

**Generierung und funktionelle *in vivo*
Charakterisierung einer Lipidkinase-
defekten Phosphatidylinositol 3-Kinase
CaVps34p der humanpathogenen Hefe
*Candida albicans***

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

**vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der
Friedrich-Schiller-Universität Jena**

von

**Diplom Biologin Juliane Günther
geboren am 24.02.1977 in Dresden**

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	1
1. Einleitung	5
1.1 <i>Candida albicans</i> , eine humanpathogene Hefe	5
1.2 Dimorphismus von <i>C. albicans</i>	6
1.3 Phosphatidylinositol 3-Kinasen	8
1.4 Intrazellulärer Vesikeltransport zur Vakuole in <i>S. cerevisiae</i>	10
1.5 CaVps34p und der Vesikeltransport in <i>C. albicans</i>	17
1.6 Zielstellung	19
2. Material und Methoden	20
2.1 Stämme und Kultivierung	20
2.1.1 <i>Escherichia coli</i> -Stämme	20
2.1.2 <i>Candida albicans</i> -Stämme	20
2.1.3 Kultivierung der <i>E. coli</i> und <i>C. albicans</i> Stämme	21
2.1.4 Untersuchung des Wachstums unter Hyphen induzierenden Bedingungen	21
2.1.5 Untersuchungen der Chlamyosporenbildung	22
2.1.6 Untersuchungen zur Stresstoleranz der <i>C. albicans</i> Stämme	22
2.2 Nukleinsäurearbeiten	23
2.2.1 Primer	23
2.2.2 Primer zur Kontrollsequenzierung des <i>CaVPS34</i> -Gens	24
2.2.3 Sonden	24
2.2.4 Plasmide	25
2.2.5 Konstruktion der Plasmide	26
2.2.6 Polymerasekettenreaktionen	27
2.2.7 Restriktionsreaktionen	27
2.2.8 DNA-Sequenzierung	27
2.2.9 Isolierung von DNA aus Agarosegelen	27
2.2.10 Ligationsreaktion	28
2.2.11 Minipräparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	28
2.2.12 Isolierung von Plasmid-DNA mit Anionenaustauscher-Säulen	29
2.2.13 Isolierung genomischer DNA aus <i>C. albicans</i>	29
2.2.14 Radioaktive Markierung von Sonden-DNA	29
2.2.15 Southern-Analyse	30

2.3	Transformationen	31
2.3.1	Transformation von <i>E. coli</i>	31
2.3.2	Transformation von <i>C. albicans</i>	31
2.4	Proteinanalyse	32
2.4.1	Heterologe Expression von CaVps34p-Proteinmutanten in <i>E. coli</i>	32
2.4.2	Nachweis spezifischer Proteine durch Westernblot-Analyse	33
2.4.3	Nachweis der PI 3-Kinase-Aktivität	33
2.4.4	Untersuchung der Autophosphorylierungsaktivität der CaVps34p-Mutantenproteine.....	34
2.5	Phänotypische Untersuchungen der <i>C. albicans</i> -Stämme	35
2.5.1	Fluoreszenzfärbung und Mikroskopie.....	35
2.5.2	Untersuchung der Adhäsion der <i>C. albicans</i> -Stämme an humane Buccalzellen.....	36
2.5.3	Untersuchung zur Virulenz der <i>C. albicans</i> -Stämme.....	36
3.	Ergebnisse	37
3.1	<i>In vitro</i> -Analyse der Enzymfunktionen von CaVps34p	37
3.1.1	Konstruktion und heterologe Expression der CaVps34p Mutantenproteine	37
3.1.2	<i>In vitro</i> Enzymaktivität der Lipidkinase-Proteinmutanten	39
3.1.3	<i>In vitro</i> Enzymaktivität der CaVps34p Serin-Proteinmutanten	42
3.2	<i>In vivo</i> -Analyse der Enzymfunktionen von CaVps34p.....	42
3.2.1	Generieren eines Lipidkinase-defekten <i>C. albicans VPS34</i> Mutantenstammes	42
3.2.2	Wachstumsanalyse der <i>CaVPS34</i> Lipidkinasemutante CAV9.....	44
3.2.3	Einfluss der Lipidkinaseaktivität von CaVps34p auf Vakuolenfunktion und intrazellulären Vesikeltransport	45
3.2.4	Die Lipidkinaseaktivität von CaVps34p beeinflusst das hyphale Wachstum	47
3.2.5	Die <i>VPS34</i> Lipidkinasemutante CAV9 ist in der Lage Chlamyosporen auszubilden	49
3.2.6	Die Lipidkinaseaktivität von CaVps34p beeinflusst die Adhärenz von <i>C. albicans</i> an humane Buccalzellen.....	51
3.2.7	Die <i>VPS34</i> Lipidkinasemutante CAV9 unterscheidet sich in der Stresssensitivität, der Ionendetoxifikation sowie im Wachstum unter alkalischen Bedingungen von der Nullmutante CAV3	51
3.2.8	Die <i>VPS34</i> Lipidkinasemutante CAV9 zeigt eine geringe Rapamycinsensitivität	55

3.2.9	Die Lipidkinaseaktivität von CaVps34p beeinflusst die Virulenz von <i>C. albicans</i>	57
4.	Diskussion	59
4.1	Funktionelle Untersuchungen des CaVps34 Proteins	60
4.1.1	Modifikationen einer Lipidbindedomäne beeinflussen nicht die Proteinkinaseaktivität von CaVps34p	60
4.1.2	C-terminale Serin-Reste stellen keine spezifischen Autophosphorylierungsstellen von CaVps34p dar	61
4.2	Zelluläre Funktion der Lipidkinaseaktivität von CaVps34p	62
4.2.1	Die Lipidkinaseaktivität von CaVps34p ist in Vesikeltransportprozesse und Vakuolenfunktion involviert	62
4.2.2	Die Lipidkinasaktivität von CaVps34p beeinflusst die Hyphenbildung	65
4.2.3	Der Verlust der Lipidkinaseaktivität von CaVps34p beeinflusst die Adhäsion von <i>C. albicans</i> an Wirtszellen	66
4.2.4	Aktivitäten von CaVps34p unabhängig von der Lipidkinase sind an der Stresstoleranz, bei Detoxifikationsprozessen und beim Wachstum unter alkalischen Bedingungen beteiligt	67
4.2.5	Die Lipidkinaseaktivität von CaVps34p hat keinen Einfluss auf die Chlamydosporenbildung	73
4.2.5	Die Lipidkinaseaktivität von CaVps34p ist entscheidend für die Virulenz von <i>C. albicans</i>	73
4.3	Übersicht der Zusammenhänge zwischen den Aktivitäten von CaVps34p und den Zellfunktionen	74
5.	Zusammenfassung	76
	Literaturverzeichnis	77
	Eigene Publikationen:	95
	Vorträge/Poster:	96
	Abkürzungsverzeichnis	97
	Danksagung	99
	Selbstständigkeitserklärung	100
	Lebenslauf	101

1. Einleitung

1.1 *Candida albicans*, eine humanpathogene Hefe

Candida spp. sind die häufigsten fungalen Pathogene des Menschen. Taxonomisch werden diese Hefen den Ascomyceten zugeordnet. Die Inzidenz schwerer Pilzinfektionen hat in den vergangenen Jahren erheblich zugenommen (Beck-Sagué & Jarvis, 1993; Edmond *et al.*, 1999; Pfaller *et al.*, 1999), was die Notwendigkeit von Untersuchungen dieser eukaryontischen Pathogene insbesondere ihrer Virulenz unterstreicht. Das klinische Spektrum der Infektionen mit *Candida spp.* umfasst oberflächige oder lokalisierte Mykosen, Fungämien sowie akute und chronische disseminierte Mykosen. Als opportunistische Krankheitserreger kolonisieren diese Hefen den Gastrointestinaltrakt sowie die Harnwege einer Vielzahl von Menschen ohne Krankheitssymptome auszulösen (McCullough *et al.*, 1996). Immunsupprimierte Patienten, darunter Krebspatienten unter Chemotherapie, Empfänger von Organtransplantaten, Patienten mit großen chirurgischen Eingriffen und HIV-Infizierte stellen eine wachsende Patientengruppe mit hohem Risiko für opportunistische lebensbedrohliche Systemmykosen dar. So sind in den USA *Candida spp.* die vierthäufigsten Erreger nosokomialer Septikämien (8%) mit der höchsten Gesamletalität (40%) (Edmond *et al.*, 1999). Die Inzidenz ist in Europa zwar niedriger, *Candida spp.* sind hier die achthäufigsten Erreger (2,8%) von sowohl nosokomialen wie ambulanten Septikämien, nimmt jedoch ebenfalls zu. Der häufigste Erreger invasiver Candidosen ist *Candida albicans*. Allerdings zeigt sich eine zunehmende Zahl von Infektionen mit *C. tropicalis*, *C. glabrata* und *C. krusei* (Wright & Wenzel, 1997; Pfaller *et al.*, 1998).

Die Spezies *C. albicans* besitzt ein diploides Genom mit einer haploiden Genomgröße von 15,5 Mbp auf 8 Chromosomen (Riggsby *et al.*, 1982; Doi *et al.*, 1992; Chu *et al.*, 1993). Ein typisches Merkmal von *C. albicans* ist der Polymorphismus. Dieser Pilz ist in der Lage in mehreren Formen zu existieren, darunter Hefen und Myzelien, wobei die myzeliale Form als die invasive Variante betrachtet wird (Dean & Burchard, 1998). Die Pathogenese von *C. albicans* ist Thema vieler Studien. So ist bekannt, dass die Mehrzahl der disseminierten *Candida*-Infektionen vom Magen-Darmtrakt ausgeht (Nucci & Anaissie, 2001). Als weitere Eintrittspforten einer *Candida*-Fungämie kommen unter anderem Katheter, Wunden und die Harnwege in Betracht (Giamarellou & Antoniadou; 1996). So kann *C. albicans* an frisch verletzte Oberflächen adhären und epitheliale sowie subepitheliale Gewebe via Aktivierung von Proteinasen und Phospholipasen angreifen (Inone *et al.*, 1988; Calderone *et al.*, 1989; Ghannoum & Abu-Elteen, 1990; Deitch *et al.*, 1990). Die Phagozytose von *C. albicans* wird als entscheidender Faktor bei der Entwicklung der Endothelschäden durch

erhöhte Prostaglandin- und Zytokinsekretion sowie vermehrte Expression von Leukozytenadhäsionsmolekülen in Endothelzellen diskutiert (Filler *et al.*, 1994; Filler *et al.*, 1995; Filler *et al.*, 1996). Bisher wurden Rezeptoren auf den Wirtszellen (Adhäsine), Morphogenese (der reversible Übergang zwischen einzelligen Hefen und filamentösen, vegetativen Formen), sezernierte Aspartyl-Proteasen und Phospholipasen sowie phänotypische Umstellungen, die von Veränderungen der Antigenexpression, Kolonimorphologie und Gewebetropismus von *C. albicans* begleitet sind, als Virulenzfaktoren identifiziert (Calderone & Fonzi, 2001).

1.2 Dimorphismus von *C. albicans*

Der Wechsel zwischen unterschiedlichen Wachstumsformen ist eine wichtige Virulenzeigenschaft von *C. albicans*. So gilt der Nachweis der Hefe und Hypheform als pathognomonisch für invasive Infektionen (Dean & Burchard, 1998). Viele virulenzassoziierte Gene, so auch das in dieser Arbeit untersuchte CaVps34 Protein, sind mittel- oder unmittelbar mit dem morphologischen Wechsel verknüpft.

Als polymorphe Hefe ist *C. albicans* in der Lage sowohl einzelne sphärische Zellen, wie die typischen Hefezellen und Chlamydosporen, als auch elongierte Zellen, multizelluläre echte Hyphen und Pseudohyphen, auszubilden. Als Dimorphismus wird üblicherweise der Wechsel zwischen Hefeform und echten Hyphen bezeichnet. Hefezellen können zum hyphalen Wachstum angeregt werden. Dabei zeichnen sich echte Hyphen durch kontinuierliches apikales Wachstum gefolgt von einer Septierung aus. Pseudohyphen dagegen wachsen durch unipolare Knospung, wonach die Knospen, immer noch mit der Mutterzelle verbunden, zu elongierten Zellen auswachsen und am apikalen Ende erneut eine Knospung stattfindet. Chlamydosporen sind dickwandige runde Zellen, zu denen sich die Ausgangszellen der Pseudohyphen entwickeln können.

Die Morphologie von *C. albicans* hängt direkt mit den Umweltbedingungen zusammen, denen der Pilz ausgesetzt ist. Der Wechsel zwischen Hefe und Hyphe wird durch verschiedene Umweltfaktoren induziert. Die effektivsten Induktionsbedingungen der Hyphenbildung sind das Wachstum unter Serum, N-Acetylglucosamin oder anderen Induktoren bei 37°C. Es ist ebenfalls möglich durch Nährstoffmangel, schaffen einer mikroaerophilen Umgebung durch Einbettung in Medium sowie einem neutralen pH-Wert von ungefähr 6,5 hyphales Wachstum zu induzieren. Diese Umweltfaktoren induzieren über unterschiedliche Signaltransduktionswege das hyphalen Wachstums (Abb. 1). Der cAMP-Weg wird durch Induktoren wie Serum und Nährstoffmangel induziert. Er beinhaltet Ras1p, den „second messenger“ cAMP sowie die ProteinkinaseA Tpk2p und aktiviert den

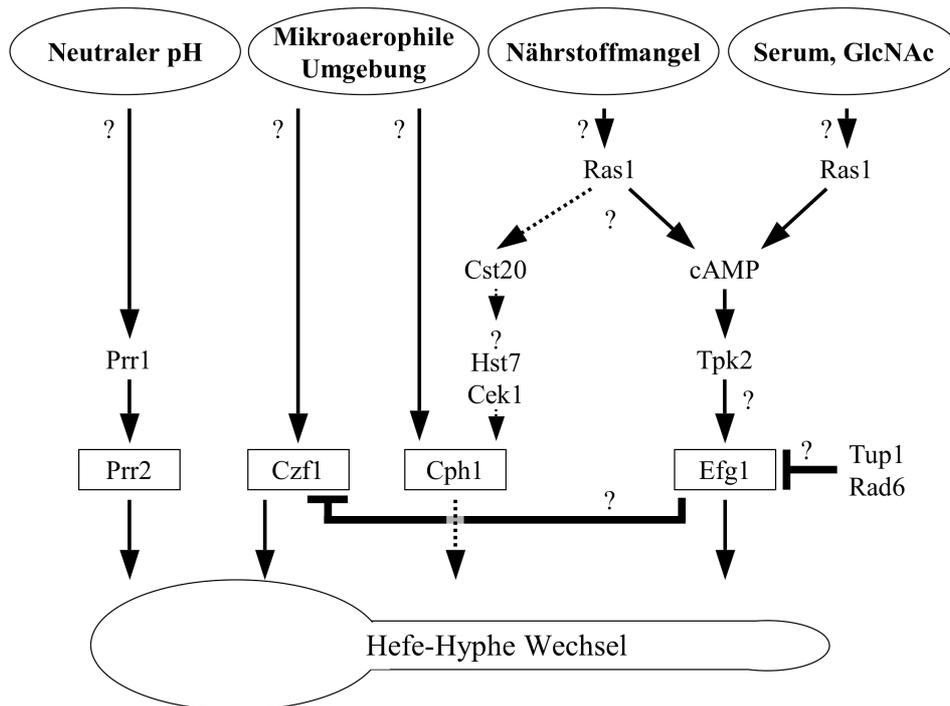


Abbildung 1: Hypheninduzierende Signaltransduktion in *C. albicans*. (nach Ernst 2000)

Transkriptionsfaktor Efg1p (Stold *et al.*, 1997; Sonneborn *et al.*, 2000). Durch Nährstoffmangel wird ebenfalls der MAP-Kinase-Signalweg induziert, in dem die Kinasen Cst20p, Hst7p und Cek1p involviert sind (Leberer *et al.*, 1996, Csank *et al.*, 1998). Cph1p ist ein Transkriptionsfaktor, der über diesen Weg aktiviert wird (Liu *et al.*, 1994). Weitere Transkriptionsfaktoren der Hyphenbildung sind bei neutralem pH-Wert Prr2p (Ramon *et al.*, 1999) sowie Czf1p unter mikroaerophilen Bedingungen (Brown *et al.*, 1999). Efg1 besitzt neben seiner Rolle als positiver Regulator der Hypheninduktion unter Serum und Nährstoffmangel auch eine Repressorfunktion des Hyphenwachstums bei mikroaerophilen Bedingungen (Sonneborn *et al.*, 1999). Daneben sind weitere Repressoren der Hyphenbildung bekannt, die bei der Aufrechterhaltung der Hefeform unter nicht induzierenden Bedingungen, wie niedriger pH und Temperatur, hohe Zelldichte sowie hoher Glukosekonzentration im Medium involviert sind. Ein Beispiel dafür ist der Transkriptionsfaktor Tup1p, der bei der Repression von Efg1p eine Rolle spielt (Braun & Johnson, 1997 und 2000). Bei der Suche nach Proteinen, die während der Hypheninduktion exprimiert werden und Bedeutung für die Virulenz von *C. albicans* besitzen, wurden verschiedene Zellwandproteine identifiziert, darunter Hwp1p, Hyr1p, Als3p und Ece1p aber auch sekretierte Aspartatproteasen (SAP4-6) (Birse *et al.*, 1993; Hube *et al.*, 1994; Bailey *et al.*, 1996; Hoyer *et al.*, 1998; Staab *et al.*, 1999). Die Regulation dieser Proteine durch die obengenannten Signalwege und Transkriptionsfaktoren ist bisher noch unklar. Der vakuoläre

Transport beeinflusst ebenfalls die Hyphenbildung von *C. albicans*. So ist die Phosphatidylinositol 3-Kinase CaVps34p, die eine Schlüsselfunktion im Transport zur Vakuole besitzt, in die Regulation des cAMP-Signalweges sowie in die Hyphenbildung unter Sauerstoffmangel involviert. Das Fehlen von CaVps34p führt in *C. albicans* zu einem starken Anstieg der Transkription des Transkriptionsfaktors Czf1p.

1.3 Phosphatidylinositol 3-Kinasen

Phosphatidylinositol 3-Kinasen (PI 3-Kinasen) bilden eine große Familie evolutionär konservierter Enzyme, die in einer Vielzahl von Zellfunktionen involviert sind, wie intrazellulärer Vesikeltransport, Wachstum, Metabolismus, Proliferation, Apoptoseschutz, Differenzierung und „rearrangement“ des Zytoskellets (Shepherd *et al.*, 1998). Sie phosphorylieren die 3'-Position des Inositolrings von Phosphoinositiden (Abb. 2).

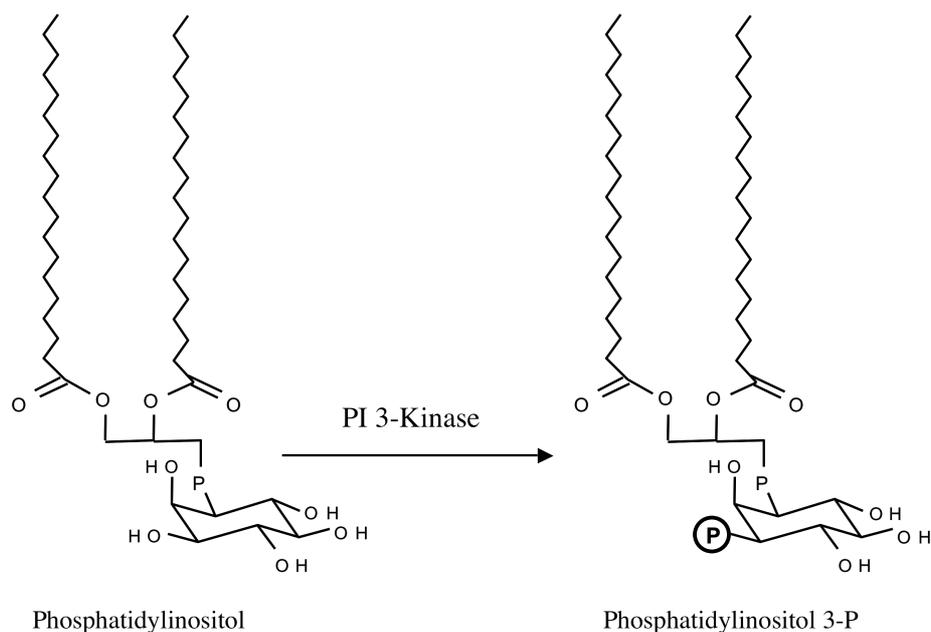


Abbildung 2: 3'-Phosphorylierung von Phosphatidylinositol.

Aufgrund der Struktur der Proteine und ihres *in vitro* Lipidsubstrates werden drei Klassen unterschieden (Vanhaesebroeck *et al.*, 1997; Wymann & Pirola, 1998). Klasse I PI 3-Kinasen phosphorylieren PtdIns, PtdIns 4-P und PtdIns(4,5)P₂ und zeigen damit die breiteste Lipidsubstratspezifität. Klasse IA PI 3-Kinasen interagieren mit Adaptorproteinen, die durch zwei Src-Homologie-2-Domänen mit Phosphotyrosinen wechselwirken und somit eine Verbindung zu Tyrosinkinase Signalwegen herstellen. Die Klasse IB PI 3-Kinase p110 γ ist

mit dem Adaptorprotein p101 assoziiert und interagiert mit der G $\beta\gamma$ Untereinheit der G-Proteine. Klasse I PI 3-Kinasen interagieren ebenfalls mit dem kleinen GTP-bindenden Protein Ras. Die *in vitro*-Lipidsubstrate der Klasse II PI 3-Kinasen sind PtdIns und PtdIns 4-P. Diese Proteingruppe beinhaltet große Moleküle (>170 kDa) und zeichnet sich durch eine C-terminale C2-Domäne aus. Die PI 3-Kinasen der Klasse III sind Homologe von Vps34p, das zuerst in *Saccharomyces cerevisiae* beschrieben wurde, und können nur PtdIns als Lipidsubstrat umsetzen. Sowohl in *C. albicans* als auch in *S. cerevisiae* stellt Vps34p die einzige PI 3-Kinase dar. Vps34p Proteine sind am intrazellulären Vesikeltransport zur Vakuole beteiligt und interagieren mit einer Serin/Threonin Proteinkinase (Vps15p) (Stack & Emr, 1994). Bei den PI 3-Kinasen der Klassen I und III ist *in vitro* eine intrinsische Proteinkinaseaktivität nachgewiesen. Untersuchungen der Klasse I PI 3-Kinasen p110 β , p110 δ und p110 γ belegten eine Phosphorylierung des jeweils letzten Serinrestes am C-Terminus der Proteine (Vanhaesebroeck *et al.*, 1999; Czupalla *et al.*, 2003). Vps34p zeigt *in vitro* ebenfalls eine intrinsische Proteinkinaseaktivität, die Autophosphorylierungsstelle wurde jedoch noch nicht lokalisiert. Zu den PI 3-Kinase verwandten Kinasen, die zwar eine Proteinkinaseaktivität aufweisen aber nicht in der Lage sind ein Lipidsubstrat zu phosphorylieren, gehören TOR Proteine (Target of Rapamycin) der Hefe und das humane Homolog FRAP.

Die Proteinstruktur der PI 3-Kinasen zeigt vier Homologieregionen (HR, Abb. 3) (Zvelebil *et al.*, 1995). HR1 umfasst die katalytische Domäne. In ihr sind die meisten konservierten Regionen der PI 3-Kinasen zu finden. Dazu gehören Sequenzen, die an der ATP-Bindung und dem Phosphattransfer involviert sind sowie Bindestellen für das Lipidsubstrat. Eine Region, die für die Interaktion mit der polaren Inositolkopfgruppe der Phosphoinoside

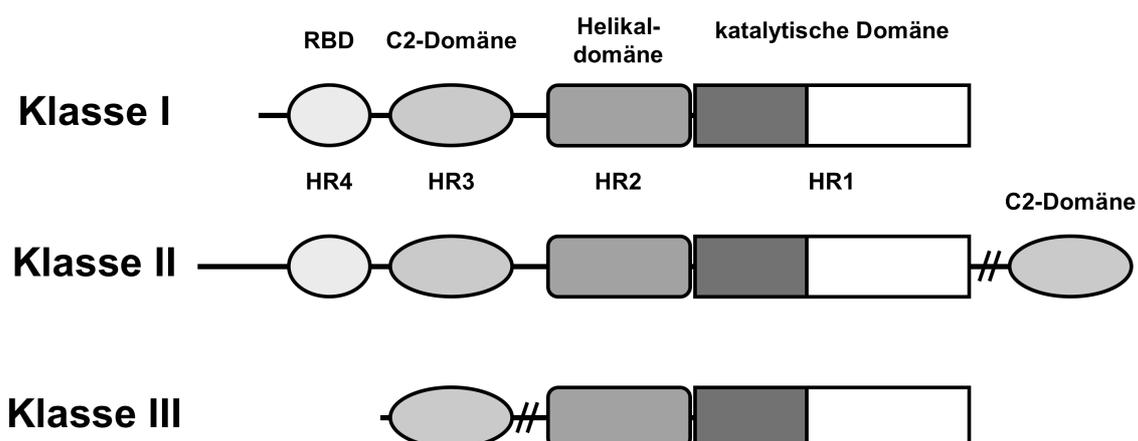


Abbildung 3: Domänenstruktur der PI 3-Kinasen. HR: Homologieregion, RBD: Ras-Bindedomäne (nach Walker *et al.*, 1999).

entscheidend ist, wurde in Studien an den PI 3-Kinasen der Klasse I identifiziert (Bondeva *et al.*, 1998; Pirola *et al.*, 2001). Diese liegt zwischen dem innerhalb der PI- und Proteinkinasen hochkonservierten DFG-Motiv (Asparaginsäure-Phenylalanin-Glycin) und einem für den Phosphattransfer auf das Lipidsubstrat erforderlichen Lysin-Rest [Lysin⁸⁰² in p110 α und Lysin⁸³³ in p110 γ (Wymann *et al.*, 1996; Stoyanova *et al.*, 1997)]. Die Bedeutung der Aminosäuresequenz dieser Region hinsichtlich der Substratspezifität ist bei den Klasse I PI 3-Kinasen p110 γ und p110 α belegt (Bondeva *et al.*, 1998; Pirola *et al.*, 2001). Die Mitglieder der Klasse III PI 3-Kinasen, wie das in dieser Arbeit untersuchte CaVps34p Protein, zeichnen sich durch die Kürze der Region sowie durch die große Anzahl darin befindlicher Prolinreste aus.

