHG“ (Fu *et al.*, 1997), denn in diesem Bereich konnte die putative Oxianionen-Bindungstasche identifiziert werden. Die Identifizierung erfolgte nach einer Konsensussequenz, die für bakterielle Lipasen aufgestellt wurde (Bell *et al.*, 2002). Sequenzvergleiche mit homologen Lipasen aus anderen Organismen unterstützen diese Annahme (3.9; Abb. 26). Der saure Aminosäurerest konnte bis jetzt noch nicht lokalisiert werden. Ausgehend von der linearen Aminosäuresequenz müßte dieser Rest zwischen den beiden bereits positionierten Aminosäuren liegen. Eine endgültige Aufklärung über die korrekten Positionen der Aminosäuren der katalytischen Triade kann aber nur z.B. durch eine *in vitro* Mutagenese oder Röntgenstrukturanalyse erhalten werden.

Zusätzlich zeichnen sich die Lipasen von *C. albicans* durch vier konservierte Cysteinreste aus, die vermutlich zwei Disulfidbrücken bilden. Das läßt darauf schließen, dass diese Enzyme sich auch in ihrer Tertiärstruktur ähneln. Die Annahme, dass diese Enzyme sekretiert werden, wird durch die möglichen Disulfidbrücken und die für eine Sekretion notwendigen N-terminalen Signalpeptide sowie verschiedene potentielle N-Glykosylierungsstellen unterstützt. Auch die menschliche Pankreas-Lipase (Winkler *et al.*, 1990) und die Lipase-Isoenzyme von *C. rugosa* sind glykosyliert (Lotti *et al.*, 1998). Bei extrazellulären Lipasen von Pilzen scheint ein Glykosylierungsniveau von 5-10 % des Molekulargewichts typisch zu sein (Commenil *et al.*, 1995).

Das von *LIP2* abgeleitete Protein Lip2 weist als Besonderheit im Hydrophobizitäts-Plot (3.1; Abb. 10), zusätzlich zum N-terminalen Peak des putativen Signalpeptids, am C-Terminus eine hydrophobe Region auf, die bei den restlichen Lipasen nicht in dieser Form vorliegt. Dies könnte ein Hinweis auf eine mögliche Erkennungsregion für einen Glykosylphosphatidylinositol (GPI)-Anker sein (Caro *et al.*, 1997). Diese Art von Protein ist in der Zellwand oder Plasmamembran verankert. Die Erkennungssequenz besteht aus den drei sogenannten ω -Positionen (ω^0 , ω^{+1} und ω^{+2}) (Udenfriend & Kodukula, 1995). Zwischen den Positionen ω^0 und ω^{+1} wird das Protein gespalten. Gerade die Positionen ω^0 und ω^{+2} sind konserviert und werden durch den GPI-Transamidase-Komplex erkannt (Gerber *et al.*, 1992). An der ω^0 -Position kommen vor allem die Aminosäuren A, C, D, G, N und S vor. Bei Lip2 könnten die Aminosäuren N⁴⁴⁸, G⁴⁴⁹ und D⁴⁵⁰ an den jeweiligen ω -Positionen liegen.

Nach dem Erkennungssignal folgt eine für GPI-Proteine typische serin-/threoninreiche, hydrophile Verbindungsdomäne und anschließend eine hydrophobe Domäne, welche im Hydrophobizitäts-Plot zu erkennen ist (3.1; Abb. 10). Weitere *in silico* Analysen haben widersprüchliche Ergebnisse ergeben, denn abhängig vom eingesetzten Algorithmus könnte eine GPI-Ankersequenz vorhanden sein (Sundstrom, 2002) oder aber auch fehlen (Lee *et al.*, 2003). Daher bedarf es experimenteller Beweise für den putativen GPI-Anker.

Vorausgesetzt, es kommt zu keinen weiteren Prozessierungen, würden alle reifen Lipasen aus 411 bis 455 Aminosäuren bestehen. Für die *C. albicans*-Lipasen konnte kein Propeptid identifiziert werden (3.1; Abb. 8) (Newport *et al.*, 2003). In der Literatur werden vereinzelt prokaryotische Lipasen beschrieben, die als Präpropeptid synthetisiert werden (Jäger *et al.*, 1994). Dieses Phänomen ist jedoch nicht auf Prokaryoten beschränkt, denn auch die beiden Lipasen von *Candida antarctica* liegen als Präpropeptid vor (Hoegh *et al.*, 1994; Uppenberg *et al.*, 1994). Erst durch eine N-terminale Aminosäuresequenzierung der aufgereinigten *C. albicans* Lipasen könnte sich klären lassen, an welcher Stelle nach dem Signalpeptid die reifen Proteine tatsächlich beginnen.

Neben den sequenzspezifischen Hinweisen sprechen auch mehrere experimentelle Daten für die Sekretion der Lipasen von *C. albicans*. So konnten Fu und Mitarbeiter (1997) durch Komplementation von *S. cerevisiae* mit *LIP1* von *C. albicans* eine extrazelluläre lipolytische Aktivität dieser ansonsten nicht-lipolytischen Hefe (Schousboe, 1976) nachweisen. *LIP1* konnte ebenfalls in *Pichia pastoris* erfolgreich kloniert und exprimiert werden (Melzer, 2002). Demnach handelt es sich bei Lip1 um eine sekretorische Lipase. Bei anderen Lipase-Genen der Genfamilie scheinen aber bestimmte CUG-Codons für Serine zu kodieren, die essentiell für die lipolytische Aktivität sind (Riecken, 2003). Das könnte auch ein Grund dafür sein, warum in der von Fu und Mitarbeitern (1997) angewendeten Methode zur Suche nach (Phospho)lipasen nur *LIP1* gefunden wurde, obwohl eine Genfamilie von Lipasen existiert.

Das reine Vorhandensein einer Genfamilie von Lipasen bei *C. albicans* reicht nicht aus, um eine Virulenzrelevanz zu begründen, da ebenfalls Lipase-Genfamilien bei den nicht-pathogenen *Candida*-Arten *C. rugosa* und *C. deformans* (Benjamin & Pandey, 1998; Bigey *et al.*, 2003) existieren. Allerdings bestehen auf Proteinebene keine hohen Homologien zwischen den Lipasen von *C. albicans* und den erwähnten weiteren *Candida*-Lipasen. Weitaus höhere Homologien liegen jedoch zu Lipasen pathogener Pilze vor. Kürzlich wurden zwei Gene kloniert und sequenziert, die für lipolytische Enzyme von *C. parapsilosis* kodieren (Neugenot *et al.*, 2002). Die abgeleitete Proteinsequenz des CpLip2-Proteins weist große Ähnlichkeiten zu den *C. albicans*-Lipasen Lip1-10 auf (42-60 %), wobei die größte Übereinstimmung zu Lip4 besteht. Sequenzanalysen des aufgereinigten reifen Proteins ergaben, dass ein Signalpeptid vorhanden ist und an einer konservierten Position abgespalten wird (Neugenot *et al.*, 2002). Dadurch erhöht sich die Wahrscheinlichkeit, dass auch Lip1-10 an dieser Position gespalten werden.

Dass homologe Sequenzen von Lipase-Genen in beiden *Candida*-Arten vorliegen, haben schon niedrigstringente Southern Blot-Analysen angedeutet (Fu *et al.*, 1997; Stehr, 1999). Weitere Hybridisierungen verstärken die Annahme, dass auch bei *C. dubliniensis* lipase-ähnliche Sequenzen vorhanden sind (3.8; Abb. 25; Stehr *et al.*, 2003). PCR-Analysen mit verschiedenen LIP-Primern untermauern die Existenz einer Lipase-Genfamilie (3.7.4.1; Abb. 22). Vier von den fünf erhaltenen Signalen lagen auf gleicher Höhe mit der entsprechenden Bande von *C. albicans*. Daher könnten bei dieser nahverwandten Hefe zu *LIP2*, *LIP5-7* und *LIP9* homologe Gene vorliegen. In der Southern Blot-Analyse, welche mit einer LIP8-Sonde unter niedrigstringenten Bedingungen durchgeführt wurde, konnten ebenfalls insgesamt fünf Signale detektiert werden. Falls keine Schnittstellen des eingesetzten Restriktionsenzym in den *C. dubliniensis*-Banden vorhanden sind, würde diese neu entdeckte Lipase-Genfamilie somit mindestens fünf Mitglieder besitzen. Die entsprechenden putativen Lipase-Gene von *C. dubliniensis* müssen noch kloniert und sequenziert werden. Interessant wäre in diesem Zusammenhang, ob der Unterschied zwischen *C. albicans* und *C. dubliniensis* bezüglich der Virulenz u.a. auf die Anzahl der Lipasen und deren Regulation zurückzuführen ist.

Im Gegensatz zu diesen Homologien wurden bei Sequenzvergleichen mit dem apathogenen Pilz *S. cerevisiae* keine homologen Lipase-Gene gefunden. *S. cerevisiae* und *C. albicans* besitzen zu 90 % homologe Gene (Magee & Scherer, 1998). Alle übrigen Gene gelten als potentielle Virulenzfaktoren. Dies unterstützt die putative Virulenzrelevanz der Lipase-Gene von *C. albicans* und deren homologen Verwandten.

Expressionsanalysen der Lipasen während der Infektion

Es wurden verschiedene Strategien verfolgt, um die *in vivo* Expression und Regulation der Lipase-Genfamilie zu analysieren. Daraus sollten Rückschlüsse gewonnen werden, welche Lipasen an welcher Art von Infektion und zu welchem Zeitpunkt beteiligt sind, um ein vielversprechendes Kandidatengenen für eine Gendisruption zu finden.

Zum einen wurden verschiedene Kulturmedien gewählt, um klinisch sinnvolle Situationen nachzustellen. Ein großer Vorteil synthetischer Medien bestand in der Möglichkeit, die Expression zeitlich aufzuschlüsseln und reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten. Es fehlten jedoch die wirtsspezifischen Reaktionen, welche während einer Infektion auftreten. Deshalb wurden zum anderen auch etablierte Mausmodelle von Candidosen (Kretschmar *et al.*, 1999) bezüglich der Lipase-Genexpression überprüft. In diesen Säugetiermodellen war eine Wirts-Pathogen-Interaktion gegeben. Auf diesem Wege konnten systemische Mykosen analysiert werden. Um die Interaktion mit humanem Gewebe zu untersuchen, wurden *Candida*-Infektionen künstlicher Schleimhaut-Modelle durchgeführt (Schaller *et al.*, 1998; Schaller *et al.*, 2003). Mit diesen kontrollierten Infektionen konnte der zeitliche Verlauf der *LIP*-Expression betrachtet werden. Ein Vorteil der *in vivo* Modelle ist die Reproduzierbarkeit, es fehlen aber Mikroflora und Immunsystem des Menschen. Aus diesem Grund wurden zusätzlich Patientenproben analysiert.

Bei den *in vitro* Untersuchungen und den *in vivo* Modellen wurde jedoch nur ein Isolat analysiert, während bei humanen Candidosen verschiedene Isolate vorkommen, die sich in der Genexpression unterscheiden können (Odds, 1988).

Die Analyse der Patientenproben wurde durch mehrere Umstände erschwert. Zum einen lag nur eine geringe Menge an Ausgangsmaterial für die RNA-Isolierung vor. Zum anderen führte die Komplexität der Stuhl-Proben häufig zu Problemen bei der RNA-Isolierung. Zusätzlich zu den Problemen der RNA-Isolierung war die Bestimmung der *Candida*-Art besonders wichtig, da *C. albicans* und *C. dubliniensis* mit routineüblichen Methoden nicht unterscheidbar sind (Kurzai *et al.*, 1999).

Die verschiedenen medizinisch relevanten *Candida*-Arten unterscheiden sich in ihrer Pathogenität und auch in ihrem Resistenzverhalten gegenüber gebräuchlichen Antimykotika (Nguyen *et al.*, 1996). Das Problem der Speziesidentifizierung in der mykologischen Labordiagnostik ist deshalb sowohl klinisch als auch epidemiologisch und wirtschaftlich relevant. Daher wurden zwei publizierte PCR-Verfahren miteinander kombiniert, um die klinischen Isolate zu differenzieren (2.2.8.6) (Donnelly *et al.*, 1999; Kurzai *et al.*, 1999). Insgesamt wurden 100 Isolate getestet. 6 % wurden als *C. dubliniensis*-Stämme identifiziert. Obwohl häufig berichtet wird, dass *C. dubliniensis* vor allem bei HIV-Patienten nachgewiesen wurde (Sullivan & Coleman, 1998), lag nur bei einem der sechs identifizierten *C. dubliniensis*-Patienten eine HIV-Erkrankung vor. *C. dubliniensis* wird zudem mit oralen Candidosen assoziiert (Sullivan & Coleman, 1998). Diese Hefe wurde aber auch schon in Urin-, Stuhl- und Sputum- sowie in vaginalen Proben nachgewiesen (Sullivan *et al.*, 1997; Kirkpatrick *et al.*, 1998; Pinjon *et al.*, 1998; Odds *et al.*, 1998; Polacheck *et al.*, 2000). Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen ergaben einen neuen Infektionsort von *C. dubliniensis*, den Zehen-Zwischenraum. Somit kann diese Hefe anscheinend auch epidermale Infektionen auslösen. Die vorgenommene Differenzierung der beiden *Candida*-Arten war notwendig, da es mit bestimmten *LIP*-Primern zu Kreuzreaktionen kam (3.7.4.1; Abb. 22).

Für die Expressionsanalysen der Lipase-Genfamilie von *C. albicans* wurde zur Generierung der Transkriptionsprofile die RT-PCR-Analyse präferiert, da die zehn Lipase-Gene von *C. albicans* in weiten Bereichen hohe Sequenzähnlichkeiten aufweisen und hierdurch bei Northern Blot-Analysen die Gefahr von Kreuzreaktionen der eingesetzten Sonden bestanden hätte. Die RT-PCR bietet die Möglichkeit, die nahverwandten Mitglieder der Lipase-Genfamilie zu unterscheiden. Ein weiterer Vorteil der RT-PCR-Analyse liegt in der höheren Sensitivität (Lee *et al.*, 1999). Diese erlaubt die Untersuchung geringer Mengen an Ausgangsmaterial, was bei der Analyse von Patientenproben eine Grundvoraussetzung ist. *C. albicans* stellt häufig eine Kontaminante von lipidreichen Lösungen dar, die in der parenteralen Ernährung eingesetzt werden (Lawrence *et al.*, 1988). Bei der *LIP*-Expressionsanalyse wurde ein Medium mit Olivenöl als einziger Kohlenstoff (C)-Quelle gewählt (3.6.2), da es oft als Induktor für mikrobielle Lipasen genutzt (Corzo & Revah, 1999) und ebenfalls als Zusatz für parenterale Ernährungslösungen diskutiert wird (Ok *et al.*, 2003).

Gerade die Lipase-Genfamilie könnte in diesem Zusammenhang eine wichtige Rolle bei der Proliferation des Pilzes in diesen Lösungen spielen. Während der Kultivierung sank der pH-Wert im Olivenöl-Medium vermutlich aufgrund der freien Fettsäuren (FFS) kontinuierlich von pH 5 auf pH 3. Diese Absenkung des pH-Wertes könnte optimale Bedingungen für weitere Virulenzfaktoren schaffen. Der pH-Wert selbst nimmt außerdem Einfluß auf die Genexpression von *C. albicans*. So werden z.B. *PHR1* und *PHR2*, die für zellwand-gebundene Glukanasen kodieren, im alkalischen bzw. sauren Milieu aktiviert (De Bernardis *et al.*, 1998). Die entsprechenden Einzeldisruptionsmutanten zeigten abhängig vom pH-Wert des Infektionsortes eine verringerte Virulenz in einer systemischen Candidose (pH 7,4 des Bluts) bzw. in einer vaginalen Candidose (pH 4,5) (De Bernardis *et al.*, 1998).

Die Lipase-Genfamilie wurde im Olivenöl-Medium zeitlich und differentiell reguliert (3.6.2; Tab. 15). Die Gene *LIP1*, *LIP4* und *LIP6-9* wurden konstitutiv transkribiert. Vermutlich sind daher ein oder mehrere der Isoenzyme für das Wachstum in diesem Lipid-Medium verantwortlich. Die restlichen Lipasen sind wahrscheinlich nicht bei der Verwertung des Olivenöls involviert, da deren Gene gar nicht oder nur schwach exprimiert wurden.

Über kontaminierte Ernährungslösungen gelangt das Pathogen unter Umgehung der Barriere Haut direkt in das Blut des Patienten, wodurch eine hämatogen disseminierte Candidose entstehen kann (Moro *et al.*, 1990). Diese Art von Infektion ist neben dem Einsatz von Harnkathetern ein Grund für Harntraktinfektionen, da die Hefepilze im Verlauf der Infektion aus dem Blut über Glomerula in den Urin ausgeschieden werden (Richards *et al.*, 1999). Bei nosokomialen Infektionen in den USA ist der Anteil an Infektionen des Harntrakts in dem Zeitraum 1980 bis 1990 von 5,0 auf 20,5 % gestiegen (Calderone, 2002). *C. albicans* ist bei 50-68 % der Harntraktinfektionen das krankheitsauslösende Agens gewesen.

Das von Frau Prof. M. Hohstetter entwickelte Urea-Medium diente zur Simulation einer Harntraktinfektion (Frau Prof. M. Hohstetter, persönliche Mitteilung). Der saure pH-Wert des Mediums von 5,0 entspricht dem Bereich, in dem das Optimum der extrazellulären lipolytischen Aktivität von *C. albicans* liegt (Ogawa *et al.*, 1992). Daher könnten die Lipasen unter diesen Bedingungen aktiv sein.

Im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit konnte auch unter diesen Bedingungen eine differentielle Regulation der Lipase-Genfamilie beobachtet werden (3.6.1; Abb. 16). Die Lipase-Gene *LIP1* und *LIP5-8* wurden über den untersuchten Zeitraum konstitutiv exprimiert. Die Produkte dieser Gene könnten somit bei einer Harntraktinfektion beteiligt sein. Zusätzlich zur differentiellen Regulation unterlagen einige Lipase-Gene auch einer zeitlichen Regulation.

Da keine Lipide als C-Quelle in dem Urea-Medium vorhanden waren, Lipase-Gene jedoch exprimiert wurden, kann davon ausgegangen werden, dass die sekretierten Lipasen noch weitere Aufgaben wahrnehmen, als nur die reine Nährstoffbeschaffung. Die Lipase-Genfamilie wird auch in anderen lipidfreien Medien exprimiert (Stehr, 1999; Hube *et al.*, 2000). So wurden Transkripte von nahezu allen Lipase-Genen in Medien mit Proteinen als einzige Stickstoffquelle entdeckt. Unter diesen Bedingungen werden auch sekretorische Proteasen exprimiert (Stehr, 1999), denen bereits eine wichtige Rolle als Virulenzfaktoren zugeschrieben wird.

Neben den *in vitro* Analysen wurden die ersten detaillierten Untersuchungen der *in vivo* Expression der *LIP*-Genfamilie durchgeführt. Zuvor erfolgte diese Art von Untersuchung nur bei der *SAP*-Genfamilie (Schaller *et al.*, 1998; Naglik *et al.*, 1999; Staib *et al.*, 2000). Es wurde ein etabliertes Mausmodell einer systemischen Candidose bezüglich der zeitlichen Expression der zehn Lipase-Gene mittels RT-PCR untersucht (3.7.1; Abb. 17). Die systemische Infektion ist die schwerste Form der Candidose, welche mit einer hohen Sterblichkeitsrate korreliert (Taylor *et al.*, 1994). Bei einer Infektion der Maus verteilen sich die *C. albicans*-Zellen ungleichmäßig in den inneren Organen, daher kann die CFU pro Organ nicht zum Angleichen der Transkriptmengen herangezogen werden (Felk, 2002). Aus diesem Grund wurde für die cDNA-Synthese eine Standardmenge der GesamtrNA aus infizierten Organen eingesetzt (2.2.8.8).

Die Lipase-Gene *LIP5* und *LIP8* wurden vor allem von *Candida*-Zellen exprimiert, die Leber und Nieren befielen, während von *LIP10* zu keiner untersuchten Zeit Transkripte in diesen Organen nachgewiesen wurden. Wenn man die *LIP*-Expression in den Leber-Proben des frühen und des späten Infektionsstadiums vergleicht, sind erhebliche Unterschiede zu beobachten. Dieses Ergebnis zeigt deutlich, dass das Expressionsprofil der Lipase-Genfamilie vom Stadium der Infektion abhängig ist. Die Lipasen, deren Gene während der Infektion runterreguliert wurden, sind vielleicht eher an den frühen Ereignissen einer Infektion, wie z.B. der Adhäsion an das Organewebe, beteiligt. Nach Stephens & Farley (1991) ist die mikrobielle Adhäsion eine Grundvoraussetzung für die folgende Penetration und Invasion eines Organs. Nach der Invasion der Leber wechselte das Pathogen sein Genexpressionsprofil und eine andere Gruppe von Lipase-Genen wurde hochreguliert. Dieses könnte eine Antwort auf sich verändernde Nährstoffbedingungen dargestellt haben. Die Strategie verhalf dem Pilz vermutlich dazu, das bestehende Substratangebot optimal auszunutzen. Besonders auffällig war die dominante Expression von *LIP5* und *LIP8*. Das könnte bedeuten, dass die beiden Genprodukte eine wichtige Rolle während der gesamten systemischen Infektion gespielt haben, wobei *Lip10* offenbar nicht involviert war. Die in der Urea-Kultur konstitutiv exprimierten Lipase-Gene wurden auch in den meisten Nieren-Proben exprimiert. Es muß jedoch beachtet werden, dass die letzte Probennahme des Kulturmediums nach 24 h erfolgte, die Nieren aber erst nach drei Tagen entnommen wurden.

Um festzustellen, ob das Urea-Medium geeignet ist, eine systemische Infektion der Nieren vollständig nachzustellen, müssten noch spätere Zeitpunkte bezüglich der Lipase-Genexpression analysiert werden.