In Studien von Vps34p aus *S. cerevisiae* konnte durch Punktmutationen der Aminosäuren Asp⁷³¹, Asp⁷³⁵, Asn⁷³⁶ und Asp⁷⁴⁹ in der katalytischen Domäne die Lipidkinase- nur zusammen mit der Autophosphorylierungsaktivität des Proteins ausgeschaltet werden (Stack & Emr, 1994). Anzumerken ist, dass Asp⁷⁴⁹ Teil des hochkonservierten DFG-Motives in ScVps34p ist. Die erwähnten Aminosäuren sind somit für die Interaktion mit ATP und/oder für die Übertragung des Phosphatrestes sowohl auf das Lipidsubstrat als auch, im Falle der Autophosphorylierung, auf das Protein selbst erforderlich.

Weitere Homologieregionen sind HR2, die in allen PI 3- und PI 4-Kinasen konserviert ist, sowie die für PI 3-Kinasen spezifische Domäne HR3. Die Ras-Bindedomäne HR4 ist nur bei den PI 3-Kinasen der Klasse I zu finden.

1.4 Intrazellulärer Vesikeltransport zur Vakuole in *S. cerevisiae*

Die Vakuole der Hefezelle stellt ein Äquivalent des Lysosoms tierischer Zellen bzw. der Vakuole der Pflanzen dar. *S. cerevisiae* dient als Modellorganismus für den Vesikeltransport zu diesem Organell. Die Vakuole der Hefe besitzt einen sauren pH-Wert, der durch die Protonenpumpe vakuoläre ATPase (vATPase) generiert wird. Die Aufgabe in Degradationsprozessen der Zelle erfüllt die Vakuole durch eine Vielzahl von Enzymen, wie Endo- und Exoproteasen, Ribonukleasen, Polyphosphatasen, α -Mannosidase, Threalase und alkalische Phosphatase (ALP). Die Vakuole dient ebenfalls als Speicherorganell für zelluläre Nährstoffe sowie als Reservoir für mono- und divalente Kationen, womit ihre Funktion in Entgiftungsprozessen korreliert. Defekte in der Vakuolenfunktion führen zu Proteinfehlverteilung und Störungen der Ionenhomöostase, was wiederum Störungen in der Osmoregulation und Sporulation bedingt (Jones *et al.*, 1997; Conibear & Stevens, 1998; Klionsky, 1998). In genetischen und biochemischen Untersuchungen von *S. cerevisiae*

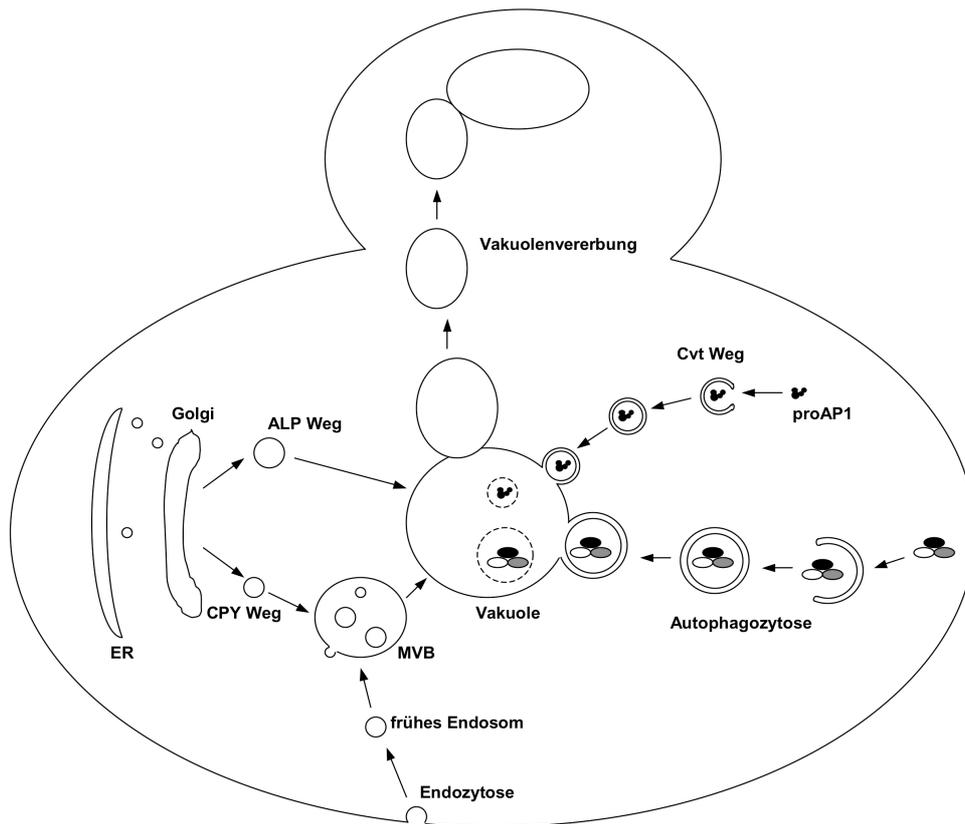


Abbildung 4: Vesikeltransport in *S. cerevisiae*. ALP: alkalische Phosphatase, CPY: Carboxypeptidase Y, Cvt: cytoplasma-to-vacuole targeting, MVB: multivesicular body, proAP1: pro Aminopeptidase 1.

konnten über 500 offene Leserahmen („open reading frame“, ORF) identifiziert werden, deren Produkte direkt oder indirekt in Funktion bzw. Biogenese der Vakuole involviert sind.

In der Hefezelle existieren verschiedene Transportwege zur Vakuole (Kucharczyk & Rytka, 2001) (Abb. 4). Neu syntetisierte Proteine, wie vakuoläre Hydrolasen, werden vom Endoplasmatischen Retikulum (ER) durch den Golgiapparat zum späten Golgi und von dort zur Vakuole transportiert. Weiterhin gelangen Bestandteile der Zellmembran sowie der extrazellulären Umgebung durch Endozytoseprozesse zur Vakuole. Diese beiden Wege überlappen im „multivesicular body“ (MVB). Der ALP Weg, auf dem alkalische Phosphatase zur Vakuole transportiert wird, umgeht das MVB. Des Weiteren existieren zwei Transportwege die Bestandteile des Zytoplasmas zur Vakuole befördern. Die Aminopeptidase 1 (AP1) wird über das so genannte „cytoplasma-to-vacuole targeting“ (Cvt) transportiert. Dieser Prozess überlappt mit der Autophagozytose, durch die unselektiv zytoplasmatische Proteine und Organellen zur Vakuole gelangen und dort abgebaut und recycelt werden. Ein neuer Vesikeltyp, Vakuolen-Import-und-Degradations-Vesikel (Vid) genannt, ist für den Transport von zum Abbau vorgesehener Fruktose-1,6-Bisphosphatase

(FBPase) zur Vakuole verantwortlich. Ionen und kleine Moleküle erreichen die Vakuole durch Fluidphasen-Endozytose. Abgesehen von dem anterograden Transport von Proteinen zur Vakuole existiert ebenfalls ein retrograder Transport zu früheren Kompartimenten. Daneben wird 50% des vakuolären Materials während der Zellteilung von der Mutter- auf die Tochterzelle übertragen. Es sind eine Vielzahl von Proteinen, die eine Rolle in der Vakuolenfunktion und dem Proteintransport spielen, bekannt. Die Hauptproteinklassen sind Vps (vacuolar protein sorting), Vac (vacuole partitioning), Apg (Autophagozytose), End (Endozytose) und Vid (vacuolar import and degradation) (Catlett & Weismann, 2000; Kim & Klionsky, 2000; Sorkin, 2000; Shieh *et al.*, 2001, Kucharczyk & Rytka, 2001). Die *vps*-Mutanten werden abhängig von ihrem Phänotyp in sechs Gruppen eingeteilt (Tab. 1; Raymond *et al.*, 1992).

Klasse	Phänotypen der Mutanten
A	Wildtyp oder leicht veränderte Vakuolen
B	fragmentierte Vakuolen, Fehlverteilung vakuolärer Proteine
C	Verlust einer organisierten Vakuole, verstreute intrazelluläre Lokalisation vakuolärer Membranproteine, defekte CPY-Verteilung
D	Defekte der Vakuolenvererbung und –ansäuerung, ALP verstreut in den Membranen des MVBs
E	Vakuolen ähnlich wie der Wildtyp, stark ausgeprägte und angesäuerte prävakuoläre Kompartimente, ALP in der Vakuole lokalisiert
F	große, zentrale Vakuolen umgeben von kleinen vakuolenähnlichen Kompartimenten, starke CPY-Verteilungsdefekte

Tabelle 1: Morphologische Klassifikation der *vps* Mutanten. (nach Raymond *et al.*, 2001).

Das Grundprinzip des Transportprozesses zur Vakuole besteht in der Abschnürung von Vesikeln eines Donororganells und dem anschließenden Vesikeltransport, wodurch Moleküle vom Ort der Vesikulation zu einem spezifischen Empfängerorganell gelangen. Die selektive Sortierung der Ladung in Vesikel und der präzise Transport zur Bestimmungsstelle wird mittels eines Proteinmantels, der um die Vesikel gebildet wird und aus sogenannten

Coatomer-Proteinen (COP) besteht, vermittelt. Der Proteinkomplex COP1 ist dabei für den retrograden Transport vom Golgi zum ER, COP2 für den anterograden Transport vom ER zum Golgi erforderlich. Ein Clathrin-Mantel wiederum ist in den Knospungsprozess von Vesikeln am Golgi mit dem MVB als Bestimmungsort, involviert. Letztlich wird die Lieferung zum Empfängerorganell über Membranerkennung, gefolgt vom Andocken und der Fusion der Vesikel, erreicht. Am Prozess des Andockens sind membranverankerte Proteine, so genannte SNARE-Proteine („soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein attachment protein receptor“), beteiligt (Sollner *et al.*, 1993; Weber *et al.*, 1998, Pelham *et al.*, 1999). Für die Membraninteraktion zweier Kompartimente sind zwei SNARE Familien essentiell: vSNAREs (Synaptobrevin verwandte Rezeptoren der Vesikelmembran) und tSNAREs (Plasmamembran Syntaxin verwandte Rezeptoren der Zielmembran). Eine Schlüsselrolle bei verschiedenen Phasen des Vesikeltransports besitzen kleine monomere GTPasen, Rab in Säugerzellen und Ypt in Hefe, deren aktivierte, membranassoziierte, GTP-gebundene Form die Funktion des SNARE-Komplex beeinflusst (Zerial & McBride, 2001).

Der vesikelvermittelte Transport neusynthetisierter Proteine beginnt in *S. cerevisiae* mit der Vesikelbildung am ER, gefolgt vom Andocken und der Fusion mit der Golgimembran. An diesem Prozess sind Proteine der Sec-Gruppe (abgeleitet von Sekretions-Mutanten) beteiligt. Sie spielen unter anderem auch bei der Ausbildung des COP2 Komplexes eine Rolle (Barlowe, 1997; Peng *et al.*, 1999; Klumperman, 2000). Die genauen Mechanismen der Selektion der Ladung in den knospenden Vesikel sind bisher noch unklar. Eine andere Gruppe von Proteinen vermittelt das Andocken und die Fusion der Vesikel mit der frühen Golgimembran. Der hochkonservierte Multiproteinkomplex TRAP (Transport-Protein-Partikel) stellt die Verbindung zwischen ER zum Golgi her, während das Andocken durch die GTPase Ypt1p vermittelt und für die Fusion mit der Golgimembran SNARE-Proteine verantwortlich sind (Stone *et al.*, 1997; Singer-Kruger *et al.*, 1998; Barrowman *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2000). Zwei weitere Ypt-Proteine sind am inter-Golgitransport beteiligt (Benli *et al.*, 1996). Ein kritischer Schritt des Vesikeltransports findet am späten Golgi statt. In diesem Stadium zweigen sich fünf Routen ab: zwei parallele Wege zur Zelloberfläche (Harsay & Bretscher, 1995), der retrograde Weg zum ER bzw. frühen Golgi (Harris & Waters, 1996) und zwei Wege zur Vakuole, einer unter Einbeziehung des MVB (CPY-Weg) sowie der alternative ALP-Weg (Bryant & Stevens, 1998). Die Komplexität der verschiedenen Wege erfordert ein hohes Maß an Regulation. Die GTPase Vps1p ist in beide Transportwege zur Vakuole involviert (Finken-Eigen *et al.*, 1997). Zwei GTP-bindende Proteine Arf1 und Arf2 rekrutieren den COP1 Komplex an die Golgimembran. An der Bildung von „Clathrin coated“-Vesikel, die Proteine zum MVB transportieren, sind neben Clathrin die PI 3-Kinase Vps34p sowie die Proteinkinase Vps15p beteiligt (Conibear & Stevens, 1995). Beide Kinasen funktionieren

innerhalb eines membranassoziierten Proteinkomplexes, in dem die Proteine Vps30p und Vps38p involviert sind (Kihara *et al.*, 2001). Der Transport vom späten Golgi zum MVB hängt von einer Vielzahl von Proteinen ab, wobei vor allem Vps-Proteine eine entscheidende Rolle einnehmen. Bei einigen Proteinen ist eine Assoziation mit SNAREs nachgewiesen, darunter das Sec1-like Protein Vps45p, die Ytp-GTPase Vps21p und ihr Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor (GEF) sowie Vps8p, Vps3p und das PtdIns 3-P bindende Vac1p (Tall *et al.*, 1999; Gotte & Lazar, 2000). Am retrograden Transport vom MVB zum Golgi ist ein sogenannter Retromerkomplex involviert (Conibear & Stevens, 2000).

Beim Transport neusynthetisierter Proteine vom ER zur Vakuole ist die Prozessierung der vakuoläre Hydrolase Carboxypeptidase Y (CPY) am besten charakterisiert (Jones *et al.*, 1997; Bryant & Stevens, 1998). CPY wird am ER als inaktives präproCPY-Protein synthetisiert und wird im Laufe der Transportprozesse vom ER-Lumen über Golgiapparat und MVB durch Glykosylierung und Proteolyse vielfach modifiziert, bis das reife mCPY-Protein in der Vakuole vorliegt. Im späten Golgi erfolgt die Sortierung durch den CPY-Rezeptor Vps10p. Der CPY-Vps10p-Komplex erreicht durch einen Vps45p abhängigen Transportprozess das MVB, wo CPY von seinem Rezeptor dissoziiert und später die Vakuole erreicht, während Vps10p zurück zum Golgi transportiert wird.

Das MVB stellt ebenfalls ein Kompartiment der Endozytose dar. Die Endozytose ist ein wichtiger Prozess des Membrantransportes von der Plasmamembran zur Vakuole. Dieser Mechanismus ermöglicht der Zelle unter anderem die Regulation der Funktion einer Vielzahl von Plasmamembranproteinen. In *Saccharomyces* werden z.B. der Transporter des α -Faktors Ste6p, der Multidrugtransporter Pdr5p und die Mating-Pheromon Rezeptoren Ste2p und Ste3p konstitutiv endozytiert und so in Reaktion auf einen externen Stimulus von der Zelloberfläche entfernt (Berkower *et al.*, 1994; Egner *et al.*, 1995; Loayza *et al.*, 1998; Bryant & Stevens, 1998, Odorizzi *et al.*, 1998; Reggiori & Pelham, 2001). Den Beginn der Endozytose stellt die Internalisation an der Plasmamembran dar. Ein gut untersuchtes Signal dieses Prozesses in der Hefe ist die Ubiquitinierung. So führt die Bindung von einem oder wenigen Ubiquitinen an ein Plasmamembranprotein zur Erkennung durch die endozytische Maschinerie und den gerichteten Transport zur Vakuole, wo die Degradation des Proteins stattfinden kann (D'Hondt *et al.*, 2000; Rotin *et al.*, 2000; Sorkin *et al.*, 2000). Unklar ist allerdings noch wie die Ubiquitinierung die Erkennung vermittelt. Die Bildung von Vesikeln an der Plasmamembran stellt den ersten Schritt der Endozytose dar. Untersuchungen an Säugerzellen belegen eine Vesikulation an Clathrin-markierten Membranabschnitten und die Internalisierung durch Interaktion von Clathrin, der GTPase Dynamin, Amphiphysin und dem Tyrosinkinase Substrat Eps15p (McMahon *et al.*, 1997). In Hefezellen unterscheidet sich dieser Prozess dahingehend, dass hier die Internalisierung von Aktin sowie aktinassoziierten

Proteinen und Lipiden abhängt. An der Endosomenfusion ist in Säugerzellen die kleine GTPase Rab5 und das PtdIns 3-P bindende Eae1p beteiligt (Cavalli *et al.*, 2001). Die entsprechenden Hefehomologe: Vps21p sowie Vac1p, regulieren den endozytischen und biosynthetischen Weg zum MVB in *S. cerevisiae*. Am MVB wurde mit ESCRT-I („endosomal sorting complex required for transport“) ein Proteinkomplex nachgewiesen werden, der für die Erkennung der ubiquitinierten Ladung notwendig ist (Katzmann *et al.*, 2001; Babst *et al.*, 2002a, b).

Den Prozess des Andockens und der Fusion des MVB mit der Vakuolenmembran sowie die Fusion von Vakuolen untereinander vermittelt ein sehr großer vakuolenassoziierter Komplex. In diesem vakuoläre tSNARE-Komplex spielt Vam3p und das PtdIns 3-P bindende Protein Vam7p eine entscheidende Rolle (Pelham *et al.*, 1999). Verschiedene Vps-Proteine der Klasse C interagieren dabei mit Vam3p und vermitteln die Assoziation des tSNARE-Komplexes während der Prozesse des Andockens und der Fusion des MVB mit der Vakuole, der ALP- und API-Vesikel mit der Vakuole sowie der Vakuolenfusion untereinander. Der Klasse C-Vps-Komplex interagiert dabei mit der Rab-GTPase Ypt7p (Price *et al.* 2000; Sato *et al.*, 2000; Wurmser *et al.*, 2000).

Der ALP-Weg stellt einen MVB-unabhängigen Transportweg neusynthetisierter Proteine dar. Dabei ist eine zweite Vesikelklasse involviert, bei der Clathrin nicht den Sortierungsschritt am späten Golgi vermittelt, stattdessen aber der AP-3 Adaptorproteinkomplex erforderlich ist. Dieser Komplex wird durch Vps41p sowie die Arf-GTPase reguliert (Cowles *et al.*, 1997; Stepp *et al.*, 1997).

Bei der Autophagozytose, einem Recyclingprozess von Zellbestandteilen, werden Zytoplasma und Zellorganellen mit einer Doppelmembran umgeben und zur Vakuole transportiert (Abeliovich & Klionsky, 2001; Huang & Klionsky, 2002; Reggiori & Klionsky, 2002). Reguliert wird dies durch die Aktivität verschiedener Kinasen, Phosphatasen und GTPasen. Nährstoffmangel oder eine Behandlung mit Rapamycin, einem Inhibitor des TOR-Signalweges, induzieren die Autophagozytose. In *Saccharomyces* wurden verschiedene *aut* und *apg* Mutanten identifiziert, die Defekte in der Autophagozytose aufweisen. Prinzipiell können bei der Autophagozytose fünf Schritte unterschieden werden: eine Tor-Kinase abhängige Induktion, die Bildung von Autophagosomen, das Andocken und die Fusion mit der Vakuole sowie der Aufschluss der Autophagosomen in der Vakuole. In die Bildung der Autophagosomen ist unter anderem die PI 3-Kinase Vps34p involviert. Vps34p bildet dabei einen Proteinkomplex mit den Proteinen Vps15p, Vps30p und Apg14p (Kihara *et al.*, 2001). Für den Transport der Autophagosomen zur Vakuole sind Mikrotubulien verantwortlich. Aut2p und Aut7p sind mikrotubuliassoziierte Proteine der Hefezelle (Lang *et*

al., 1998). Der vakuoläre tSNARE-Komplex ist für den Prozess des Andockens und der Fusion mit der Vakuole erforderlich. Er beinhaltet Proteine, die auch bei anderen Transportwegen vorkommen, wie Vam3p und Vam7p (Klionsky & Emr, 2000). Der letzte Schritt der Autophagozytose ist das Aufbrechen der Autophagosomen in der Vakuole. Dadurch ist ein Abbau sowohl der Vesikel als auch ihres zytoplasmatischen Inhalts möglich. Dabei ist das integrale Protein der Vakuolenmembran Aut4p für die Desintegration der Vesikel in der Vakuole essentiell (Suriapranata *et al.*, 2000).

Der Cvt-Signalweg reguliert den Transport von Proteinen, die an freien Ribosomen synthetisiert werden, zur Vakuole. Ein Markerprotein für diesen Transportweg ist AP1. Auch im Cvt-Weg erfolgt der Transport durch Doppelmembranvesikel und endet mit der Vesikellyse im Vakuolenlumen. Der Cvt-Weg ist eng mit der Autophagozytose verwandt. Dennoch existieren Unterschiede, was durch die Identifizierung von *S. cerevisiae cvt* und *aut* Mutanten mit unterschiedlichem Phänotyp belegt werden konnte (Klionsky, 1998; Hutchins & Klionsky, 2001).

Die Fusion von Vakuolen untereinander ist verwandt mit den vakuolären Transportprozessen. Bei einer homotypischen Vakuolenfusion sind ähnlich wie bei der heterotypischen Vesikel-Vakuolen Fusion die Interaktion von tSNARE- und vSNARE-Komplexe entscheidend (Grotte & Lazar, 1999).

Für den intrazellulären Vesikeltransports sind neben Proteinen auch Lipide von entscheidender Bedeutung. Dabei besteht ihr Einfluss neben der Bildung sogenannter Lipidrafts, die Membranabschnitte gliedern, auch darin, dass sie sowohl Substrat von Lipidkinasen bzw. -phosphatasen als auch Bindepartner von Proteinen darstellen. Besondere Bedeutung haben in diesem Zusammenhang die Phosphoinoside, deren Inositolkopfgruppe an verschiedenen Positionen phosphoryliert sein kann. PtdIns(4,5)P₂ spielt eine Rolle im Internalisationsschritt der Clathrin-vermittelten Endozytose (McPherson *et al.*, 1996; Micheva *et al.*, 1997) während PtdIns 3-P an späten Endozytoseschritten sowie am endosomalen/vakuolären Transport beteiligt ist (Wurmser & Emr, 1998). Die Synthese von PtdIns(3,5)P₂ wiederum ist mit Sortierungsprozessen im MVB gekoppelt. Es ist allerdings unklar auf welche Weise dieses Lipid in die Membraninvagination im MVB involviert ist. Mehrere Binderegion für Phosphoinoside sind bekannt. Dazu gehören die FYVE-Domäne (Fab1, YGL023, Vps27 und EEA1) von Vac1p, Vps27p und Fab1p (Burd & Emr, 1998; Misra & Hurley, 1999; Sankaran *et al.*, 2001; Stahelin *et al.*, 2002) sowie die Phagozyten-NADPH-Oxidase Homologie-Domäne (Phox, PX) von Vam7p, Vps5p und Vps17p (Cheever *et al.*, 2001; Burda *et al.*, 2002). Sphingolipide bilden zusammen mit Ergosterol eine Sterol-Sphingolipid-reiche Domäne in der Plasmamembran und grenzen

dadurch einen Membranabschnitt räumlich ab, was bei der Rekrutierung der endozytotischen Maschinerie entscheidend ist (Bagnat *et al.*, 2000; Simonsen *et al.*, 2001).

1.5 CaVps34p und der Vesikeltransport in *C. albicans*

Der vakuoläre Vesikeltransport ist eng mit der Virulenz von *C. albicans* verknüpft. Bisher liegen nur wenige Untersuchungen zum Vesikeltransport in *C. albicans* vor. Diese belegen allerdings deutliche Unterschiede zu den Transportprozessen in *S. cerevisiae*.

Eine zentrale Rolle in der Regulation des Vesikeltransportes nimmt CaVps34p ein. CaVps34p ist eine 118 kDa große PI 3-Kinase mit zwei Enzymaktivitäten, die auf PtdIns als Lipidsubstrat beschränkte Lipidkinaseaktivität sowie eine intrinsische Proteinkinaseaktivität (Eck *et al.*, 2000; Günther *et al.*, 2005). Eine Interaktion von CaVps34p mit Vma7p, einer Untereinheit der vakuolären ATPase, ist *in vitro* nachgewiesen (Eck *et al.*, im Druck). Die Interaktion von CaVps34p mit der Serin/Threonin Proteinkinase Vps15p aus *C. albicans* ist im Zwei-Hybrid-System belegt (unveröffentlichte Daten, Eck *et al.*). Diese Proteininteraktion unterscheidet sich wesentlich von der in *S. cerevisiae*. Bei *S. cerevisiae* ist der C-Terminus von Vps15p essentiell für die Interaktion mit Vps34p (Budovskaya *et al.*, 2002) während bei *C. albicans* sowohl der C- als auch der N-Terminus von CaVps15p an der CaVps34p-Bindung involviert ist. *Candida*-Homologe von Vps30p, Vps38p und Apg14p, die in *S. cerevisiae* einen Proteinkomplex mit Vps34p bilden (Kihara *et al.*, 2001), existieren im *C. albicans*-Genom nicht.

Die *C. albicans vps34* Nullmutante besitzt neben Defekten in der Endozytose, Autophagozytose und des CPY-Transports auch Störungen der Kernverteilung und eine stark veränderte Vakuolenmorphologie, was sich in einer abnormen Größe und in einem Ansäuerungsdefekt dieses Organells zeigt. Daneben tritt eine Hyphenbildungsstörung, sowohl nach Induktion durch Serum als auch durch Nährstoffmangel, eine verstärkte Stresssensitivität und Antibiotikaresistenz sowie Defekte in der Adhäsion an Wirtszellen und eine reduzierte Sekretion von SAP's (sekretierte Aspartatproteasen) auf. Diese Defekte haben eine Avirulenz der *vps34* Nullmutante im Maus-Candidosis Modell zur Folge (Bruckmann *et al.*, 2000 und 2001; Eck *et al.*, im Druck).

Die Generierung des „second messenger“ PtdIns 3-P durch CaVps34p stellt einen Weg der Signaltransduktion mit Beteiligung von CaVps34p dar. Die PI 3-Phosphat 5-Kinase CaFab1p ist in den Vesikeltransport involviert und benötigt PtdIns 3-P als Lipidsubstrat zur Generierung von PtdIns(3,5)P₂. Die *fab1* Nullmutante weist wie die *vps34* Nullmutante stark vergrößerte Vakuolen und einen Ansäuerungsdefekt dieses Organells sowie einen Kernverteilungsdefekt auf (Augsten *et al.*, 2002). Auch ist die *fab1* Nullmutante wie die *vps34*

Nullmutante nicht in der Lage Hyphen unter Serum bzw. Nährstoffmangel auf festem Medium auszubilden. Es existieren aber auch Unterschiede der Phänotypen der beiden Nullmutanten. So zeigt die *fab1* Nullmutante weder eine verstärkte Sensitivität auf Temperatur- und hyperosmotischen Stress noch einen Adhäsionsdefekt an Wirtszellen im Gegensatz zur *vps34* Nullmutante. Untersuchungen der *fab1* Nullmutante im Maus-Candidosis Modell belegen, dass Fab1p nicht für die Virulenz von *C. albicans* erforderlich ist. Deutliche Unterschiede zeigen sich hinsichtlich der Zellfunktion von Fab1p in *C. albicans* und *S. cerevisiae*. So ist Fab1p, in die Osmoregulation von *Saccharomyces* involviert, während in *C. albicans* dies nicht der Fall ist.

CaVac1p ist ein weiteres Protein des Vesikeltransportes von *C. albicans* mit PtdIns 3-P bindender FYVE-Domäne und wird momentan untersucht (unveröffentlichte Daten, Franke K., Nguyen M., Zipfel P. F., Künkel W., Eck R.). Auch bei der *vac1* Nullmutante zeigen sich Defekte im Vesikeltransport und bei Virulenzfaktoren wie Hyphenbildung und Adhäsion. Die Avirulenz der *vac1* Nullmutante lässt einen Virulenz beeinflussenden Signalweg vermuten in dem Vac1p downstream von CaVps34p wirkt.

Die Untereinheit der vakuolären ATPase Vma7p zeigt eine Bindung an CaVps34p die im Zwei-Hybrid-System und durch *in vitro* Studien der Proteininteraktion nachgewiesen ist (Eck *et al.*, im Druck). Vma7p ist im Vesikeltransport von *C. albicans* involviert. So zeigt die *vma7* Nullmutante Defekte der Endozytose, Vakuolenansäuerung und beim Wachstum im alkalischen Medium, die mit der *vps34* Nullmutante vergleichbar sind. Die *vma7* Nullmutante zeigt ebenfalls Defekte des Hyphenwachstums, eine erhöhte Sensitivität gegenüber Metallionen und ist avirulent im Mausmodell für systemische Candidiasis (Polterman *et al.*, im Druck).

Neben CaVps34p und den Proteinen die unmittelbar mit dessen Funktion verknüpft sind, stellt Vps11p das einzig weitere charakterisierte Protein des Vesikeltransportes in *C. albicans* dar. Die *vps11p* Nullmutante zeigt eine zeitliche Verzögerung bei der Entwicklung echter Hyphen sowie eine reduzierte Sekretion von SAP's (sekretierte Aspartatproteasen) und Lipasen (Palmer *et al.*, 2003).

Aufgrund der Bedeutung des vakuolären Transports im Virulenzgeschehen und der Tatsache, dass eine Übertragung von Erkenntnissen vom Vesikeltransport in *S. cerevisiae* auf *C. albicans* nicht ohne weiteres möglich ist, sind weitere Untersuchungen in *C. albicans* erforderlich, um diese Zellfunktionen genauer zu bestimmen.

1.6 Zielstellung

CaVps34p ist ein multifunktionelles Protein des vakuolären Transportes, das die Virulenz von *C. albicans* beeinflusst. Der Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist die Untersuchung der Enzymaktivität der PI 3-Kinase CaVps34p. Da bei CaVps34p sowohl eine Lipid- als auch eine intrinsische Proteinkinaseaktivität nachgewiesen ist, über deren Rolle sowohl in *C. albicans* als auch in *S. cerevisiae* kaum Erkenntnisse vorliegen, sollen beide Enzymfunktionen unabhängig voneinander betrachtet werden.

Den Ausgang bildet die Generierung rekombinanter CaVps34p Proteinmutanten. Bei diesen Mutanten werden vermutete Lipidsubstratbindestellen modifiziert sowie Aminosäurereste, die potentielle Ziele für die intrinsische Proteinkinaseaktivität darstellen, verändert. Die nachfolgenden *in vitro*-Enzymtests auf Lipid- und Proteinkinaseaktivität dieser Proteinmutanten sollen zeigen, ob das Ziel, Enzymfunktionen spezifisch auszuschalten, erreicht wurde. Nach erfolgreicher Generierung einer CaVps34p Proteinmutante ohne Lipidkinase- aber mit Autophosphorylierungsaktivität sollen *in vivo*-Untersuchungen folgen, um den Einfluss der Enzymaktivitäten auf die Funktion von CaVps34p in *C. albicans* zu untersuchen. Zu diesem Zweck ist es notwendig, eine *C. albicans VPS34* Lipidkinasemutante herzustellen, bei der nur das mutierte CaVps34p exprimiert wird. Anschließend wird die Lipidkinasemutante phänotypisch charakterisiert und mit der *vps34* Nullmutante sowie dem *C. albicans* Wildtyp verglichen. Es werden Aufschlüsse über die Rolle der Lipidkinaseaktivität von CaVps34p erwartet. Aber auch die Bedeutung anderer, auch in *S. cerevisiae* kaum untersuchter Funktionen des Proteins, wie z.B. die Proteinkinaseaktivität aber auch Wechselwirkungen durch Protein-Protein-Interaktionen von CaVps34p soll aufgeklärt werden.

2. Material und Methoden

2.1 Stämme und Kultivierung

2.1.1 *Escherichia coli*-Stämme

<i>E. coli</i> Stamm	Genotyp	Referenz
<i>E. coli</i> XL-1 Blue	<i>supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA46 thi relA1 lac F'[proAB⁺ lac^f M15 Tn10(Tet^r)]</i>	Stratagene, La Jolla, CA
<i>E. coli</i> M15	<i>Na^s, Str^s, Rif^s, Thi⁻, Lac⁻, Ara⁺, Gal⁺, Mtl⁻, F⁻, RecA⁺, Uvr⁺, Lon⁺</i>	Quiagen, Hilden

2.1.2 *Candida albicans*-Stämme

<i>C. albicans</i> Stamm	Genotyp	Referenz
SC5314 (VPS34/VPS34)	Wildtyp	Fonzi & Irwin (1993)
CAV3 (vps34/vps34)	<i>Δvps34::hisG/Δvps34::hisG-URA3-hisG, Δura3::imm434/Δura3::imm434</i>	Bruckmann <i>et al.</i> (2000)
CAV4	<i>Δvps34::hisG/Δvps34::hisG, Δura3::imm434/Δura3::imm434</i>	Bruckmann <i>et al.</i> (2000)
CAV5 (VPS34/vps34)	<i>Δvps34::hisG/ΔVPS34::URA3, Δura3::imm434/Δura3::imm434</i>	Bruckmann <i>et al.</i> (2000)
CAV9 (VPS34-L/vps34)	<i>Δvps34::hisG/ΔVPS34TOR::URA3, Δura3::imm434/Δura3::imm434</i>	Diese Arbeit

2.1.3 Kultivierung der *E. coli* und *C. albicans* Stämme

Für die Anzucht von *E. coli* wurden LB-Medium [1% (w/v) Bactotrypton, 0,5% (w/v) Hefeextrakt, 0,5% (w/v) NaCl, pH 7,4] sowie 2xYT-Medium [1,6% (w/v) Bactotrypton, 1% (w/v) Hefeextrakt, 0,5% (w/v) NaCl, 2% (w/v) Glukose, pH 7,4] verwendet. Feste Nährmedien wurden mit 2% (w/v) Agar-Agar hergestellt. Eine Selektion auf Antibiotikaresistenz erfolgte durch Zugabe von Tetracyclin (12,5 µg/ml), Ampicillin (100 µg/ml) bzw. Kanamycin (25 µg/ml).

C. albicans Stämme wurden in YPD-Medium [2% (w/v) Glukose, 2% (w/v) Pepton, 1% (w/v) Hefeextrakt, pH 5,5 – 6,0], YPG-Medium [2% (w/v) Galaktose, 2% (w/v) Pepton, 1% (w/v) Hefeextrakt, pH 5,5 – 6,0], Sabouraud-Medium [2% (w/v) Glukose, 1% (w/v) Pepton aus Casein] und SD-Medium [2% (w/v) Glukose, 0,7% (w/v) Yeast-Nitogen-Base ohne Aminosäuren (Difco)] sowie SD-N-Medium [2% (w/v) Glukose, 0,7% (w/v) Yeast-Nitogen-Base ohne Stickstoff (Difco)] bei 30°C angezogen. Dem SD-Medium wurde bei *ura⁻* Stämmen 20 mg/ml Uridin zugesetzt. Untersuchungen zum Wachstum der Stämme bei unterschiedlichen pH-Werten erfolgten in Sabouraud-Medium, dem 50 mM Tris pH 11,5 zugegeben und dessen pH-Wert anschließend mit Zitronensäure eingestellt wurde. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte unter Verwendung eines Hämocytoometers.

2.1.4 Untersuchung des Wachstums unter Hyphen induzierenden Bedingungen

Hyphales Wachstum in Flüssigkultur wurde induziert, indem Kulturen aus der späten exponentiellen Wachstumsphase in einer 10fachen Verdünnung frischem YPD-Medium mit 15% (w/v) fötalem Kälberserum (Fetal Calf Serum FCS, Sigma) zugesetzt und bei 37°C kultiviert wurden. Für die Induktion auf festem Medium wurde Zellen über Nacht in YPD bei 30°C kultiviert, gewaschen und auf Spider-Platten [1% (w/v) Nutient Broth, 0,2 (w/v) K₂HPO₄, 1% (w/v) Mannit, 1,35% (w/v) Agar-Agar] bzw. YPD-Platten mit 10% FCS ausgesäht. Zwischen 20 und 100 Zellen pro Platte wurden bei 37°C für 14 Tage inkubiert. Hyphenbildung unter mikroaerophilen Bedingungen wurde durch Wachstum in YPS-Platten [2% (w/v) Saccharose, 2% (w/v) Pepton, 1% (w/v) Hefeextrakt, pH 5,5 – 6,0] untersucht (Brown *et al.*, 1999). Dafür wurden Zellen einer YPD-Übernachtskultur in YPS-Agar eingebettet und der Anteil von Kolonien mit Hyphen nach Wachstum bei 24°C über vier Tage bestimmt.

2.1.5 Untersuchungen der Chlamydosporenbildung

Die Bildung von Chlamydosporen wurde durch Wachstum auf Reisagar induziert (Joshi *et al.*, 1993). Dafür wurden Objektträger mit Reisagar überschichtet und auf dieses Medium *C. albicans*-Stämme aus einer YPD-Übernachtskultur geimpft. Um einen Sauerstoffmangel zu induzieren wurde der Reisagar mit Deckgläschen abgedeckt. Die präparierten Objektträger wurden drei Tage bei 24°C inkubiert. Die Chlamydosporenbildung wurde anschließend mit Phasenkontrastmikroskopie analysiert (OPTIPHOT-2, Nikon).

2.1.6 Untersuchungen zur Stresstoleranz der *C. albicans* Stämme

Sensitivität der Stämme hinsichtlich hyperosmotischen Bedingungen wurde auf YPD- und YPG-Platten denen 1 M, 1,2 M und 1,5 M NaCl bzw. KCl oder 1,5 M Sorbitol zugesetzt wurde untersucht. Bestimmung der Ionentoxizität erfolgte auf YPD-Platten mit je 10 mM MnCl₂, ZnCl₂ bzw. CuCl₂. Die Temperatursensitivität der Stämme wurde nach Inkubation von YPD- und YPG-Platten bei 30°C, 37°C, 38°C und 40°C ermittelt.

2.2 Nukleinsäurearbeiten

2.2.1 Primer

Nachfolgend sind die für die Klonierungen verwendeten Primer aufgeführt. Sofern nicht anders beschrieben, sind die genomischen Sequenzen von *CaVPS34* unterstrichen. Basenpositionen der Primer im *CaVPS34*-Gen sind jeweils angegeben. Alle Oligonukleotide wurden von der Firma MWG-Biotech (Ebersberg) hergestellt.

Primer zum Einfügen einer *KpnI*-Restriktionsstelle in den Expressionsvektor pVPEX1:

5'-CGGGCGGCCGTGACCCTAACCTTT**GGTACC**ATTA-3'

(Position +2696 bis +2726, *KpnI*-Restriktionsstelle in fetten Buchstaben, *XmaIII*-Restriktionsstelle am 5'-Ende, upstream)

5'-GCCTGCAGTTAAGCTCTCCAATACTGTGCTAA-3'

(Position +3039 bis +3062, *PstI*-Restriktionsstelle am 3'-Ende, downstream)

Synthetische Oligonukleotide zum Einfügen eines *TOR*-Fragments in pVPEX2:

5'-GGCCGTGCAATATTACGTGAGAAGTATCCAGAGAGGGTAC-3'

(*XmaIII*-Restriktionsstelle am 5'-Ende)

5'-CCTCTCTGGATACTTCTCACGTAATATTGCAC-3'

(*KpnI*-Restriktionsstelle am 5'-Ende, kodierende Sequenz von *CaTOR* unterstrichen, die Sequenz wurde dem Stanford's *Candida albicans* sequencing projekt entnommen: Assembly 19, ORF19.1903 auf Contig135;

URL: <http://sequence-www.stanford.edu/group/candida/index.html>)

Primer zum Einfügen eines p110 γ -Fragments in pVPEX2:

5'-GGCCGTTATAAATCTTTTCTTGGTATTAATAAAGAAAGGGTAC-3'

(*XmaIII*-Restriktionsstelle am 5'-Ende)

5'-CCTTTCTTTATTAATACCAAGAAAAGATTTATAAC-3'

(*KpnI*-Restriktionsstelle am 5'-Ende, kodierende Sequenz von p110 γ unterstrichen)

Primer zum Austausch Ser⁹⁹⁹ gegen Ala in pVPEX1:

5'-CATTTCCAAAATTTGATTAATGAT**GCT**GTGAATGCGTTTTTGCCTGTTG-3'

5'-CAACAGGCAAAAACGCATTCAC**AGC**ATCATTAAATCAAATTTTGAAATG-3'

(Position +2977 bis +3018, modifiziertes Basentriplett in fetten Buchstaben)

Primer zum Austausch Ser¹⁰¹³ gegen Ala in pVPEX1:

5'-CCTGTTGTTATAGATAGATTACAT**GCTTT**AGCACAGTATTGGAGAG-3'

5'-CTCTCCAATACTGTGCTAA**AGC**ATGTAATCTATCTATAACAACAGG-3'

(Position +3012 bis +3057, modifiziertes Basentriplett in fetten Buchstaben)

Primer zum Einfügen des *TOR*-Fragments in den Reintegrationsvektor pKEU1:

Amplifikation der C-terminalen Sequenz des *CaVPS34T*-Gens des Expressionsvektors pVTPEX (pVTPEX Sequenz unterstrichen)

5'-CGGGCGGCCGTGCAATATTAC-3'

(Position +2696 bis +2712, *Xma*III-Restriktionsstelle am 5'-Ende, upstream)

5'-CGGGCACGTGACATATATTTATTTTTGCTCTGTT**CAGTTTAAAGCTCTCCAATACTG-**
TGCTAAAC-3'

(Position +3037 bis -35, *Pma*CI-Restriktionsstelle am 5'-Ende, downstream)

2.2.2 Primer zur Kontrollsequenzierung des *CaVPS34*-Gens

5'-TGAAGGTTTGATCATAATCTTAG-3'

5'-CATCAAAAAATGACATTGCCTA-3'

5'-TTATCCTGAGGAATCATCAGTTT-3'

5'-CGGGTATTTCCATATCTAGATCG-3'

5'-GCCACTCCACAATTGAGAGATG-3'

5'-GGTTCTTCCTAAAGTTGATGCC-3'

5'-GGAAGACGACCCCAATATAG-3'

5'-GTTTTAGCACAGTATTGGAG-3'

5'-GGCATTTAACAACAAGGGAAG-3'

5'-CCGTTTTTCATCACTTTTCAT-3'

5'-CTTAAATGAAGCACGTAATAAC-3'

5'-TCCATCAGAAGTTTCACCACC-3'

2.2.3 Sonden

Zur Hybridisierung wurde folgende Gen-Sonde eingesetzt:

CaVPS34 4,9 kb *Eco*RI/*Hind*III-Fragment aus pKE2

2.2.4 Plasmide

Plasmids	Beschreibung	Quelle
pUC18	<i>E. coli</i> -Klonierungsvektor	Yanisch-Perron <i>et al.</i> (1985)
pKE2	pUC18 mit 4.9 kb <i>C. albicans</i> Genomfragment mit <i>CaVPS34</i>	Bruckmann <i>et al.</i> (2000)
pKEU1	wie pKE2, aber mit <i>CaURA3</i>	Bruckmann <i>et al.</i> (2000)
PKEUT	wie pKEU1, aber mit hybriden <i>CaVPS34TOR</i>	diese Arbeit
pQE9	<i>E. coli</i> -Proteinexpressionsvektor	Quiagen
PVPEX1	pQE9 mit 3.1kb Fragment mit komplettem <i>CaVPS34</i>	Bruckmann <i>et al.</i> (2000)
PVPEX2	wie pVPEX1, aber mit <i>KpnI</i> - Restriktionsstelle	diese Arbeit
pVTPEX	wie pVPEX2, aber mit hybriden <i>CaVPS34TOR</i>	diese Arbeit
pVGPEX	wie pVPEX2, aber mit hybriden <i>CaVPS34p110γ</i>	diese Arbeit
pVS999APEX	wie pVPEX1, aber Ser ⁹⁹⁹ zu Ala	diese Arbeit
pVS1013APEX	wie pVPEX1, aber Ser ¹⁰¹³ zu Ala	diese Arbeit

2.2.5 Konstruktion der Plasmide

Für die Konstruktion der Plasmide zur Proteinexpression der CaVps34p-Lipidkinasemutantenproteine wurde zuerst eine *KpnI*-Restriktionsstelle in die *CaVPS34* Sequenz des Expressionsvektors pVPEX1 eingefügt. Dafür wurde ein 380 bp Fragment von *CaVPS34* mit Polymerasekettenreaktion (PCR) amplifiziert und über die von den Primern generierten *XmaIII*- und *PstI*-Restriktionsstellen in das CaVps34p-Expressionsplasmid pVPEX1 kloniert. Im Anschluss wurde über die *XmaIII*- und *KpnI*-Restriktionsstellen des resultierenden Plasmids pVPEX2 die zwischen diesen befindliche kodierende Sequenz von *CaVPS34* durch Restriktionreaktion entfernt. Anschließend wurden synthetische doppelsträngige Oligonukleotide, welche die kodierenden Sequenzen von *CaTOR* bzw. p110 γ sowie *XmaIII*- und *KpnI*-Restriktionsstellen enthalten, über Ligationsreaktion in das gespaltene pVPEX2-Plasmid integriert. Die resultierenden Expressionsplasmide enthalten das *CaTOR*-Fragment (pVTPEX) bzw. das p110 γ -Fragment (pVGPEX) an Position +2696 bis +2717 des *CaVPS34*-Gens.

Die Plasmide zur Expression der CaVps34p-Serinmutantenprotein wurden durch *in vitro*-Mutagenese generiert. Die dazu nötigen PCR-Reaktionen erfolgten mit den oben angegebenen Primerpaaren. Das Plasmidtemplate war der CaVps34p-Expressionsvektor pVPEX1. In den resultierenden Expressionsplasmiden pVS999APEX bzw. pVS1013APEX ist das Basentriplett, das den Serinrest an Aminosäure-Position 999 bzw. 1013 des *CaVPS34*-Gens kodiert, durch ein für Alanin kodierendes Basentriplett ersetzt.

Für die Integration des *CaVPS34TOR*-Gens, bei dem die Sequenz von *CaVPS34* analog zum Expressionsplasmid pVTPEX1 modifiziert ist, in das Genom von *C. albicans* wurde das Integrationsplasmid pKEUT konstruiert. Zu diesem Zweck wurde 450 bp aus dem *VPS34*-Integrationsplasmids pKEU1 durch *XmaIII/PmaCI*-Restriktion entfernt. Die C-terminale Sequenz des *CaVPS34TOR*-Gens des Expressionsvektors pVTPEX wurde durch PCR amplifiziert. Das resultierende 450 bp Fragment enthält die C-terminale Sequenz von *CaVPS34TOR* und die Sequenz downstream des *CaVPS34*-Gens (Position +2696 bis -35). Die Primer generieren die *XmaIII*- und *PmaCI*-Restriktionsstellen des Fragments. Über diese Restriktionsorte wurde das PCR-Fragment in das gespaltene pKEU1-Plasmid ligiert und dadurch das Integrationsplasmid pKEUT generiert.

2.2.6 Polymerasekettenreaktionen

Die Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente erfolgte mit Polymerasekettenreaktion (PCR, Mullis und Fallona, 1987). Als thermostabile DNA-Polymerase wurde die Pwo-Polymerase (Roche) verwendet. Der Reaktionsansatz erfolgte nach Angaben des Herstellers. Die Reaktionsbedingungen wurden den jeweiligen Annealing-Temperaturen der Primer angepasst. Die Reaktionen erfolgten im Primus 96 Thermocycler (MWG Biotech).

Durch Amplifikation kompletter Plasmide mit *in vitro*-Mutagenese wurden einzelne Aminosäuren verändert. Dies erfolgte unter Verwendung des QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene), wobei die Reaktionen nach Angaben des Herstellers durchgeführt wurden.

2.2.7 Restriktionsreaktionen

Für die Restriktionsreaktionen wurden pro µg DNA 3-4 U Enzym eingesetzt und unter den entsprechenden Reaktionsbedingungen inkubiert.

2.2.8 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung wurde innerhalb der Abteilung Infektionsbiologie durch Fr. Ina Löschmann durchgeführt. Grundlage der verwendeten Methode ist die enzymatische Didesoxysequenzierung nach Sanger (Sanger *et al.*, 1977), die in Kombination mit der Polymerasekettenreaktion das Prinzip des Cycle-Sequenzierung (Murray, 1989) bildet. Die Analyse erfolgte mit ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA).