Es konnten keine deutlichen Unterschiede bezüglich der Expressionsprofile von Leber und Niere infizierenden *Candida*-Zellen nachgewiesen werden (3.7.2; Abb. 18). Dieses ist mit Ergebnissen von Staib und Kollegen (2000) vergleichbar, die im gleichen Infektionsmodell einer systemischen Candidose festgestellt haben, dass *Candida*-Zellen, welche Leber und Nieren befielen, ein ähnliches *SAP*-Expressionsprofil aufwiesen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Lipase-Genfamilie während einer systemischen Mausinfektion exprimiert und differentiell reguliert wird. Der Expressionsstatus der *Candida*-Zellen hängt eindeutig vom Stadium der Infektion ab, ist aber unabhängig vom Infektionsort.

Die Mitglieder der *LIP*-Genfamilie sind darüber hinaus vermutlich auch an der Besiedlung von humanem Gewebe beteiligt, da Transkripte von allen zehn Lipase-Genen während einer experimentellen Infektion eines künstlichen oralen Schleimhautmodells (RHE) detektiert wurden (3.7.3.1; Abb. 20). Bis jetzt wurde nur die Expression der *SAP*-Genfamilie in diesem Modell analysiert (Schaller *et al.*, 1998; Schaller *et al.*, 1999). Die Lipasen könnten in diesem Szenario bei der Adhäsion an die künstliche Mucosa und/oder deren Penetration beteiligt gewesen sein. Das humanpathogene Bakterium *S. epidermidis* produziert eine Lipase (GehD), die neben der lipolytischen Aktivität auch eine Kollagen-bindende Domäne aufweist (Bowden *et al.*, 2002). Dieses Enzym ist somit bifunktional, da es Adhäsions- und Hydrolyseeigenschaften besitzt. Für eine Esterase von *Penicillium funiculosum* konnte z.B. gezeigt werden, dass sie eine kohlenhydratbindende Domäne aufweist (Kroon *et al.*, 2000). Vielleicht existieren ebenfalls weitere Liganden für die Lipasen von *C. albicans*.

Transkripte von *LIP1* und *LIP4-9* wurden in allen untersuchten RHE-Proben nachgewiesen, was auf eine konstitutive Expression dieser Gene in diesem Modell hindeutet. Die Expression der restlichen Lipase-Gene war erst nach 36 h detektierbar. Somit konnte erneut eine zeitliche Regulation der Lipase-Gentranskription nachgewiesen werden. Verglichen mit dem Mausmodell einer systemischen Candidose konnte wieder eine konstitutive Expression von *LIP5-LIP8* gezeigt werden. Anscheinend übernimmt diese Gruppe an Lipasen in beiden Infektionsmodellen eine wichtige Aufgabe. Interessanterweise erfolgte die zeitliche Regulation von *LIP4* und *LIP9* gegenläufig in beiden Modellen. Zum späten Zeitpunkt der systemischen Infektion wiesen weniger Leber-Proben eine Expression dieser Gene auf als im frühen Stadium. Im Gegensatz dazu wurden die beiden Gene im RHE-Modell mit Zunahme der Infektionszeit stärker exprimiert. Die zeitliche Regulation der Lipase-Gene ist somit abhängig vom untersuchten Infektionsmodell. Des Weiteren wurde zum ersten Mal die zeitlich kontrollierte *in vivo* Expression von *LIP10* nachgewiesen.

Es wurde ein weiteres Schleimhaut-Modell, nämlich das einer vaginalen Schleimhaut, bezüglich der Lipase-Genexpression überprüft. Kürzlich ist die erste Veröffentlichung mit dem vaginalen Modell erschienen (Schaller *et al.*, 2003), in der die Expression der *SAP*-Genfamilie überprüft und verschiedene *sap*-Mutanten bezüglich ihrer Invasivität getestet wurden. Candidosen der Vagina und der Mundhöhle sind die häufigsten Pilzinfektionen der Schleimhaut. Die vaginale Candidose ist eine Pilzerkrankung, von der $\frac{3}{4}$ aller Frauen betroffen sind (Sobel *et al.*, 1998). Der vaginale pH-Wert von 4,5 (Caillouette *et al.*, 1997) liegt im Bereich des pH-Optimums der lipolytischen Aktivität von *C. albicans*. Daher kann angenommen werden, dass die Lipase-Genfamilie an dieser Art von Candidose beteiligt sein könnte. Die Lipasen unterstützen eventuell die Adhäsion des Pathogens an vaginale Epithelzellen. Es wurde gezeigt, dass das Absenken des pH-Wertes auf 3,5 die Adhäsion von Mikroorganismen an vaginale Zellen fördert (Bibel *et al.*, 1987). Durch das Freisetzen von FS könnten die Lipasen den pH-Wert bis auf 3,5 absenken, wie sich in den Versuchen mit YNB-Olivenöl zeigte. Zusätzlich begünstigen die FFS hydrophobe Wechselwirkungen und damit die unspezifische Adhäsion an Wirtszellen und/oder benachbarte Zellen, wie es für *Propionibacterium acnes* postuliert wurde (Miskin *et al.*, 1997). Das Absenken des pH-Wertes scheint auch einen erheblichen Einfluß auf den Infektionsverlauf zu nehmen, da bei weniger schweren vaginalen Candidosen der pH-Wert zwischen 3,8 und 4,2 liegt (Plourd, 1997).

Im vaginalen Schleimhaut-Modell wurden *LIP4-8* über den untersuchten Zeitraum von 24 h exprimiert (3.7.3.2; Tab. 16). Da die Lipase-Gene ebenfalls im RHE-Modell durchgehend exprimiert wurden, scheinen sie auch in dieser Art von Oberflächeninfektion eine Rolle zu spielen. Die restlichen Lipase-Gene wurden nur am Anfang (*LIP1*, *LIP3* und *LIP9*) oder gar nicht (*LIP10*) transkribiert, was einen Unterschied zur RHE-Expression darstellt, wo die Expression dieser Gene mit der Zeit anstieg. Somit konnte erneut eine zeitliche und vom Infektionsmodell abhängige *LIP*-Expression gezeigt werden. Auch die *SAP*-Gene werden in diesem Modell zeitlich und differentiell reguliert (Schaller *et al.*, 2003). Im Gegensatz zu der Lipase-Genfamilie werden mit der Zeit mehr *SAP*-Gene exprimiert als zu Anfang der Infektion. Die gleichzeitige Expression von verschiedenen Hydrolase-Genen, die unterschiedlich reguliert werden, unterstreicht die Flexibilität des Pilzes. Daher erscheint es sinnvoll, nach gemeinsamen Hemmstoffen zu suchen, um die pathogene Proliferation von *C. albicans* durch eine antimykotischen Therapie zu unterbinden.

Einer der stärksten Hinweise, dass die Lipase-Gene für Virulenzfaktoren kodieren, war der Nachweis der Expression verschiedener *LIP*-Gene in klinischen Proben von Patienten, die an unterschiedlichen Candidosen erkrankt waren (3.7.4.2; Abb. 24, Tab. 17). Neben der differentiellen und zeitlichen Regulation im RHE-Modell konnte die Expression der Lipase-Genfamilie in Proben von Patienten, die an oraler Candidose erkrankt waren, gezeigt werden (3.7.4.2; Abb. 24).

Die orale Candidose ist die häufigste opportunistische Infektion HIV-Infizierter, wobei bis zu 90 % der Patienten betroffen sein können (Sullivan *et al.*, 1995). *C. albicans* kann sich an die orale Mucosa sowie an Zahnprothesen heften. Die Lipasen von *C. albicans* könnten durch ihre katalytischen Eigenschaften die Hydrophobizität und damit ein unspezifisches Anheften des Pathogens fördern. Bei *S. aureus* wird angenommen, dass die Lipase Oberflächenmoleküle der Wirtszelle angreift und somit Rezeptoren freisetzt, welche die Adhäsion unterstützen (Rollof *et al.*, 1988).

In den oralen Patientenproben wurde erneut vor allem *LIP8* exprimiert (Abb. 24). Des Weiteren wurde die Expression von *LIP4* und *LIP5* in 50 % der Proben nachgewiesen. Transkripte von *LIP1*, *LIP2*, *LIP3*, *LIP7* und *LIP9* wurden jeweils nur in einer Probe nachgewiesen, obwohl *LIP1*, *LIP7* und *LIP9* während der RHE-Infektion zu allen untersuchten Zeitpunkten exprimiert wurden. Ebenso wurde *LIP6* im künstlichen Mucosa-Modell konstitutiv exprimiert, aber nur in zwei Patientenproben wurden entsprechende Transkripte nachgewiesen. *LIP10*-mRNA konnte in keiner der acht Proben detektiert werden, obwohl die einzige *in vivo* Detektion von *LIP10*-Transkripten im RHE-Modell erfolgte. Unterschiede bezüglich der Expressionsdaten von RHE-Modell und oralen Patientenproben können aus den bereits erwähnten Gründen aufgetreten sein.

Neben den oralen Proben wurden noch weitere Infektionsorte, wie z.B. der gastrointestinale Trakt sowie die vaginale Schleimhaut, untersucht (3.7.4.2; Tab. 17). Die Zahl an detektierten *Candida*-Zellen im Stuhl kann aufgrund von ernährungsspezifischen Faktoren oder einem pathogenen Befall des gastrointestinalen Traktes erhöht sein (Auger & Joly, 1975). Die Lipasen von *C. albicans* könnten dem Pilz in diesem Zusammenhang die vorhandenen Lipide als C-Quelle erschließen und somit dessen Proliferation fördern. Insgesamt wurden fünf Lipase-Gene in der einzigen auswertbaren Stuhlprobe exprimiert. Vor allem konnte von *LIP6-8* eine deutliche Expression nachgewiesen werden.

Es wurde bereits präsentiert, dass die *LIP*-Genfamilie während der kontrollierten Infektion eines künstlichen Modells einer vaginalen Schleimhaut differentiell exprimiert und zeitlich reguliert wird (3.7.3.2; Tab. 16). Zusätzlich wurden auch zwei Proben von Patientinnen untersucht, die an einer vaginalen Candidose litten. Wie im analysierten Modell wurden *LIP5* und *LIP8* in beiden vaginalen Proben exprimiert (3.7.4.2; Tab. 17). Die beiden Lipasen sind daher höchstwahrscheinlich bei dieser Art der Pathogenese beteiligt. Zusammenfassend läßt sich sagen, dass auch bei einer vaginalen Candidose die Lipase-Genfamilie differentiell exprimiert wird. Dies ist mit den Ergebnissen von Schaller *et al.* (2003) vergleichbar, die bei vaginalen Patientenproben eine differentielle *SAP*-Expression vorgefunden haben. Da zwei Arten von sekretierten Hydrolasen während vaginaler Candidosen gleichzeitig exprimiert und differentiell reguliert werden, könnte es zwischen den verschiedenen sekretierten Hydrolasen zu synergistischen Effekten kommen. Die Herstellung von Mehrfach-Mutanten, bei denen verschiedene Hydrolase-Gene ausgeschaltet werden sowie die Verwendung einer Kombination unterschiedlicher Enzym-Inhibitoren, könnten über mögliche Synergismen Aufschluß geben.

Alle zehn Lipase-Gene waren zumindest in einem Modell transkriptionell aktiv, was beweist, dass es sich nicht um Pseudogene handelt. Bei *S. cerevisiae* sind Pseudogene ungewöhnlich (Dujon, 1996). Bei *C. rugosa* wurden hingegen Pseudogene von Lipasen gefunden (Phillips *et al.*, 1995). Durch heterologe Expressionen in Hefen konnte gezeigt werden, dass *LIP1*, *LIP4*, *LIP8* und *LIP10* aktive Lipasen kodieren (Fu *et al.*, 1997; Melzer, 2002; Riecken, 2003).

Aufgrund der Expressionsdaten und erster erfolgreicher Proteincharakterisierungen können erste Rückschlüsse auf mögliche Funktionen einzelner Lipasen gezogen werden. Bei der systemischen Mauseinfektion wurde *LIP4* im frühen Stadium deutlich exprimiert, wobei die Expression mit der Zeit abnahm. In beiden Schleimhaut-Modellen wurde eine konstitutive Expression nachgewiesen. Des Weiteren wurde *LIP4*-mRNA in 50 % der vaginalen und oralen Patientenproben detektiert. Aufgrund dieser Ergebnisse kann angenommen werden, dass Lip4 an frühen Infektionsprozessen bzw. oberflächlichen Infektionen beteiligt ist. Dies stimmt mit den Daten überein, die von Lan und Mitarbeitern (2002) über den phänotypischen Wechsel gesammelt wurden. Eine Microarray-Analyse hat gezeigt, dass *LIP4* während dieses Wechsels reguliert wird. Verglichen mit den „white“ Zellen (W-Zellen) wurde die *LIP4*-Expression in den „opaque“ Zellen (O-Zellen) des WO-1-Stammes hochreguliert. O-Zellen waren in einem kutanen Mausmodell virulenter als in einem systemischen Mausmodell (Kvaal *et al.*, 1999). Anzumerken ist, dass Gene, die für Enzyme der β -Oxidation kodieren, in O-Zellen stärker exprimiert werden als in W-Zellen. Somit könnten die Lipide der Haut eventuell besser verwertet werden. Hanley und Mitarbeiter (2000) haben gezeigt, dass die Erzeugung von Cholesterol und FFS im richtigen Verhältnis kritisch für die Erhaltung der epidermalen Barrierefunktion ist. Die unkontrollierte Freisetzung von FFS könnte somit die Invasion von Pathogenen erleichtern. Daher ist es notwendig, die kombinierten Effekte von den sekretierten lipolytischen Enzymen selbst und deren enzymatischen Endprodukte in der gesamten mikrobiellen Virulenz zu berücksichtigen. Diese Reaktionen könnten Entzündungsprozesse und Gewebeschädigungen verursachen. Daher erscheint es sinnvoll, eine *LIP4*-KO-Mutante von *C. albicans* herzustellen und z.B. in einem Epidermis-Modell zu testen.

LIP8 wurde sowohl in den Infektionsmodellen, als auch in den getesteten Proben der Patienten konstitutiv exprimiert. Während der systemischen Mauseinfektion wurden *LIP8*-Transkripte sogar in 100 % der untersuchten Leber-Proben detektiert. Erste Charakterisierungen des heterolog exprimierten Proteins ergaben, dass zwei Serine, die durch CUG-Codons kodiert werden, essentiell für die Aktivität der Lipase sind (Riecken, 2003). In Abhängigkeit davon, wieviele CUG-Codons für die heterologe Expression in *Pichia pastoris* korrigiert wurden, veränderten sich pH- und Temperatur-Optima der entsprechenden Lipase-Varianten. Die Substratspezifität hingegen blieb konstant. Die verschiedenen Lip8-Formen bevorzugten C-Ketten mit einer Länge von 8 und 16 C-Atomen.

Die höchsten lipolytischen Aktivitäten wurden mit dem Enzym erreicht, bei welchem alle drei CUG-Codons angepaßt wurden und damit dem ursprünglichen Protein am ehesten entsprach. Diese Lipase besaß ihre höchste Aktivität in einem Temperaturbereich von 28-37 °C und einem pH-Bereich von 4-7. Durch diese Eigenschaften könnte dieses Enzym an vielen verschiedenen Stellen im Wirt aktiv werden, was die vorgefundene konstitutive Expression untermauert.

Funktionsanalyse von Lip8, einer konstitutiv exprimierten Lipase

Wie kann die Funktion bzw. Virulenzrelevanz eines Gens analysiert werden? Zum einen gibt es die Möglichkeit, das Gen gezielt auszuschalten, zum anderen den entgegengesetzten Weg einer konstitutiven Überexpression des Zielgens. Die entsprechenden Mutanten können dann unter verschiedenen *in vitro* Bedingungen und während unterschiedlicher Infektionen im Vergleich zum Wildtyp (wt) analysiert werden.

Um zu untersuchen, ob Lipasen bei der Pathogenese von Candidosen von Bedeutung sind, wurden *lip8*-Mutanten hergestellt. Dieses spezielle Lipase-Gen wurde als Angriffsziel ausgewählt, da es, verglichen mit den anderen Mitgliedern der Lipase-Genfamilie, am häufigsten *in vivo* exprimiert wurde, was auf eine wichtige Rolle bei Infektionen mit *C. albicans* schließen könnte. Zur Funktionsanalyse von *LIP8* wurden verschiedene Gendisruptionsmethoden - die konventionelle *URA*-Blaster-Methode der vollständigen Gendisruption und zwei neue im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Methoden zum „Knock-down“ der Genexpression - und eine Strategie zur konstitutiven Überexpression des Gens angewendet.

Mit der *URA*-Blaster-Methode konnten beide *LIP8*-Allele erfolgreich zerstört werden (3.10; Abb. 28), was mit einer Expressionsanalyse bestätigt wurde (3.10; Abb. 29). Die dafür angewandte Methode zur gezielten Eliminierung von Genen (1.4; Abb. 4) ist bei Fonzi & Irwin (1993) und Gow *et al.* (1994) ausführlich beschrieben worden und wurde bereits mehrfach für die Untersuchung von sekretorischen Proteasen angewendet (Hube *et al.*, 1997; Sanglard *et al.*, 1997; Ibrahim *et al.*, 1998). Ein Nachteil dieser Methode besteht darin, dass zwei Transformationen notwendig sind, um beide Ziel-Allele nacheinander auszuschalten. Mit jeder erfolgten Transformation und der damit verbundenen genetischen Veränderung besteht die Gefahr, dass ungewollte und unerkannte Mutationen auftreten. Des Weiteren beinhaltet diese Methode den Einsatz des Zellgiftes Fluoroorotat, welches unspezifische Rekombinationsereignisse fördern könnte. Daher ist es von Nutzen, wenn die Zahl der Transformationen auf ein geringeres Maß reduziert werden kann. Im Rahmen der Doktorarbeit wurden zwei neue Methoden etabliert, um die Genexpression von *LIP8* mit einer einzigen Transformation stark zu senken. Diese Strategien kombinieren den KO-Effekt (Deletion eines Teils des Zielgens) mit einem Antisense- bzw. RNAi-Interferenz-Effekt (Knock-down (KD) Effekt).

Zum einen wurde eine Insertionskassette entwickelt, welche spezifisch ein *LIP8*-Allel über homologe Rekombination ausgeschaltet (3.11; Abb. 32) und gleichzeitig Antisense-RNA produziert hat. Diese Antisense-RNA war gegen den 5'-Teil von *LIP8* gerichtet. Der eingesetzte *TEF3*-Promotor (Colthurst *et al.*, 1992) sollte für eine konstitutive Expression der Antisense-RNA sorgen. Zum anderen wurde eine Insertionskassette generiert, die ebenfalls ein Allel über homologe Rekombination zerstörte (3.11; Abb. 32). Zusätzlich sollte diese Kassette doppelsträngige RNA (dsRNA) des 5'-Teils von *LIP8* mit einem internen Abstandshalter exprimieren. Dieses Konstrukt stand nach der Transformation unter der Kontrolle des endogenen *LIP8*-Promotors.

Die produzierte dsRNA, die möglicherweise bei beiden Strategien entstand, sollte als Initiator für die sogenannte RNA-Interferenz (RNAi) fungieren. Diese spezielle Form des „post-transcriptional gene silencing“ (PTGS) wurde das erste Mal bei *C. elegans* beschrieben (Fire *et al.*, 1998). Interessanterweise scheint *S. cerevisiae* diesen Mechanismus der RNA-Interferenz nicht zu besitzen. Daher war es fraglich, ob diese Strategie in der nahverwandten Hefe *C. albicans* funktionieren würde. Durch eine Homologiesuche nach RNAi-relevanten Proteinen in der *C. albicans*-Datenbank konnte ein Argonaut (Ago)-homologes Protein identifiziert werden (Anhang 3). Es wird vermutet, dass Argonaut-Proteine für den Transport von „short interfering RNAs“ (siRNAs) zwischen der RNase III „Dicer“ und dem Protein-RNA Nuklease Komplex „RNA-induced silencing complex“ (RISC) zuständig sind (Hammond *et al.*, 2001). *AGO*-Gene kommen in den meisten eukaryotischen Genomen vor (Bohmert *et al.*, 1998; Tabara *et al.*, 1999; Catalanotto *et al.*, 2000; Hammond *et al.*, 2001; Pal-Bhadra *et al.*, 2002), wobei *S. cerevisiae* höchstwahrscheinlich eine Ausnahme darstellt. Diese Proteine besitzen alle sogenannte PAZ- und Piwi-Domänen. Im *S. cerevisiae*-Genom kommt kein Protein mit einer Piwi-Domäne vor. Nach den RT-PCR Ergebnissen der Knock-down-Mutanten zu urteilen, scheint die RNA-Interferenz in *C. albicans* mit beiden Strategien erfolgreich gewesen zu sein, denn es konnte keine Expression von *LIP8* mehr nachgewiesen werden (3.11; Abb. 33A). Der Knock-down-Effekt schien spezifisch gewesen zu sein, denn es konnte nachwievor eine Expression des zu *LIP8* nahverwandten Gens *LIP5* festgestellt werden (3.11; Abb. 33C). Um die putativen siRNAs nachzuweisen und damit den RNAi-Mechanismus endgültig zu belegen, müssen noch Northern Blot-Analysen erfolgen.

Somit wurden zwei neue Strategien zur Analyse von Genfunktionen entwickelt, welche nur eine Transformation benötigten.

Für die konstitutive Überexpression von *LIP8* wurde zusätzlich ein dritter *LIP8*-ORF in das Genom von *C. albicans* eingeführt. Dieser ORF stand unter der Kontrolle des Actin-Promotors (Losberger & Ernst, 1989), um eine Überexpression zu gewährleisten. Da die Mutanten (drei *LIP8*-ORFs) verglichen mit dem wt (zwei *LIP8*-ORFs) und mit einer heterozygoten KO-Mutante (ein *LIP8*-ORF) (3.12; Abb. 36) sehr starke *LIP8*-Expressions-signale aufwiesen, kann von einem Funktionieren des Konstruktes ausgegangen werden.