2.2.9 Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Die Auftrennung einzelner DNA-Fragmente erfolgte in einem 1%igen Agarosegel, dem 0,5 µg/ml Ethidiumbromid zugesetzt wurden, und mit 1x TAE (40 mM Tris, 20 mM Natriumacetat, 2 mM EDTA, pH 8) als Laufpuffer. Als Größenstandart wurde ein 1 kb Marker (Gibco BRL, Eggenstein) mitgeführt. Um die DNA zu isolieren, wurden die Banden mit Hilfe eines UV-Transilluminators sichtbar gemacht und das entsprechende DNA-Fragment aus dem Gel ausgeschnitten. Das Gelstück mit der gewünschte DNA wurde zusammen mit

einem entsprechenden Volumen 1x TAE-Puffer in eine semipermeable Dialysemembran (Porengröße 0,45 µm) gegeben und die DNA mittels Elektrophorese eluiert. Eine anschließende Reinigung der DNA erfolgte durch Phenolextraktion und Ethanolfällung. Alternativ wurde das QIAquick System (Quiagen) verwendet, wobei Extraktionssäulchen für die Gelextraktion der DNA verwendet wurden. Die Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellerprotokolls. Die DNA wurde dabei zusammen mit dem Gel aufgeschmolzen und anschließend an eine Säulenmatrix gebunden. Es folgen Waschschrte gefolgt von der Elution der DNA von der Säule.

2.2.10 Ligationsreaktion

Für die Ligation glatter bzw. überhängender Enden von DNA-Strängen wurde die T4 DNA-Ligase (Amersham) sowie der Fast-Link™ DNA Ligation Kit (Biozym Diagnostik GmbH) verwendet. Pro µg DNA wurde für die Ligation 2 U Ligase zugesetzt. Bei der Ligation überhängender Enden wurde auf ein Vektor-Insert-Verhältnis von 1:2, im Falle glatter Enden von 1:5 geachtet. Eine Reinigung des Ligats und das Entfernen der Ligase erfolgte durch Phenolextraktion und anschließender Ethanolfällung.

Probleme bei der Ligation von PCR-Fragmenten wurden durch Verwendung des pCR-Skript™ SK(+)-Kits gelöst. Die von der Pwo-Polymerase erzeugten glatten Enden ermöglichten dabei eine direkte Ligation in den pCR-Script Vektor. Die Insertion des Fragmentes in den vorgesehenen Zielvektor erfolgte anschließend durch Restriktion aus pCRScript und Ligation in den entsprechenden Vektor.

2.2.11 Minipräparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Kleine Mengen Plasmid-DNA werden unter alkalischen Bedingungen aus lysozymbehandelten Zellen isoliert (Birnboim und Dooly, 1979). Dazu wurden 1,5 ml einer LB ÜN-Kultur pelletiert und die Zellen in 100 µl Lösung 1 (50 mM Glucose, 25 mM Tris/HCl, pH 8, 10 mM EDTA, 5 mg/ml Lysozym) lysiert. Nach 5minütiger Inkubation bei RT wurde durch Zugabe von 200 µl Lösung 2 (0,2 M NaOH, 1% SDS) und 5minütiger Inkubation auf Eis DNA sowie Proteine denaturiert und die Probe anschließend mit 150 µl Lösung 3 (3 M Kaliumacetat, pH 4,8) neutralisiert. Proteine und chromosomale DNA wurden durch Zentrifugation von der Plasmid-DNA abgetrennt. Eine Reinigung der Plasmid-DNA erfolgte durch Phenol/Chloroform-Extraktion, woran sich eine Isopropanolfällung anschloss.

2.2.12 Isolierung von Plasmid-DNA mit Anionenaustauscher-Säulen

Für die Isolierung größerer Mengen Plasmid-DNA wurden Anionenaustauscher-Säulen (Nucleobond AX PC- Kit 2000, Macherey & Nagel, Düren) verwendet. Der Aufschluss der *E. coli*-Zellen erfolgte durch alkalische Lyse, woran sich eine Abtrennung der Membranbruchstücke mit daran gebundener chromosomaler DNA durch Zentrifugation anschloss. Danach wurde die Plasmid-DNA durch Bindung an eine Anionenaustauscher-Säule, Waschen und anschließende Elution weiter aufgereinigt. Alle benötigten Lösungen waren im Kit enthalten. Die Durchführung der Methode erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers. Anschließend folgte eine Fällung der DNA mit Isopropanol.

2.2.13 Isolierung genomischer DNA aus *C. albicans*

Für die Isolierung genomischer DNA aus Hefen wurden Zellen aus einer 20 ml dichten ÜN-Kultur pelletiert und mit 20 ml 0,9 M NaCl gewaschen. Danach wurde das Zellpellet in 5 ml Lysepuffer (25 mM Tris pH 8,0, 25 mM EDTA, 50 µg/ml RNase A) aufgenommen und 30-80 min bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Es folgte der Aufschluss durch Zugabe von 500 µl 5 M NaCl und 1,2 ml 10% SDS, jedes Mal gefolgt von energischem Mixen. Nach Zusatz von 2,4 ml 5 M Kaliumacetat und anschließender 20minütiger Inkubation auf Eis wurden die ausgefallenen Zelltrümmer abzentrifugiert. Die im Überstand befindliche DNA wurde im Anschluss durch Phenol/Chloroform Extraktion gereinigt und mit Ethanol gefällt.

2.2.14 Radioaktive Markierung von Sonden-DNA

Die radioaktive Markierung der DNA erfolgte unter Verwendung des „High Prime DNA Labeling Kit, (Roche Molekular Biochemicals) und wurde nach der Methode des „Random Priming, (Feinberg und Vogelstein, 1984) durchgeführt. Als radioaktives Nuklid wurde [α -³²P]dCTP (Amersham Pharmacia Biotech) eingesetzt.

Markierungsansatz: 50 ng denaturierte DNA in 8 µl Aqua dest.
3 µl dNTP-Mix (je 0,5 mM dATP, dGTP und dTTP)
4 µl High Prime Reaktionsgemisch (12-mer Random Primer Gemisch, 1 U/µl Klenow-Polymerase, 5x Reaktionspuffer)
5 µl [α -³²P]dCTP (10 µCi/µl)

Der Reaktionsansatz wurde 10 min bei 37°C inkubiert und die Reaktion mit 1 µl 0,5 M EDTA (pH 8) abgestoppt. Um freie Nukleotide von der markierten Sonden-DNA abzutrennen, folgte eine Reinigung durch Zentrifugation (2 min, 3000 rpm) über eine Sephadex G50-Säule (ProbeQuant™ G-50 Micro Columns, Amersham Pharmacia Biotech). Unmittelbar vor dem Zusatz zur Hybridisierungslösung erfolgte die Denaturierung der DNA durch Erhitzen auf 95°C für 10 min.

2.2.15 Southern-Analyse

Um Sequenzen in genomischer DNA nachzuweisen wurde eine Southern-Analyse durchgeführt. Die genomische DNA aus *C. albicans* wurde dafür mit geeigneten Restriktionsendonukleasen mindestens 6 h geschnitten, um einen vollständigen Verdau zu gewährleisten. Danach folgten Phenolextraktion und Ethanolfällung. Anschließend wurde die DNA in einem 1%igem Agarosegel mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid aufgetrennt und zur Bestimmung der Fragmentgröße ein 1 kb DNA-Marker (Gibco) mitgeführt. Die aufgetrennten Fragmente wurden mit einem UV-Transiluminator sichtbargemacht und mit einem Lineal die Retentionslängen der Markerfragmente bestimmt. Die im Gel enthaltenen DNA-Fragmente wurden durch 20minütige Behandlung mit 0,5 M NaOH/1,5 M NaCl denaturiert. Anschließend erfolgte die Neutralisation mit 1 M Tris/HCl/1,5 M NaCl (pH 7,5) für 20 min. Die DNA-Fragmente wurden mit 10x SSC-Lösung (1,5 M NaCl, 150 mM Natriumcitrat) durch Vakuumtransfer (Vacuum Blotter, Appligene) auf eine Nylonmembran (Hybond N, Amersham-Pharmacia Biotech) überführt. Eine Immobilisierung der DNA auf der Nylonmembran erfolgte durch zweistündiges „Backen“ bei 80°C oder UV-Crosslinken (GS Gene Linker UV-Chamber, Bio-Rad, München).

5x HEPES:	3 M	NaCl	50x Denhardt-Puffer:	1%	Ficoll 400
	0,1 M	HEPES		1%	Polyvinylpyrrolidon K 25
	0,02 M	EDTA		1%	Gelatine
		pH 6,8		0,5%	SDS

Die Hybridisierung der Nylonmembran erfolgte unter Standardbedingungen (Sambrook *et al.*, 1998). Zuerst wurde der Blot 2 h in der Hybridisierungslösung (1x HEPES, 10x Denhardt-Puffer, 100 µg/ml denaturierte Heringssperma-DNA) bei 65°C vorhybridisiert. Im Anschluss folgte eine 12stündige Inkubation bei 65°C in Hybridisierungslösung mit denaturierter radioaktiv markierter Sonden-DNA (2.2.14). Nach der Hybridisierung wurde die

ungebundene radioaktive Sonde mit 2x SSC, 0,1% SDS 3x 20 min bei 65°C vom Filter gewaschen und dieser in Plastikfolie eingeschweißt. Der Nachweis der gebundenen Sonden-DNA erfolgte in einem Phosphorimager (Molecular Dynamics GmbH, Krefeld) bzw. durch Auflegen eines Röntgenfilms (Hyperfilm, Amersham Pharmacia Biotech).

2.3 Transformationen

2.3.1 Transformation von *E. coli*

Für die Transformation von *E. coli* standen zwei Methoden zur Verfügung, die CaCl₂-Methode (Sambrook *et al.*, 1989) und die Elektroporation (Shikegawa und Dower, 1988; Dower *et al.*, 1988; Calvin und Hannawalt, 1988). Kompetente Zellen beider Methoden wurden in 10% Glycerol bei -70°C gelagert.

Die Transformation mit der CaCl₂-Methode erfolgte durch Zugabe von 10 µl Ligationsansatzes zu 200 µl kompetenten Zellen und 45minütige Inkubation auf Eis. Daran schloss sich ein 2minütiger Hiteschock von 42°C an. Danach wurde der Transformationsansatz bis zu einem Volumen von 1 ml mit LB-Medium versetzt und 1 h bei 37°C inkubiert. Die Elektroporation erfolgte in 0,2 mm Elektroporationsküvetten (Eurogentec, Herstal, Belgien) mit Hilfe eines GenePulsers (Bio-Rad) unter folgenden Bedingungen: C=25 µF, R=200 Ω, U=2,5 kV. Nach erfolgter Transformation wurden die Zellen wie beschrieben mit LB-Medium versetzt und bei 37°C inkubiert. Je 100 µl der transformierten *E. coli*-Zellen beider Methoden wurden anschließend zur Selektion auf LB-Agarplatten, die das zur Selektion benötigte Antibiotikum enthielten, ausgestrichen und bei 37°C inkubiert.

2.3.2 Transformation von *C. albicans*

Für die Transformation von *C. albicans* wurde die Methode nach De Backer *et al.* (1999) angewandt. Der Uridin-bedürftige *Candida*-Stamm wurde in 50 ml SD-Medium unter Zusatz von 20 mg/l Uridin (1-β-D-Ribofuranosyluracil, Sigma) über Nacht bei 30°C angezogen. Die Kultur wurde bei einem OD₆₀₀ von 1,3 geerntet und das Pellet in 25 ml Lithium-Acetat-Lösung (25 mM Lithium-Acetat, 10 mM DTT) aufgenommen. Es folgte eine 1stündige Inkubation bei 30°C unter Schütteln (180 rpm). Anschließend wurden die Zellen bei 3500 rpm und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde zweimal mit eiskaltem Aqua dest. und einmal mit 10 ml eiskaltem 1 M Sorbitol gewaschen und danach in 100 µl Sorbitol aufgenommen.

100 µl kompetente *Candida*-Zellen wurden mit der entsprechenden DNA, die das *URA3*-Gen als Marker enthielt, durch Elektroporation transformiert. Dies erfolgte unter Verwendung einer Küvette mit einem Elektrodenabstand von 0,2 mm bei einem Puls von 1,5 kV, 25 µF und 200 Ω (Gene Pulser). Im Anschluss wurde 1 ml eiskaltes 1 M Sorbitol zugegeben und die Zellen auf SD Platten bei 30°C inkubiert.

2.4 Proteinanalyse

2.4.1 Heterologe Expression von CaVps34p-Proteinmutanten in *E. coli*

Die entsprechenden Veränderungen der potentiellen PI-Kopfgruppen-Interaktionsregion von CaVps34p bzw. die Mutationen der Aminosäuren, die als Autophosphorylierungsstelle des Proteins in Betracht kamen, erfolgten im Expressionsvektor pVPEX1 der durch die Klonierung von *CaVPS34* in den Expressionsvektor pQE9 (Quiagen) eine Überexpression des CaVps34p in *E. coli* ermöglicht. Die N-terminale Fusion eines Polyhistidinpeptides (HisTag) gewährleistete eine Aufreinigung des Proteins. Das jeweils resultierende Plasmid wurde in *E. coli* M15 [pREP4] transformiert. Mit Hilfe des Plasmids pREP4 war es möglich, durch Überexpression des *lac*-Repressors die Transkription der *CaVPS34*-Mutanten am T5-Promotor zu kontrollieren. Durch Zugabe von IPTG konnte die Expression der rekombinanten Proteine durch Inaktivierung des *lac*-Repressors induziert werden.

Für die Expression der verschiedenen Proteine in *E. coli* wurde eine Vorkultur des entsprechenden Stammes 1:50 in Expressionsmedium (2xYT-Medium, 10 mM MgCl₂, 1 mM MnCl₂) überführt und bei 37°C bis zu einem OD₆₀₀=0,6 inkubiert. Anschließend folgte die 4stündige Expression des rekombinanten Proteins durch Zugabe von 1 mM IPTG bei 30°C. Die Kultur wurde danach zentrifugiert und das Pellet in flüssigem Stickstoff eingefroren. Der Zellaufschluss erfolgte im nativen Aufschlusspuffer [50 mM NaH₂PO₄, 500 mM NaCl, 10% (v/v) Glycerin, 10 mM MgCl₂, 0,02% NP-40, 10 mM Imidazol, pH 7,8] mit Proteaseinhibitoren (Protease Inhibitor Mix HP, Serva) durch Lysozym (10 mg/ml) und anschließender Ultraschallbehandlung. Nach Abtrennung der Zelltrümmer durch Zentrifugation folgte eine affinitätschromatografische Reinigung der HisTag-Proteine unter Verwendung der Chelatormatrix Ni-NTA-Superflow (Quiagen). Der Bindung der HisTag-Proteine an die Matrix schloss sich ein mehrmaliges Waschen mit Puffer [50 mM NaH₂PO₄, 500 mM NaCl, 10% (v/v) Glycerin, 20 mM Imidazol, pH 7,8] über eine Säule an. Es folgte eine fünfmalige Elution mit je 500 µl Puffer [50 mM NaH₂PO₄, 500 mM NaCl, 10% (v/v)

Glycerin, 250 mM Imidazol, pH 7,8]. Die Fraktionen mit den aufgereinigten HisTag-Proteinen wurden anschließend in einer SDS-Page untersucht.

2.4.2 Nachweis spezifischer Proteine durch Westernblot-Analyse

Die Auftrennung der Proteine erfolgte mit SDS-Page in einem diskontinuierlichen Lämmli-System (Lämmli, 1970). Zu diesem Zweck wurde ein 8%iges Trenngel mit einem 4%igen Sammelgel überschichtet. Die Proben wurden vor dem Auftragen auf das Gel in einem reduzierenden Proteinauftragspuffer (Roti-Load 1, Roth) 5 min bei 95°C denaturiert. Als Molekulargewichtsstandart diente der Proteinmarker Mark12 (Invitrogen). Die Anfärbung der Proteinbanden erfolgte durch Coomassie-Färbung (Rotiphorese blau R bzw. Roti-Blue Kolloidale Coomassie-Färbung, Roth). Für die Westernanalyse wurde auf das Färben der Proteingele verzichtet. Stattdessen wurden die Proteine auf eine Nitrozellulosemembran (Protran, Schleicher und Schüll, Dassel) geblottet. Dies erfolgte durch Nasstransfer (Mini-Trans-Blot-Zelle, Bio-Rad) im Blotpuffer [25 mM Tris/HCl, 192 mM Glycin, 20% (v/v) Methanol] bei 4°C für 4 h bei 80 V. Dem Blotten folgte die Inkubation der Membran in einer Blockierungslösung [2,5% BSA in PBS-T-Puffer (100 mM NaH₂PO₄, 100 mM NaCl, 0,1% Tween 20, pH 7,5)]. Danach folgte die Bindung des Primärantikörpers (Anti-HisTag, monoklonal von der Maus, Verdünnung 1:1000, Quiagen) an die Membran in Blockierungslösung für 1 h bei RT. Nach mehrmaligem Waschen der Membran in PBS-T-Puffer folgte die Bindung des Sekundärantikörpers (Anti-Maus-Immunglobulin konjugiert mit Meerrettich-Peroxidase vom Schaf, Verdünnung 1:5000, Amersham Pharmacia Biotech) in Blockierungslösung für 1 h bei RT. Analog wurden alle nichtgebundenen Antikörper durch Waschen mit PBS-T von der Membran entfernt. Die Detektion der gebundenen Antikörper geschah mit Hilfe des ECL-Systems (Enhanced Chemiluminescence, Amersham Pharmacia Biotech) auf einem Röntgenfilm (Hyperfilm ECL, Amersham Pharmacia Biotech).

2.4.3 Nachweis der PI 3-Kinase-Aktivität

Der Nachweis der PI 3-Kinase-Aktivität erfolgte nach der Methode von Schu *et al.* (1993). Die rekombinanten HisTag-Proteine wurden durch Verwendung von Konzentrationssäulchen (Ultrafree-0.5, Ausschlussgröße 50 kDa, Millipore, USA) in Reaktionspuffer (20 mM HEPES pH 7,5, 10 mM MgCl₂) umgepuffert. Die Proteinmenge wurde jeweils durch eine SDS-Page mit anschließender Coomassiefärbung bestimmt. Dazu wurde eine Proteinprobe mit bekannter Konzentration mitgeführt. Der 50 µl Reaktionsansatz bestand aus ca. 0,5 µg

Protein, 10 µg ultraschallbehandeltem PtdIns, PtdIns 4-P oder PtdIns(4,5)P₂ (Avanti polar lipids, Alabasta, AL), 60 µM ATP und 0,1 µCi/ml [γ -³²P]ATP (Amersham Pharmacia Biotech) in Reaktionspuffer. Bei der Ultraschallbehandlung von PtdIns 4-P und PtdIns(4,5)P₂ wurde jeweils die gleiche Menge Phosphatidylserin (Sigma) zugesetzt. Die Reaktion erfolgte für 15 min bei 37°C und wurde durch Zugabe von 80 µl 1 M HCl abgestoppt. Anschließend wurden die Lipide mit 160 µl Chloroform/Methanol (1:1, v/v) extrahiert. Die organische Phase wurde 1x mit 1 M HCl gewaschen, danach getrocknet und in 20 µl Chloroform aufgenommen. Im Anschluss wurden die Proben auf mit CDTA-Lösung (4,55 g CDTA x H₂O, 165 ml H₂O, 330 ml Ethanol, 3,0 ml 10 M NaOH) behandelte Silica 60 TLC-Platten (Merck) aufgetragen und in einem Borat-Puffersystem (Walsh *et al.*, 1991) bzw. auf mit Oxalat vorbehandelten TLC Platten in Chloroform/Aceton/Methanol/Essigsäure/Wasser (80:30:26:24:14, v/v/v/v/v) aufgetrennt. Die Detektion der radioaktiv markierten Lipide geschah mittels Autoradiographie unter Verwendung eines Phosphoimagers (Molekular Dynamics GmbH, Krefeld) bzw. durch Auflegen eines Röntgenfilms (Hyperfilm, Amersham Pharmacia Biotech). Die Quantifizierung des gebildeten PtdIns 3-Phosphats erfolgte mit Hilfe der Phosphoimager-Software.

2.4.4 Untersuchung der Autophosphorylierungsaktivität der CaVps34p-Mutantenproteine

Der Autophosphorylierungsassay wurde nach Czupalla *et al.* (2003) durchgeführt. Dazu war es notwendig, die Proteinproben äquivalent zum PI 3-Kinaseassay in Reaktionspuffer [0,1% BSA, 1 mM EGTA, 0,2 mM EDTA, 7 mM MgCl₂, 10 mM MnCl₂, 100 mM NaCl, 40 mM HEPES pH 7,4, 1mM Dithiothreitol (DTT), 1 mM β -Glycerophosphat] umzupuffern, da der Na-Phosphat/Imidazol-Elutionspuffer sich störend auf die Reaktion auswirkt. Durch diese Prozedur wurde das Protein gleichfalls aufkonzentriert. Der Assay erfolgte mit ca. 200 ng Protein durch Zugabe von 25 µM ATP und 0,1 µCi/ml [γ -³²P]ATP in einem 30 µl Reaktionsansatz und 30minütige Inkubation bei 30°C. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 µl 4x Probenpuffer (Roti-Load, Roth) abgestoppt und die Proben nach 10minütiger Denaturierung bei 95°C in einem 8%igem PAA/SDS-Gel aufgetrennt. Im Anschluss folgte nach Coomassie-Färbung und Trocknen des Gels die Detektion der radioaktiv markierten Proteinbanden mittels Autoradiographie.

2.5 Phänotypische Untersuchungen der *C. albicans*-Stämme

2.5.1 Fluoreszenzfärbung und Mikroskopie

Um die verschiedenen *C. albicans*-Stämme morphologisch zu untersuchen, erfolgten verschiedene Fluoreszenzfärbungen. Der Vesikeltransport zu Vakuole wurde mit dem lipophilen Fluoreszenzfarbstoff FM4-64 [N-(3-triethylammoniumpropyl)-4-(*p*-diethylamino-phenyl)hexatrienyl) pyridinium dibromide (Molecular Probes, Eugene, OR)] untersucht (Vida & Emr, 1995). Dazu wurde eine *Candida*-Kultur bis zu einem OD₆₀₀ zwischen 0,8 und 1,6 bei 30°C herangezogen. Die Zellen wurden geerntet und in einer Konzentration von 20-40 OD₆₀₀ Einheiten in frischen YPD-Medium resuspendiert. Danach wurde 16 nM FM4-64 gelöst in DMSO zugegeben und die Probe für 15 min bei 30°C inkubiert, gefolgt von einer Überführung in YPD ohne Farbstoff in einer Konzentration von 10-20 OD₆₀₀ Einheiten für 1 h. Zur mikroskopischen Analyse wurden die Zellen auf einem Objektträger mit einem dünnen 1%igem Agarosefilm überschichtet. Die Fluoreszenz der Proben wurde durch Verwendung eines Filters von 546 nm Exzitation und 575-640 nm Emission (Axioplan 1, Zeiss, Jena) beobachtet.

Die Ansäuerung der Vakuole wurde mit dem Fluoreszenzfarbstoff Quinacrine (Molecular Probes) untersucht. Diese schwache Base akkumuliert in der Vakuole, wenn sie durch eine saure Umgebung protoniert wird. Nach Anzucht ÜN in YPD folgte die Ernte der *Candida*-Zellen und anschließend eine Resuspension in YPD pH 7,6, eingestellt mit 1 M Tris pH 11,5. 500 µl dieser Probe wurden mit 2,5 µl einer Quinacrine Lösung (20 mg/ml) versetzt und 5 min bei RT inkubiert. Es folgte eine Überführung in frisches YPD pH 7,6 und danach die mikroskopische Untersuchung mit BP450-490 Exzitationsfilter, BA520 Beam Splitter und DM500 Emissionsfilter am Fluoreszenzmikroskop (Olympus BX51TF, OLYMPUS, Tokyo, Japan).

Zur Induktion der Autophagozytose wurden *Candida*-Zellen einem Stickstoffmangel bzw. dem antibiotischen Makrolid Rapamycin ausgesetzt. Dafür wurden Zellen einer ÜN-Kultur in frisches SD-N-Medium bzw. SD-Medium dem 0,1 mg/ml Rapamycin zugesetzt wurde überführt. Der Zusatz von 1 mM PMSF zum Medium verhinderte den Abbau der Autophagozytosevesikel in der Vakuole. Nach Inkubation von 1 h bei 30°C wurden die Zellen mikroskopisch im Phasenkontrast untersucht (OPTIPHOT-2, Nikon).

Parallel zu den Fluoreszenzfärbungen wurden die *C. albicans*-Zellen im differenziellen Phasenkontrast (DIC) beobachtet.

2.5.2 Untersuchung der Adhäsion der *C. albicans*-Stämme an humane Buccalzellen

Die Adhäsion der *Candida*-Zellen an humane Buccal-Epithel-Zellen (HBE-Zellen) wurde mit einem *in vitro*-Assay mit visueller Auswertung untersucht (Bailey *et al.*, 1995). Zu diesem Zweck wurden einem männlichen Probanden Zellen der Mundschleimhaut entnommen und in 2 ml 1x PBS für Zellkultur pH 7,2 (PBS Dulbecco's, Gibco) resuspendiert, die Zellzahl am Zellcounter Z2 (Beckmann Coulter, Fullerton, CA) bestimmt und auf 10^5 Zellen/ml in 1x PBS eingestellt. Zur gleichen Zeit wurden *Candida*-Zellen einer ÜN Kultur in 1x PBS gewaschen und auf eine Zellzahl von 2×10^7 Zellen/ml eingestellt. Anschließend erfolgte die Inkubation von 1 ml HBE-Zellen und 1 ml *Candida*-Zellen für 2 h bei 37°C. Die Adhäsionsrate wurde danach am Mikroskop bestimmt. Dafür wurden 100 HBE-Zellen auf Adhäsion von *C. albicans* untersucht. Die Adhäsionsrate wurde als prozentualer Anteil der HBE-Zellen mit adhärennten *Candida*-Zellen an der Gesamtzellzahl an HBE-Zellen angegeben.

2.5.3 Untersuchung zur Virulenz der *C. albicans*-Stämme

Die Virulenztests im Maus-Modell für systemische Candidiasis erfolgten in der Abteilung für Wirkstoffprüfung des HKI unter Leitung von A. Härtel. Sechs Wochen alte männliche NMRI Mäuse (Harlan-Winkelmann, Borcheln) wurden zu fünft in einem Käfig gehalten und täglich kontrolliert. Die Infektion der Mäuse erfolgte mit *Candida*-Zellen einer ÜN-Kultur in Sabouraud bei 28°C, welche dreimal mit 0,9% NaCl gewaschen wurden. Je 200 µl einer Suspension mit 5×10^6 , 5×10^5 bzw. 5×10^4 Zellen wurden den immunkompetenten Mäusen in die laterale Schwanzvene intravenös injiziert und das Überleben über 21 Tage kontrolliert. Dafür wurden die Mäuse regelmäßig gewogen und ihr Gesundheitszustand beurteilt.

Zur Quantifizierung der Nierenbesiedlung wurden je drei Mäuse pro *Candida*-Stamm drei bzw. 21 Tage nach Beginn des Experiments getötet, die Nieren präpariert und nach Bestimmung des Gewichts in 3 ml 0,9% NaCl aufgenommen. Die Zerkleinerung der Nieren erfolgte mit einem Dispergiergerät (Ultra-Turrax T18 basic, Roth). Anschließend wurden verschiedenen Verdünnungen auf YPD-Agar ausplattiert und nach drei Tagen die gewachsenen Kolonien und damit die *Candida*-Keimzahl in den Nieren bestimmt.

3. Ergebnisse

3.1 *In vitro*-Analyse der Enzymfunktionen von CaVps34p

3.1.1 Konstruktion und heterologe Expression der CaVps34p Mutantenproteine

Die in dieser Arbeit untersuchte PI 3-Kinase CaVps34p ist ein multifunktionelles, virulenzassoziiertes Protein von *C. albicans* mit sowohl Lipid- als auch Proteinkinaseaktivität, die sich in der Fähigkeit zur *in vitro*-Autophosphorylierung zeigt. Eine biochemische Untersuchung des Proteins erforderte die Herstellung und Analyse verschiedener rekombinanter CaVps34p Mutanten.

Um die PI 3-Kinaseaktivität von CaVps34p getrennt von der Proteinkinaseaktivität zu betrachten, wurde die Region im Protein, deren Struktur unmittelbar nur mit der Lipidkinaseaktivität gekoppelt ist, modifiziert. Zu diesem Zweck wurde die vermutete PI-Kopfgruppeninteraktionsregion in der katalytischen Domäne verändert. Diese Region C-terminal des hochkonservierten DFG-Motivs (Aminosäure-Position 984) ist für die Substratbindung der Enzyme der Klasse I PI 3-Kinasen mitverantwortlich (Bondeva *et al.*,

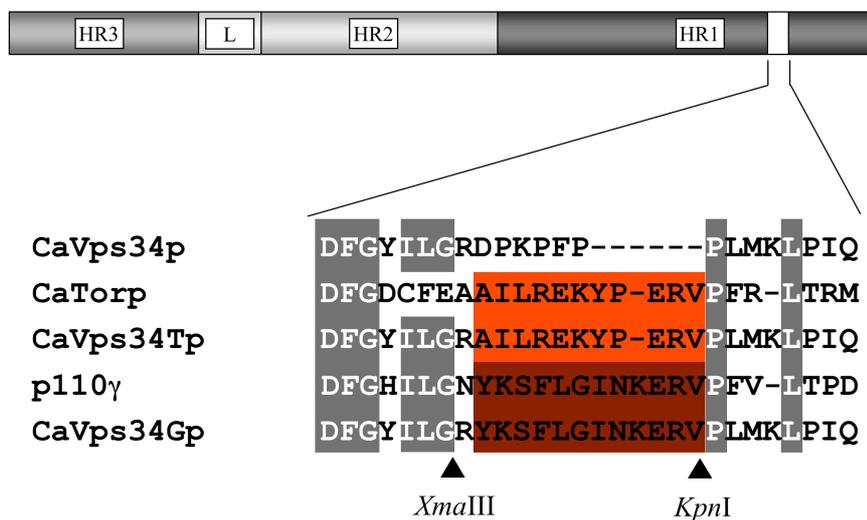


Abbildung 5: Konstruktion der CaVps34p Mutantenproteine CaVps34Tp und CaVps34Gp. CaVps34p besteht aus drei Homologieregionen (HR) und einer Linkerregion (L). Die CaVps34 Mutantenproteine wurden durch Austausch der potentiellen PI-Kopfgruppeninteraktionsregion (offene Box) mit den korrespondierenden Regionen des CaTor Proteins (hell-rot hervorgehoben) bzw. der humanen Klasse I PI 3-Kinase p110 γ (dunkel-rot hervorgehoben) durch Verwendung der *XmaIII*- und *KpnI*-Restriktionsstellen generiert. Identische Aminosäuren sind grau unterlegt.

1998, Pirola *et al.*, 2001). Die Lipidkinasemutanten CaVps34Tp und CaVps34Gp wurden konstruiert, indem diese Region gegen eine korrespondierende des PI 3-Kinase-verwandten CaTor Proteins ohne Lipidkinaseaktivität bzw. der humane PI 3-Kinase p110 γ , die in der Lage ist neben PtdIns auch PtdIns 4-P und PtdIns (4,5)P₂ zu phosphorylieren, ersetzt wurde (Abb. 5). Die in dieser Arbeit konstruierten Expressionsvektoren pVTPEX und pVGPEX dienen der Expression der Proteinmutanten CaVps34Tp (enthält TOR Sequenz) bzw. CaVps34Gp (enthält p110 γ Sequenz).

Neben der Lipidkinase- besitzt CaVps34p auch eine Autophosphorylierungsaktivität (Günther *et al.*, 2005, Bruckmann Dissertation). Bei verschiedenen Klasse I PI 3-Kinasen stellt ein Serinrest am extremen C-terminus die Autophosphorylierungsstelle dieser Proteine dar (Vanhaesebroeck *et al.*, 1999, Czupalla *et al.*, 2003). Aus diesem Grund wurden die beiden C-terminalen Serinreste von CaVps34p auf ihre Funktion bei der Autophosphorylierung des Proteins untersucht. Serin⁹⁹⁹ ist innerhalb der Vps34 Proteine konserviert, wohingegen zu Serin¹⁰¹³ keine Homologien bestehen (Abb. 6). Zur Herstellung der CaVps34p Mutanten S999A und S1013A wurde das jeweilige Serin im Expressionsvektor durch Alanin unter Verwendung der *in vitro* Mutagenese ersetzt. Die resultierenden Expressionsvektoren pVS999APEX und pVS1013AEX dienen der rekombinanten Expression der CaVps34p Proteinmutanten S999Ap und S1013Ap.

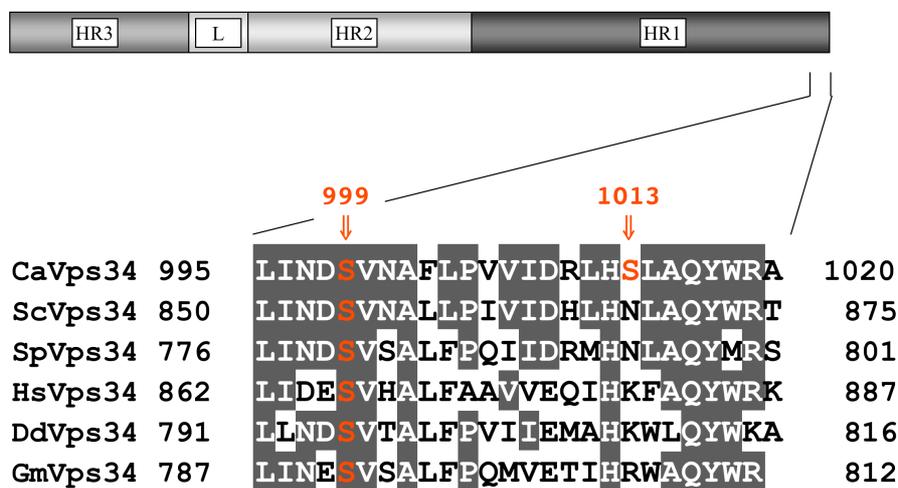


Abbildung 6: Alignment des C-Terminus der Klasse III PI 3-Kinasen aus *C. albicans* (CaVps34), *S. cerevisiae* (ScVps34), *Schizosacharomyces pombe* (SpVps34), Humanzellen (HsVps34), *Drosophila melanogaster* (DmVps34) und *Glycine max* (GmVps34). Identische Aminosäuren sind grau unterlegt. C-terminale Serinreste sind rot markiert.

Die beiden CaVps34p Proteinmutanten mit veränderter potentieller PI-Kopfgruppeninteraktionsregion CaVps34Tp und CaVps34Gp sowie die beiden CaVps34p Serin-Mutanten S999Ap und S1013Ap wurden rekombinant in *E. coli* exprimiert. Eine N-terminale Fusion von sechs Histidinresten der jeweiligen Proteine ermöglichte anschließend die Aufreinigung mittels Affinitätschromatographie und den Nachweis der rekombinanten Proteine im Western Blot (Abb. 7 bzw. 9).

3.1.2 *In vitro* Enzymaktivität der Lipidkinase-Proteinmutanten

Die *in vitro*-Lipidkinaseaktivität der CaVps34p Mutanten wurde durch Verwenden von PtdIns als Substrat in einem radioaktiven Enzymassay untersucht (Abb. 7). Dabei zeigte die CaVps34Tp Proteinmutante keine *in vitro*-Lipidkinaseaktivität. Eine PtdIns 3-P Bildung durch das Protein wurde nicht nachgewiesen. Das ebenfalls untersuchte CaVps34Gp Protein weist eine stark reduzierte *in vitro*-Lipidkinaseaktivität für das Substrats PtdIns auf. Im Vergleich zum Wildtyp-Protein beträgt die Menge des generierten PtdIns 3-P ca. 0,4%. Eine

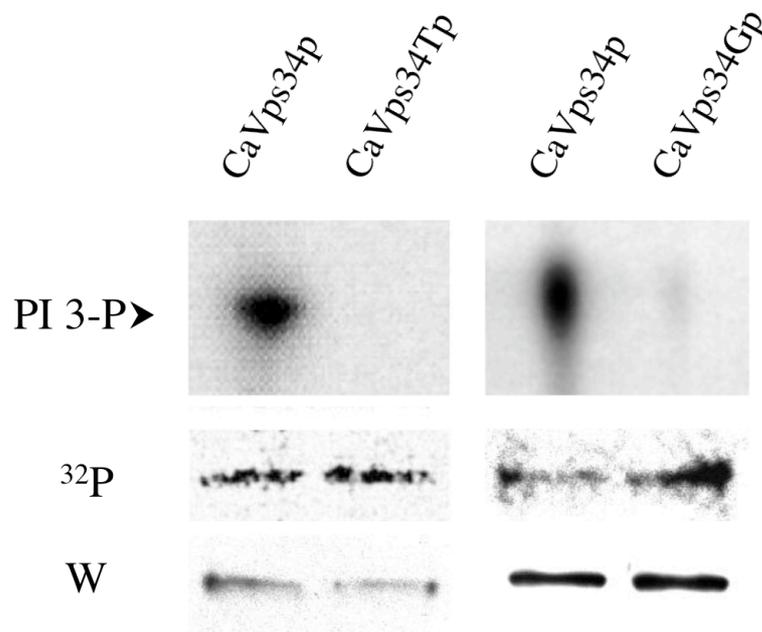


Abbildung 7: *In vitro*-Enzymaktivitäten der rekombinanten CaVps34 Proteinmutanten CaVps34Tp und CaVps34Gp im Vergleich zum WT CaVps34p. Die Proteine wurden rekombinant in *E. coli* als HisTag-Fusionen exprimiert und mit Western Blot (W) identifiziert. (a) Die Lipidkinaseaktivität wurde durch Inkubation der rekombinanten CaVps34 Proteine mit PtdIns und [γ - 32 P]ATP und anschließende Auftrennung der Lipide mit Dünnschichtchromatographie (DC) im Boratpuffersystem bestimmt. Das durch PI 3-Kinaseaktivität gebildete PtdIns 3-P erscheint als autoradiographisch nachweisbares Signal. (b) Die Autophosphorylierung der CaVps34 Proteine wurde nach Inkubation mit [γ - 32 P]ATP in einer SDS-Page nachgewiesen (32 P).

Veränderung der Substratspezifität von CaVps34Gp wurde anschließend überprüft. Zu diesem Zweck wurde der Lipidkinaseassay mit PtdIns 4-P bzw. PtdIns(4,5)P₂ als Substrat durchgeführt. Dabei zeigte die CaVps34Gp Proteinmutante keine Erweiterung der Substratspezifität von CaVps34p. Es konnte weder eine Bildung von PtdIns(3,4)P₂ noch PtdIns(3,4,5)P₃ durch CaVps34Gp nachgewiesen werden (Abb. 8).

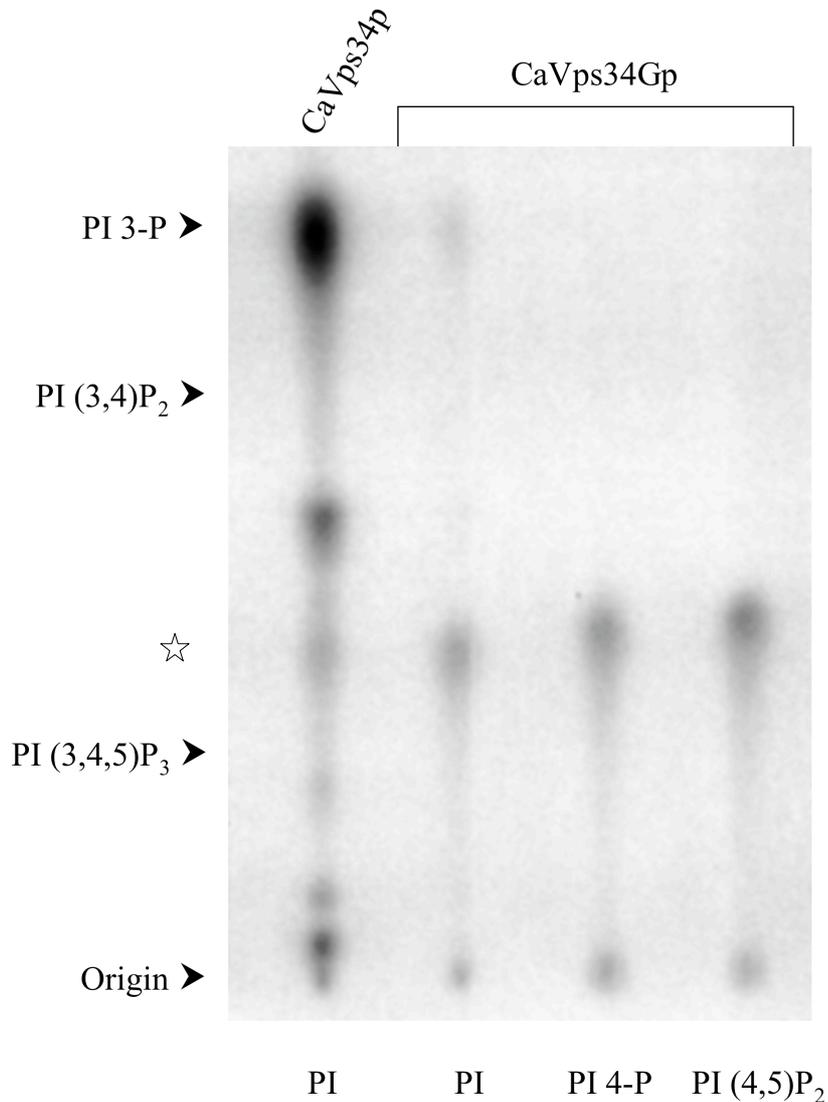


Abbildung 8: Substratspezifität des Mutantenproteins CaVps34Gp. CaVps34Gp wurde zusammen mit [γ -³²P]ATP und PtdIns (PI), PtdIns 4-P (PI 4-P) bzw. PtdIns(4,5)P₂ [PI (4,5)P₂] inkubiert und anschließend mit Dünnschichtchromatographie mittels Chloroform/Aceton/Methanol/Essigsäure/Wasser aufgetrennt. Die Bildung von PtdIns(3,4)P₂ [(PI (3,4)P₂) und PtdIns(3,4,5)P₃ [PI (3,4,5)P₃] konnte nicht nachgewiesen werden. Durch CaVps34Gp gebildetes PtdIns 3-P (PI 3-P) ist als schwaches Signal nachweisbar. Als Vergleich dient das PtdIns 3-P-Signal nach Inkubation mit CaVps34p. Die entsprechenden Retentionslängen der Lipide sind durch Pfeile markiert. Origin: Auftragspunkt. Der Stern markiert ein vermutetes ATP-Degradationsprodukt.

Um die Auswirkungen der vorgenommenen Proteinmodifikationen auf die *in vitro*-Autophosphorylierungsaktivität von CaVps34p zu analysieren, wurden die Proteinmutanten in einem Proteinkinaseassay eingesetzt. Auf diese Weise konnte der Einbau von radioaktiven Phosphat in das jeweilige Protein untersucht werden. Alle drei Proteine, die beiden Mutanten CaVps34Tp und CaVps34Gp sowie der Wildtyp CaVps34p, zeigen ein vergleichbares autoradiographisches Signal. Dies demonstriert, dass die Veränderungen in der potentiellen PI-Kopfgruppeninteraktionsregion von CaVps34p die *in vitro*-Proteinkinaseaktivität dieses Proteins nicht beeinflusst.

Die Ergebnisse der Enzymtests belegen, dass mit CaVps34Tp ein Protein generiert wurde, dessen Lipidkinaseaktivität ohne Beeinflussung der *in vitro*-Autophosphorylierungsaktivität spezifisch ausgeschaltet wurde. Dagegen ist es nicht möglich, durch den Austausch der PI-Kopfgruppeninteraktionsregion von CaVps34p gegen die der Klasse I PI 3-Kinase p110 γ eine Erweiterung der Substratspezifität dieser Klasse 3 PI 3-Kinase zu erreichen.

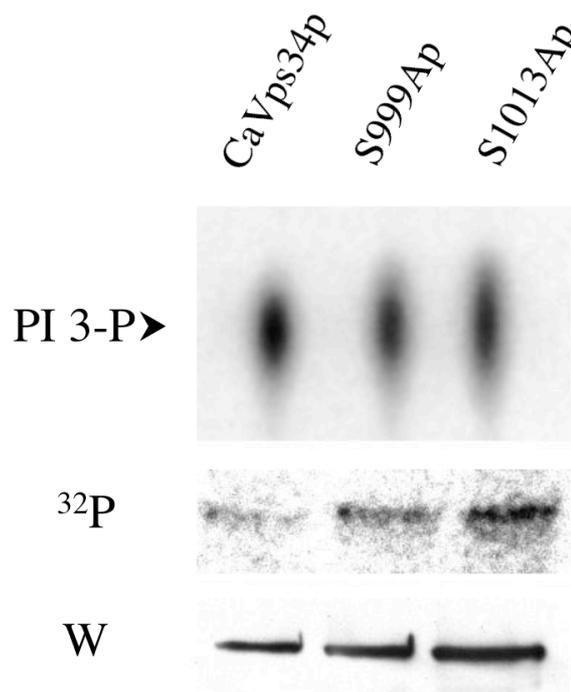


Abbildung 9: *In vitro*-Enzymaktivitäten der CaVps34p Proteinmutanten S999Ap und S1013Ap.

Nach rekombinanter Expression der HisTag-Fusionsproteine und Identifikation im Western Blot (W) wurde die Lipidkinaseaktivität durch Inkubation mit $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ und PtdIns (a) bestimmt. Die Autophosphorylierung der Proteine nach Inkubation mit $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ wurde in einer SDS-Page detektiert (^{32}P) (b).

3.1.3 *In vitro* Enzymaktivität der CaVps34p Serin-Proteinmutanten

Die beiden CaVps34p Proteinmutanten, mit zu Alanin mutierten C-terminale Serinrest Serin⁹⁹⁹ bzw. Serin¹⁰¹³, wurden hinsichtlich ihrer *in vitro*-Lipid- und Autophosphorylierungsaktivität untersucht (Abb. 9). Dabei zeigten sich keine Defekte der Lipidkinaseaktivität. Bei beiden CaVps34p Proteinmutanten, S999Ap und S1013Ap, konnte in dem durchgeführten Lipidkinaseassay ein dem CaVps34p Wildtypprotein vergleichbares autoradiographisches PtdIns 3-P Signal nachgewiesen werden.

Der radioaktive Proteinkinaseassay beider CaVps34p Proteinmutanten S999Ap und S1013Ap zeigte *in vitro* ein Phosphorylierungssignal, das in seiner Intensität dem des CaVps34p Wildtypproteins vergleichbar ist. Dies belegt, dass *in vitro* keines der beiden untersuchten C-terminalen Serine relevant für die intrinsische Proteinkinaseaktivität von CaVps34p ist. So konnte nachgewiesen werden, dass im Gegensatz zu einigen PI 3-Kinasen der Klasse I die Kinase der Klasse III CaVps34p keinen C-terminalen Serin-Rest besitzt, der Ziel einer spezifischen *in vitro*-Autophosphorylierung darstellt.

3.2 *In vivo*-Analyse der Enzymfunktionen von CaVps34p

3.2.1 Generieren eines Lipidkinase-defekten *C. albicans* VPS34 Mutantenstammes

Um die Rolle der Lipidkinaseaktivität von CaVps34p, getrennt von der Proteinkinaseaktivität aber auch von Proteinwechselwirkungen, *in vivo* zu untersuchen, erfolgte die Generierung eines *C. albicans* Mutantenstammes mit hybridem *CaVPS34TOR* Gen ohne funktionelle Lipidkinasedomäne (Abb. 10a). Dafür wurde das Integrationsplasmid pKEUT mit einer Integrationskassette konstruiert, die sowohl das *CaVPS34TOR* Gen als auch das Markergen *CaURA3* enthält. Die Generierung des *VPS34* Mutantenstammes erfolgte durch Transformation des Uridin bedürftigen *vps34* Nullmutantenstammes CAV4 mit dem 6,0 kb *BbvI/HindIII*-Fragment des Integrationsplasmids pKEUT. Das Insert enthält neben der *CaVPS34TOR* Gensequenz die für die homologe Integration in den *VPS34* Genlokus erforderlichen upstream und downstream Sequenzen. Eine Selektion der Mutanten fand durch das Markergen *CaURA3* statt. Die korrekte Integration des *CaVPS34TOR* Gens wurde durch Southern Analyse der *HindIII/KpnI* gespaltenen chromosomalen DNA bewiesen (Abb. 10b). Das 7,0 kb Fragment in der ersten Spur repräsentiert beide *CaVPS34* Allele des *C. albicans* Wildtyp-Stammes SC5314. Der Verlust dieser beiden 7,0 kb Fragmente und das

Auftreten der 2,5 kb und 2,7 kb Fragmente in der zweiten Spur zeigt das Ersetzen beider *VPS34* Allele durch eine *hisG*-Kassete im Stamm CAV4. Wird das komplette Wildtyp *VPS34* Gen zusammen mit dem *URA3* Marker in den Nullmutantenstamm CAV4 reintegriert, kann dies durch ein zusätzliches 8,4 kb Fragment nachgewiesen werden. Dieses Hybridisierungsmuster zeigt der heterozygote *CaVPS34* Reintegrantenstamm CAV5 (dritte Spur). Die vierte Spur in Abbildung 10b zeigt das Fragmentmuster des in dieser Arbeit generierten Lipidkinase-defekten Mutantenstammes CAV9. Bei diesem Stamm spaltet sich das 8,4 kb Fragment, aufgrund der zusätzlichen *KpnI*-Restriktionsstelle im hybriden *CaVPS34TOR* Gen, in ein 3,1 kb und ein 5,3 kb Fragment auf, wodurch die korrekte Integration von *CaVPS34TOR* bewiesen wurde.