Die hergestellten *LIP8*-Mutanten (KO-, KD- und Überexpressionsmutanten) wurden bezüglich verschiedener Parameter untersucht, um den Einfluß einer gesteigerten bzw. einer herabgesenkten oder gänzlich ausgeschalteten *LIP8*-Expression auf das Verhalten von *C. albicans* unter verschiedenen *in vitro* und *in vivo* Bedingungen zu klären.

Anscheinend beeinträchtigte das Zerstören von einem oder zwei *LIP8*-Allelen bzw. deren Runterregulierung nicht die Fähigkeit zur Chlamydosporenbildung (3.13.2.3; Abb. 43). Des weiteren nahm der Verlust von Lip8 keinen Einfluß auf die Fähigkeit von *C. albicans* andere Kohlenhydrat-Quellen als Glucose zu nutzen (3.13.2.5; Abb. 46A&B) und keinen Einfluß auf die Osmotoleranz des Pilzes (3.13.2.6; Abb. 47A&B). Alle generierten *lip8*-Mutanten zeigten dafür im Lipid-Medium YNB-Tween 40 ein schlechteres Wachstum als der wt (3.13.1.2; Abb. 38A&B). Tween 40 wird häufig als Zusatz bei Kulturmedien und als Lipasesubstrat für verschiedene pathogene Bakterien genutzt (Lonon *et al.*, 1988; van Boxtel *et al.*, 1990; Pratt *et al.*, 2000). Anscheinend war die Expression beider *LIP8*-Allele für *C. albicans* notwendig, um eine optimale Wachstumsrate in diesem Medium zu erzielen, denn bereits die heterozygoten KO-Mutanten zeigten ein schwächeres Wachstum als der wt. Demnach konnte dieser Verlust nicht vollständig durch andere Lipasen ausgeglichen werden. Die Überexpressionsmutanten verhielten sich in diesem Medium wie der wt. Daher scheint ein dritter *LIP8*-ORF, keinen Wachstumsvorteil für die Hefe zu bewirken. Von weitaus größerer klinischer Relevanz ist, dass die KO- und KD-Mutanten in NuTRIFlex[®] Lipid-Medium signifikant schlechter wuchsen als der wt (3.13.1.3; Abb. 39). Diese Art von Lösung stellt eine mögliche Kontaminationsquelle für mikrobielle Infektionen dar (Deitel *et al.*, 1975). Nach dem Wachstumstest zu urteilen, ist Lip8 für eine optimale Proliferation in dieser Lösung, welche in der parenteralen Ernährungsbehandlung zum Einsatz kommt, notwendig. Diese Lipase ist somit ein Kolonisationsfaktor, der das Wachstum in einer lipidreichen Umgebung fördert, wie es z.B. auch auf pathogene *Staphylococcus*-Arten zutrifft. Deren extrazelluläre lipolytische Aktivität unterstützte ebenfalls das Wachstum der Bakterien (Rollof *et al.*, 1987; Longshaw *et al.*, 2000). Die *C. albicans* Lipasen stellen somit möglicherweise eine Anpassung an den Wirt dar (Bossenz, 1998). Falls man die Definition eines Virulenzfaktors ausweitet und Gene bzw. deren abgeleiteten Produkte, die das Überleben des pathogenen Organismus unterstützen, miteinbezieht, so wären die Lipasen von *C. albicans* potentielle Virulenzfaktoren im weitesten Sinne. Somit stellt dieses Lipase-Gen bzw. das Enzym ein geeignetes Angriffsziel dar, um die Proliferation von *C. albicans* in diesen Fettemulsionen, wie z.B. das verwendete NuTRIFlex[®] Lipid-Medium, zu unterbinden.

Die Inkubationstemperatur beeinflusste den Phänotyp der *LIP8*-Mutanten (3.13.2.2; Abb. 42). Mit steigender Temperatur wurde der „rauhe“ Phänotyp bei den *lip8*-Mutanten stärker ausgeprägt. Dieses war sowohl bei den KO- als auch bei den KD-Mutanten zu beobachten.

Die Überexpressionsmutanten verhielten sich über den untersuchten Temperaturbereich wie der wt. Bei den KO- und KD-Mutanten wurde bei höherer Temperatur die Myzelbildung gefördert bzw. bei niedrigerer Temperatur inhibiert. Das gleiche Phänomen war bei einem steigenden pH-Wert festzustellen (3.13.2.1; Abb. 41). Selbst die Retransformante der homozygoten KO-Mutante konnte diesen Phänotyp nicht revertieren. Anscheinend waren zwei intakte *LIP8*-ORFs erforderlich, denn die Retransformante der heterozygoten KO-Mutante verhielt sich wie der wt. Dieses Ergebnis würde auf einen Gendosis-Effekt hindeuten. Die lipolytischen Aktivitätstests im NuTRIflex[®] Lipid-Medium haben jedoch gezeigt, dass sowohl die Retransformanten der heterozygoten als auch der homozygoten KO-Mutante eine wesentlich höhere sekretierte lipolytische Aktivität aufwiesen als der wt (3.13.3; Abb. 49B). Daher kann ein Gendosis-Effekt vermutlich ausgeschlossen werden.

Möglicherweise ist das Zusammenspiel von zwei *LIP8*-Allelen notwendig, um den wt-Phänotyp wiederherzustellen. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass beide Allele sich differenziert und auseinander entwickelt haben und daher unterschiedliche Aufgaben wahrnehmen. Bei den *SAP2*-Allelen konnte diese Art von divergenter Evolution nachgewiesen werden (Staib, *et al.*, 2002a). Dass bereits die heterozygoten KO-Mutanten den „rauh“ Phänotyp ausbildeten, obwohl noch ein intaktes *LIP8*-Allel vorhanden war, ist daher nicht erstaunlich. Uhl und Mitarbeiter haben kürzlich gezeigt (2003), dass heterozygote Mutanten phänotypische Abweichungen zum wt zeigen können. Über eine Transposon-Mutagenese haben sie festgestellt, dass 146 Gene den Hefe-Myzel-Übergang beeinflussen, wenn sie nur in einer Kopie vorliegen. In diesem Screen fiel u.a. auch ein mögliches Lipase-Gen auf (*LIP2-3*). Diese „Transposon“-Mutante zeigte eine verminderte Myzelbildung auf Spider-Medium. Die Ergebnisse zeigen, dass Lipasen einen Einfluß auf den Hefe-Myzel-Übergang nehmen können. Die *lip8*-Mutanten verhielten sich aber auf Spider-Medium ähnlich wie der wt (3.13.2.3; Abb. 43). Interessanterweise schienen die Überexpressionsmutante und die Retransformante der heterozygoten KO-Mutante mehr Myzel am Rand der Kolonie zu bilden als der wt. Offenbar unterstützte ein dritter *LIP8*-ORF bzw. der überexprimierte ORF die Filamentbildung auf diesem Medium. Auf Platten, die normalerweise genutzt werden, um die W- und O-Zellen des WO-1-Stammes zu unterscheiden (Andersen & Soll, 1987), zeigten die Überexpressionsmutante und die Retransformante der heterozygoten KO-Mutante, ähnlich wie beim Spider-Medium, eine erhöhte Filamentbildung (3.13.2.4; Abb. 45). Des weiteren wiesen die Kolonien rote Sektoren auf, die beim wt nicht auftraten. Beim WO-1 Stamm ist dies ein Indikator für O-Zellen. Vielleicht förderte die Überexpression von *LIP8* den phänotypischen Wechsel. Eine KO-Mutante von *SIR2* („silent information regulator“) wies ebenfalls eine vermehrte Myzelbildung und eine erhöhte Frequenz des phänotypischen Wechsels auf (Perez-Martin *et al.*, 1999).

Zusätzlich zeigten die *lip8*-Mutanten eine erhöhte Eigenaggregation (3.13.1.4; Abb. 40A&B). Diese Flockung könnte durch eine gesteigerte Hydrophobizität verursacht worden sein. Die Mutanten neigten unter vielen Bedingungen zu einer vermehrten Filamentbildung und gerade die Myzelform ist hydrophober als die Hefeform (Lopez-Ribot *et al.*, 1991; Rodrigues *et al.*, 1999). Eine Aquaporin-Mutante von *S. cerevisiae* wies ebenfalls eine erhöhte Flockenbildung auf (Carbrey *et al.*, 2001). Bei *S. cerevisiae*-Mutanten sind häufig Zellflockung im flüssigen Medium und eine „rauhe“ Morphologie der Kolonie auf Agar-Platten miteinander gekoppelt (Hampsey, 1997), was auf die *lip8*-Mutanten ebenfalls zutrifft. Der Grund der häufig zum wt abweichenden Kolonief orm der Mutanten ist daher vermutlich die vermehrte Filamentbildung dieser Mutanten. Es wäre denkbar, dass Lip8 bevorzugt hydrophobe Substrate auf den Pilzzellen abbaut und somit die unspezifische Zellaggregation unterbindet.

Da eine putative Lipase ausgeschaltet wurde, war neben den morphologischen Untersuchungen vor allem der Einfluß auf die lipolytische Aktivität von Interesse. Die Überstände der KO- und KD-Mutanten, die im NuTRIflex[®] Lipid-Medium kultiviert wurden, zeigten eine verringerte Aktivität gegenüber dem Überstand des wt (3.13.3; Abb. 49A). Die Differenz kann nicht auf das Fehlen eines *URA3*-Allels zurückgeführt werden, da CAI-2 die gleiche extrazelluläre lipolytische Aktivität wie der wt besaß. Anscheinend wurde Lip8 in diesem Medium sekretiert, denn die mit dem Überexpressionsvektor transformierten Stämme (Retransformanden und Überexpressionsmutanten) besaßen eine stark erhöhte extrazelluläre Aktivität gegenüber dem wt (3.13.3; Abb. 49B). Es wurde eine Abhängigkeit der lipolytischen Aktivität von Art und Anzahl der Allel festgestellt, die folgende Reihe ergab:

2 wt-Allele < 1 Überexpressionsallel < (1 wt-Allel + 1 Überexpressionsallel) < (2 wt-Allele + 1 Überexpressionsallel).

Die Zellwand des Pilzes selbst wird nicht von sezernierten lipolytischen Enzymen angegriffen, da sie hauptsächlich aus β -Glukan (48-60 %), Mannoproteinen (20-23 %), Protein (2-3 %), Chitin (0,6-2,7 %) und nur zu 2 % aus Lipiden besteht (Sullivan *et al.*, 1983). Die lipolytische Katalyse könnte durch Spaltung von antimykotischen FS direkt einen Schutz für *C. albicans* bieten. So produziert z.B. *S. aureus* eine Lipase, welche die antibakteriellen Lipide der Haut hydrolysiert (Tirunarayanan & Lundebeck, 1968). Es wird angenommen, dass das Fettsäure-modifizierende Enzym (FAME) (Kapral *et al.*, 1992) diese Funktion unterstützt (Lowe *et al.*, 1998). In diesem Zusammenhang wäre es interessant, die Suszeptibilität der *LIP8*-Mutanten gegenüber antimikrobiellen Lipiden zu testen. Es konnte bereits gezeigt werden, dass Sphingosine gegen Dermatophyten und *C. albicans* aktiv sind (Bibel *et al.*, 1993). Schließlich könnten die Lipasen auch andere kommensale Mikroorganismen direkt angreifen oder durch Veränderung der Umgebung die Wachstumsbedingungen für andere Mikroorganismen verschlechtern und gleichzeitig für *C. albicans* verbessern. Man könnte in diesem Zusammenhang die *LIP8*-Mutanten in Kokulturen mit verschiedenen kommensalen Mikroorganismen testen.

Zusätzlich zu den verschiedenen *in vitro* Analysen wurden die Mutanten in mehreren Infektionsmodellen eingesetzt, um die Virulenzrelevanz von Lip8 zu klären.

Es wurde der Einfluß der *LIP8*-Expression auf eine künstliche orale Candidose überprüft (3.14.3.1; Abb. 53A&B). Hierbei zeigte sich, dass die eingesetzte KO-Mutante genauso infektiös gegenüber der künstlichen Schleimhaut war wie der wt. Die Mutante wies erneut eine verstärkte Myzelbildung auf, was dem Bild der *in vitro* Versuche entspricht. Der Vergleich der Expressionsmuster von wt und Mutante (3.7.3.1; Abb. 20; Tab. 18) ergab, dass die Expression von *LIP1-3* und *LIP8-10* keine wesentliche Rolle für eine RHE-Infektion spielte. Dagegen wurden *LIP4-7* von beiden Stämmen konstitutiv exprimiert. Somit konnte offenbar das Fehlen von Lip8 ausgeglichen werden, obwohl *LIP8* am häufigsten in oralen Patientenproben exprimiert wurde (3.7.4.2; Abb. 24).

Auch im vaginalen Schleimhautmodell schien Lip8 keine entscheidende Rolle zu spielen, denn die KO-Mutante war genauso virulent wie der wt. Bezüglich des Expressionsprofils war auffällig, dass fast alle *LIP*-Gene konstitutiv von der KO-Mutante exprimiert wurden (3.14.3.2; Tab. 19). *LIP1*, *LIP3* und *LIP9* waren hingegen beim wt nach 24 h nicht mehr aktiv. Vielleicht war diese schwache Expression zusätzlicher Lipase-Gene eine Form der Kompensation der Mutante. Wie beim RHE-Modell wurden *LIP4-7* erneut stark exprimiert. Möglicherweise sind gerade diese Gene wichtig für Schleimhautinfektionen.

Bei einer intraperitonealen Infektion von Mäusen werden die *Candida*-Zellen in die Bauchhöhle gespritzt. Anschließend müssen sie zunächst die Organkapseln penetrieren, um in das Blutssystem zu gelangen. Diese Gewebeschädigungen können über Messungen von Markerenzymen festgehalten werden (Kretschmar *et al.*, 1999; Ok *et al.*, 2003). Nach der Alaninaminotransferase der Leber zu urteilen, bestand nach 24 h Infektion kein Unterschied zwischen wt und Mutanten. Vielleicht wären Unterschiede erst zu einem späteren Zeitpunkt sichtbar gewesen oder es reichte z.B. die konstitutive *LIP5*-Expression aus, um die fehlende *LIP8*-Expression zu ersetzen. Gerade *LIP5* zeigt die höchsten Homologien zu *LIP8* und ist vielleicht daher geeignet, die Aufgaben von *LIP8* zu übernehmen.

Des Weiteren wurde das Mausmodell einer Katheterinfektion genauer untersucht. Der Katheter ist die häufigste nosokomiale Erregerquelle. Studien ergaben, dass in den USA zentrale intravenöse Katheter das Risiko einer über das Blut vermittelten Candidose um den Faktor 3 erhöhen (Beck-Sague & Jarvis, 1993). Diese Art von Candidose wird mit einer intravenösen (i.v.)-Infektion bei Mäusen nachgestellt. Nach der i.v. Injektion des Pilzes verteilt sich dieser über das Blut und befällt die Organe. *C. albicans* ist dazu in der Lage, an die Endothelzellen der Blutgefäße zu adhären und diese zu penetrieren, um das dahinter gelegene Organewebe von z.B. Nieren und Leber zu befallen (Cannom *et al.*, 2002). In diesem Szenario ist die Endothelschicht die erste Barriere, die der Pilz zu überwinden hat. Die sekretierten Lipasen von *C. albicans* könnten möglicherweise an den Infektionsschritten der Adhäsion und/oder der Penetration beteiligt sein.

Die homozygote KO-Mutante wurde während der i.v.-Infektion in einem geringeren Prozentsatz in den Nieren der Mäuse vorgefunden als der wt (3.14.4.2; Abb. 55A). Gerade die Niere ist in diesem Infektionsmodell das Organ mit dem größten Pathogen-Befall (Cannom *et al.*, 2002). Die restlichen Mutanten zeigten keine signifikanten Unterschiede zum wt. In der Leber waren die Unterschiede wesentlich ausgeprägter (3.14.4.2; Abb. 55B) - anscheinend war die KO-Mutante nicht dazu in der Lage, dieses Organ innerhalb von drei Tagen zu befallen. Die heterozygote Mutante und die Retransformante der homozygoten KO-Mutante besaßen ferner eine geringere CFU als der wt. Die restlichen *Candida*-Stämme wiesen keine signifikanten Unterschiede gegenüber dem wt auf. Danach zu schließen, sind zwei intakte *LIP8*-Kopien notwendig, um eine vollständige Virulenz zu entfalten. Somit scheint Lip8 einen Virulenzfaktor für eine Katheterinfektion darzustellen, denn es starb keine Maus, die mit der KO-Mutante infiziert wurde (3.14.4.2; Tab. 20). Bei allen anderen Stämmen traten letale Infektionen auf, wobei sich das Bild der CFU in der Leber auch hier widerspiegelte, denn die Stämme mit der geringeren CFU verursachten auch die wenigsten letalen Infektionen. Diese Korrelation von erhöhter CFU und erhöhter Sterblichkeitsrate wurde ebenfalls von Ibrahim und Mitarbeitern (1995) festgestellt.

Um zu klären, warum eine verringerte Virulenz im Mausmodell nach einer i.v.-Infektion auftrat, wurden die Infektionsschritte der Adhäsion und Penetration an isolierten humanen Endothelzellen genauer untersucht. Andere Gruppen haben diesbezüglich den Einfluß von verschiedenen Proteasen, Phospholipasen und Adhäsionsproteinen bereits geprüft (Ibrahim *et al.*, 1998; Leidich *et al.*, 1998; Fu *et al.*, 2002). Es stellte sich die Frage, ob die generierten *lip8*-KO- und Knock-down-Mutanten ebenfalls eine geringere bzw. die Überexpressionsmutanten eine erhöhte Adhäsion an die Endothelzellen aufweisen würden als der wt. Wie die Adhäsionsversuche an isolierten Endothelzellen gezeigt haben, verhielten sich die Mutanten aber wie der wt (3.14.1.2; Abb. 51). Somit nahm Lip8 keinen Einfluß auf die Endothel-Adhäsion oder andere Lipasen konnten das Fehlen von Lip8 kompensieren.

Auch die Gendisruptionsmutanten von Phospholipase B1 (*caPLB1*) und den sekretorischen Protease-Genen *SAP1*, *SAP2* und *SAP3* wiesen bezüglich der Adhäsion keinen Unterschied zum wt auf (Ibrahim *et al.*, 1998; Leidich *et al.*, 1998). Im Gegensatz zu diesen sekretierten Hydrolasen zeigte eine Gendisruptionsmutante des Adhäsins Als1p eine stark reduzierte Adhäsion an humane Endothelzellen (Fu *et al.*, 2002). Des weiteren konnte festgestellt werden, dass die Hydrophobizität der *C. albicans*-Zellen bei der Anheftung an die Wirtszellen eine wichtige Rolle spielt (Glee *et al.*, 2001). Da die *lip8*-Mutanten wahrscheinlich hydrophober sind als der wt, ist es erklärlich, warum die Mutanten keine reduzierte Adhäsion aufwiesen.

Nach einer erfolgreichen Adhäsion des Pathogens ist das nächste Stadium der Infektion die Penetration und Zerstörung der Endothelzellen. Es wurde nachgewiesen, dass Endothelzellen *C. albicans*-Zellen phagozytieren, aber nicht töten können (Filler *et al.*, 1995). *C. albicans* induziert zunächst seine eigene Phagozytose indem es die Tyrosinphosphorylierung von zwei Endothelzellproteinen stimuliert (Belanger *et al.*, 2002).

Die Pilzzellen können nach der Phagozytose jedoch aus den Endothelzellen wieder ausbrechen und so aus den Blutgefäßen weiter in tiefere Gewebe vordringen.

Die sekretierten Lipasen von *C. albicans* könnten an der Zerstörung der Plasmamembran durch eine unspezifische Hydrolyse von Phospholipiden beteiligt sein. Diese unspezifische Hydrolyse durch Lipasen ist nicht ungewöhnlich, da Phospholipide und Triacylglycerole ein ähnliches Grundgerüst besitzen (Anthonsen *et al.*, 1995). Somit wäre die Möglichkeit gegeben, die Membranen von Wirtszellen zu lysieren oder deren Oberfläche zu verändern, wodurch die Adhäsion und Penetration für den Mikroorganismus erleichtert wären. Als Beispiel für eine unspezifische Katalyse von Lipasen und der Zerstörung von Zelloberflächen kann *Borytris cinerea*, ein phytopathogener Pilz mit einem breiten Wirtsspektrum, angeführt werden. Dieser Pilz produziert eine Lipase, die neben lipolytischer auch cutinolytische Aktivität zeigt (Commenil *et al.*, 1995). Neben einer unspezifischen Hydrolyse könnten die Lipasen aber auch direkt Wirtsgewebe schädigen. Bei *Helicobacter pylori* wurde gezeigt, dass eine Lipase die Barriere-Funktion des Mucus durch den Abbau von endogenen Lipiden schwächt (Slomiany *et al.*, 1992). Eine unkontrollierte Hydrolyse von Lipiden des Wirtes durch *C. albicans* würde FFS erzeugen, welche bioaktive Moleküle sind. Sie agieren als Signalboten, die u.a. die Aktivität von Phospholipasen, Ionenkanälen, ATPasen, G-Proteinen und Proteinkinasen beeinflussen (Duplus *et al.*, 2000). FFS können somit das ausbalancierte Netzwerk des Wirtes stören. Daher könnte die lipolytische Hydrolyse eine indirekte Rolle in der Virulenz spielen, indem sie Signaltransduktionswege modifiziert und aus dem Gleichgewicht bringt.

Um zu überprüfen, ob die *LIP*-Gene an der Penetration der Endothelschicht beteiligt sind, wurden mit den *LIP8*-Mutanten sogenannte „Damage“-Versuche an humanen Endothelzellen durchgeführt. Nach den ersten Ergebnissen zu urteilen, ist eine der KD-Mutanten, in der Fähigkeit Endothelzellen zu zerstören, beeinträchtigt (3.14.2; Abb. 52). Die Überexpressionsmutante zeigte das entgegengesetzte Verhalten, da sie invasiver war als der wt. Somit wäre es möglich, dass aufgrund der verringerten Fähigkeit der Penetration eine geringere Virulenz der *lip8*-Mutanten im i.v.-Mausmodell einer Katheterinfektion festgestellt wurde.