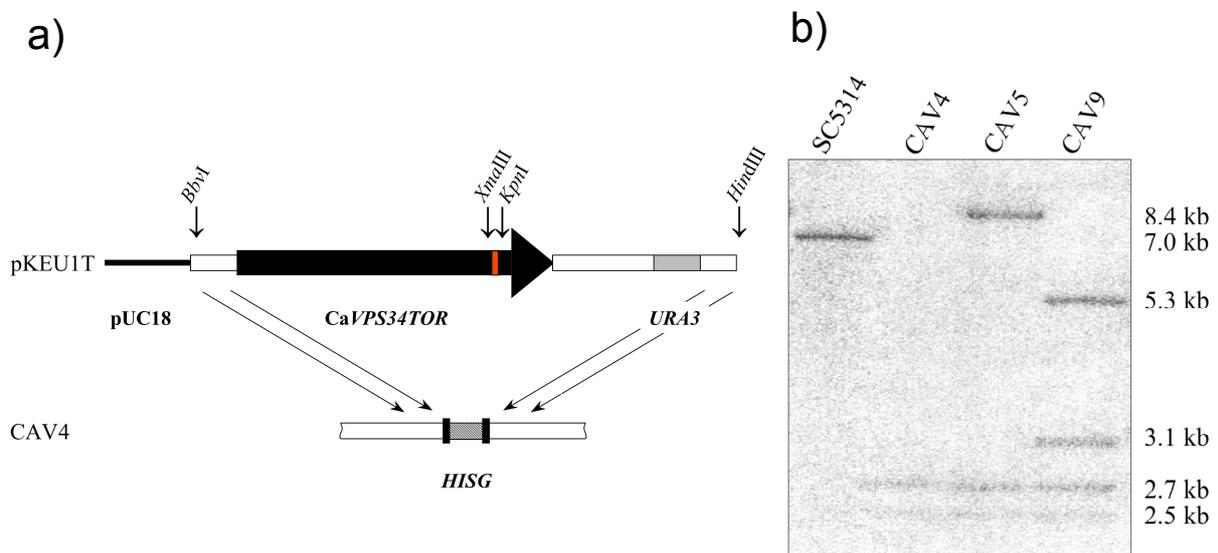


Abbildung 10: Integration des mutierten *CaVPS34TOR* Gens in die *vps34* Nullmutante CAV4 (*ura⁻*). (a) Schematische Darstellung des Plasmids pKEU1T und des chromosomalen Lokus des disruptierten *VPS34* Allels im *ura⁻ vps34* Stamm CAV4 illustriert die Integrationsstrategie. Das Plasmid pKEU1T beinhaltet das *CaVPS34TOR* Gen (fetter schwarzer Pfeil: kodierende Region, offene Boxen: nichtkodierende Region) und das *URA3* Gen. Die putative PI-Kopfgruppeninteraktionsregion zwischen den Restriktionsstellen *XmaIII* und *KpnI* wurde gegen die korrespondierende Region des *CaTOR* Gens ausgetauscht, übereinstimmend mit der Konstruktion des hybriden *CaVps34T* Proteins (rote Box). (b) Southern Blot der *KpnI/HindIII* gespaltene chromosomalen DNA zeigt die korrekte Integration des *CaVPS34TOR* Gens in den Stamm CAV4. Spur 1: *C. albicans* WT SC5314, Spur 2: *vps34* Nullmutante CAV4, Spur 3: *VPS34* heterozygote Revertante CAV5, Spur 4: CAV9 mit dem Lipidkinase-defekten *CaVPS34TOR* Gens. Der Blot wurde mit dem 4,9 kb großen und [α - 32 P]dCTP markierten *EcoRI/HindIII*-Fragments des Plasmids pKE2 hybridisiert.

3.2.2 Wachstumsanalyse der *CaVPS34* Lipidkinasemutante CAV9

Der Verlust beider *VPS34* Allele führt bei *C. albicans* zu einer leichten Verringerung der Wachstumsraten (Bruckmann *et al.*, 2000). Da Defekte im Wachstum Einfluss auf verschiedene Phänotypen haben, wurde das Wachstum der Lipidkinasemutante in verschiedenen Nährmedien untersucht. Zu diesem Zweck wurde der Lipidkinase-defekte Stamm CAV9 in YPD- und Sabouraud-Medium angezogen und die Generationszeiten bestimmt (Tab. 2). Die *VPS34* Lipidkinasemutante CAV9 hat eine Generationszeit von ca. 84 Minuten in YPD-Vollmedium. Diese ist mit der Nullmutante CAV3, deren Generationszeit ca. 76 Minuten beträgt, vergleichbar. Dies belegt einen Wachstumsdefekt der Mutanten, da die Zellzahl des Wildtyps SC5314 sich während der logarithmischen Wachstumsphase schon nach 45 Minuten verdoppelt. Im Sabouraud-Medium wurde für CAV9 eine Verdopplungszeit von etwa 68 Minuten ermittelt. Die Generationszeit der Nullmutante CAV3 bzw. des Wildtyps beträgt ca. 72 bzw. 65 Minuten. Dieses Ergebnis zeigt, dass in dem nährstoffärmeren Medium kein Wachstumsdefekt der *CaVPS34* Mutanten CAV9 und CAV3 vorhanden ist. Frühere Untersuchungen bei denen gezeigt werden konnte, dass sich die *VPS34* Reintegrante CAV5 hinsichtlich ihres Wachstums wie der *C. albicans* Wildtyp verhält (Bruckmann *et al.*, 2000), weisen darauf hin, dass beobachtete Wachstumsdefekte allein auf das Ausschalten der Lipidkinasefunktion zurückgeführt werden können.

<i>C. albicans</i> - Stamm	Generationszeit in Minuten	
	YPD-Medium	Sabouraud-Medium
CAV9	84	68
CAV3	76	72
SC5314	45	65

Tabelle 2: Generationszeiten der *C. albicans*-Stämme CAV9, CAV3 und SC5314. YPD- bzw. Sabouraud-Medium wurde mit 5×10^5 Zellen/ml des jeweiligen Stammes beimpft und das Wachstum bei 30°C über 36 h verfolgt.

3.2.3 Einfluss der Lipidkinaseaktivität von CaVps34p auf Vakuolenfunktion und intrazellulären Vesikeltransport

Die PI 3-Kinase CaVps34p ist in verschiedene Wege des Vesikeltransports zur Vakuole involviert. Die Bedeutung der Lipidkinaseaktivität von CaVps34p und damit die Produktion des „second messengers“ PtdIns 3-P auf die Funktion der Vakuole und den intrazellulären Vesikeltransport wurde durch mikroskopische Analysen der Lipidkinasemutante CAV9 untersucht. Die differenziellen Interferenzkontrastmikroskopie (DIC) zeigte eine deutliche Vergrößerung sowohl der Zellen als auch der Vakuole von CAV9. Dieser Phänotyp korreliert auffällig mit dem der Nullmutante CAV3. Dies zeigt, dass ein Defekt der PtdIns 3-P Produktion zu einer Beeinflussung der Vakuolenfunktion führt. Um dies genauer zu analysieren, wurde die Fluoreszenzmikroskopie angewandt. Der Fluoreszenzfarbstoff FM4-64 bietet die Möglichkeit den endozytotischen Vesikeltransport zur Vakuole zu untersuchen. In Hefezellen wird dieser lipophile Farbstoff in die Zellmembran aufgenommen und folgt anschließend der endozytotischen Aufnahme und dem Vesikel-vermittelten Transport zur Vakuole. Mittels Fluoreszenzmikroskopie wurde die Verteilung von FM4-64 in der Lipidkinasemutante CAV9 und damit der Einfluss der PI 3-Kinaseaktivität von CaVps34p auf die Endozytose untersucht (Abb. 11a). Als Kontrollen dienten die Nullmutante CAV3 und der Wildtyp SC5314. Nach Applikation des Farbstoffs wurde bei der Lipidkinasemutante CAV9 eine schwache Färbung der Vakuolenmembran und eine starke Färbung prävakuolärer Kompartimente im Zytoplasma nachgewiesen. Die gleiche Verteilung des Farbstoffs zeigte die Nullmutante CAV3. Beim Wildtyp SC5314 erreichte der Farbstoff dagegen die Vakuole und es konnte das typische Ringmuster nachgewiesen werden. Im Vergleich zu den beiden *VPS34* Mutanten fehlten dagegen endozytotische Vesikel im Zytoplasma. Diese Unterschiede belegen, dass die Bildung von PtdIns 3-P in die letzten Schritte der Endozytose, dem Transport der prävakuolären endozytotischen Vesikel zur Vakuole bzw. bei deren Fusion mit der Vakuolenmembran, involviert ist.

Das Vakuolenlumen besitzt einen sauren pH-Wert, was unmittelbar mit der Aufgabe dieses Organells beim Proteinabbau sowie der Ionenhomöostase der Hefezelle zusammenhängt. Eine Methode den pH-Wert der Vakuole zu bestimmen stellt der Fluoreszenzfarbstoff Quinacrine dar. Diese schwache Base akkumuliert in der Vakuole, wenn sie durch eine saure Umgebung protoniert wird. Um die Rolle der Lipidkinaseaktivität von CaVps34p bei der Vakuolenansäuerung zu überprüfen, wurde die Lipidkinasemutante CAV9 nach Behandlung mit Quinacrine untersucht (Abb. 11b). Durch Fluoreszenzmikroskopie konnte keine Anreicherung von Quinacrine in der Vakuole der Lipidkinasemutante CAV9 nachgewiesen werden, was für ein alkalisches Vakuolenlumen spricht. Allerdings wurde eine Akkumulation

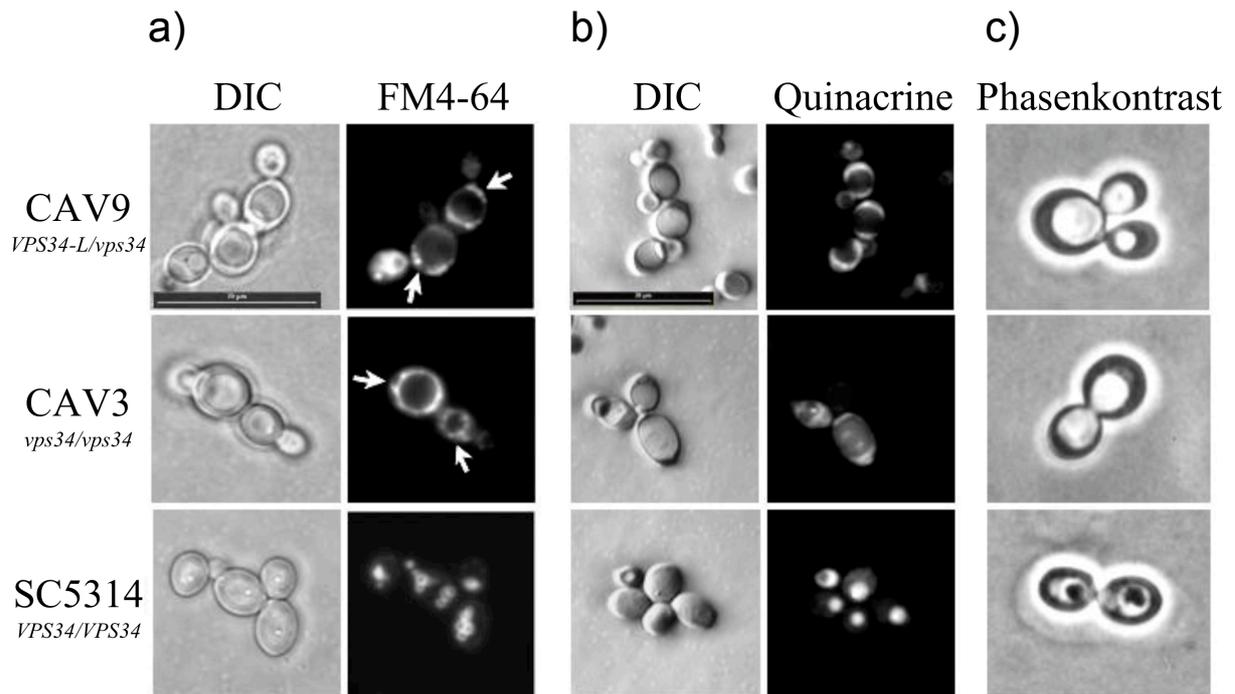


Abbildung 11: Mikroskopische Untersuchungen der *C. albicans* CaVPS34 Lipidkinasemutante CAV9 im Vergleich zum WT SC5314 und der *vps34* Nullmutante CAV3. Mikroskopie bei 1000facher Vergrößerung. (a) Charakterisierung des endozytischen Proteintransports durch Untersuchung der Verteilung des lipophilen Fluoreszenzfarbstoffs FM4-64. Die Zellen wurden 30 min mit FM4-64 versetzt und anschließend 60 min ohne den Farbstoff inkubiert. Differenzieller Interferenzkontrast (DIC) und Fluoreszenzmikroskopie (FM4-64) zeigen die Akkumulation von FM4-64 in prävakuolären Kompartimenten im Zytoplasma der *C. albicans* Mutanten CAV9 und CAV3 (Pfeile). Der WT SC5314 zeigt das typische Ringmuster nach Akkumulation des Farbstoffs in der Vakuolenmembran. Der schwarze Balken entspricht einer Größe von 20 μm . (b) Untersuchung der Vakuolenansäuerung mittels Quinacrine. Die fluoreszierende schwache Base akkumuliert in der Vakuole wenn sie durch eine saure Umgebung protoniert wird. Die *C. albicans* Zellen wurden 5 min zusammen mit Quinacrine in YPD pH 7,5 inkubiert. Nach Auswaschen des überschüssigen Farbstoffs folgte die Auswertung mittels DIC und Fluoreszenzmikroskopie (Quinacrine). Die *C. albicans* Mutanten CAV9 und CAV3 zeigen eine Färbung des Zytoplasmas, die Vakuolen sind farbstofffrei. Beim WT SC5314 kann eine Akkumulation von Quinacrine in der Vakuole beobachtet werden. (c) Autophagozytose der *C. albicans* Mutanten nach Induktion durch N-Mangel. Die *C. albicans* Stämme wurden dafür 1 h bei 30°C in SD-N-Medium inkubiert. Den Abbau von Autophagosomen in der Vakuole verhinderte der Zusatz von 1 mM PMSF. Die Auswertung erfolgte mittels Phasenkontrastmikroskopie. Bei beiden *C. albicans* *VPS34* Mutanten CAV9 und CAV3 enthalten die Vakuolen keine Vesikel. Der WT SC5314 zeigt dagegen eine Akkumulation von Autophagosomen in der Vakuole.

des Farbstoffs im Zytoplasma beobachtet. Ein vergleichbares Färbungsmuster zeigt die *vps34* Nullmutante CAV3. Der Wildtyp hingegen akkumuliert Quinacrine in der Vakuole, das Zytoplasma bleibt ungefärbt. Dieses Resultat zeigt, dass die Lipidkinaseaktivität von CaVps34p eine Rolle bei der Vakuolenansäuerung spielt und dass dieser Azidifizierungsdefekt das Milieu des Zytoplasmas hinsichtlich des pH-Wertes beeinflusst.

Die Autophagozytose ist ein weiterer Transportprozess in der Zelle mit Beteiligung von CaVps34p. Bei Nährstoffmangel oder nach Gabe des antibiotisch wirksamen Makrolids Rapamycin werden große Teile des Zytoplasmas mit einer Doppelmembran umschlossen und in die Vakuole transportiert. Ein Unterschied zu anderen Vesikeltransporten besteht in der Größe der Vesikel (300-900 nm). Die Autophagozytose der Lipidkinasemutante CAV9 wurde nach Kultivierung in Stickstoffmangelmedium unter Zusatz von 1 mM PMSF, das den Abbau der Autophagozytosevesikel in der Vakuole verhindert, untersucht. Die Phasenkontrastmikroskopie zeigte in den Zellen der Lipidkinasemutante große Vakuolen ohne interne Vesikel (Abb. 11c). Bei der Nullmutante CAV3 wurde der gleiche Phänotyp beobachtet. Beim Wildtyp SC5314 hingegen konnten Vesikel in der Vakuole nachgewiesen werden. Lipidkinasemutante und Nullmutante zeigten nach Induktion der Autophagozytose durch Rapamycin den gleichen Autophagozytosedefekt wie nach Induktion unter Stickstoffmangel (Daten nicht abgebildet). Diese Ergebnisse belegen den Einfluss der PI 3-Kinaseaktivität von CaVps34p bei der Autophagozytose von *C. albicans*. Sie erlauben aber keine genaue Aussage bei welchem Schritt dieses Prozesses PtdIns 3-P involviert ist.

3.2.4 Die Lipidkinaseaktivität von CaVps34p beeinflusst das hyphale Wachstum

Die polymorphe Hefe *C. albicans* ist in der Lage in Abhängigkeit von ihrer Umwelt Hyphen auszubilden. Hohe Temperaturen, neutraler pH, Nährstoffmangel und Serum sind Auslöser des hyphalen Wachstums (Ernst, 2000; Odds, 1988). Aufgrund der Bedeutung des Hyphenwachstums für die Virulenz wurde bei der Lipidkinasemutante CAV9 die Rolle der Lipidkinaseaktivität von CaVps34p in diesem Prozess analysiert. Zu diesem Zweck wurde der Phänotyp der Mutante nach Wachstum unter Hyphen induzierenden Bedingungen, sowohl im flüssigen als auch auf festem Medium, betrachtet.

Zuerst wurde das Wachstum der Mutanten in flüssigen YPD-Medium untersucht (Abb. 12a). Die Induktion der Hyphenbildung erfolgte bei 37°C durch Zusatz von 15% FCS. Der Anteil der Zellen mit Keimschläuchen wurde am Mikroskop bestimmt. Der Mutantenstamm CAV9 zeigte dabei signifikante Defekte des filamentösen Wachstums. So war eine Verzögerung der Hyphenbildung im Vergleich zum Wildtyp zu beobachten. CAV9 erreichte mit etwa 90%

das Maximum der Hyphen bildenden Zellen nach ca. 180 min. Ausserdem zeigten ca. 80% der filamentös wachsenden Zellen einen pseudohyphalen Phänotyp. Dieses Ergebnis entspricht den Beobachtungen, die bei der *vps34* Nullmutante CAV3 gemacht wurden. Der Wildtyp SC5314 zeigte hingegen normales Hyphenwachstum, mit einem vernachlässigbar geringen Anteil an Pseudohyphen. Der Hefe-Hyphye Switch war schon nach ca. 90 min abgeschlossen und 100% der Zellen zeigten einen hyphalen Phänotyp.

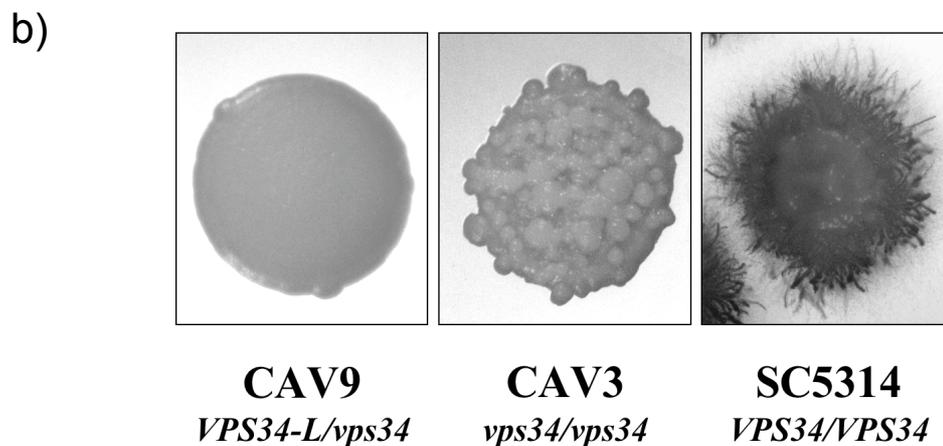
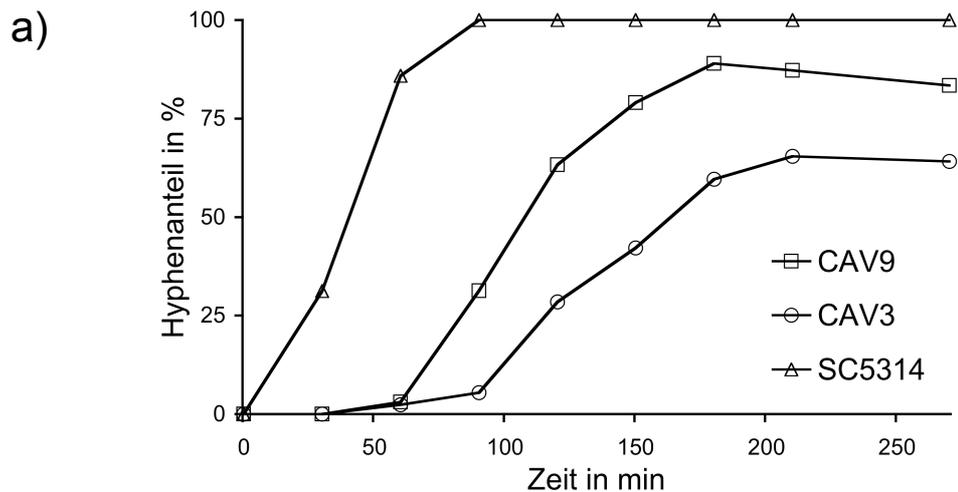


Abbildung 12: Hyphenbildung des *C. albicans* *CaVPS34* Lipidkinasemutante CAV9 im Vergleich zum WT SC5314 und der *vps34* Nullmutante CAV3. (a) Hyphales Wachstum in flüssigen YPD-Medium nach Induktion mit 15% fetalem Kälberserum (FCS) bei 37°C. Ein Hyphenanteil von 100% meint, dass alle Hefezellen echte Hyphen oder Pseudohyphen ausbilden. (b) Phänotypen der Kolonien der Stämme CAV9, CAV3 und SC5314 nach 14tägigen Wachstum auf festen Spider-Medium mit Mannit als C-Quelle bei 37°C.

Auch auf festen Nährmedien bildet *C. albicans* Hyphen aus. Dabei ist der feste Nährboden selbst Auslöser der Hyphenbildung. Die Lipidkinasemutante CAV9 zeigte nach Seruminduktion auf YPD-Agar sowie auf Spider-Agar, bei dem ein Nährstoffmangel imitiert wird, keine filamentösen Kolonien. Abbildung 12b zeigt die Koloniemorphologie der Stämme nach Wachstum auf Spider-Agar. Die Kolonien der Lipidkinasemutante bildeten keinen Hyphensaum und die mikroskopische Untersuchung von Koloniematerial zeigte nur Hefen. Dieser Phänotyp ist mit dem der *vps34* Nullmutante CAV3 vergleichbar, die ebenfalls unter diesen Bedingungen kein Hyphenwachstum zeigt. Der Wildtyp SC5314 zeigt dagegen ein deutliches filamentöses Wachstum unter diesen Bedingungen. Beide *CaVPS34* Mutanten CAV9 und CAV3 zeigen Unterschiede in der Koloniemorphologie. Die Kolonien der Lipidkinasemutante CAV9 sind glatt und rund, während die von CAV3 eine raue, unregelmäßige Oberfläche aufweisen. Ähnliche Ergebnisse hinsichtlich der Hyphenbildung wurden auch nach Induktion durch Serum auf YPD-Agar beobachtet (Daten nicht abgebildet). Auch unter diesen Bedingungen bildeten weder CAV9 noch CAV3 Hyphen aus, während der Wildtyp ein filamentöses Wachstum zeigte. Es konnten bei dieser Untersuchung ebenfalls signifikante Unterschiede der Koloniemorphologie von CAV9 und CAV3 nachgewiesen werden, vergleichbar denen nach Wachstum auf Spider-Agar. Diese Ergebnisse belegen, dass die Lipidkinaseaktivität von CaVps34p eine entscheidende Rolle bei der Hypheninduktion durch Serum und Nährstoffmangel darstellt.

Eine weitere Möglichkeit Hyphen zu induzieren ist eine Kultur unter Sauerstoffmangel bei niedriger Temperatur. Bei diesem Experiment wurde die Lipidkinasemutante in YPS-Agar eingebettet und bei 24°C kultiviert. Die Bestimmung des Anteils von Kolonien mit hyphalem Charakter zeigte ein verfrühtes Einsetzen der Hyphenbildung der Lipidkinasemutante. Nach 72stündigem Wachstum bei 24°C betrug der Anteil von Kolonien mit hyphalem Phänotyp 35% bei CAV9. Dies war vergleichbar mit der Nullmutante CAV3, bei der 26% der Kolonien Hyphen ausbildeten. Keine myzelialen Kolonien wurden dagegen bei SC5314 beobachtet und ihr Anteil bei der *CaVPS34* Revertante CAV5 betrug nur 9%. So konnte auch bei diesem alternativen Hyphen-induzierenden Signalweg in *C. albicans* die entscheidende Rolle der Lipidkinaseaktivität von CaVps34p belegt werden.