Des Weiteren wurde das Mausmodell einer Ösophagus-Candidose getestet. Ösophagus und Kardia (Mageneingang) sind von einem verhornten mehrschichtigen Plattenepithel ausgekleidet. Die Einmündung des Kardias in den Antrum stellt einen Grenzbereich dar, in dem das Plattenepithel in das mehrschichtige Zylinderepithel übergeht (Pschyrembel, 1990). Die histologischen Grenzbereiche sind sehr verletzlich und können im Fall einer Maus-Infektion als eine Invasionsstelle dienen (Frau Dr. M. Kretschmar, persönliche Mitteilung). In diesem Mausmodell war die KO-Mutante nicht fähig, die Grenze zwischen Kardia und Antrum zu penetrieren (3.14.4.3; Abb. 56B). Die *LIP8*-Überexpressionsmutante hingegen konnte sogar an weiteren für den wt ungewöhnlichen Stellen das Gewebe penetrieren (3.14.4.3; Abb. 56C). In diesem Modell konnte somit eindeutig gezeigt werden, dass Lip8 einen Virulenzfaktor darstellt.

Nach den Mausmodellen der Katheterinfektion und der Ösophagus-Candidose zu urteilen, ist Lip8 ein neu identifizierter Virulenzfaktor von *C. albicans*.

Antisense-Oligonukleotide und Lipase-Inhibitoren

Wie gezeigt wurde, kann der Verlust einer konstitutiv exprimierten Lipase zum Teil vom Pilz kompensiert werden. Da eine Familie von *LIP*-Genen existiert und *C. albicans* weitere putative lipolytische Enzyme besitzt, stellte sich die Frage, wie möglichst viele Gene bzw. deren Produkte gleichzeitig gehemmt werden können. Eine Strategie war, über eine Kombination von Antisense-Oligonukleotiden, welche gegen verschiedene Lipase-Gene gerichtet waren, die mRNA-Prozessierung zu stören. Es existiert ein Patent über die Anwendung von Antisense-Oligonukleotiden als therapeutischen Ansatz gegen die Proliferation von *C. albicans* (Ecker & Hoke, 1994). Eine andere Vorgehensweise war der Einsatz von Lipase-Inhibitoren, um die sekretierten Enzyme direkt zu hemmen.

Beim Einsatz von Antisense-Oligonukleotiden ist die Auswahl der Zielsequenz besonders kritisch, denn die Aktivität der Antisense-Oligonukleotide kann in Abhängigkeit von der Position der Zielsequenz von 0 % bis 100 % schwanken. Hierbei kann bereits die Verschiebung der Sequenz um wenige Nukleotide zu dieser Schwankung führen (Crooke, 1992). Daher muß die effektivste Sequenz empirisch ermittelt werden. Durch den Einsatz speziell modifizierter Antisense-Oligonukleotide, welche gegen Lipase-Gensequenzen gerichtet waren, die das Startcodon enthielten, konnte das Wachstum von *C. albicans* in YNB-Olivenöl gehemmt werden. Diese Antisense-Oligonukleotide besaßen endständige Phosphothioat-Bindungen, um sie vor Exonukleasen zu schützen. Die größte Hemmung wurde mit einer Kombination von vier verschiedenen Antisense-Oligonukleotiden erzielt, die gegen Lipase-Transkripte von *LIP4-6* und *LIP8* gerichtet waren (3.15.2; Abb. 58). Anscheinend war der gewählte Sequenzbereich essentiell für die Prozessierung, den Transport oder die Translation der mRNA. Es wäre ebenfalls möglich, dass die Antisense-DNA an die Ziel-mRNA hybridisierte und sie somit für einen Abbau durch die RNase H markierte (Lottspeich & Zorbas, 1998). Der Ausfall der Lipasen konnte durch die anderen Mitglieder der Genfamilie nicht kompensiert werden.

Eine weitere Strategie, um die Proliferation von *C. albicans* in einer lipidreichen Umgebung zu hemmen und die gesamte lipolytische Aktivität zu senken bzw. mehrere lipolytische Enzyme gleichzeitig zu inhibieren, war der Einsatz von Lipase-Inhibitoren.

Die Alkaloide Quinin und Quinidin konnten mit der höchsten eingesetzten Konzentration das Wachstum von *C. albicans* im Lipid-Medium vollständig hemmen (3.16; Abb. 59A&B). Erste lipolytische Aktivitätstests haben gezeigt, dass mit 2 g Quinidin/l die extrazelluläre Aktivität von *C. albicans* auf einen Wert von 76 % erniedrigt werden konnte (3.17). Es ist beschrieben worden, dass Quinidin ebenfalls eine Esterase der Leukozyten konzentrationsabhängig hemmen konnte, wobei mit einer Konzentration von 6,6 g/l eine Restaktivität von 60 % gemessen wurde (Markovic *et al.*, 1988).

Quinin konnte mit einer Endkonzentration von 2 mg/ml die extrazelluläre lipolytische Aktivität von *C. albicans* um ca. 50 % erniedrigen (3.17; Abb. 64).

Des Weiteren hatte Acetylsalicylsäure (ASS) eine inhibitorische Wirkung auf das Wachstum von *C. albicans* in YNB-Tween 40 und in einem Medium, welches in der parenteralen Ernährung eingesetzt wird (NuTRIflex[®] Lipid-Medium) (3.16; Abb. 60C). Die Inhaltsstoffe dieses Mediums (Elektrolyte, Spurenelemente, Proteine und Lipide) stellen eine exzellente Grundlage für das Wachstum von *C. albicans* dar. *In vitro* konnte hier sogar ein selektiver Vorteil des Pilzes gegenüber Bakterien festgestellt werden (Sherertz *et al.*, 1992). Das Wachstum in den Emulsionen wird mit systemischen *Candida*-Infektionen assoziiert. Wie sich gezeigt hat, konnte die lipolytische Aktivität des *Candida*-Überstandes einer NuTRIflex[®] Lipid-Kultur sowie die Aktivität der eingesetzten Kontroll-Lipase konzentrationsabhängig mit ASS gehemmt werden (3.17; Abb. 65). Mit der Inhibition von Lipasen konnte in der vorliegenden Arbeit eine neue Wirkung von ASS identifiziert werden. Der Wirkmechanismus basiert wahrscheinlich auf einer Acetylierung des nukleophilen Serins der katalytischen Triade, denn Cyclooxygenasen werden ebenfalls an ihrem aktiven Serin durch ASS acetyliert (Bailey, 1989). Darauf basiert die entzündungshemmende Wirkung von Aspirin[®]. Bis jetzt wurde ASS bzw. Aspirin[®] jedoch noch nicht als Lipase-Inhibitor beschrieben. Der Vorteil dieses Inhibitors wäre daher, dass mikrobielle lipolytische Enzyme gehemmt und gleichzeitig Entzündungsreaktionen von Seiten des Wirtes inhibiert werden könnten.

Die lipolytische Aktivität eines Kulturüberstandes von *C. albicans* war interessanterweise durch den Einsatz von Orlistat[®], einem bekannten Inhibitor von humanen Lipasen, reduzierbar (3.17; Abb. 63). Humane Lipasen wurden zum Teil mit einer Orlistat[®]-Endkonzentration von 1 mg/l im Blut stark gehemmt (Krebs *et al.*, 2000). Mit einer 100fach höheren Konzentration wurde die extrazelluläre lipolytische Aktivität von *C. albicans* inhibiert, und es bestand eine Restaktivität von ca. 70 %. Die humane Leber-Esterase wurde ebenfalls erst bei dieser höheren Konzentration inhibiert (Hadvary *et al.*, 1988).

Zur weiteren Charakterisierung der Lipasen von *C. albicans* wurden neben den Versuchen mit Inhibitoren humaner Lipasen auch Untersuchungen mit deren Aktivatoren vorgenommen. Bei einer humanen Lipase wurde festgestellt, dass das Gallensalz Natriumtaurocholat die adsorbierte Lipase wahrscheinlich stabilisiert (Granon & Seneriva, 1980). Die Röntgenstrukturanalyse der gallensalzaktivierten Lipase des Rinds bewies, dass das Natriumtaurocholat den „Deckel“ des Enzyms in der offenen Konformation festhält (Wang *et al.*, 1997). Bei *C. albicans* konnte die extrazelluläre lipolytische Aktivität durch die Zugabe des Gallensalzes stimuliert werden (3.17; Abb. 62). Dies stimmt mit Ergebnissen überein, die mit *Malassezia furfur* erzielt wurden. Hier konnte die lipolytische Aktivität des Pilzes, welche ebenfalls ein pH-Optimum von 5,0 besitzt, konzentrationsabhängig mit Natriumtaurocholat erhöht werden (Ran *et al.*, 1993).

Tsuboi und Mitarbeiter (1996) konnten bereits mit einer Konzentration von 0,5 % Natriumtaurocholat eine Erhöhung der extrazellulären Esterase-Aktivität von *C. albicans* auf einen Wert von 183 % messen. Bei Wachstumsversuchen mit *C. albicans* verursachte die höchste Endkonzentration an Natriumtaurocholat (1 %) nach drei Tagen eine Wachstumszunahme um den Faktor 5 (3.16; Abb. 61). Damit konnte gezeigt werden, dass die extrazelluläre lipolytische Aktivität das Wachstum von *C. albicans* förderte. Dies stimmt mit Ergebnissen überein, welche mit *M. furfur* erhalten wurden. Auch hier konnte durch die Zugabe von Natriumtaurocholat das Wachstum der lipophilen Hefe konzentrationsabhängig gefördert werden (Ran *et al.*, 1993).

Somit beeinflussen sowohl Aktivatoren als auch Inhibitoren humaner Lipasen das Wachstum und die extrazelluläre lipolytische Aktivität von *C. albicans*. Ein Grund dafür könnte die Anpassung des opportunistischen Pathogens an den Wirt sein. Beide erhalten das gleiche Nährstoffangebot. Daher ist es plausibel, wenn sich die Enzyme der Nährstoffbeschaffung auch in ihren Eigenschaften gleichen.

Spekulationen über weitere Funktionen der sekretierten Lipasen von *C. albicans*

Genauso wie die *SAP*-Genfamilie erfährt die Lipase-Genfamilie eine differentielle und zeitliche Kontrolle der Genexpression, was darauf hinweist, dass die einzelnen Lip-Isoenzyme individuelle Funktionen übernehmen könnten. Daher kann angenommen werden, dass *C. albicans* die Lipase(n) exprimiert, die abhängig von der Umgebung am geeignetsten sind. Die wahrscheinlich durch Genduplikation und anschließende Diversifizierung entwickelten Lipasen, die vermutlich optimal an unterschiedliche Aufgaben in Wirtsnischen adaptiert sind, ermöglichen dem Erreger eine ideale Anpassung an die sich verändernde Wirtsumgebung. Die sekretierte Lipasen von *C. albicans* könnten während der Kolonisation und Infektion des Wirtes folgende Funktionen übernehmen (Abb. 66; modifiziert Stehr *et al.*, 2003):

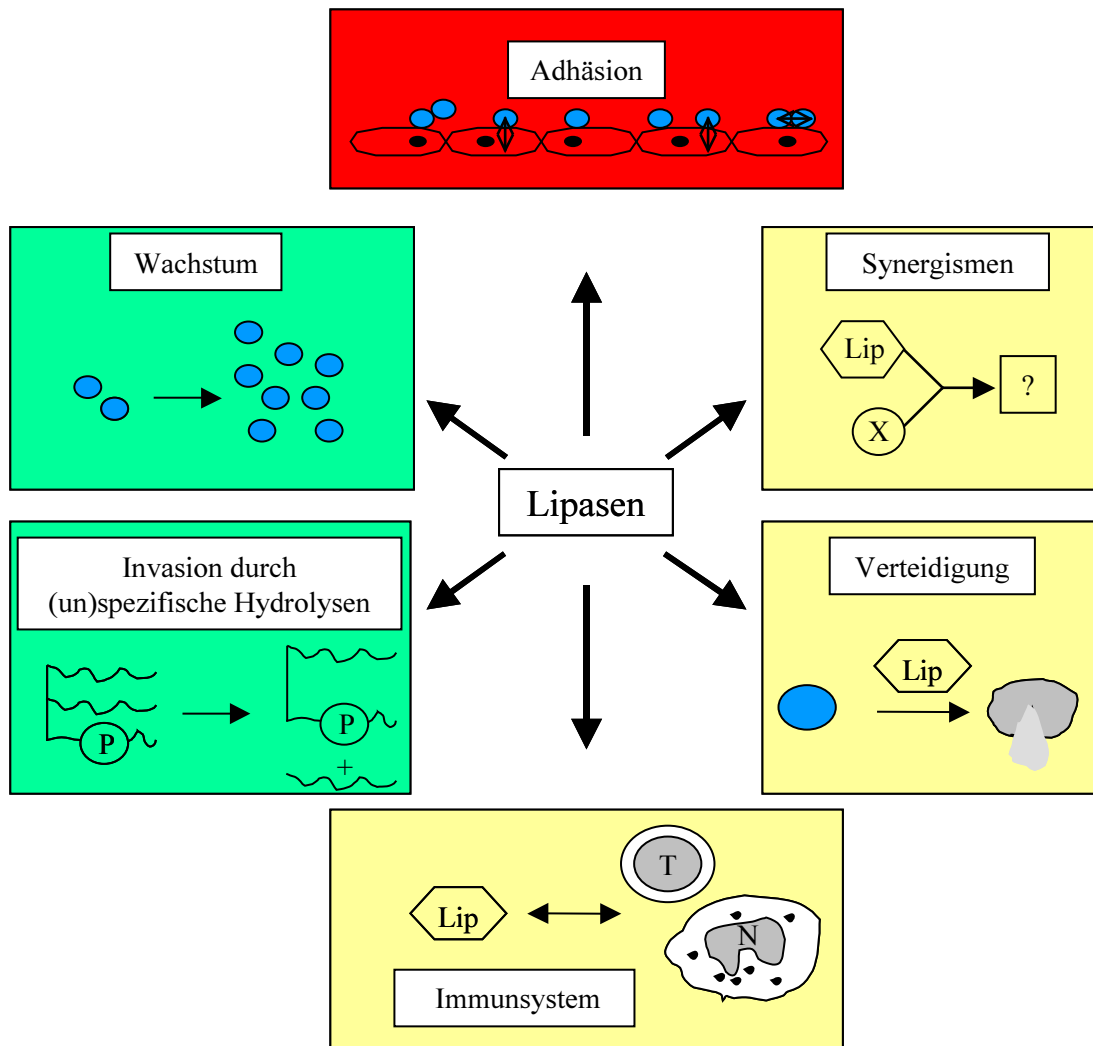


Abb. 66: Mögliche Funktionen der Lipasen von *C. albicans*, die zum Teil bestätigt (grüne Felder), widerlegt (rote Felder) bzw. noch untersucht werden müssen (gelbe Felder).

Wachstum: Die Lipolyse könnte C-Quellen für *C. albicans* erschließen und somit das Wachstum fördern. **Adhäsion:** Die freigesetzten FS könnten über hydrophobe Wechselwirkungen die Adhäsion des Pilzes stimulieren. **Synergismen:** Die Lipasen könnten mit anderen Hydrolasen zusammenwirken oder zumindest optimale Bedingungen für diese Enzyme schaffen. **Verteidigung:** *C. albicans* erfährt durch die extrazellulären Lipasen möglicherweise einen Selektionsvorteil gegenüber anderen Mikroorganismen, indem die Lipasen diese Konkurrenten oder antimykotische Lipide des Wirts abbauen. **Immunsystem:** Die Lipasen und deren katalytischen Endprodukte könnten Effekte auf Immunzellen ausüben und vielleicht Entzündungsreaktionen hervorrufen. **Invasion durch (un)spezifische Hydrolysen:** Die Lips könnten zusätzlich phospholipolytische Aktivität aufweisen oder direkt die Invasion fördern.

Der zunehmende Einsatz neuerer medizinischer Behandlungsmethoden wie Organtransplantationen, eine Langzeitanwendung von Breitbandantibiotika und/oder Immunsuppressiva sowie zentralvenöse Katheter führen zu einer erhöhten Inzidenz invasiver Mykosen unter den nosokomialen Infektionen. Analog zur HIV-Kombinationstherapie könnten sich durch den Einsatz von diversen Inhibitoren gegen hydrolytische Enzyme möglicherweise neue Therapieansätze eröffnen, um die Proliferation des humanpathogenen Pilzes *C. albicans* zu unterdrücken.

5 Zusammenfassung

Der opportunistische Erreger *Candida albicans* verursacht die meisten Mykosen beim Menschen. Zur Zeit gibt es nur wenige wirkungsvolle Medikamente gegen invasive oder systemische *Candida albicans*-Infektionen. Durch Zunahme der Risikopatienten und der Zahl resistenter Pilze wird die Situation weiter verschärft.

Im Rahmen dieser Arbeit wird erstmalig eine Genfamilie von sekretierten Lipasen bei einem humanpathogenen Pilz beschrieben. Sie besitzt mindestens zehn Mitglieder (*LIP1-LIP10*). Um neue klinisch relevante Angriffspunkte zu identifizieren, sollte die Bedeutung sekretierter lipolytischer Enzyme, speziell der Lipase-Genfamilie, bei der Besiedlung und Infektion von *Candida albicans* aufgeklärt werden. Dazu wurden während verschiedener Infektionen umfangreiche *in vivo* Expressionsstudien durchgeführt. Es wurde gezeigt, dass ein neu identifiziertes Phospholipase A-Gen sowohl *in vitro* als auch bei Infektionen künstlicher Schleimhäute konstitutiv exprimiert wird, was auf eine essentielle Rolle dieses Gens schließen lässt. Des Weiteren wurde mittels RT-PCR-Analysen gezeigt, dass die Lipase-Genfamilie während systemischer Mausinfektionen, Infektionen künstlicher oraler und vaginaler Schleimhäute sowie verschiedener humaner Candidosen exprimiert und differentiell reguliert wird. Um Patientenproben untersuchen zu können, wurde eine PCR-basierte Methode zur Unterscheidung der nahverwandten Hefen *Candida albicans* und *Candida dubliniensis* etabliert.

Einige Lipase-Gene wurden konstitutiv exprimiert während andere eine transiente Expression aufwiesen. Vor allem *LIP4* bis *LIP8* wurden durchgehend bei oberflächlichen sowie systemischen Candidosen exprimiert. Das Transkriptionsprofil der Lipase-Gene hing vom Infektionsstadium (zeitliche Kontrolle) und der Art der Infektion ab. Diese Ergebnisse verdeutlichen die Flexibilität des pathogenen Pilzes als Antwort auf veränderte Umgebungsreize, sein Expressionsstatus den gegebenen Umständen anzupassen. In den Patientenproben wurden vor allem *LIP8*-Transkripte nachgewiesen. Um zu klären, ob es sich bei *LIP8* um einen Virulenzfaktor für *Candida albicans* handelt, wurde das Gen mittels *URA*-Blaster-Methode zerstört. Parallel dazu wurden zwei neue molekularbiologische Strategien entwickelt, um die Genexpression von *LIP8* mit einer einzigen Transformation - basierend auf einem RNA-Interferenz/Antisense-Mechanismus - vollständig zu inhibieren. Zusätzlich wurden Überexpressionsmutanten hergestellt.

Infektionsstudien deuteten an, dass Lip8 nicht an der Infektion oraler und vaginaler künstlicher Schleimhäute sowie bei systemischen Infektionen von Mäusen beteiligt ist, da die Mutanten genauso virulent waren wie der Wildtyp. Im Gegensatz dazu ergaben *in vitro* Analysen des Phänotyps, dass die *lip8*-Mutanten zu einer vermehrten Filamentbildung auf unterschiedlichen Festmedien und in Flüssigmedien neigten. Es wurde eine direkte Korrelation zwischen pH-Wert, Temperatur und der Myzelbildung festgestellt.

Die Verhinderung der *LIP8*-Genexpression verursachte ein verringertes Wachstum in verschiedenen Lipid-Medien. Von klinischer Relevanz war die geringere Proliferation der Mutanten in einer fetthaltigen, parenteralen Ernährungslösung. Zusätzlich zeigten die Mutanten auch eine um bis zu 30 % niedrigere, extrazelluläre lipolytische Aktivität als der Wildtyp.

Lip8 stellt sowohl bei intravenösen als auch bei Ösophagus-Infektionen einen Virulenzfaktor von *Candida albicans* dar. Bei der intravenösen Infektion von Mäusen wurde bei der Deletionsmutante, im Gegensatz zum wt, keine letale Wirkung festgestellt. Außerdem konnte eindeutig gezeigt werden, dass Lip8 bei einer Infektion des Ösophagus von Mäusen essentiell für die Penetration der Kardial-Antrum-Falte ist. Im gleichen Modell wies eine *LIP8*-Überexpressionsmutante eine weitaus größere Invasivität auf als der Wildtyp.

Mit den Lipase-Inhibitoren Quinin, Quinidin und Acetylsalicylsäure sowie verschiedenen Antisense-Oligonukleotiden konnte die Proliferation von *Candida albicans* in Lipid-Medien beeinträchtigt oder sogar ganz unterbunden werden. Es wurde gezeigt, dass die extrazelluläre lipolytische Aktivität des Pilzes für das Wachstum von *Candida albicans* in einer parenteralen Ernährungslösung verantwortlich ist, da das Wachstum und die Aktivität mit Acetylsalicylsäure gehemmt werden konnte. Der humane Lipase-Inhibitor Orlistat[®] konnte die lipolytische Aktivität ebenfalls hemmen. Damit wurde gezeigt, dass sekretierte lipolytische Enzyme bei dem multipotenten Erreger *Candida albicans* die Erschließung von Lipiden als Nährstoffquellen und die Invasion bei verschiedenen Infektionsmodellen ermöglichen.

Das Verständnis der Rolle der Lipasen von *Candida albicans* könnte zu neuen Therapieansätzen führen. Diese Arbeit hat mit dem Lipase-Gen *LIP8* einen neuen Ansatzpunkt für eine antimykotische Therapie identifiziert.

6 Literaturverzeichnis

Akamatsu, H., Tomita, T. & Horio T. (2002)

Effects of Roxithromycin on the production of lipase and neutrophil chemotactic factor by *Propionibacterium acnes*
Dermatology 204(4): 277-280

Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D.J. (1997)

Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs
Nucl. Acid. Res. 25: 3389-3402

Anderson, J.M. & Soll, D.R. (1987)

Unique phenotype of opaque cells in the white-opaque transition of *Candida albicans*
J. Bacteriol. 169(12): 5579-5588

Anthonsen, H.W., Baptista, A., Drablos, F., Martel, P., Petersen, S.B., Sebastiao, M. & Vaz, L. (1995)

Lipases and esterases: a review of their sequences, structure and evolution
Elsevier Science B.V., Biotechnology Annual Review: 315-371

Athenstaedt, K. & Daum, G. (2003)

YMR313c/TGL3 encodes a novel triacylglycerol lipase located in lipid particles of *Saccharomyces cerevisiae*
J. Biol. Chem. 278(26): 23317-23323

Auger, P. & Joly, J. (1975)

Study of various aspects of the pathogenesis of *Candida albicans* infections
Sabouraudia 13(3): 263-273

Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. & Struhl, K. (1994)

Current Protocols in Molecular biology Vol. 2
Greene & Wiley, New York, USA

Bailey, J.M. (1989)

Biochemistry and pharmacology of cyclooxygenase inhibitors
Bull. N. Y. Acad. Med. 65(1): 5-15

Ballinger, A. & Peikin, S.R. (2002)

Orlistat: its current status as an anti-obesity drug
Eur. J. Pharmacol. 440(2-3): 109-117

Barrett-Bee, K., Hayes, Y., Wilson, R.G. & Ryley, J.F. (1985)

A comparison of phospholipase activity, cellular adherence and pathogenicity of yeasts
J. Gen. Microbiol. 131: 1217-1221

Bauer, T.M., Ofner, E., Just, H.M., Just, H. & Faschner, F.D. (1990)

An epidemiological study assessing the relative importance of airborne and direct contact transmission of microorganisms in a medical intensive care unit
J. Hosp. Inf. 15: 301-309

Beck-Sague, C.M. & Jarvis, W.R. (1993)

Secular trends in the epidemiology of nosocomial fungal infections in the United States, 1980-1990
J. Infect. Dis. 167: 1247-1251

Belanger, P.H., Johnston, D.A., Fratti, R.A., Zhang, M. & Filler, S.G. (2002)

Endocytosis of *Candida albicans* by vascular endothelial cells is associated with tyrosine phosphorylation of specific host cell proteins
Cell. Microbiol. 4(12): 805-812

Bell, P.J.L., Sunna, A., Gibbs, M.D., Curach, N.C., Nevalainen, H. & Bergquist, P.L. (2002)

Prospecting for novel lipase genes using PCR
Microbiology 148: 2283-2291

Benjamin, S. & Pandey, A. (1998)

Candida rugosa lipases: molecular biology and versatility in biotechnology
Yeast 14: 1069-1087

- Bennett, D.E., McCreary, C.E. & Coleman, D.C. (1998)**
Genetic characterization of a phospholipase C gene from *Candida albicans*: presence of homologous sequences in *Candida* species other than *Candida albicans*
Microbiology 144: 55-72
- Bibel, D.J., Aly, R., Lahti, L., Shinefield, H.R. & Maibach, H.I. (1987)**
Microbial adherence to vulvar epithelial cells
J. Med. Microbiol. 23(1): 75-82
- Bibel, D.J., Aly, R., Shah, S. & Shinefield, H.R. (1993)**
Sphingosines: antimicrobial barriers of the skin
Acta Derm. Venereol. 73(6): 407-11
- Bigey, F., Tuery, K., Bougard, D., Nicaud, J.M. & Moulin, G. (2003)**
Identification of a triacylglycerol lipase gene family in *Candida deformans*: molecular cloning and functional expression
Yeast 20(3): 233-248
- Boeke, J.D., LaCroute, F. & Fink, G.R. (1984)**
A positive selection for mutants lacking orotidine-5'-phosphate decarboxylase activity in yeast: 5-fluoroorotic acid resistance
Mol. Gen. Genet. 197: 345-346
- Bohmert, K., Camus, I., Bellini, C., Bouchez, D., Caboche, M. & Benning, C. (1998)**
AGO1 defines a novel locus of *Arabidopsis* controlling leaf development
EMBO J. 17(1): 170-180
- Borchert, N. (2002)**
Charakterisierung einer putativen Phospholipase aus dem humanpathogenen Pilz *Candida albicans*
Diplomarbeit, Hamburg
- Borgström, B. (1988)**
Mode of action of tetrahydrolipstatin: a derivative of the naturally occurring lipase inhibitor lipstatin
Biochim. Biophys. Acta 962: 308-316
- Borg-von Zepelin, M., Meyer, I., Thomssen, R., Wurzner, R., Sanglard, D., Telenti, A. & Monod, M. (1999)**
HIV-Protease inhibitors reduce cell adherence of *Candida albicans* strains by inhibition of yeast secreted aspartic proteases
J. Invest. Dermatol. 113(5): 747-751
- Bossenz, M. (1998)**
Identifizierung, Klonierung und Charakterisierung von Lipase-Genen des humanpathogenen Pilzes *Candida albicans*
Diplomarbeit, Hamburg
- Bowden, M.G., Visai, L., Longshaw, C.M., Holland, K.T., Speziale, P. & Hook, M. (2002)**
Is the GehD lipase from *Staphylococcus epidermidis* a collagen-binding adhesin?
J. Biol. Chem. 277: 43017-43023
- Boyce, S.T. & Ham, R.G. (1983)**
Calcium-regulated differentiation of normal human epidermal keratinocytes in chemically defined clonal culture and serum-free serial culture
J. Invest. Dermatol. 81(1): 33-40
- Brady, L., Brzozowski, A.M., Derewenda, Z.S., Dodson, E., Dodson, G., Tolley, S., Turkenburg, J.P., Christiansen, L., Huge-Jensen, B., Norskov, L., Thim, L. & Menge, U. (1990)**
A serine protease triade forms the catalytic centre of triacylglycerol lipase
Nature 343: 767-770
- Brandis, H. & Otte, H.J. (1984)**
Lehrbuch der Medizinischen Mikrobiologie
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York, 5. Auflage
- Brocca, S., Grandori, R., Breviario, D. & Lotti, M. (1995)**
Localisation of lipase genes on *Candida rugosa* chromosomes
Curr. Genet. 28: 454-457

Brockerhoff, H. & Jensen, R.G. (1974)

Lipolytic enzymes
Academic press, New York

Brown, A.J.P. & Gow, N.A.R. (1999)

Regulatory networks controlling *Candida albicans* morphogenesis
Trends Microbiol. 7(8): 333-338

Brown, D.W., McCormick, S.P., Alexander, N.J., Proctor, R.H. & Desjardins, A.E. (2001)

A genetic and biochemical approach to study trichothecene in *Fusarium sporotrichioides* and *Fusarium graminearum*
Fungal Genet. Biol. 32(2): 121-133

Caillouette, J.C., Sharp, C.F., Zimmerman, G.J. & Roy, S. (1997)

Vaginal pH as a marker for bacterial pathogens and menopausal status
Am. J. Obstet. Gynecol. 176(6): 1270-1275

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

Adherence and receptor relationship for *Candida albicans*
Microbiol. Rev. 55: 1-20

Calderone, R.A. (2002)

in *Candida and Candidiasis*, Introduction and Historical Perspectives
ASM Press, Washington, D.C., USA

Cannom, R.R.M., French, S.W., Johnston, D., Edwards, J.E. Jr. & Filler, S.G. (2002)

Candida albicans stimulates local expression of leukocyte adhesion molecules and cytokines *in vivo*
J. Infect. Dis. 186: 389-396

Carbrey, J.M., Bonhivers, M., Boeke, J.D. & Agre, P. (2001)

Aquaporins in *Saccharomyces*: characterization of a second functional water channel protein
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98: 1000-1005

Caro, L.H., Tettelin, H., Vossen, J.H., Ram, A.F., van den Ende, H. & Klis, F.M. (1997)

In silico identification of glycosyl-phosphatidylinositol-anchored plasma-membrane and cell wall proteins of *Saccharomyces cerevisiae*
Yeast 13(15): 1477-1489

Casal, M. & Linares, M.J. (1981)

The comparison of six media for chlamydospore production by *Candida albicans*
Mycopathologia 76(2): 125-128

Catalanotto, C., Azzalin, G., Macino, G. & Cogoni, C. (2000)

Gene silencing in worms and fungi
Nature 404(6775): 245

Catterall, M.D., Ward, M.E. & Jacobs, P. (1978)

A reappraisal of the role of *Pityrosporum orbiculare* in Pityriasis versicolor and the significance of extracellular lipase
J. of invest. Dermatol. 71: 398-401

Chen, C.Y., Oppermann, H. & Hitzeman, R.A. (1984)

Homologous versus heterologous gene expression in the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*
Nucleic Acids Res. 12(23): 8951-8970

Choo, D.W., Kurihara, T., Suzuki, T., Soda, K. & Esaki, N. (1998)

A cold-adapted lipase of an Alaskan psychrotroph, *Pseudomonas* sp. strain B11-1: gene cloning and enzyme purification and characterization
Appl. Environ. Microbiol. 64(2): 486-491

Cole, S.T., Brosch, R., Parkhill, J., Garnier, T., Churcher, C., Harris, D., Gordon, S.V., Eiglmeier, K., Gas, S., Barry, C.E. 3rd, Tekaia, F., Badcock, K., Basham, D., Brown, D., Chillingworth, T., Connor, R., Davies, R., Devlin, K., Feltwell, T., Gentles, S., Hamlin, N., Holroyd, S., Hornsby, T., Jagels, K., Barrell, B.G., et al. (1998)

Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence
Nature 393(6685): 537-544

- Colthurst, D.R., Schauer, B.S., Hates, M.V. & Tuite, M.F. (1992)**
Elongation factor 3 (*EF-3*) from *Candida albicans* shows both structural and functional similarity to *EF-3* from *Saccharomyces cerevisiae*
Mol. Microbiol. 6: 1025-1033
- Commenil, P., Belingheri, L., Sancholle, M. & Dehorter, B. (1995)**
Purification and properties of an extracellular lipase from the fungus *Botrytis cinerea*
Lipids 30(4): 351-356
- Corpet, F. (1988)**
Multiple sequence alignment with hierarchical clustering
Nucl. Acids Res. 16(22): 10881-10890
- Corzo, G. & Revah, S. (1999)**
Production and characteristics of the lipase from *Yarrowia lipolytica* 681
Bioresource Technology
- Crooke, S.T. (1992)**
Oligonucleotide therapy
Curr. Opin. Biotechnol. 3(6): 656-661
- Dartois, V., Baulard, A., Schank, K. & Colson, C. (1992)**
Cloning, nucleotide sequence and expression in *Escherichia coli* of a lipase gene from *Bacillus subtilis* 168
Biochim. Biophys. Acta 1131: 253-260
- De Bernardis, F., Mühlischlegel, F.A., Cassone, A. & Fonzi, W.A. (1998)**
The pH of the host niche controls gene expression in and virulence of *Candida albicans*
Infect. Immun. 66(7): 3317-3325
- Deitel, M., Kaminsky, V.M. & Fuksa, M. (1975)**
Growth of common bacteria and *Candida albicans* in 10% soybean oil emulsion
Can. J. Surg. 18(6): 531-535
- Dennis, E.A., Darke, P.L., Deems, R.A., Kensil, C.R. & Pluckthun, A. (1981)**
Cobra venom phospholipase A2: a review of its action toward lipid/water interfaces
Mol. Cell. Biochem. 36(1): 37-45
- Derewenda, U., Brzozowski, A.M., Lawson, D.M. & Derewenda Z.S. (1992)**
Catalysis at the interface: the anatomy of a conformational change in a triglyceride lipase
Biochemistry 31(5): 1532-1541
- Derewenda, Z.S. & Sharp, A.M. (1993)**
News from the interface: the molecular structures of triacylglyceride lipases
Elsevier Science Publishers, UK, TIBS 18: 20-25
- Derewenda, Z.S. (1994)**
Structure and function of lipases
Advances in Protein chemistry, Vol. 45; lipoproteins, apolipoproteins, and lipases: 1-51
- Donnelly, S.M., Sullivan, D.J., Shanley, D.B. & Coleman, D.C. (1999)**
Phylogenetic analysis and rapid identification of *Candida dubliniensis* based on analysis of *ACT1* intron and exon sequences
Microbiology 145: 1871-1882
- Dorko, E., Kmet'ova, M., Marossy, A., Dorko, F. & Molokacova, M. (1999)**
Non-albicans *Candida* species isolated from plastic devices
Mycopathologia 148(3): 117-122
- Dujon, B. (1996)**
The yeast genome project: what did we learn?
Trends Genet. 12(7): 263-270
- Duplus, E., Glorian, M. & Forest, C. (2000)**
Fatty acid regulation of gene transcription
J. Biol. Chem. 275(40): 30749-30752

Ecker, D.J. & Hoke, G.D. (1994)

Oligonucleotides inhibiting *Candida* germ tube formation.
United States Patent 5,691,461

Edmond, M.B., Wallace, S.E., McClish, D.K., Pfaller, M.A., Jones, R.N. & Wenzel, R.P. (1999)

Nosocomial bloodstream infections in United States hospitals: a three-year analysis
Clin. Infect. Dis. 29: 239-244

Eijkman, C. (1901)

Über Enzyme bei Bakterien und Schimmelpilzen
Cb. Bakt. Parasitenk. Infektionkr. 29: 841-848

Epple, U.D., Eskelinen, E.L. & Thumm, M. (2003)

Intravacuolar membrane lysis in *Saccharomyces cerevisiae*. Does vacuolar targeting of Cvt17/Aut5p affect its function?
J. Biol. Chem. 278(10): 7810-7821

Ernst, J. (2000)

Dimorphism in *Candida albicans*
Contributions to Microbiology. Dimorphism in Human Pathogenic and Apathogenic Yeasts
In: Ernst, J.F. & Schmidt, A. (eds.), S. Karger AG: Basel 2000: 98-111

Fan, J., Chaturvedi, V. & Shen, S.H. (2002)

Identification and phylogenetic analysis of a glucose transporter gene family from the human pathogenic yeast *Candida albicans*
J. Mol. Evol. 55(3): 336-346

Felk, A. (2002)

Sekretorische Aspartat Proteasen von *Candida albicans* und ihre Bedeutung als Virulenzfaktoren
Dissertation, Berlin

Fell, J.W. (1993)

Rapid identification of yeast species using three primers in a polymerase chain reaction
Mol. Mar. Biol. Biotechnol. 2(3): 174-180

Feng, Q., Summers, E., Guo, B. & Fink, G. (1999)

Ras signalling is required for serum-induced hyphal differentiation in *Candida albicans*
J. Bacteriol. 181(20): 6339-6346

Fidel, P.L. (1998)

Vaginal candidiasis: review and role of local mucosal immunity
AIDS PATIENT CARE and STDs 12: 359-366

Filler, S.G., Swerdloff, J.N., Hobbs, C. & Luckett, P.M. (1995)

Penetration and damage of endothelial cells by *Candida albicans*
Infect. Immun. 63(3): 976-983

Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E. & Mello, C.C. (1998)

Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caneorhabditis elegans*
Nature 391(6669): 806-811

Fischer, W., Heinz, E. & Zeus, M. (1973)

The suitability of lipase from *Rhizopus arrhizus delemar* for analysis of fatty acid distribution in dihexosyl diglycerides, phospholipids and plant sulfolipids
Hopp-Seyler's Z. Physiol. Chem. 354: 1115-1123

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

Isogenic strain construction and gene mapping in *Candida albicans*
Genetics 134: 717

Fu, Y., Ibrahim, A.S., Fonzi, W., Zhou, X., Ramos, C.F. & Ghannoum, M.A. (1997)

Cloning and characterization of a gene (*LIP1*) which encodes a lipase from the pathogenic yeast *Candida albicans*
Microbiology 143: 331-340

Fu, Y., Ibrahim, A.S., Sheppard, D.C., Chen, Y.C., French, S.W., Cutler, J.E., Filler, S.G. & Edwards, J.E. Jr. (2002)

Candida albicans Als1p: an adhesin that is a downstream effector of the *EFG1* filamentation pathway
Mol. Microbiol. 44(1): 61-72

Fuller, R.S., Sterne, R.E. & Thorner, J. (1988)

Enzymes required for yeast prohormone processing
Ann. Ren. Physiol. 50: 345-362

Gerber, L.D., Kodukula, K. & Udenfriend, S. (1992)

Phosphatidylinositol glycan (PI-G) anchored membrane proteins. Amino acid requirements adjacent to the site of cleavage and PI-G attachment in the COOH-terminal signal peptide
J. Biol. Chem. 267(17): 12168-12173

Giaever, G., Chu, A.M., Ni, L., Connelly, C., Riles, L., Veronneau, S., Dow, S., Lucau-Danila, A., Anderson, K., Andre, B., Arkin, A.P., Astromoff, A., El-Bakkoury, M., Bangham, R., Benito, R., Brachat, S., Campanaro, S., Curtiss, M., Davis, K., Deutschbauer, A., Entian, K.D., Flaherty, P., Foury, F., Garfinkel, D.J., Gerstein, M., Gotte, D., Guldener, U., Hegemann, J.H., Hempel, S., Herman, Z., Jaramillo, D.F., Kelly, D.E., Kelly, S.L., Kotter, P., LaBonte, D., Lamb, D.C., Lan, N., Liang, H., Liao, H., Liu, L., Luo, C., Lussier, M., Mao, R., Menard, P., Ooi, S.L., Revuelta, J.L., Roberts, C.J., Rose, M., Ross-Macdonald, P., Scherens, B., Schimmack, G., Shafer, B., Shoemaker, D.D., Sookhai-Mahadeo, S., Storms, R.K., Strathern, J.N., Valle, G., Voet, M., Volckaert, G., Wang, C.Y., Ward, T.R., Wilhelmy, J., Winzeler, E.A., Yang, Y., Yen, G., Youngman, E., Yu, K., Bussey, H., Boeke, J.D., Snyder, M., Philippsen, P., Davis, R.W. & Johnston, M. (2002)

Functional profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome
Nature 418(6896): 387-391

Gillum, A.M., Tsay, E.Y.H. & Kirsch, D.R. (1984)

Isolation of the *Candida albicans* gene for orotidine-5'-phosphate decarboxylase by complementation of *S. cerevisiae* *ura3* and *E. coli* *pyrF* mutations
Mol. Gen. Genet. 198: 179-182

Glee, P.M., Cutler, J.E., Benson, E.E., Bargatzke, R.F. & Hazen, K.C. (2001)

Inhibition of hydrophobic protein-mediated *Candida albicans* attachment to endothelial cells during physiologic shear flow
Infect. Immun. 69(5): 2815-2820

Göttlich, E., de Hoog, G.S., Yoshida, S., Takeo, K., Nishimura, K. & Miyaji, M. (1995)

Cell-surface hydrophobicity and lipolysis as essential factors in human tinea nigra
Mycosis 38: 489-494

Gow, N.A., Robbins, P.W., Lester, J.W., Brown, A.J., Fonzi, W.A., Chapman, T. & Kinsman, O.S. (1994)

A hyphal-specific chitin synthase gene (*CHS2*) is not essential for growth, dimorphism, or virulence of *Candida albicans*
Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 91(13): 6216-6220

Gow, N.A.R., Brown, A.J.P. & Odds, F.C. (2002)

Fungal morphogenesis and host invasion
Curr. Opin. Microbiol. 5: 366-371

Granon, S. & Semeriva, M. (1980)

Effect of taurodeoxycholate, colipase and temperature on the interfacial inactivation of porcine pancreatic lipase
Eur. J. Biochem. 111(1): 117-124

Grippa, E., Valla, R., Battinelli, L., Mozzanti, G., Saso, L. & Silvestrini, B. (1999)

Inhibition of *Candida rugosa* lipase by berberine and structurally related alkaloids, evaluated by high-performance liquid chromatography
Biosci. Biotechnol. Biochem. 63(9): 1557-1562

Gupta, A.K., Kohli, Y. & Summerbell, R.C. (2000)

Molecular differentiation of seven *Malassezia* species
J. Clin. Microbiol. 38: 1869-1875