3.2.5 Die *VPS34* Lipidkinasemutante CAV9 ist in der Lage Chlamydosporen auszubilden

Eine andere morphologische Form der polymorphen Hefe *C. albicans* ist die Chlamydospore. Chlamydosporen sind große, stark lichtbrechende Zellen, die sich durch eine besonders

dickwandige Zellwand auszeichnen. Auslöser dieses Entwicklungsprozesses ist Nährstoffmangel verbunden mit einer Sauerstoff-limitierten Umgebung.

Um den Einfluss der Lipidkinaseaktivität von CaVps34 auf die Bildung von Chlamydosporen zu untersuchen, wurde die Lipidkinasemutante CAV9, die *vps34* Nullmutante CAV3 sowie die Revertante CAV5 und der Wildtyp SC5314 auf einem mit Reisagar beschichteten Objektträger unter mikroaerophilen Bedingungen bei RT im Dunkeln angezogen und das Wachstum mikroskopisch untersucht (Abb.: 13). Dabei konnte festgestellt werden, dass die Lipidkinasemutante in der Lage ist Chlamydosporen auszubilden. Auch beim Wildtyp und der Revertante konnten Chlamydosporen nachgewiesen werden. Dagegen zeigte die Nullmutante unter diesen Bedingungen keine Chlamydosporen. Dieses Resultat belegt, dass die Lipidkinaseaktivität von CaVps34p nicht für die Chlamydosporenbildung benötigt wird. Der bei CAV3 beobachtete Verlust der Fähigkeit diese dormante Zellform auszubilden, muss darum auf eine andere Aktivität von CaVps34p, wie die Proteinkinase, zurückzuführen sein.

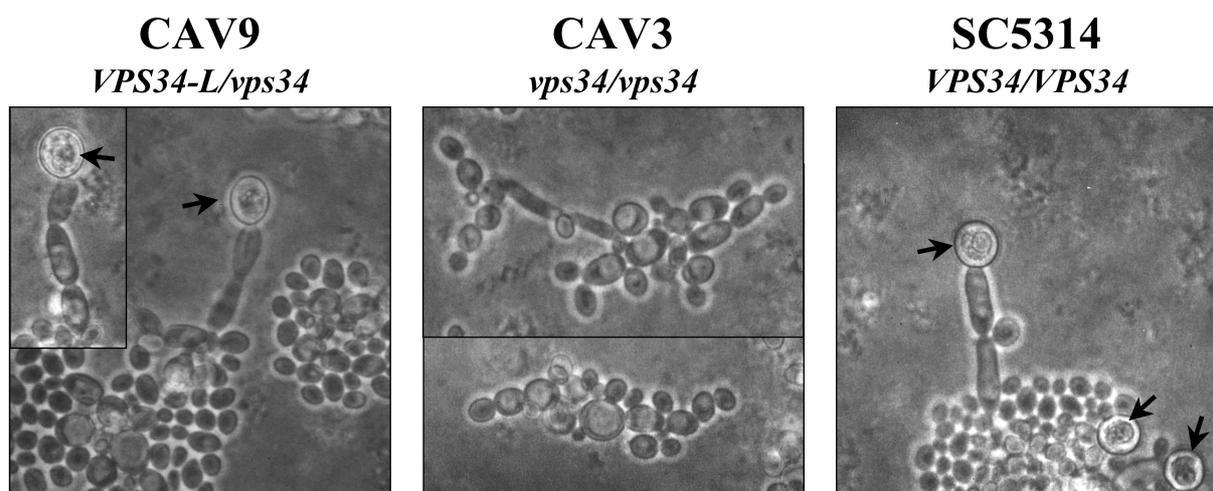


Abbildung 13: Chlamydosporenbildung des *C. albicans* CaVPS34 Lipidkinasemutante CAV9 im Vergleich zum WT SC5314 und der *vps34* Nullmutante CAV3. Die Stämme wurden drei Tage bei 24°C auf Reisagar unter mikroaerophilen Bedingungen kultiviert. Die Auswertung der Chlamydosporenbildung erfolgte durch Phasenkontrastmikroskopie (400fache Vergrößerung). Chlamydosporen sind als dickwandige, stark lichtbrechende, runde Zelle sichtbar (Pfeile).

3.2.6 Die Lipidkinaseaktivität von CaVps34p beeinflusst die Adhärenz von *C. albicans* an humane Buccalzellen

Ein wichtiger Virulenzfaktor von *C. albicans* ist die Fähigkeit an Wirtszellen zu adhären. Um den Einfluss der Lipidkinaseaktivität von CaVps34p auf diesen Virulenzfaktor von *C. albicans* zu testen, wurde die Adhäsionsfähigkeit der Lipidkinasemutante CAV9 überprüft. Ein direkter Nachweis der Adhäsion von *C. albicans* an Wirtszellen erfolgte mittels eines mikroskopisch auszuwertenden Tests auf Adhäsion an humane Buccalzellen (Bailey *et al.*, 1995). In diesem Test zeigten 50% der Wirtszellen eine Besiedlung mit der Lipidkinasemutante CAV9. Die Nullmutante CAV3 war in der Lage an 45%, der Wildtyp an 80% der ausgezählten Buccalzellen zu adhären. Dieses Resultat belegt sowohl für CAV9 als auch für CAV3 ein Adhärenzdefekt im Vergleich zum Wildtyp.

3.2.7 Die VPS34 Lipidkinasemutante CAV9 unterscheidet sich in der Stresssensitivität, der Ionendetoxifikation sowie im Wachstum unter alkalischen Bedingungen von der Nullmutante CAV3

Die Fähigkeit zur Anpassung auf Änderungen der Umwelt wirkt sich auf das Überleben von Zellen aus. Um zu klären welche Rolle die Lipidkinasefunktion von CaVps34p bei der Reaktion von *C. albicans* auf verschiedenen Stressfaktoren spielt, wurden der Einfluss dieser Faktoren auf das Wachstum der Lipidkinasemutante CAV9 untersucht und mit der Nullmutante CAV3, dem Wildtyp SC5314 sowie der heterozygoten VPS34 Reintegrante CAV5 verglichen.

Der Einfluss der Temperatur auf das Wachstum der Lipidkinasemutante CAV9 wurde auf YPD-Agar bei 30°C, 37°C, 38°C und 40°C untersucht (Abb. 14). CAV9 ist in der Lage bei einer Temperatur von 38°C zu wachsen, während die Nullmutante CAV3 bei dieser Temperatur kein Wachstum zeigt. Dies belegt einen Unterschied in der Temperatursensitivität beider VPS34 Mutanten. Bei der Untersuchung wurde zudem ein eingeschränktes Wachstum der Lipidkinasemutante CAV9 bei einer Temperatur von 38°C und eine Sensitivität gegenüber einer Temperatur von 40°C beobachtet. Dieser Phänotyp unterscheidet die Lipidkinasemutante vom Wildtyp und der Reintegrante CAV5.

Um die Reaktion der Lipidkinasemutante auf hyperosmotischen Stress zu untersuchen, wurde das Wachstum auf YPD-Agarplatten, denen die Osmolyten NaCl sowie KCl in einer Konzentration von 1 M, 1,2 M bzw. 1,5 M zugesetzt wurden, verfolgt (Abb. 15). Hierbei wurde bei CAV9 ein Wachstum auf YPD mit einer Osmolytkonzentration von 1,2 M

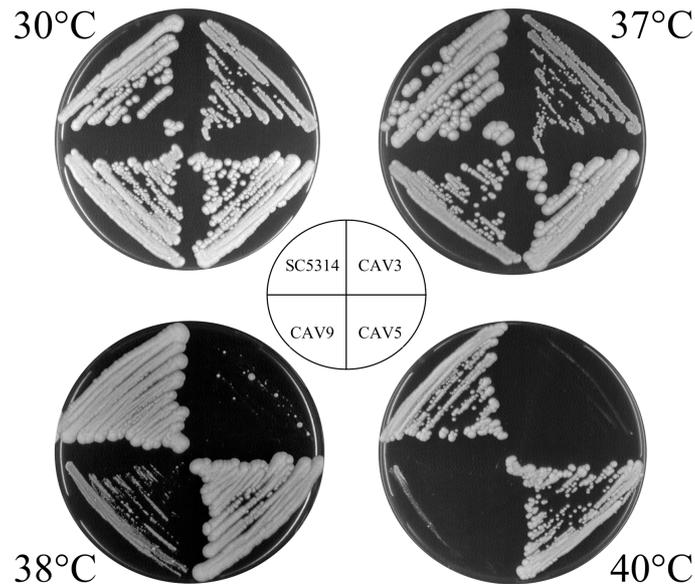


Abbildung 14: Sensitivität der *C. albicans* VPS34 Lipidkinasemutante CAV9 gegen hohe Temperaturen im Vergleich mit dem WT SC5314, der *vps34* Nullmutante CAV3 und der VPS34 Revertante CAV5. Das Wachstum der *C. albicans* Stämme erfolgte auf YPD-Agar bei 30°C, 38°C und 40°C über 48 h.

nachgewiesen. Dagegen ist die Nullmutante CAV3 nicht in der Lage diesen hyperosmotischen Stress zu überleben. Allerdings zeigte sich bei einer Osmolytkonzentration von 1,5 M eine reduzierte Stressresistenz des Mutantenstammes CAV9 verglichen mit dem Wildtyp SC5314 und CAV5. Die Analysen der Auswirkung von Temperatur und Osmostress auf die beiden VPS34 Mutanten CAV9 und CAV3 belegen, dass die Lipidkinaseaktivität von CaVps34p bei der Reaktion von *C. albicans* auf diese Umweltfaktoren einen geringen Einfluss besitzt. Eine verringerte Stresstoleranz im Vergleich zum Wildtyp und der Revertante CAV5 kann auf andere schon beschriebene Wachstumsdefekte der Lipidkinasemutante in YPD-Medium zurückgeführt werden.

Eine Möglichkeit der Hefezelle auf eine hyperosmotische Umgebung zu reagieren, ist die Aktivierung des HOG-MAP-Kinase Signalwegs, in dessen Folge das Osmolyt Glycerol produziert wird, was zu einer osmotischen Stabilisation der Zelle führt. Das Wachstum mit Galaktose als C-Quelle erlaubt der Zelle nur eine stark eingeschränkte Glycerolproduktion. Um den Einfluss der Produktion dieses zelleigenen Osmolyten auf die Osmosensitivität der VPS34 Lipidkinasemutante zu überprüfen, erfolgte die Kultivierung auf YPG-Agar bei einer NaCl-Konzentration von 1,2 M (Daten nicht abgebildet). Dabei zeigte die CAV9 Mutante die gleiche Osmotoleranz beim Wachstum auf Galaktoseagar und Glukosemedium. Auch die Temperatursensitivität der Lipidkinasemutante ist unabhängig von der intrazellulären Glycerolproduktion. Dies zeigte die Analyse des Wachstums auf YPG-Agar bei

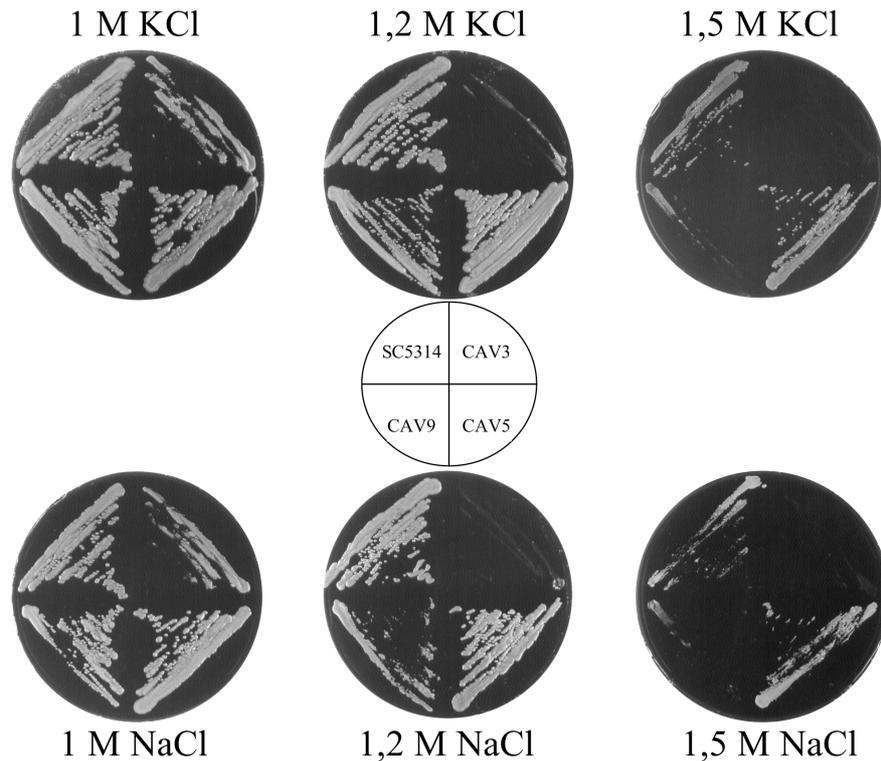


Abbildung 15: Osmosensitivität der *C. albicans* VPS34 Lipidkinasemutante CAV9 verglichen mit dem WT SC5314, der *vps34* Nullmutante CAV3 und der VPS34 Revertante CAV5. Die Stämme wurden auf YPD-Agar dem 1,0 M, 1,2 M und 1,5 M NaCl bzw. KCl zugesetzt wurden 48 h bei 30°C angezogen.

unterschiedlichen Temperaturen (Daten nicht abgebildet). Auch bei den Kontrollstämmen CAV3, SC5314 und CAV5 war kein Unterschied im Wachstum unter Temperatur- und Osmostress auf YPG- und YPD-Medium zu beobachten. Demnach besteht kein Zusammenhang zwischen der Produktion des Osmolyts Glycerol und der Temperatur- bzw. Osmosensitivität, ausgelöst durch die Deletion der Lipidkinaseaktivität von CaVps34p bzw. des kompletten Proteins in *C. albicans*. Die nicht nachweisbare Osmosensitivität der Lipidkinasemutante CAV9 sowie der Nullmutante CAV3 beim Wachstum auf YPD-Agar dem 1,5 M Sorbit zugesetzt wurden (Daten nicht abgebildet) lässt vermuten, dass Defekte im Ionentransport für die durch NaCl bzw. KCl ausgelöste Osmosensitivität verantwortlich sind. Aus diesem Grund wurde der Einfluss des Ionentransportes bei der beobachteten Osmosensitivität der Lipidkinasemutante durch Analyse der Ionentoxizität von CAV9 untersucht. Aufgrund der toxischen Auswirkung von Mn^{2+} -, Zn^{2+} - und Cu^{2+} -Ionen auf die Zelle in niedriger Konzentration ohne osmotische Relevanz besteht die Möglichkeit, Ionenentgiftung getrennt vom osmotischen Stress zu betrachten. Dies ist bei gering toxischen Ionen wie Na^+ oder K^+ nicht möglich. Die Toxizität von $MnCl_2$, $ZnCl_2$ und $CuCl_2$ auf die *C. albicans*-Stämme wurde durch Wachstumsanalyse auf YPD-Agar, der mit den die

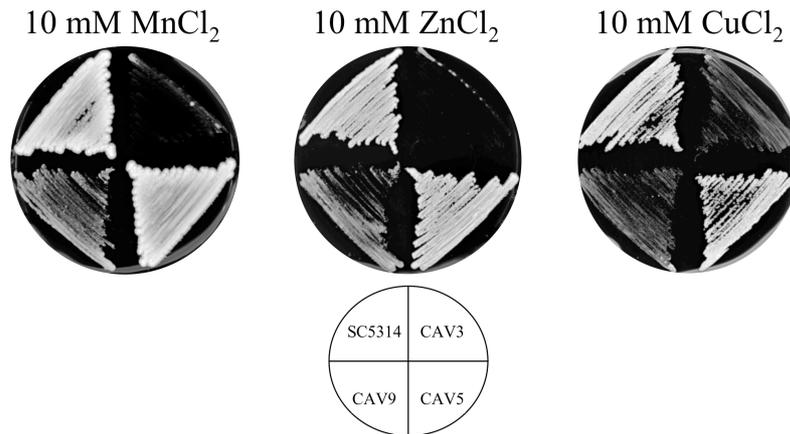


Abbildung 16: Ionentoxizitätsuntersuchung der *C. albicans* VPS34 Lipidkinasemutante CAV9, dem WT SC5314, der *vps34* Nullmutante CAV3 und der VPS34 Revertante CAV5. Die Stämme wurden 48 h auf YPD-Agar dem 10 mM MnCl₂, ZnCl₂ bzw. CuCl₂ zugesetzt wurde angezogen.

jeweiligen Salzen in einer Konzentration von 10 mM supplementiert wurde untersucht (Abb. 16). Die Lipidkinasemutante CAV9 zeigte dabei eine höhere Toleranz gegenüber Mn²⁺- und Zn²⁺-Ionen als die Nullmutante CAV3. Dagegen wirken Cu²⁺-Ionen vergleichbar toxisch auf beide VPS34 Mutantenstämme. Dieses Ergebnis zeigt den Einfluss der Lipidkinaseaktivität von CaVps34p auf die Entgiftung von Cu²⁺, da der Verlust dieser Enzymaktivität zu einem ähnlichen Phänotyp wie die Deletion des kompletten CaVps34p in *C. albicans* führt. Die Toxizität von Mn²⁺ und Zn²⁺ ist dagegen nicht von der Lipidkinaseaktivität des Proteins abhängig.

Im Zusammenhang mit den Untersuchungen der Reaktion auf Umweltstress wurde das Wachstum der VPS34 Lipidkinasemutante bei unterschiedlichen pH-Werten überprüft (Abb. 17). Dafür wurde CAV9 zusammen mit den Kontrollstämmen auf Sabouraud-Agar mit einem pH-Wert von 4, 6 und 8 bei 30°C kultiviert. Die Lipidkinasemutante zeigte dabei eine hohe Toleranz auf die Erhöhung des pH-Wertes im Medium. Das Wachstum der *C. albicans* Mutante bei allen untersuchten pH-Werten ist vergleichbar mit dem Wildtyps SC5314 und der VPS34 Reintegrante CAV5. Dagegen ist die *vps34* Nullmutante stark sensitiv auf eine Erhöhung des pH-Wertes. Schon ein schwach alkalischer pH-Wert von pH 6 bewirkt einen Wachstumsdefekt dieser Mutante. Bei pH 8 ist bei CAV3 kein Wachstum nachweisbar. Der Unterschied der beiden VPS34 Mutanten war überraschend, da vorher durch Quinacrine-Färbung ein Ansäuerungsdefekt von CAV9 nachgewiesen wurde, welcher dem der Nullmutante CAV3 entspricht (siehe oben). Die Untersuchungen des Wachstums bei unterschiedlichen pH-Werten zeigen, dass eine Funktion von CaVps34p unabhängig von der Lipidkinaseaktivität beim Wachstum von *C. albicans* im neutralen bis basischen Milieu entscheidend ist.

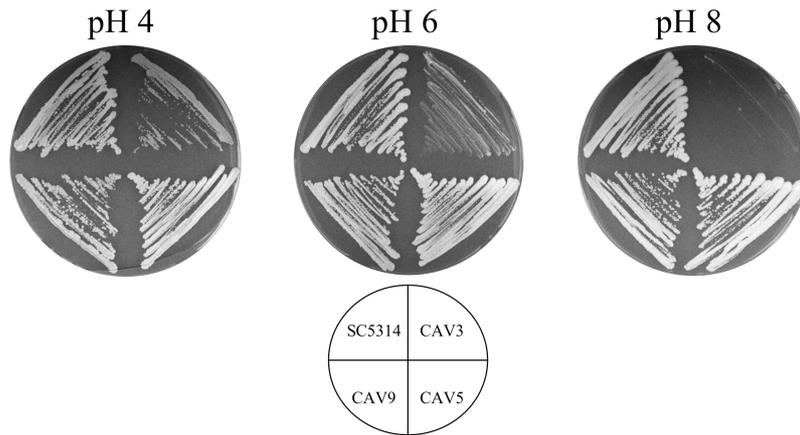


Abbildung 17: Wachstum der *C. albicans* Lipidkinasemutante CAV9, SC5314, CAV3 und CAV5 bei unterschiedlichen pH-Werten. Die Anzucht erfolgte auf Sabouraud-Medium dessen pH-Wert auf pH 4, pH 6 bzw. pH 8 eingestellt wurde bei 30°C über 48 h.

3.2.8 Die *VPS34* Lipidkinasemutante CAV9 zeigt eine geringe Rapamycinsensitivität

Das antibiotische Makrolid Rapamycin ist ein Inhibitor des TOR (Target of Rapamycin) Signalweges. In Gegenwart von Rapamycin wird in *C. albicans* eine Zellantwort provoziert, die derjenigen ähnelt, die durch Nährstoffmangel ausgelöst wird. Um die Rapamycinsensitivität der *VPS34* Lipidkinasemutante auf diese Substanz zu untersuchen, wurde das Wachstum von CAV9, sowie der Kontrollstämme CAV3 und SC5314 in SD-Medium mit und ohne Zusatz von 0,2 µg/ml Rapamycin sowie das Überleben der *C. albicans* Stämme 72 h nach Rapamycingabe bestimmt (Abb. 18). Die Lipidkinasemutante CAV9 zeigte ein verringertes Wachstum unter Rapamycinbehandlung. Auch beim Wildtyp SC5314 ist Wachstumsdefekt in Gegenwart von Rapamycin zu beobachten. Die Lipidkinasemutante zeigt allerdings eine längere lag-Phase. Die Nullmutante CAV3 ist nicht in der Lage in SD-Medium mit Rapamycin zu wachsen. Die Bestimmung der Überlebensraten mit und ohne Rapamycin zeigte für CAV9 und SC5314 einen deutlichen Verlust der Vitalität der Zellen unter Rapamycin. Die Nullmutante CAV3 überlebt die Rapamycinbehandlung nicht. Die Untersuchung zeigte außerdem, dass die Überlebensrate von CAV9 in Medium mit und ohne Rapamycin im Vergleich zum Wildtyp SC5314 reduziert war. Solche Unterschiede, die unabhängig von der Rapamycingabe auftreten, stehen vermutlich im Zusammenhang mit Defekten der Lipidkinasemutante, die ebenfalls das Wachstum und Überleben von *C. albicans* beeinflussen. Die vorliegenden Resultate zeigen eine Funktion von CaVps34p

bei der Reaktion von *C. albicans* auf Rapamycinbehandlung, die unabhängig von der Lipidkinaseaktivität des Proteins ist. Dies ist unabhängig von der durch Rapamycin ausgelösten Autophagozytose, da dieser Prozess sowohl bei CAV9 als auch CAV3 vergleichbare Defekte aufweist (siehe oben).

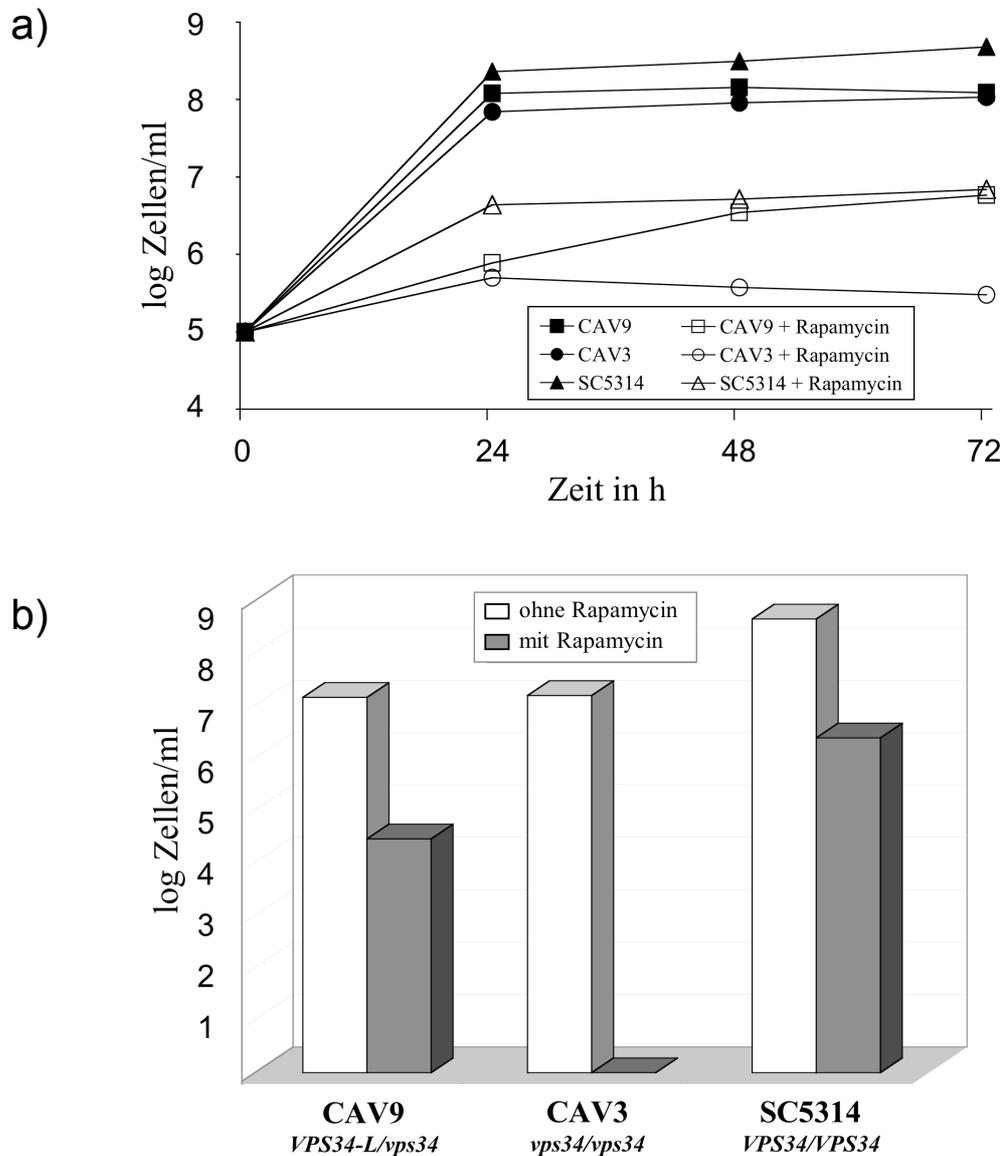


Abbildung 18: Empfindlichkeit der *C. albicans* *VPS34* Lipidkinasemutante CAV9 gegenüber dem antibiotisch wirksamen Makrolid Rapamycin verglichen mit dem WT SC5314 und der *vps34* Nullmutante CAV3. (a) Das Wachstum der *C. albicans* Stämme in SD-Medium mit und ohne Zugabe von 0,2 µg/ml Rapamycin über 72 h. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte zu den angegebenen Zeiten mittels Hämocytometer. (b) Überlebensrate der *C. albicans* Stämme nach 72stündiger Kultur in SD-Medium mit und ohne Rapamycin. Die *C. albicans*-Zellen wurden auf YPD-Platten ausgestrichen und 48 h kultiviert. Anschließend folgte durch Auszählung der Kolonien die Bestimmung der Überlebensrate.