- Haas, M.J., Cichowicz, D.J. & Bailey, D.G. (1992)**
Purification and characterization of an extracellular lipase from the fungus *Rhizopus delemar*
Lipids 27: 571-576
- Hadvary, P., Lengsfeld, H. & Wolfer, H. (1988)**
Inhibition of pancreatic lipase *in vitro* by the covalent inhibitor tetrahydrolipstatin
Biochem. J. 256: 357-361
- Hammond, S.M., Boettcher, S., Caudy, A.A., Kobayashi, R. & Hannon, G.J. (2001)**
Argonaute2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi
Science 293: 1146-1150
- Hampsey, M. (1997)**
A review of phenotypes in *Saccharomyces cerevisiae*
Yeast 13: 1099-1133
- Hanahan, D. (1985)**
Techniques for Transformation of *E. coli*
In: Glover DM (ed.): DNA Cloning: A Practical Approach. Vol. 1. IRL Press, Oxford: 109-135
- Hanley, K., Komuves, L.G., Ng, D.C., Schoonjans, K., He, S.S., Lau, P., Bikle, D.D., Williams, M.L., Elias, P.M., Auwerx, J. & Feingold, K.R. (2000)**
Farnesol stimulates differentiation in epidermal keratinocytes via PPARalpha
J. Biol. Chem. 275: 11484-11491
- Hannon, G.J. (2002)**
RNA interference
Nature 418: 244-251
- Hazen, K.C. & Hazen, B.W. (1987)**
Temperature-modulated physiological characteristics of *Candida albicans*
Microbiol. Immunol. 31(6): 497-508
- Hennig, L. (1999)**
WinGene/WinPep: User-friendly software for the analysis of aminoacid sequences
BioTechniques 26: 1170-1172
- Higgs, H.N., Han, M.H., Johnson, G.E. & Glomset, J.A. (1998)**
Cloning of a phosphatidic acid-preferring phospholipase A1 from bovine testis
J. Biol. Chem. 273(10): 5468-5477
- Hjorth, A., Carrier, F., Cudrey, C., Wöldike, H., Boel, E., Lawson, D.M., Ferrato, F., Cambillau, C., Dodson, G.G., Thim, L. & Verger, R. (1993)**
A structural domain (the lid) found in pancreatic lipases is absent in the *guinea pig* (phospho) lipase
Biochem. 32: 4702-4707
- Hoegh, I., Patkar, S., Halkier, T. & Hansen, M.T. (1994)**
Two lipases from *Candida antarctica*: cloning and expression in *Aspergillus oryzae*
Can. J. Bot. 73: 869-875
- Hoyer, L.L. (2001)**
The *ALS* gene family of *Candida albicans*
Trends Microbiol. 9:176-80
- Hube, B. (1996)**
Candida albicans secreted aspartyl proteinases
Curr. Top. Med. Mycol. 7: 55-69
- Hube, B., Sanglard, D., Odds, F.C., Heß, D., Monod, M., Schäfer, W., Brown, A.J.P. & Gow, N.A.R. (1997)**
Gene disruption of the Secretory Aspartyl Proteinase Genes *SAP1*, *SAP2* and *SAP3* in *Candida albicans* attenuates virulence
Infec. Immun. 65: 3529-3538

- Hube, B., Stehr, F., Bossenz, M., Mazur, A., Kretschmar, M. & Schäfer, W. (2000)**
Secreted lipases of *Candida albicans*: cloning, characterisation and expression analysis of a new gene family with at least ten members
Arch. Microbiol. 174: 362-374
- Hube, B., Heß, D., Baker, C.A., Schaller, M., Schäfer, W. & Dolan, J.W. (2001)**
The role and relevance of phospholipase D1 during growth and dimorphism of *Candida albicans*
Microbiology 147: 879-889
- Hube, B. & Naglik, J. (2001)**
Candida albicans proteinases: resolving the mystery of a gene family
Microbiology 147: 1997-2005
- Hull, C.M. & Johnson, A.D. (1999)**
Identification of a mating type-like locus in the asexual pathogenic yeast *Candida albicans*
Science 285(5431): 1271-1275
- Hull, C.M., Raisner, r.M. & Johnson, A.D. (2000)**
Evidence for mating of the "asexual" yeast *Candida albicans* in a mammalian host
Science 289: 307-310
- Ibrahim, A., Mirbod, F., Filler, S.g., Yoshiko, B., Cole, G.T., Kitajima, Y., Edwards, J.E., J.R., Nozawa, Y. & Ghannoum, M.A. (1995)**
Evidence implicating phospholipase as a virulence factor of *Candida albicans*
Infect. Immun. 63(5): 1993-1998
- Ibrahim, A.S., Filler, S.G., Sanglard, D., Edwards, J.E. Jr. & Hube, B. (1998)**
Secreted aspartyl proteinases and interactions of *Candida albicans* with human endothelial cells
Infect. Immun. 66(6): 3003-3005
- Iwai, M. & Tsujisaka, Y. (1984)**
Fungal lipase
Lipases: 443-469
- Jäger, K.-E., Kinscher, D.A., König, B. & König, W. (1992)**
Extracellular lipase of *Pseudomonas aeruginosa*: biochemistry and potential role as virulence factor
Cystic Fibrosis, Basis and Clinical Research, Hoiby, N. and Pedersen, S.S., eds. Elsevier, Amsterdam: 113-119
- Jäger, K.-E. & Wohlfarth, S. (1993)**
Bakterielle Lipasen: Biochemie, Molekulargenetik und biotechnologische Bedeutung
Bio Engineering 9: 39-46
- Jäger, K.-E., Ransac, S., Dijkstra, B.W., Colson, C., van Heuvel, M. & Misset, O. (1994)**
Bacterial lipases
FEMS Microbiology Reviews 15: 29-63
- Jäger, K.-E. & Reetz, M.T. (1998)**
Microbial lipases form versatile tools for biotechnology
TIBTECH 16: 396-403
- Jäger, K.-E., Dijkstra, B.W. & Reetz, M.T. (1999)**
Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases
Annu. Rev. Microbiol. 53: 315-351
- Jaffe, E.A., Nachman, R.L., Becker, C.G. & Minick, C.R. (1973)**
Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria
J. Clin. Invest. 52(11): 2745-2756
- Kapral, F.A., Smith, S. & Lal, D. (1992)**
The esterification of fatty acids by *Staphylococcus aureus* fatty acid modifying enzyme (FAME) and its inhibition by glycerides
J. Med. Microbiol. 37: 235-237

Kirkpatrick, W.R., Revankar, S.G., Mcatee, R.K., Lopez-Ribot, J.L., Fothergill, A.W., McCarthy, D.I., Sanche, S.E., Cantu, R.A., Rinaldi, M.G. & Patterson, T.F. (1998)

Detection of *Candida dubliniensis* in oropharyngeal samples from human immunodeficiency virus-infected patients in North America by primary CHROMagar candida screening and susceptibility testing of isolates
J. Clin. Microbiol. 36(10): 3007-3012

Kitahara, M., Asano, M., Naganawa, H., Maeda, K., Hamada, M., Aoyagi, T., Umezawa, H., Iitaka, Y. & Nakamura, H. (1987)

Valilactone, an inhibitor of esterase, produced by actinomycetes
J. Antibiot. (Tokyo) 40(11): 1647-1650

Köller, W. (1991)

Plant cuticles: A barrier to be overcome by plant pathogens
The fungal Spore and Disease Initiation in Plants and Animals, G.T. Cole, H.C. Hoch, eds (Plenum, New York): 219-246

Kok, R.G., van Thor, J.J., Nugteren-Roodzant, I.M., Brouwer, M.B.W., Egmond, M.R., Nudel, C.B., Vosman, B. & Hellingwerf, K.J. (1995)

Characterization of the extracellular lipase, LipA, of *Acinetobacter calcoaceticus* BD413 and sequence analysis of the cloned structural gene
Mol. Microbiol. 15(5): 803-818

Kokotos, G., Verger, R. & Chiou, A. (2000)

Synthesis of 2-Oxo amide triacylglycerol analogues and study of their inhibition effect on pancreatic and gastric lipases
Chemistry 6(22): 4211-4217

Kontoyiannis, D.P., Vaziri, I., Hanna, H.A., Boktour, M., Thornby, J., Hachem, R., Bodey, G.P. & Raad, I.I. (2001)

Risk Factors for *Candida tropicalis* fungemia in patients with cancer
Clin. Infect. Dis. 33(10): 1676-1681

Koolman, J. & Röhm, K.-H. (1994)

Taschenatlas der Biochemie
Georg Thieme Verlag Stuttgart-New York

Krebs, M., Stingl, H., Nowotny, P., Weghuber, D., Bischof, M., Waldhausl, W. & Roden, M. (2000)

Prevention of *in vitro* lipolysis by tetrahydrolipstatin
Clin. Chem. 46(7): 950-954

Kretschmar, M., Hube, B., Bertsch, T., Sanglard, D., Merker, R., Schroder, M., Hof, H. & Nichterlein, T. (1999)

Germ tubes and proteinase activity contribute to virulence of *Candida albicans* in murine peritonitis
Infect. Immun. 67:6637-6642

Kroon, P.A., Williamson, G., Fish, N.M., Archer, D.B. & Belshaw, N.J. (2000)

A modular esterase from *Penicillium funiculosum* which releases ferulic acid from plant cell walls and binds crystalline cellulose contains a carbohydrate binding module
Eur. J. Biochem. 267(23): 6740-6752

Kurzai, O., Heinz, W.J., Sullivan, D.J., Coleman, D.C., Frosch, M. & Mühlischlegel, F.A. (1999)

Rapid PCR test for discriminating between *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* isolates using primers derived from the pH-regulated *PHR1* and *PHR2* genes of *C. albicans*
J. Clin. Microbiol. 37: 1587-1590

Kvaal, C., Lachke, S.A., Srikantha, T., Daniels, K., McCoy, J. & Soll, D.R. (1999)

Misexpression of the opaque-phase-specific gene *PEP1* (*SAP1*) in the white phase of *Candida albicans* confers increased virulence in a mouse model of cutaneous infection
Infect. Immun. 67: 6652-6662

Kwon-Chung, K.J. & Bennett, J.E. (1992)

Med. Mycol., 1st Edition, Lea and Febiger, Philadelphia, London

Kyte, J. & Doolittle, R.F. (1982)

A simple method for displaying the hydropathic character of a protein
J. Mol. Biol. 157: 105-132

- Lan, C.Y., Newport, G., Murillo, L.A., Jones, T., Scherer, S., Davis, R.W. & Agabian, N. (2002)**
Metabolic specialization associated with phenotypic switching in *Candida albicans*
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99: 14907-14912
- Lang, F. (1987)**
Pathophysiology, Pathobiochemie. 3. Auflage. Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart
- Lawrence, J., Turner, M. & Gilbert, P. (1988)**
Microbial contamination and growth in total parenteral nutrition solutions
J. Clin. Pharm. Ther. 13(2): 151-7
- Lee, W.L., Shalita, A.R., Suntharalingam, K. & Fikrig, S.M. (1982)**
Neutrophil chemotaxis by *Propionibacterium acnes* lipase and its inhibition.
Infect. Immun. 35(1): 71-78
- Lee, G.-C., Tang, S.-J., Sun, K.-H. & Shaw, J.-F. (1999)**
Analysis of the gene family encoding lipases in *Candida rugosa* by competitive reverse transcription-PCR
Appl. Environ. Microbiol. 65(9): 3888-3895
- Lee, S.A., Wormsley, S., Kamoun, S., Lee, A.F., Joiner, K. & Wong B. (2003)**
An analysis of the *Candida albicans* genome database for soluble secreted proteins using computer-based prediction algorithms
Yeast 20(7):595-610
- Lehninger, A.L., Nelson, D.L. & Cox, M.M. (1998)**
Prinzipien der Biochemie
2. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg/ Berlin/ Oxford
- Leidich, S.D., Ibrahim, A.S., Fu, Y., Koul, A., Jessup, C., Vitullo, J., Fonzi, W., Mirbod, F., Nakashima, S., Nozawa, Y. & Ghannoum, M.A. (1998)**
Cloning and disruption of *caPLB1*, a phospholipase B gene involved in the pathogenicity of *Candida albicans*
J. Biol. Chem. 273: 26078-26086
- Lesuisse, E., Schank, K. & Colson, C. (1993)**
Purification and preliminary characterisation of the extracellular lipase of *Bacillus subtilis* 168, an extremely basic pH-tolerant enzyme
Eur. J. Biochem. 216: 155-160
- Leuker, C.E., Hahn, A.M. & Ernst, J.F. (1992)**
 β -Galactosidase of *Kluyveromyces lactis* (Lac4p) as reporter of gene expression in *Candida albicans* and *C. tropicalis*
Mol. Gen. Genet. 235: 235-241
- Lev, S., Hernandez, J., Martinez, R., Chen, A., Plowman, G. & Schlessinger, J. (1999)**
Identification of a novel family of targets of PYK2 related to *Drosophila* retinal degeneration B (rdgB) protein
Mol. Cell. Biol. 19(3): 2278-2288
- Lewis, R.E., Lo, H.J., Raad, I.I. and Kontoyiannis, D.P. (2002)**
Lack of catheter infection by the *efg1/efg1 cph1/cph1* double-null mutant, a *Candida albicans* strain that is defective in filamentous growth
Antimicrob. Agents Chemother. 46: 1153-1155
- Liu, H., Kohler, J. & Fink, G.R. (1994)**
Suppression of hyphal formation in *Candida albicans* by mutation of a *STE12* homolog
Science 266(5191): 1723-1726
- Liu, H., Styles, C.A. & Fink, G.R. (1996)**
Saccharomyces cerevisiae S288C has a mutation in *FLO8*, a gene required for filamentous growth
Genetics 144: 967-978
- Lo, H.J., Köhler, J.R., DiDomenico, B., Loebenberg, D., Cacciapuoti, A. & Fink, G.R. (1997)**
Nonfilamentous *C. albicans* mutants are avirulent
Cell 90 : 939-949

- Longshaw, C.M., Farrell, A.M., Wright, J.D. & Holland, K.T. (2000)**
Identification of a second lipase gene, *gehD*, in *Staphylococcus epidermidis*: comparison of sequence with those of other staphylococcal lipases
Microbiology 146:1419-1427
- Lonon, M.K., Woods, D.E. & Straus, D.C. (1988)**
Production of lipase by clinical isolates of *Pseudomonas cepacia*
J. Clin. Microbiol. 26(5): 979-984
- Lookene, A., Skottova, N. & Olivecrona, G. (1994)**
Interactions of lipoprotein lipase with the active-site inhibitor tetrahydrolipstatin (Orlistat)
Eur. J. Biochem. 222(2): 395-403
- Lopez-Ribot, J.L., Casanova, M., Martinez, J.P. & Sentandreu, R. (1991)**
Characterization of cell wall proteins of yeast and hydrophobic mycelial cells of *Candida albicans*
Infect. Immun. 59(7): 2324-2332
- Losberger, C. & Ernst, J.F. (1989)**
Sequence of the *Candida albicans* gene encoding actin
Nucleic Acids Res. 17: 9488
- Lotti, M., Monticelli, S., Montesinos, J.L., Brocca, S., Valero, F. & Lafuente, J. (1998)**
Physiological control on the expression and secretion of *Candida rugosa* lipase
Chemistry and Physics of Lipids 93: 143-148
- Lottspeich, F & Zorbas, H. (1998)**
Bioanalytik
Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg/ Berlin/ Oxford
- Lowe, A.M., Beattie, D.T. & Deresiewicz, R.L. (1998)**
Identification of novel staphylococcal virulence genes by *in vivo* expression technology
Mol. Microbiol. 27(5): 967-976
- Lüthi-Peng, Q., Märki, H.P. & Hadvary, P. (1992)**
Identification of the active-site serine in human pancreatic lipase by chemical modification with tetrahydrolipstatin
FEBS 299(1): 111-115
- Magee, P.T. & Scherer, S. (1998)**
Genome mapping and gene discovery in *Candida albicans*
ASM News 64(9): 505-511
- Mago, N. & Khuller, G.K. (1990)**
Subcellular localization of enzymes of phospholipids metabolism in *Candida albicans*
J. Med. Vet. Mycol. 28: 355-362
- Mamputu, J.C., Desfaits, A.C. & Renier, G. (1997)**
Lipoprotein lipase enhances human monocyte adhesion to aortic endothelial cells
J. Lipid Res. 38(9): 1722-1729
- Maneu, V., Cervera, A.M., Martinez, J.P. & Gozalbo, D. (1996)**
Molecular cloning and characterization of a *Candida albicans* gene (*EFB1*) coding for the elongation factor EF-1 β
FEMS Microbiol. Letters 145: 157-162
- Markovic, O.T., Young, D.S. & Markovic, N.S. (1988)**
Quinidine-induced inhibition of leukocyte esterases
Clin. Chem. 34(3): 518-524
- Martinez, C., De Geus, P., Lauwereys, M., Matthyssens, G. & Cambillau, C. (1992)**
Fusarium solani cutinase is a lipolytic enzyme with a catalytic serine accessible to solvent
Nature 356: 615-618
- Mates, A. (1973)**
Inhibition of *Staphylococcus aureus* lipase by tetracycline
J. Invest. Dermatol. 60(3): 150-152

Matthews, R.C. (1994)

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

McCormick, S.P. & Alexander N.J. (2002)

Fusarium Tri8 encodes a trichothecene C-3 esterase
Appl. Environ. Microbiol. 68(6): 2959-2964

McLain, N. & Dolan, J.W. (1997)

Phospholipase D activity is required for dimorphic transition in *Candida albicans*
Microbiology 143: 3521-3526

Melzer, I.M. (2002)

Charakterisierung von *Candida*-Lipasen
Diplomarbeit, Hamburg

Miskin, J.E., Farrell, A.M., Cunliffe, W.J. & Holland, K.T. (1997)

Propionibacterium acnes, a resident of lipid-rich human skin, produces a 33 kDa extracellular lipase encoded by *gehA*
Microbiology 143: 1745-1755

Monod, M., Hube, B., Hess, D. & Sanglard, D. (1998)

Differential regulation of *SAP8* and *SAP9*, which encode two new members of the secreted aspartic proteinase family in *Candida albicans*
Microbiology 144: 2731-2737

Moran, G.P., Sanglard, D., Donnelly, S.M., Shanley, D.B., Sullivan, D.J. & Coleman, D.C. (1998)

Identification and expression of multidrug transporters responsible for fluconazole resistance in *Candida dubliniensis*
Antimicrob. Agents Chemother. 42: 1819-1830

Moro, M.L., Maffei, C., Manso, E., Morace, G., Polonelli, L. & Biavasco, F. (1990)

Nosocomial outbreak of systemic candidosis associated with parenteral nutrition
Infect. Control Hosp. Epidemiol. 11(1): 27-35

Moriyama, T., Urade, R. & Kito, M. (1999)

Purification and characterization of diacylglycerol lipase from human platelets
J. Biochem. (Tokyo) 125(6): 1077-1085

Morschhäuser, J. (2002)

The genetic basis of fluconazole resistance development in *Candida albicans*
Biochim. Biophys. Acta. 1587(2-3): 240-248

Murad, A.M., Lee, P.R., Broadbent, I.D., Barelle, C.J. & Brown, A.J. (2000)

Clp10, an efficient and convenient integrating vector for *Candida albicans*
Yeast 16: 325-327

Naglik, J.R., Newport, G., White, T.C., Fernandes-Naglik, L.L., Greenspan, J.S., Greenspan, D., Sweet, S.P., Challacombe, S.J. & Agabian, N. (1999)

In vivo analysis of secreted aspartyl proteinase expression in human oral candidiasis
Infect. Immun. 67: 2482-2490

Nantel, A., Dignard, D., Bachewich, C., Marcus, D., Marcil, A., Bouin, A.P., Sensen, C.W., Hogues, H., van het Hoog, M., Gordon, P., Rigby, T., Benoit, F., Tessier, D.C., Thomas, D.Y. & Whiteway, M. (2002)

Transcription profiling of *Candida albicans* cells undergoing the yeast-to-hyphal transition
Mol. Biol. Cell 13: 3452-3465

Nardini, M., Lang, D.A., Liebeton, K., Jaeger, K.-E., Dijkstra, B.W. (2000)

Crystal structure of *Pseudomonas aeruginosa* lipase in the open conformation. The prototype for family I.1 of bacterial lipases
J. Biol. Chem. 275(40): 31219-31225

Neugnot, V., Moulin, G., Dubreucq, E. & Bigey, F. (2002)

The lipase/acyltransferase from *Candida parapsilosis*: molecular cloning and characterization of purified recombinant enzymes
Eur. J. Biochem. 269(6): 1734-1745

Newport, G., Kuo, A., Flattery, A., Gill, C., Blake, J.J., Kurtz, M.B., Abruzzo, G.K. & Agabian, N. (2003)

Inactivation of Kex2p diminishes the virulence of *Candida albicans*
J. Biol. Chem. 278(3): 1713-1720

Nguyen, M.H., Peacock, J.E. Jr., Morris, A.J., Tanner, D.C., Nguyen, M.L., Snyderman, D.R., Wagener, M.M., Rinaldi, M.G. & Yu, V.L. (1996)

The changing face of candidemia: emergence of non-*Candida albicans* species and antifungal resistance
Am. J. Med. 100(6): 617-623

Nicholas, K.B. & Nicholas, H.B. Jr. (1997)

GeneDoc: a tool for editing and annotating multiple sequence alignments
Multiple Sequence Alignment Editor + Shading Utility Version 2.1.000

Noble, W.C. (1978)

Staphylococcus epidermidis: commensal or pathogen?
Int. J. Dermatol. 17(3): 213-215

Odds, F.C. (1988)

History, in *Candida* and Candidosis
Bailliere Tindall, London, United Kingdom: 1-6

Odds, F.C. (1994)

Candida species and virulence
ASM News 60(6): 313-318

Odds, F.C., Van Nuffel, L. & Dams, G. (1998)

Prevalence of *Candida dubliniensis* isolates in a yeast stock collection
J. Clin. Microbiol. 36(10): 2869-2873

Odds, F.C. (1999)

5th conference on *Candida* and Candidiasis
Mycology newsletter: 9-14

Ogawa, H., Nozawa, Y., Rojanavanich, V., Tsuboi, R., Yoshiike, T., Banno, Y., Takahashi, M.,

Nombela, C., Herreros, E., Garcia-Saez, M.I., Santos, A.I. & Sanchez, M. (1992)

Fungal enzymes in the pathogenesis of fungal infections
J. of Med. Vet. Mycol. 30(1): 189-196

Ohama, T., Suzuki, T., Mori, M., Osawa, S., Ueda, T., Watanabe, K. & Nakase, T. (1993)

Non-universal decoding of the leucine codon CUG in several *Candida* species
Nucl. Acid. Res. 21(17): 4039-4045

Ok, E., Yilmaz, Z., Karakucuk, I., Akgun, H. & Sahin, H. (2003)

Use of olive oil based emulsions as an alternative to soybean oil based emulsions in total parenteral nutrition and their effects on liver regeneration following hepatic resection in rats
Ann. Nutr. Metab. 47(5): 221-227

Pal-Bhadra, M., Bhadra, U. & Birchler, J.A. (2002)

RNAi related mechanisms affect both transcriptional and posttranscriptional transgene silencing in *Drosophila*
Mol. Cell 9(2): 315-327

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

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

Perez-Martin, J., Uria, J.A. & Johnson, A.D. (1999)

Phenotypic switching in *Candida albicans* is controlled by a *SIR2* gene
EMBO J. 18(9): 2580-2592

Phillips, A., Pretorius, G.H.J. & van Rensburg, H.G. (1995)

Molecular characterization of a *Galactomyces geotrichum* lipase, another member of the cholinesterase/lipase family
Biochim. Biophys. Acta 1252: 305-311

- Pinjon, E., Sullivan, D., Salkin, I., Shanley, D. & Coleman, D. (1998)**
Simple, inexpensive, reliable method for differentiation of *Candida dubliniensis* from *Candida albicans*
J. Clin. Microbiol. 36(7): 2093-2095
- Plourd, D.M. (1997)**
Practical guide to diagnosing and treating vaginitis
Medscape Womens Health 2(2): 2
- Polacheck, I., Strahilevitz, J., Sullivan, D., Donnelly, S., Salkin, I.F. & Coleman, D.C. (2000)**
Recovery of *Candida dubliniensis* from non-human immunodeficiency virus-infected patients in Israel
J. Clin. Microbiol. 38(1): 170-174
- Pratt, J., Cooley, J.D., Purdy, C.W. & Straus, D.C. (2000)**
Lipase activity from strains of *Pasteurella multocida*
Curr. Microbiol. 40(5): 306-309
- Pschyrembel (1990)**
Klinisches Wörterbuch
Walter de Gruyter, Berlin - New York, 256. Auflage
- Raith, H.J. (1994)**
Die Behandlung des Mundsoors bei Säuglingen
Hautnah Päd. 6: 548
- Ran, Y., Yoshiike, T. & Ogawa, H. (1993)**
Lipase of *Malassezia furfur*: some properties and their relationship to cell growth
J. of Med. Vet. Mycol. 31: 77-85
- Richards, M.J., Edwards, J.R., Culver, D.H. & Gaynes, R.P. (1999)**
Nosocomial infections in medical intensive care units in the United States. National Nosocomial Infections Surveillance System
Crit. Care Med. 27(5): 887-892
- Richardson, M.D. & Warnock, D.W. (1997)**
Fungal infections: Diagnosis and Management
2nd ed. London, Blackwell Scientific Publications
- Riecken, S. (2003)**
Mutagenese der *LIP8* DNA-Sequenz aus *C. albicans* und Charakterisierung der Enzymeigenschaften im *P. pastoris*-Expressionssystem
Diplomarbeit, Hamburg
- Robertson, D.L., Hilton, S., Wong, K.R., Koepke, A. & Buckley, J.T. (1994)**
Influence of active site and tyrosine modification on the secretion and activity of the *Aeromonas hydrophila* lipase/acyltransferase
J. of Biol. Chem. 269(3): 2146-2150
- Rodrigues, A.G., Mardh, P.A., Pina-Vaz, C., Martinez-de-Oliveira, J. & Fonseca, A.F. (1999)**
Germ tube formation changes surface hydrophobicity of *Candida* cells
Infect. Dis. Obstet. Gynecol. 7(5): 222-226
- Rollof, J., Hedstrom, S.A. & Nilsson-Ehle, P. (1987)**
Lipolytic activity of *Staphylococcus aureus* strains from disseminated and localized infections
Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand. [B] 95: 109-113
- Rollof, J., Braconier, J.H., Söderström, C. & Nilsson-Ehle, P. (1988)**
Interference of *Staphylococcus aureus* lipase with human granulocyte function
Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 7(4): 505-510
- Rozovskaia, T.A., Minasian, S.K., Kukhanova, M.K., Kraevskii, A.A. & Chidzhavadze, Z.G. (1989)**
DNA polymerase I, Klenow fragment of *Escherichia coli*: hydrolysis and pyrophosphorolysis of DNA containing phosphothioate groups
Mol. Biol. (Mosk.) 23(2): 449-462
- Rüchel, R. (1993)**
Diagnosis of invasive mycoses in severely immunosuppressed patients
Ann. Hematol. 67: 1-11

Rustchenko, E.P., Howard, D.H. & Sherman, F. (1997)

Variation in assimilating functions occurs in spontaneous *Candida albicans* mutants having chromosomal alterations

Microbiology 143: 1765-1778

Ryding, U., Renneberg, J., Rollof, J. & Christensson, B. (1992)

Antibody response to *Staphylococcus aureus* whole cell, lipase and staphylolysin in patients with *S. aureus* infections

FEMS Microbiol. Immunol. 4: 105-110

Salyers, A.A. & Whitt, D.D. (1994)

Bacterial pathogenesis: a molecular approach

Washington, D.C.; American Society for Microbiology

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

Molecular cloning: A laboratory manual

Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York

Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A.R. (1977)

DNA sequencing with chain-terminating inhibitors

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 5463-5467

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

A triple deletion in the *SAP4*, *SAP5* and *SAP6* Secretory Aspartyl Proteinase genes of *Candida albicans* causes attenuated virulence

Infec. Immun. 65: 3539-3546

Santos, M.A.S., Keith, G. & Tuite, M.F. (1993)

Non-standard translational events in *Candida albicans* mediated by an unusual seryl-tRNA with a 5'-CAG-3' (leucine) anticodon

The EMBO J. 12(2): 607-616

Sarda, L. & Desnuelle, P. (1958)

Action de la lipase pancreatique sur les esters en emulsion

Biochim. Biophys. Acta 30: 251-254

Schäfer, W. (1994)

Molecular mechanisms of fungal pathogenicity to plants

Annu. Rev. Phytopathol. 32: 461-477

Schaller, M., Schäfer, W., Korting, H.C. & Hube, B. (1998)

Differential expression of secreted aspartyl proteinases in a model of human oral candidosis and in patient samples from the oral cavity

Mol. Microbiol. 29: 605-615

Schaller, M., Korting, H.C., Schäfer, W., Bastert, J., Chen, W. & Hube, B. (1999)

Secreted aspartic proteinase (Sap) activity contributes to tissue damage in a model of human oral candidosis

Mol. Microbiol. 34(1): 169-180

Schaller, M., Bein, M., Korting, H.C., Baur, S., Hamm, G., Monod, M., Beinhauer, S. & Hube, B. (2003)

The secreted aspartyl proteinases Sap1 and Sap2 cause tissue damage in an *in vitro* model of vaginal candidiasis based in reconstituted human vaginal epithelium

Infec. Immun. 71(6): 3227-3234

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

Genetics of *Candida albicans*

Microbiol. Rev. 54(3): 226-241

Schousboe, I. (1976)

Triacylglycerol lipase activity in baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*)

Biochim. Biophys. Acta 424(3): 366-375

Schrag, J.D., Li, Y., Wu, S. & Cygler, M. (1991)

Ser-His-Glu triad forms the catalytic site of the lipase from *Geotrichum candidum*

Nature 351: 761-764

Sherertz, R.J., Gledhill, K.S. & Hampton, K.D. (1992)

Outbreak of *Candida* bloodstream infections associated with retrograde medication administration in a neonatal ICU
J. Pediatr. 120: 455-461

Sitges-Serra, A., Puig, P., Jaurrieta, E., Garau, J., Alastrue, A. & Sitges-Creus, A. (1980)

Catheter sepsis due to *Staphylococcus epidermidis* during parenteral nutrition
Surg. Gynecol. Obstet. 151(4): 481-483

Skottova, N., Savonen, R., Lookene, A., Hultin, M. & Olivecrona, G. (1995)

Lipoprotein lipase enhances removal of chylomicrons and chylomicron remnants by the perfused rat liver
J. Lipid Res. 36(6): 1334-1344

Slomiany, B.L., Piotrowski, J. & Slomiany, A. (1992)

Effect of sucralfate on the degradation of human gastric mucus by *Helicobacter pylori* protease and lipases
Am. J. Gastroenterol. 87(5): 595-599

Slutsky, B., Staebell, M., Anderson, J., Risen, J., Pfaller, J. & Soll, D.R. (1987)

"White-opaque transition": A second high-frequency switching system in *Candida albicans*
J. of Bacteriology 169: 189-197

Sobel, J.D. (1998)

Vulvovaginitis due to *Candida glabrata*. An emerging problem
Mycoses 41(Suppl. 2): 18-22

Sobel, J.D., Faro, S., Force, R.W., Foxman, B., Ledger, W.J., Nyirjesy, P.R., Reed, B.D. & Summers, P.R. (1998)

Vulvovaginal candidiasis: epidemiologic, diagnostic, and therapeutic considerations
Am. J. Obstet. Gynecol. 178: 203-211

Soll, D.R. (1992)

Switching and the regulation of gene transcription in *Candida albicans*
Dimorphic Fungi in Biology and Medicine, edited by Bossche, H.V. *et al.*, Plenum Press, New York

Somma-Delpero, C., Valette, A., Lepetit-Thevenin, J., Nobili, O., Boyer, J. & Verine, A. (1995)

Purification and properties of a monoacylglycerol lipase in human erythrocytes
Biochem. J. 312(2): 519-525

Staab, J.F., Bradway, S.D., Fidel, P. & Sundstrom, P. (1999)

Adhesive and mammalian transglutaminase substrate properties of *Candida albicans* *HWP1*
Science 283: 1535-1538

Staub, P., Kretschmar, M., Nichterlein, T., Hof, H. & Morschhäuser, J. (2000)

Differential activation of a *Candida albicans* virulence gene family during infection
Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 97: 6102-6107

Staub, P., Kretschmar, M., Nichterlein, T., Hof, H. & Morschhäuser, J. (2002a)

Host versus in vitro signals and intrastain allelic differences in the expression of a *Candida albicans* virulence gene
Mol. Microbiol. 44: 1351-1366

Staub, P., Kretschmar, M., Nichterlein, T., Hof, H. & Morschhäuser, J. (2002b)

Transcriptional regulators Cph1p and Efg1p mediate activation of the *Candida albicans* virulence gene *SAP5* during infection
Infect Immun. 70(2): 921-927

Stam, H. & Hulsmann, W.C. (1982)

Intracellular origin and regulation of endogenous lipolysis in rat heart
Adv. Myocardiol. 3: 499-507

Stehr, F. (1999)

Die Lipase-Genfamilie von *Candida albicans* – Charakterisierung und Regulationsanalyse
Diplomarbeit, Hamburg

Stehr, F., Felk, A., Kretschmar, M., Schaller, M., Schäfer, W. & Hube, B. (2000)

Extracellular hydrolytic enzymes and their relevance during *Candida albicans* infections
Mycoses 43(SUPPL. 2): 17-21

- Stehr, F., Kretschmar, M., Kröger, C., Hube, B & Schäfer, W. (2003)**
Microbial lipases as virulence factor
J. Molec. Catal. B 22: 347-355
- Steiner, D.F., Quinn, P.S., Chan, S.J., Marsh, J. & Tager, H.S. (1980)**
Processing mechanism in the biosynthesis of proteins
Ann. N.Y. Acad. Sci. 343: 1-16
- Steinmetz, L.M., Scharfe, C., Deutschbauer, A.M., Mokranjac, D., Herman, Z.S., Jones, T., Chu, A.M., Giaever, G., Prokisch, H., Oefner, P.J. & Davis, R.W. (2002)**
Systematic screen for human disease genes in yeast
Nat. Genet 31(4): 400-404
- Stephens, D.S. & Farley, M.M. (1991)**
Pathogenic events during infection of the human nasopharynx with *Neisseria meningitidis* and *Haemophilus influenzae*
Rev. Infect. Dis. 13: 22-33
- Sugiyama, Y., Nakashima, S., Mirbod, F., Kanoh, H., Kitajima, Y., Ghannoum, M.A. & Nozawa, Y. (1999)**
Molecular cloning of a second phospholipase B gene, *caPLB2* from *Candida albicans*
Med. Mycol. 37: 61-67
- Sullivan, P.A., Yin, C.Y., Molloy, C., Templeton, M.D. & Shepherd, M.G. (1983)**
An analysis of the metabolism and cell wall composition of *Candida albicans* during germ-tube formation
Can. J. Microbiol. 29(11): 1514-1525
- Sullivan, D., Westerneng, T.J., Haynes, K.A., Bennett, D.E. & Coleman, D.C. (1995)**
Candida dubliniensis sp. nov.: phenotypic and molecular characterisation of a novel species associated with oral candidosis in HIV-infected individuals
Microbiology 141: 1507-1521
- Sullivan, D., Haynes, K., Bille, J., Boerlin, P., Rodero, L., Lloyd, S., Henman, M. & Coleman, D. (1997)**
Widespread geographic distribution of oral *Candida dubliniensis* strains in human immunodeficiency virus-infected individuals
J. Clin. Microbiol. 35(4): 960-964
- Sullivan, D. & Coleman, D.C. (1998)**
Candida dubliniensis: characteristics and identification
J. Clin. Microbiol. 36: 329-334
- Sundstrom, P. (1999)**
Adhesins in *Candida albicans*
Curr. Opin. Microbiol. 2: 353
- Sundstrom, P. (2002)**
Adhesion in *Candida* spp.
Cell. Microbiol. 4(8): 461-469
- Tabara, H., Sarkissian, M., Kelly, W.G., Fleenor, J., Grishok, A., Timmons, L., Fire, A., Mello, C.C. (1999)**
The *rde-1* gene, RNA interference, and transposon silencing in *C. elegans*
Cell 99(2): 123-132
- Taylor, G.D., Buchanan-Chell, M., Kirkland, T., McKenzie, M. & Wiens, R. (1994)**
Trends and sources of nosocomial fungaemia
Mycoses 37(5-6): 187-190
- Teter, S.A., Eggerton, K.P., Scott, S.V., Kim, J., Fischer, A.M. & Klionsky, D.J. (2001)**
Degradation of lipid vesicles in the yeast vacuole requires function of Cvt17, a putative lipase
J. Biol. Chem. 276(3): 2083-2087
- Thirstrup, K., Verger, R. & Carriere, F. (1994)**
Evidence for a pancreatic lipase subfamily with new kinetic properties
Biochem. 33: 2748-2756

Tirunarayanan, M.O. & Lundebeck, H. (1968)

Investigations on the enzymes and toxins of staphylococci. Assay of lipase using Tween as the substrate
Acta Pathol. Microbiol. Scand. 72: 263-276

Titball, R.W., Hunter, S.E., Martin, K.L., Morris, B.C., Shuttleworth, A.D., Rubidge, T., Anderson, D.W. & Kelly, D.C. (1989)

Molecular cloning and nucleotide sequence of the alpha-toxin (phospholipase C) of *Clostridium perfringens*
Infect. Immun. 57(2): 367-376

Toida, J., Kondoh, K., Fukuzawa, M., Ohnishi, K. & Sekigushi, J. (1995)

Purification and characterization of a lipase from *Aspergillus oryzae*
Biosci. Biotech. Biochem. 59: 1199-1203

Tsuboi, R., Komatsuzaki, H. & Ogawa, H. (1996)

Induction of an extracellular esterase from *Candida albicans* and some of its properties
Infect. Immun. 64(8): 2936-2940

Tyski, S., Tylewska, S., Hryniewicz, W. & Jeljaszewicz (1987)

Induction of human neutrophils chemotaxis by *staphylococcal* lipase
J. Zentralbl. Bakteriologie. Mikrobiol. Hyg. 265: 360-368

Udenfriend, S. & Kodukula, K. (1995)

How glycosylphosphatidylinositol-anchored membrane proteins are made
Annu. Rev. Biochem. 64: 563-591

Uhl, M.A. & Johnson, A.D. (2001)

Development of *Streptococcus thermophilus lacZ* as a reporter gene for *Candida albicans*
Microbiology 147: 1189-1195

Uhl, M.A., Biery, M., Craig, N. & Johnson, A.D. (2003)

Haploinsufficiency-based large-scale forward genetic analysis of filamentous growth in the diploid human fungal pathogen *C. albicans*
EMBO J. 22(11): 2668-2678

Umezawa, H., Aoyagi, T., Hazato, T., Uotani, K., Kojima, F., Hamada, M. & Takeuchi, T. (1978)

Esterastin, an inhibitor of esterase, produced by actinomycetes
J. Antibiot (Tokyo) 31(6): 639-641

Uppenberg, J., Hansen, M.T., Patkar, S. & Jones, T.A. (1994)

The sequence, crystal structure determination and refinement of two crystal forms of lipase B from *Candida antarctica*
Structure 2: 293-308

Upton, C. & Buckley, J.T. (1995)

A new family of lipolytic enzymes?
Trends Biochem. Sci. 20: 178-179

van Boxel, R.M., Lambrecht, R.S. & Collins, M.T. (1990)

Effect of polyoxyethylene sorbate compounds (Tweens) on colonial morphology, growth, and ultrastructure of *Mycobacterium paratuberculosis*
APMIS 98(10): 901-908

van Tilbeurgh, H., Egloff, M.-P., Martinez, C., Rugani, N., Verger, R. & Cambillau, C. (1993)

Interfacial activation of the lipase-procolipase complex by mixed micelles revealed by X-ray crystallography
Nature 362: 814-820

von Heijne, G. (1986)

A new method for predicting signal sequence cleavage sites
Nucl. Acid. Res. 14(11): 4683-4690

Wang, X., Wang, C.S., Tang, J., Dyda, F. & Zhang, X.C. (1997)

The crystal structure of bovine bile salt activated lipase: insights into the bile salt activation mechanism
Structure 5(9): 1209-1218

Warnock, D.W., Burke, J., Cope, N.J., Johnson, E.M., Von Fraunhofer, N.A. & Williams, E.W. (1988)

Fluconazole resistance in *Candida glabrata*
Lancet 2: 1310

Webster, G.F., McGinley, K.J. & Leyden, J.J. (1981)

Inhibition of lipase production in *Propionibacterium acnes* by sub-minimal-inhibitory concentrations of tetracycline and erythromycin
Br. J. Dermatol. 104(4): 453-457

Weese-Mayer, D.E., Fondriest, D.W., Brouillett, R.T. & Shulman, S.T. (1987)

Risk factors associated with candidemia in the neonatal intensive care unit: a case-control study
Pediatr. Infect. Dis. J. 6: 190-196

Wenzel, R.P. (1995)

Nosocomial candidemia: risk factors and attributable mortality
Clin. Infect. Dis. 20(6): 1531-1534

Werner, H. (1966)

Untersuchungen über die Lipase-Aktivität bei Hefen und hefeähnlichen Pilzen
Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. A 22 o: 113-124

Wilhelm, S., Tommassen, J. & Jäger, K.E (1999)

A novel lipolytic enzyme located in the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*
J. Bacteriol. 181(22): 6977-6986

Winkler, U.K. & Stuckmann, M. (1979)

Glycogen, Hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*
J. Bacteriol. 138(3): 663-670

Winkler, F.K., D'Arcy, A. & Hunziker, W. (1990)

Structure of human pancreatic lipase
Nature 343: 771-774

Yeaman, S.J., Smith, G.M., Jepson, C.A., Wood, S.L. & Emmison, N. (1994)

The multifunctional role of hormone-sensitive lipase in lipid metabolism
Adv. Enzyme Regul. 34: 355-370

Zandonella, G., Haalck, L., Spener, F., Faber, K., Paltauf, F. & Hermetter, A. (1995)

Inversion of lipase stereospecificity for fluorogenic alkyldiacyl glycerols
Eur. J. Biochem. 231: 50-55

Anhang 1: In dieser Arbeit hergestellte Plasmide, deren Ausgangsvektoren und Verwendungszweck.

Plasmid	Insert	Ausgangsvektor	Quelle	Zweck
pCR-BluntII-TOPO-LIP3 (B42)	<i>LIP3 + umliegende Bereiche</i>	pCR-BluntII-TOPO	Diese Arbeit	Sequenzierung
pGEM [®] -T-LIP6 (B112)	<i>LIP6 + umliegende Bereiche</i>	pGEM [®] -T	Diese Arbeit	Sequenzierung
pGEM [®] -T-LIP7 (B113)	<i>LIP7 + umliegende Bereiche</i>	pGEM [®] -T	Diese Arbeit	Sequenzierung
pGEM [®] -T-LIP8 (B103)	<i>LIP8 + umliegende Bereiche</i>	pGEM [®] -T	Diese Arbeit	Sequenzierung
pGEM [®] -T-LIP9 (B114)	<i>LIP9 + umliegende Bereiche</i>	pGEM [®] -T	Diese Arbeit	Sequenzierung
pGEM [®] -T-LIP10 (B115)	<i>LIP10 + umliegende Bereiche</i>	pGEM [®] -T	Diese Arbeit	Sequenzierung
pGEM [®] -T-HindIII-PLAexp-XhoI (B5)	<i>HindIII-PLAexp-XhoI</i>	pGEM [®] -T	Diese Arbeit	Sequenzierung
pMB-7 (B23)	<i>hisG-URA3-hisG</i>	pUC18	Fonzi & Irvin, 1993	Knock out
pGEM [®] -T-SacI-LIP8(5')-KpnI (B11)	<i>SacI-LIP8(5')-KpnI</i>	pGEM [®] -T	Diese Arbeit	Knock out, Antisense
pGEM [®] -T-Sall-LIP8(3')-PstI (B9)	<i>Sall-LIP8(3')-PstI</i>	pGEM [®] -T	Diese Arbeit	Knock out, Antisense, RNAi
pGEM [®] -T-SacI-LIP8(5')-KpnI-2 (B14)	<i>SacI-LIP8(5')-KpnI-2</i>	pGEM [®] -T	Diese Arbeit	RNAi
pGEM [®] -T-KpnI-LIP8antisense-BglII (B15)	<i>KpnI-LIP8antisense-BglII</i>	pGEM [®] -T	Diese Arbeit	RNAi
pGEM [®] -T-BglII-PolyA-BglII (B16)	<i>BglII-PolyA-BglII</i>	pGEM [®] -T	Diese Arbeit	RNAi
pGEM [®] -T-KpnI-TEF3-Promotor-KpnI (B22)	<i>KpnI-TEF3-Promotor-KpnI</i>	pGEM [®] -T	Diese Arbeit	Antisense
pGEM [®] -T-KpnI-Actin-Promotor-KpnI (B40)	<i>KpnI-Actin-Promotor-KpnI</i>	pGEM [®] -T	Diese Arbeit	Retransformation, Überexpression
pMB-7-Sall-LIP8(3')-PstI (B12)	<i>Sall-LIP8(3')-PstI</i>	pMB-7	Diese Arbeit	Knock out, Antisense, RNAi
pGEM [®] -T-SacI-LIP8sense-KpnI-LIP8antisense-BglII (B24)	<i>SacI-LIP8sense-KpnI-LIP8antisense-BglII</i>	pGEM [®] -T-SacI-LIP8(5')-KpnI-2	Diese Arbeit	RNAi
pMB-7-SacI-LIP8(5')-KpnI-hisG-URA-hisG-Sall-LIP8(3')-PstI (B25)	<i>SacI-LIP8(5')-KpnI-hisG-URA-hisG-Sall-LIP8(3')-PstI</i>	pMB-7-Sall-LIP8(3')-PstI	Diese Arbeit	Knock out
pMB-7-SacI-LIP8sense-KpnI-LIP8antisense-BglII-hisG-URA-hisG-Sall-LIP8(3')-PstI (B28)	<i>SacI-LIP8sense-KpnI-LIP8antisense-BglII-hisG-URA-hisG-Sall-LIP8(3')-PstI</i>	pMB-7-Sall-LIP8(3')-PstI	Diese Arbeit	RNAi
pMB-7-SacI-LIP8(5')-KpnI-TEF3-Promotor-KpnI-hisG-URA-hisG-Sall-LIP8(3')-PstI (B29)	<i>SacI-LIP8(5')-KpnI-TEF3-Promotor-KpnI-hisG-URA-hisG-Sall-LIP8(3')-PstI</i>	pMB-7-Sall-LIP8(3')-PstI	Diese Arbeit	Antisense

Plasmid	Insert	Ausgangsvektor	Quelle	Zweck
pMB-7-SacI-LIP8sense-KpnI-LIP8antisense-BglII-PolyA-BglII-hisG-URA-hisG-Sall-LIP8(3')-PstI (B30)	<i>SacI-LIP8sense-KpnI-LIP8antisense-BglII-PolyA-BglII-hisG-URA-hisG-Sall-LIP8(3')-PstI</i>	pMB-7-SacI-LIP8sense-KpnI-LIP8antisense-BglII-hisG-URA-hisG-Sall-LIP8(3')-PstI	Diese Arbeit	RNAi
pGEM [®] -T-KpnI-LIP8ORF+3'UTR-NcoI (B39)	<i>KpnI-LIP8ORF+3'UTR-NcoI</i>	pGEM [®] -T	Diese Arbeit	Retransformation, Überexpression
pGEM [®] -T-KpnI-Actin-Promotor-KpnI (B40)	<i>KpnI-Actin-Promotor-KpnI</i>	pGEM [®] -T	Diese Arbeit	Retransformation, Überexpression
pGEM [®] -T-KpnI-Actin-Promotor-KpnI-LIP8ORF+3'UTR-NcoI (B41)	<i>KpnI-Actin-Promotor-KpnI-LIP8ORF+3'UTR-NcoI</i>	pGEM [®] -T-KpnI-LIP8ORF+3'UTR-NcoI	Diese Arbeit	Retransformation, Überexpression
pGEM [®] -T-SacI-Actin-Promotor-LIP8-SacI (B43)	<i>SacI-Actin-Promotor-LIP8-SacI</i>	PCR mit B41 als DNA-Template	Diese Arbeit	Retransformation, Überexpression
pCIp10 (B38)	<i>RP10-URA3</i>	pBluescript KS ⁺ II	Murad <i>et al.</i> , 2000	Retransformation, Überexpression
pCIp10-SacI-Actin-Promotor-LIP8-SacI (B44)	<i>SacI-Actin-Promotor-LIP8-SacI</i>	pCIp10	Diese Arbeit	Retransformation, Überexpression

Erklärung der relevanten Abkürzungen, wenn nicht anders beschrieben, sind die Gene und Genfragmente von *C. albicans*:

Actin-Promotor: Promotor des Actin-Gens; *hisG*: Sequenz des *hisG*-Gens von *Salmonella typhimurium*; LIP8(5'), LIP8(3'): 5'- bzw. 3'-Bereich des *LIP8*-Gens; LIP8antisense, LIP8sense: entgegengesetzt orientierte Abschnitte des *LIP8*-Gens; LIP8ORF+3'UTR: ORF und 3'-UTR des *LIP8*-Gens; PLAexp: Gen für eine putative Phospholipase; PolyA: 3'-Bereich mit 3'-UTR des *LIP8*-Gens; *RP10*: Gen für ein ribosomales Protein; TEF3-Promotor: Promotor des *TEF3*-Gens; *URA3*: Gen für die Orotidin-5'-Monophosphat Decarboxylase

Sequenzierung: Die Inserts dieser Plasmide wurden sequenziert; Knock out, Antisense, RNAi, Überexpression: Diese Plasmide wurden eingesetzt, um das entsprechende Konstrukt für die *Candida*-Transformation zu generieren.

Anhang 2: Rechnerischer Vergleich der aus den Lipase-Genen abgeleiteten Proteine. Es sind jeweils die Anzahl der identischen Aminosäuren, die Anzahl der „ähnlichen“ Aminosäuren (z.B. Leucin und Isoleucin) und die Anzahl der „Lücken“ (s. freie Positionen in Abb. 8, 3.1) angegeben. Ebenso sind diese absoluten Zahlen in Prozentzahlen umgerechnet. So besitzen z.B. Lip5 und Lip8 zu 84 % identische Aminosäuren (390 AS) und zu 92 % ähnliche Aminosäuren (426 AS). Es wurden drei „Lücken“ im Alignment eingesetzt. Die Proteine sind von links nach rechts nach ihrer Homologie angeordnet.

	Lip1	Lip3	Lip2	Lip6	Lip10	Lip4	Lip5	Lip8	Lip9	Lip7
Lip1	468	72 %	58 %	57 %	55 %	53 %	52 %	53 %	51 %	35 %
	0	87 %	77 %	77 %	76 %	70 %	69 %	70 %	69 %	53 %
	0	0 %	0 %	1 %	0 %	1 %	1 %	1 %	3 %	8 %
Lip3	343	471	56 %	61 %	55 %	48 %	50 %	50 %	47 %	35 %
	415	0	76 %	77 %	74 %	69 %	69 %	69 %	66 %	55 %
	3	0	1 %	1 %	1 %	2 %	1 %	2 %	3 %	9 %
Lip2	272	265	466	64 %	65 %	48 %	49 %	49 %	48 %	34 %
	363	356	0	82 %	82 %	66 %	66 %	65 %	65 %	53 %
	2	5	0	0 %	0 %	1 %	1 %	1 %	2 %	8 %
Lip6	271	290	301	463	64 %	50 %	50 %	51 %	48 %	35 %
	363	366	384	0	80 %	69 %	67 %	68 %	66 %	53 %
	5	8	3	0	0 %	1 %	2 %	2 %	2 %	7 %
Lip10	259	261	306	300	465	48 %	50 %	49 %	47 %	35 %
	359	352	383	373	0	68 %	66 %	67 %	66 %	53 %
	3	6	1	2	0	1 %	1 %	1 %	2 %	8 %
Lip4	251	230	225	234	226	459	80 %	80 %	74 %	35 %
	329	328	310	323	317	0	92 %	90 %	87 %	54 %
	9	12	7	6	6	0	0 %	1 %	1 %	8 %
Lip5	248	236	233	238	235	372	463	84 %	74 %	34 %
	325	328	312	316	312	428	0	92 %	86 %	55 %
	5	8	7	10	8	4	0	0 %	2 %	8 %
Lip8	251	236	231	239	231	373	390	460	71 %	35 %
	329	327	307	320	317	417	426	0	85 %	55 %
	8	11	8	11	9	5	3	0	1 %	8 %
Lip9	239	222	228	227	219	341	344	329	453	33 %
	323	315	306	310	310	402	399	392	0	55 %
	15	18	13	12	12	6	10	7	0	6 %
Lip7	167	168	159	163	163	163	161	164	154	426
	252	263	247	251	251	252	258	256	254	0
	42	45	40	37	39	37	41	38	31	0

Anhang 3: Argonaut-ähnliches Protein von *C. albicans*.

Dieses Protein wurde von den ORFs orf6-2445 (12471-13169) und orf6-2445 (13248-15224) abgeleitet. Es könnte eine Funktion in der RNA-Interferenz übernehmen. Zwei Domänen wurden identifiziert: die PAZ-Domäne (Aminosäuren 259-387, hellblau unterlegt) und die Piwi-Domäne (Aminosäuren 554-880, gelb unterlegt).

```
1    MSDLVKFSTPTKINDKALVAIDTYKKTfQkQIKNEQNGILLRPSFGTEGVPTIVGVNYFK
61   YNVNGLKLYSYRVDLLEDPNVKTRLSIKTAVEKYLMELEPFKSKKAIYYRDHNHLYSRM
121  PLPIEDVVIYPLELGGDPKREKKIVELKIQFIKQLNFSDLLNYTQLKNYTPDFLETVEYT
181  NALVAVMGSQVMKNTNVVGLGPNKFFLMDGATKTTDLKGLYVAMGTFASVRSFDDVRIN
241  LNPTPAIFYKSSKPNGQPMNVLDLIQEFKIRNVPTERDIRRAQSFikGCKIYRTYLNRK
301  TTKPILGFDYSNNSETLKFKDANDKLVNVKQYFQERWNI RLKHPTLPLIKIGPEAF LPMK
361  LGI IAPHQQYKGFADPAKI IKITATRPNQKAELISKTNRNLFQKQVDFGTIESQFTVVP
421  ARVLNAPTIEYANNQMVTYRPAFNGRTEKQKGNWNLERYQFVDGAKLTKPMGKPFTEFGV
481  VILKDEFVAKRIGDLQRAVPTFLTELGR LGIKIGKNFKKYSIDLNHASVQSQTGLESNII
541  SIAKKAKTEDQCNFLLFILPRQDTPLYSAIKRACDLKVGILNSCSILNTFTKKRRGTENF
601  DAMTYAQMAMKINIKLGGSNHKLKSKKDSQGLFDKNNVPIFILGADVTHPTGEINSESVSI
661  ASIVGSEDGIFNKFPGSVRIQTGGQEV IADVKSMLERLENFHKKIGKLPSKVLFYRDGV
721  SEGQYTTILKEELTKIKAAFNEYGKLKNI PKYSPTITFMI VVKRHHTRFIPIHDNADDPK
781  TKKQIAVTSNENVIAGTTVDREITSPAYFD FYVQSQQSLQGTGIPAHYYVLHDENNYTSD
841  TIQKITYDLCHTF SRATKSVKVVPAAYYADLLCTRGRDYIYGFAKDPNLKGSPIERARTK
901  FGENVNPSIKNTMFYI
```


Danksagung

Bei folgenden Personen möchte ich mich sehr herzlich bedanken:

Herrn Prof. Wilhelm Schäfer für die Überlassung des Themas, seine intensive Betreuung, seine wertvollen Ratschläge, die auch über das Fachliche hinausreichten sowie die persönliche Unterstützung für meine Auslandsaufenthalte.

Herrn Prof. Udo Wienand für das freundliche Angebot, die Zweitkorrektur meiner Dissertation zu übernehmen sowie seine persönliche Unterstützung für den „Cold Spring Harbor“-Kurs.

Bernhard Hube dafür, dass er mich in die „*Candida*-Welt“ („damals in Schottland...“) eingeführt hat, für seine große Unterstützung beim Stipendiums Antrag, die Initiierung der Kooperation mit Prof. Scott Filler (Harbor-UCLA) und vieles mehr.

Dem Boehringer Ingelheim Fonds für die finanzielle und wissenschaftliche Unterstützung, besonders Claudia Walther, Monika Beutelsbacher und Herrn Fröhlich, die mir Vieles ermöglicht haben.

Herrn Prof. Neuber und Birgit Mähnß vom UKE (Dermatologie) für die produktive Zusammenarbeit.

Frau Dr. Marianne Kretschmar für die erfolgreiche Kooperation.

Don Sheppard, für viele gute Ratschläge und Herrn Prof. Scott Filler für die freundliche Aufnahme in seinem Labor in L.A.

Beim gesamten AMPIII-Labor:

Sascha (Super-Saschi) dafür, dass er ein sehr guter Freund und immer für einen da ist, dass er (neben seiner eigenen Arbeit) meine Doktorarbeit ertragen hat, für seine Ratschläge, die gemeinsame Zeit bei der Muppet-Show im Swiss-Center, unvergessen auch unser ewiger Kampf mit dem Getränkeautomaten; und natürlich bei Jasna, die einfach das beste zweite Frühstück der Welt macht; Anke (Ms. General-Point-Liste), die noch mehr Ratschläge hatte (ob gewollt oder ungewollt), ohne deren Organisation bei AMPIII (fast) gar nichts laufen würde, einfach die beste Rockerin der Welt; Angelika, die mit ihrem umwerfenden Lachen immer für eine fröhliche Atmosphäre sorgte und mir viel bezüglich „*Candida*“ beigebracht hat; Frank, der immer für einen Witz gut ist (die Franks müssen sowieso zusammenhalten), der einfach nur am falschen Pilz forscht; Nadine, die meinen Musikgeschmack teilt und meinen Gesang ertragen hat, (übrigens, zu meinen „Denkpausen“: „Sage nicht alles was Du weißt, aber wisse immer was Du sagst“); Inga, die ebenfalls meinen Gesang ertragen mußte (dafür mußte ich die „*Pichia*-Brühe“ ertragen), für die ???-Abende im Thalia; Birgit, ohne die ebenfalls nichts im Labor laufen würde, die immer hilfsbereit war;

Katrin, für unzählige Lacher, nette Parties (ja, ich werde demnächst auch mal wieder feiern); Cathrin, die den Spaß an der *Candida*-Arbeit teilt („Sie baden gerade ihre Hände drin“), und eine sehr große Unterstützung war; Attila, für anregende Diskussionen, und noch mehr für die Tanzstunden (Danke, dass Du nicht durchgehend gelacht hast); Sigi, für die große Unterstützung beim Korrigieren, der sich immer Zeit für mich nahm, sowie für seine hilfreichen Ratschläge; Nicole, für einen gemeinsamen Tanz, die netten Gespräche und ihre Hilfsbereitschaft; Brigitte („Mal wieder Primer bestellen“), für all die Unterstützung; Cenap, der auch nie aus dem Labor rauskam und ein guter Tischtennisgegner war; Christian alias „Howie“, der einfach alles schon mal gemacht hat, und mindestens sieben Veröffentlichungen über Lipasen rausbringen wird, und der das Party-Power-Pack vermissen wird; sowie allen anderen und ehemaligen „AMPIIIern“ für viel Spaß und die freundliche Atmosphäre (dafür reicht diese Seite einfach nicht aus).

Außerdem ganz vielen Dank an:

Janbo-Lee („Arme weit offen“), für seine super-große Unterstützung, sei es bezüglich Computer und anderer technischer Geräte, sowie Korrekturlesen, dafür, dass er ein sehr guter Freund ist, auf den man immer zählen kann (was will man mehr?); Kerstin, für zahlreiche Tipps (besonders bezüglich der Antisense-Geschichten); Christoph, für die Jogging-Runden (eine Parkbank wartet immer noch auf uns), denn geteiltes Leid ist halbes Leid; meiner kleinen Schwester Tini, die einfach viel besser Englisch kann als ich, für viele spannende Video-Abende.

Vor allem meinen Eltern für ihre Unterstützung, ihr immerwährendes Vertrauen und ihre Liebe.

Und zu guter Letzt meiner Claudia für all die Liebe und Unterstützung, die alles ertragen hat (vor allem mich), für das Korrekturlesen, („Lipase-Genfamilie“ wird zum Unwort erklärt), ohne sie hätte ich diesen Schreibmarathon bestimmt nicht durchgehalten, dass sie immer für mich da war, einen ganz großen Dank von Herzen.

Hochschulstudium

1994 - 1995 Chemie, Universität Hamburg
1995 - 2000 Biochemie/Molekularbiologie, Universität Hamburg
1999 Diplomprüfung: Biochemie/Molekularbiologie,
Neurobiologie, Molekulare Medizin

Diplomarbeit:
„Die Lipase-Genfamilie von *Candida albicans* -
Charakterisierung und Regulationsanalyse“
im Labor von Prof. Dr. W. Schäfer, Institut für Allgemeine
Botanik, Universität Hamburg

Promotion

April 2000- Stipendium des Boehringer Ingelheim Fonds
Doktorarbeit:
„Sekretierte Lipasen des humanpathogenen Pilzes *Candida albicans* und ihre Bedeutung als Virulenzfaktoren“
im Labor von Prof. Dr. W. Schäfer, Institut für Allgemeine
Botanik, Universität Hamburg

November 2002- Forschungsaufenthalt im Labor von Prof. Dr. Scott Filler
Februar 2003 Harbor-UCLA, Kalifornien, USA

Oktober 2003 voraussichtlicher Abschluß der Promotion

Projektstudien

F. Stehr. 1997. Aggregation and stabilisation of paired helical filaments of Alzheimer's disease. Labor von Prof. Dr. E. Mandelkow, Max-Planck-Einheit der Strukturellen Molekularbiologie, Hamburg.

F. Stehr. 1997. Peptide transport and proteinase expression in *Candida albicans*. Labor von Prof. Dr. N. Gow. Department of Molecular and Cell Biology. Institute of Medical Sciences, Aberdeen, United Kingdom, und Prof. Dr. W. Schäfer/Dr. B. Hube, Institut für Allgemeine Botanik, Universität Hamburg.

F. Stehr. 1998. Detection of frequency transcripts in different *Neurospora crassa* mutants which are impaired in light-perception. Labor von Prof. Dr. G. Macino. Dipartimento di Biotecnologie Cellulari ed Ematologia, Sezione di Genetica Molecolare, Rom, Italien.

F. Stehr. 1998. Analysis of the adhesion of *Malassezia furfur* and *Candida albicans* on corneocytes, ceratinocytes and different lipids. Labor von Dr. F. Wolf. Beiersdorf AG, Abteilung „Mikrobiologie der Haut“, Hamburg.

Poster

S. Mathes, F. Stehr, D. Drexler, G. Sauermann, U. Hoppe, F. Wolf, and C. Maier. Modulation of microbial interactions with human skin. 8. Forschungsforum Beiersdorf AG, 1999, Hamburg.

F. Stehr, B. Hube, M. Bossenz, A. Mazur, M. Kretschmar, and W. Schäfer. Secreted lipases of *Candida albicans*: cloning, characterization and expression analysis of a new family of putative virulence genes with at least ten members. 41st International Conference on the Biochemistry of Lipids, 13. - 16. September 2000, Halle.

F. Stehr, M. Kretschmar, B. Hube, and W. Schäfer. The Lipase Gene Family of *Candida albicans*: A New Virulence Factor? International conference „Human Fungal Pathogens“. 8. - 13. September 2001, Seefeld in Tirol, Österreich.

F. Stehr, M. Kretschmar, B. Hube, and W. Schäfer. Neuigkeiten von der Lipase Genfamilie von *Candida albicans*. 35. Wissenschaftliche Tagung der Deutschsprachigen Mykologischen Gesellschaft e.V., MYK 13. - 15. September 2001, Marburg.

S. Salomon, I. M. Melzer, F. Stehr, and W. Schäfer. Secreted Lipases (1, 4, 10) of *Candida albicans*. 22nd Fungal Genetics Conference, 18. - 23. März 2003, Pacific Grove, CA, USA.

F. Stehr, M. Kretschmar, B. Mähnß, K. Neuber, B. Hube, and W. Schäfer. Expression analysis of the *Candida albicans* lipase gene family during experimental infections and in patient samples. 22nd Fungal Genetics Conference, 18. - 23. März 2003, Pacific Grove, CA, USA.

Veröffentlichungen

F. Stehr, B. Hube, M. Bossenz, A. Mazur, M. Kretschmar, and W. Schäfer. 2000. Secreted lipases of *Candida albicans*: cloning, characterisation and expression analysis of a new gene family with at least ten members. Archives of Microbiology, 174(5): 362-374.

F. Stehr, A. Felk, M. Kretschmar, M. Schaller, W. Schäfer, and B. Hube. 2000. Extracellular hydrolytic enzymes and their relevance during *Candida albicans* infections. Mycoses, 43(SUPPL. 2): 17-21.

F. Stehr, M. Kretschmar, B. Hube, C. Kröger, and W. Schäfer. 2003. Microbial lipases as virulence factors. Journal of Molecular Catalysis B, 22: 347-355.

F. Stehr, A. Felk, A. Gacser, M. Kretschmar, B. Mähnß, K. Neuber, B. Hube, and W. Schäfer. Expression analysis of the *Candida albicans* lipase gene family during experimental infections and in patient samples. FEMS Yeast Research (Akzeptiert).

Präsentationen

F. Stehr. Secreted lipases in *Candida albicans*: cloning and characterization of a new group of putative virulence genes. 50th Annual Congress of the German Society for Hygiene and Microbiology, 11. - 14. Oktober 1999, Regensburg.

F. Stehr. The lipase gene family of *Candida albicans*: A new virulence factor? International Workshop „Synthesis, Testing and Pharmacological Applications of Lipase Inhibitors“. 6. Juli 2001, Rom, Italien.

Sonstiges

Methoden-Kurs	„Protein Purification & Characterization“ Cold Spring Harbor Laboratory, Long Island, USA, April 2002
Patent	W. Schäfer, A. Nasser Eddine und F. Stehr. Fungizid mit Lipase-Hemmer. 2001. Deutsche Patentanmeldung 10113045.7
Praktikums- betreuung	Praktikum der Mikrobiologie für Studenten des Studiengangs Biochemie/ Molekularbiologie Universität Hamburg