3.2.9 Die Lipidkinaseaktivität von CaVps34p beeinflusst die Virulenz von *C. albicans*

Die Pathogenität und Virulenz von *C. albicans* Stämmen wird im Tiermodell untersucht. Das Mausmodell für systemische Candidiasis ist etabliert. Dabei erfolgt die Infektion der Versuchstiere über die laterale Schwanzvene und der Verlauf der Infektion wird über drei Wochen verfolgt. Um den Einfluss der Lipidkinaseaktivität von CaVps34p bei der Virulenz von *C. albicans* zu untersuchen, wurde der Lipidkinase-defekte Stamm CAV9 im Mausmodell für systemische Candidiasis getestet (Abb. 19). Als Kontrollstämme dienten dabei der *C. albicans* Wildtyp SC5314 und die *vps34* Nullmutante CAV3. Den Mäusen wurden drei verschiedene Infektionsdosen pro *C. albicans* Stamm appliziert, wobei die Keimzahl 5×10^4 , 5×10^5 bzw. 5×10^6 betrug. Alle Mäuse, die dabei mit dem Lipidkinase-defekten Stamm CAV9 infiziert wurden, überlebten die drei Wochen des Versuchs ohne Krankheitssymptome zu zeigen, selbst nach Applikation der höchsten Keimzahl von 5×10^6 . Dies entspricht den Beobachtungen, die bezüglich der *vps34* Nullmutante CAV3 während des Experiments und in früheren Studien gemacht wurden (Bruckmann *et al.*, 2000). Auch dieser Stamm war nicht in der Lage bei den Versuchstieren ein Krankheitsbild hervorzurufen. In diesem Modell bewirkt der *C. albicans* Wildtyp, bei der höchsten Injektionsdosis von 5×10^6 Zellen, schon nach zwei Tagen bei den Versuchstieren eine Letalität von 100% und auch bei der mittleren Keimzahl von 5×10^5 Zellen verstarben alle Versuchstiere innerhalb von acht Tagen. Die niedrigste Dosis von 5×10^4 Zellen überlebten 20% der Mäuse 21 Tage bis zum Ende des Versuches.

Bei einer systemischen Candidiasis kommt es aufgrund der hämatogenen Streuung zur Infiltration innerer Organe wie Niere, Lunge, Leber und Milz. In Infektionsstudien bei Versuchstieren zeigen dabei die Nieren eine Präferenz hinsichtlich der Besiedlung mit *Candida*, was die Mortalität der Tiere stark beeinflusst (Odds, 1994). Aus diesem Grund erfolgte die Bestimmung der Nierenbesiedlung drei Tage nach Infektion mit 5×10^5 Zellen der Stämme CAV9, SC5314 und CAV3 bei drei Versuchstieren. Die mit der Lipidkinasemutante CAV9 infizierten Mäuse zeigten dabei wie die Nullmutante eine geringe fungale Kolonisation der Nieren. Die Nierenbesiedlung lag bei CAV9 in der Größenordnung von 10^1 - 10^2 Kolonie bildenden Einheiten (CFU) pro Gramm Nierengewicht. Die Anzahl der CFUs pro Gramm Niere betrug bei CAV3 10^1 - 10^3 . Dagegen zeigten die Tiere, die mit dem Wildtyp infiziert wurden eine stärkere Nierenbesiedlung von 10^4 CFUs pro Gramm Gewebe. Am Ende des Virulenzexperiments nach 21 Tagen erfolgte nochmals eine Bestimmung der Nierenkolonisation. Die Bestimmung der Nierenbesiedlung durch die Stämme CAV9 und CAV3 erfolgte bei jeweils drei mit 5×10^5 Zellen infizierten Mäusen. Dabei zeigte die

Lipidkinasemutante und die Nullmutante eine geringe *C. albicans*-Besiedlung. Bei CAV9 lag die Nierenbesiedlung bei 10^2 - 10^3 bei CAV3 bei 10^3 - 10^4 CFUs pro Gramm Niere. Aufgrund der hohen Mortalität nach Infektion mit dem Wildtyp SC5314 konnten nur die Nieren zweier Mäuse, welche mit 5×10^4 Zellen infiziert wurden und bis zum Ende des Experiments überlebten, präpariert werden. Dabei wurde eine starke Nierenbesiedlung in von 10^6 CFUs pro Gramm Gewebe nachgewiesen. Mikroskopische Untersuchungen des Nierengewebes von Mäusen, die mit den beiden *VPS34* Mutantenstämmen infiziert wurden, zeigten eine Besiedlung mit Pseudohyphen. Die beobachtete reduzierten Keimzahlen der Nieren mit CAV9 und CAV3 im Vergleich zum Wildtyp demonstrieren, dass diesen Stämme eine Etablierung im Wirtsorganismus möglich ist. Die Infektion der Mäuse mit beiden Mutanten löst allerdings keine Krankheitssymptome bei den Versuchstieren aus.

Die Avirulenz des Mutantenstammes CAV9 ist ausschließlich auf den Verlust der Lipidkinaseaktivität von CaVps34p zurückzuführen. Der veränderte Genlocus von *URA3* und die nur einfach auftretende Kopienzahl im Genom haben in diesem Fall keinen Einfluss auf die Virulenz der Lipidkinasemutante. Dies belegen frühere Untersuchungen der *VPS34* Mutanten, die zeigen, dass die Reintegration des *VPS34* Gens in den entsprechenden Genlocus der *vps34* Nullmutante zu einer kompletten Wiederherstellung der Virulenz führt (Bruckmann *et al.*, 2000).

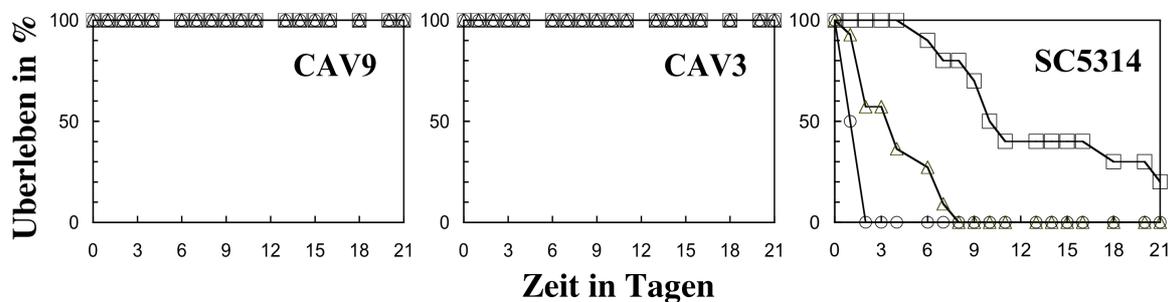


Abbildung 19: Untersuchung der Virulenz der Lipidkinase defekten *VPS34* Mutante CAV9. Die *C. albicans* Mutante CAV9 wurde zusammen mit dem WT SC5314 und der *vps34* Mutante CAV3 im Maus Modell für systemische Candidosis getestet. Das Überleben der Mäuse nach Infektion mit 5×10^4 (□), 5×10^5 (△) und 5×10^6 (○) wurde über 21 Tage verfolgt (n = 10, ausgenommen 5×10^5 wo n = 15).

4. Diskussion

C. albicans ist der klinisch wichtigste humanpathogene Erreger von invasiven Mykosen. Die Zunahme von Infektionen und die Selektion resistenter Erreger unterstreichen die Notwendigkeit der Entwicklung neuer wirksamer und verträglicher Antimykotika. Proteine in *C. albicans*, die Einfluss auf die Pathogenese einer Candidiasis nehmen und sich von humanen unterscheiden, stellen dabei einen möglichen Angriffspunkt solcher Wirkstoffe dar. Die Untersuchung der molekularen und funktionalen Zusammenhänge von virulenzassoziierten Signalmolekülen stellt eine wichtige Grundlage dafür dar.

Die multifunktionelle PI 3-Kinase CaVps34p beeinflusst unterschiedlichste Pathogenitätsfaktoren und die Virulenz von *C. albicans* (Bruckmann *et. al.*, 2000). Das Vorhandensein mehrerer Enzymaktivitäten, der PI 3-Kinase- und der Proteinkinaseaktivität, sowie die Beteiligung dieses Proteins an verschiedenen Zellfunktionen, waren der Anlass CaVps34p und seine Kinaseaktivitäten genauer zu charakterisieren. In der vorliegenden Arbeit wurden CaVps34p Mutantenproteine generiert und deren *in vitro*-Enzymfunktionen untersucht. Dabei wurde mit CaVps34Tp ein Mutantenprotein ohne Lipidkinase- aber mit Proteinkinaseaktivität hergestellt. Daran anschließend folgte dem Generieren einer Lipidkinase-defekten *C. albicans* Mutante deren phänotypische Charakterisierung *in vivo*. Diese Untersuchungen zeigen, dass die Lipidkinaseaktivität von CaVps34p entscheidend für die Virulenz von *C. albicans* ist. Ein Verlust der Lipidkinaseaktivität führt zu Defekten der Endozytose, Autophagozytose und Vakuolensäuerung und verursacht Störungen der Hyphenbildung und der Adhäsion an Wirtszellen. Andere Funktionen von CaVps34p, wie die Proteinkinaseaktivität und die Wechselwirkungen mit anderen Proteinen, beeinflussen die Reaktion von *C. albicans* auf Umweltstress und spielen eine Rolle bei Entgiftungsmechanismen der Hefe.

4.1 Funktionelle Untersuchungen des CaVps34 Proteins

4.1.1 Modifikationen einer Lipidbindedomäne beeinflussen nicht die Proteinkinaseaktivität von CaVps34p

Die PI 3-Kinase CaVps34p aus *C. albicans* gehört zu einer Gruppe von Proteinen, die sowohl eine Lipid- als auch eine Proteinkinaseaktivität aufweisen. Ein Ziel der Arbeit war es, durch Modifikation einer vermuteten Binderegion des Lipidsubstrates die Lipidkinaseaktivität von CaVps34p auszuschalten bzw. zu verändern, ohne andere Funktionen, wie die Proteinkinaseaktivität, des Proteins zu beeinflussen.

Der Austausch der vermuteten Lipidkopfguppeninteraktionsregion in CaVps34p durch die korrespondierende Region von CaTorp führt zu einem kompletten Verlust der *in vitro* PI 3-Kinaseaktivität des resultierenden hybriden Proteins CaVps34Tp. Dies belegt die Bedeutung dieser Region für die Phosphorylierung des Lipidsubstrates der PI 3-Kinasen der Klasse III, äquivalent zu den Mitgliedern der Klasse I. Die Fähigkeit von CaVps34Tp zur Autophosphorylierung zeigt, dass die Proteinkinasefunktion des Proteins durch die Manipulationen in der Region nicht beeinträchtigt ist. Die Modifikation führt vermutlich zu einer Veränderung der Proteinstruktur, die dazu führt, dass die Inositolgruppe des Lipidsubstrates nicht mehr mit dem Protein interagieren kann. Dies korreliert mit den Resultaten der Studien an Klasse I PI 3-Kinasen p110 α und p110 γ , die zu der Vermutung führten, dass die untersuchte Region eine Tasche in der Proteinstruktur bildet, welche durch die polare Inositolkopfguppe ausgefüllt wird. Aufgrund der Nähe der veränderten Proteinregion zu Aminosäuren des DFG-Motivs bzw. zum konservierten Lysin⁹¹² ist zudem ein Defekt der Übertragung des Phosphatrestes auf die Inositolgruppe wahrscheinlich. Mit CaVps34Tp wurde erstmals eine Klasse III PI 3-Kinase generiert, bei der die *in vitro*-Lipidkinaseaktivität spezifisch ausgeschaltet ist, ohne die Proteinkinaseaktivität zu beeinflussen. Dies war eine Voraussetzung um Funktionen von CaVps34p *in vivo* getrennt von der PI 3-Kinaseaktivität zu betrachten.

Der vorgenommene Austausch der PI-Kopfguppeninteraktionsregion von CaVps34p durch die korrespondierende Region der Klasse I PI 3-Kinase p110 γ zeigt, dass es nicht möglich ist, dadurch die Substratspezifität der Klasse III PI 3-Kinase zu erweitern. Das resultierende Mutantenprotein CaVps34Gp zeigt im Vergleich zum Wildtypprotein CaVps34p eine stark reduzierte *in vitro* Phosphorylierung von PtdIns zu PtdIns 3-P. Eine Phosphorylierung der p110 γ -Lipidsubstrate PtdIns 4-P sowie PtdIns(4,5)P₂ durch CaVps34Gp ist nicht nachweisbar. Die beobachtete Autophosphorylierung von CaVps34Gp belegt, dass auch diese Veränderung der potentiellen Substratbinderegion keinen Einfluss auf die *in vitro*-

Proteinkinaseaktivität von CaVps34p besitzt. Der Austausch der Region in CaVps34p durch den der Klasse I PI 3-Kinase reicht vermutlich nicht aus, um eine Bindung von PtdIns 4-P bzw. PtdIns(4,5)P₂ zu ermöglichen. Auch wird durch die Veränderung der Substratbinderegion die Interaktion mit PtdIns stark eingeschränkt. Ein schon bei CaVps34Tp diskutierter möglicher defekter Phosphattransfer kann mitentscheidend für den bei CaVps34Gp beobachteten Lipidkinasedefekt sein. Wenig wahrscheinlich ist, dass es zu einer Bindung von PtdIns 4-P bzw. PtdIns(4,5)P₂ kommt, die Übertragung des Phosphatrestes aber so stark gestört ist, so dass keine PtdIns(3,4)P₂ sowie PtdIns(3,4,5)P₃ und eine nur stark eingeschränkte PtdIns 3-P Bildung durch CaVps34Gp nachweisbar ist.

4.1.2 C-terminale Serin-Reste stellen keine spezifischen Autophosphorylierungsstellen von CaVps34p dar

Zusätzlich zur Lipidkinaseaktivität besitzt CaVps34p eine Proteinkinaseaktivität, die zu einer Autophosphorylierung führt. Studien der Klasse I PI 3-Kinasen p110 β , p110 δ und p110 γ , die C-terminale Serine als Autophosphorylierungsstellen identifizierten (Vanhaesebroeck *et al.*, 1999; Czupalla *et al.*, 2003), waren der Anlass die Rolle des C-Terminus bei der Autophosphorylierung von CaVps34p zu untersuchen. Sequenzanalysen der Vps34p Proteine zeigen, dass auch bei den Klasse III Kinasen Serinreste am C-Terminus vorkommen. CaVps34p besitzt zwei C-terminale Serine. Serin⁹⁹⁹ ist innerhalb der Vps34 Proteine konserviert, während Serin¹⁰¹³ spezifisch für CaVps34p ist. Um diese Serinreste auf ihre Funktion als Ziel der intrinsischen Proteinkinaseaktivität von CaVps34p zu untersuchen, wurden Punktmutationen dieser Serine zu Alanin durchgeführt und die Auswirkung auf die *in vitro*-Autophosphorylierung der resultierenden Mutantenproteine untersucht. Dabei wurde bei den Proteinen mit Mutation Serin⁹⁹⁹ zu Alanin bzw. Serin¹⁰¹³ zu Alanin eine Autophosphorylierung vergleichbar mit dem Wildtypprotein CaVps34p festgestellt. Auch die Lipidkinaseaktivität bleibt durch diese Mutationen unbeeinflusst. Dies zeigt, dass weder Serin⁹⁹⁹ noch Serin¹⁰¹³ eine spezifische Autophosphorylierungsstelle von CaVps34p *in vitro* darstellt und lässt vermuten, dass bei CaVps34p der extreme C-Terminus nicht Ziel der intrinsischen Proteinkinase ist. Andere Serin- oder Threoninreste des Proteins stellen mögliche Autophosphorylierungsstellen dar. Eine Thyrosinphosphorylierung ist wenig wahrscheinlich. Dabei ist anzumerken das CaVps34p kein Threonin aber ein konserviertes Thyrosin²⁰¹⁷ am C-Terminus besitzt.

4.2 Zelluläre Funktion der Lipidkinaseaktivität von CaVps34p

Die PI 3-Kinase CaVps34p ist ein multifunktionelles Protein, das in verschiedene Wege des intrazellulären Vesikeltransportes involviert ist und das unterschiedliche Virulenzfaktoren von *C. albicans* beeinflusst. Das Protein besitzt zwei Kinaseaktivitäten, von denen nicht bekannt ist, welche Enzymfunktion für welche Zellfunktion entscheidend ist. Dies ist der Grund, die Aktivitäten von CaVps34p getrennt *in vivo* zu untersuchen. Mit dem Mutantenprotein CaVps34Tp, wurde ein Protein generiert, dessen Lipidkinase ausgeschaltet, die Proteinkinaseaktivität aber aufrechterhalten ist. Aufgrund der relativ geringen Veränderung des Proteins, bei dem nur sechs Aminosäuren ausgetauscht sind, wird angenommen, dass Interaktionen von CaVps34Tp mit anderen Proteinen von der Modifikation nicht beeinflusst sind. Für die *in vivo* Untersuchungen der CaVps34Tp Proteinmutante erfolgte die Herstellung einer *C. albicans* Lipidkinasemutante, bei der nur das Mutantenprotein exprimiert wird. Durch Vergleich der verschiedenen Phänotypen der *vps34* Nullmutante hinsichtlich ihrer Ausprägung in der *VPS34* Lipidkinasemutante war es möglich, die Rolle der Lipidkinase und anderer Aktivitäten von CaVps34p zu definieren.

4.2.1 Die Lipidkinaseaktivität von CaVps34p ist in Vesikeltransportprozesse und Vakuolenfunktion involviert

CaVps34p ist am Vesikeltransport von *C. albicans* beteiligt (Bruckmann *et al.*, 2000). Die Rolle der Lipidkinaseaktivität von CaVps34p bei dieser Zellfunktion wurde in der vorliegenden Arbeit geklärt. Es zeigte sich, dass die PI 3-Kinaseaktivität von CaVps34p entscheidend für den letzten Schritt der Endozytose ist, da sowohl die *VPS34* Lipidkinase- als auch die Nullmutante Defekten bei der Verschmelzung von Endozytosevesikeln mit der Vakuole zeigen. Eine besondere Bedeutung haben dabei vermutlich PtdIns 3-P-bindende Proteine, die beim Andocken der Vesikel bzw. der Vesikelfusion beteiligt sind. In *C. albicans* wurden Proteine mit Bindedomäne für PtdIns 3-P untersucht. Auch in *S. cerevisiae* wurde die Funktion solcher Proteine aufgeklärt. CaVac1p ist ein Protein mit PtdIns 3-P bindender FYVE-Domäne, das in die endozytotischen Prozesse von *C. albicans* involviert ist. Die *C. albicans vac1p* Nullmutante zeigt wie die *VPS34* Lipidkinasemutante einen Endozytosedefekt (unveröffentlichte Daten, Franke *et al.*). Vac1p ist in *S. cerevisiae* Bestandteil des frühen Endosoms und essentiell für die Endosomenfusion. Es wurde nachgewiesen das Vac1p PtdIns 3-P nicht zur Membranrekrutierung benötigt durch dieses

Lipid aber eine Modulation seiner Aktivität erfährt (Burd *et al.*, 1997; Tall *et al.*, 1999). Ein weiteres *C. albicans*-Protein mit FYVE-Domäne ist das Klasse E Vps-Protein Vps27p (Xu *et al.*, 2004). Bisher gibt es keine Untersuchungen zur Rolle von Vps27p im Vesikeltransport von *C. albicans*. In *S. cerevisiae* ist bekannt, dass PtdIns 3-P entscheidend für die Rekrutierung dieses Proteins an die Membran des Endosoms und damit für die Erkennung von ubiquinierter MVB-Ladung und die Rekrutierung des ESCRT-Komplexes (endosomal sorting complex required for transport) ist (Piper *et al.*, 1995; Katzmann *et al.*, 2003). Vam7p ist für das Andocken des MVB's an die Vakuole in *S. cerevisiae* erforderlich (Sato *et al.*, 1998). Dieses Protein ist Teil des vakuolären tSNARE-Komplexes und besitzt durch seine PX-Domäne eine hohe Affinität zu PtdIns 3-P. Von Vam7p ist kein *C. albicans*-Homolog bekannt, im Genom findet sich allerdings die Sequenz eines hypothetischen Proteins mit Homologie zu Vam7p aus *S. cerevisiae*. Störungen in der Funktion der genannten Proteine, aufgrund des fehlenden Interaktionspartners PtdIns 3-P, sind vermutlich die Ursache für die bei der Lipidkinasemutante beobachteten Defekte in der letzten Phase der Endozytose. Sowohl bei der *C. albicans* VPS34 Lipidkinasemutante als auch bei der Nullmutante ist eine schwache Färbung der Vakuolenmembran mit dem endozytotisch aufgenommenen Farbstoff FM4-64 nachweisbar. Dies lässt vermuten, dass die Endozytose auch ohne die Aktivität von CaVps34p in stark reduzierter Form stattfinden kann.

Antikörper gegen *C. albicans*-Proteine, die auf diesem Weg transportiert werden, stehen nicht zur Verfügung. Dadurch ist eine direkte Untersuchung des Transports vom ER über den Golgi zur Vakuole, äquivalent den Studien an *S. cerevisiae*, nicht möglich. Dennoch kann aufgrund der Überschneidung dieses Transportwegs mit der Endozytose im MVB ein Defekt im letzten Schritt der Proteinsortierung vom ER zur Vakuole bei der VPS34 Lipidkinasemutante angenommen werden.

Die Autophagozytose ist ein weiterer Vesikeltransportprozess zur Vakuole in dem CaVps34p involviert ist. Dieser, im Vergleich zur Endozytose und dem sekretorischen Transport, eher unspezifische Prozess wird bei *C. albicans* sowohl durch Stickstoffmangel als auch durch die Inhibierung der TOR-Kinase mit Rapamycin induziert. Die VPS34 Lipidkinasemutante zeigt einen Defekt dieses Transportweges, was die Bedeutung von PtdIns 3-P bei der Autophagozytose demonstriert. CaVac1p, ein PtdIns 3-P bindendes Protein des Vesikeltransports, ist nicht essentiell für die Autophagozytose von *C. albicans*. Die *C. albicans* vac1 Nullmutante zeigt keinen Defekt der Autophagozytose (unveröffentlichte Daten, Franke *et al.*). In *S. cerevisiae* ist der vakuoläre tSNARE-Komplex für das Andocken und die Verschmelzung der Autophagosomen mit der Vakuolenmembran erforderlich (Abeliovich & Klionsky, 2001; Huang & Klionsky, 2002; Reggiori & Klionsky, 2002). Vam7p ist Teil dieses Komplexes und ein Interaktionspartner von PtdIns 3-P. Störungen in der

Ausbildung dieses tSNARE-Komplexes sind ein möglicher Grund für das Fehlen von Autophagosomen in den Vakuole der Lipidkinase-defizienten *VPS34* Mutante.

Die *VPS34* Lipidkinasemutante zeigt eine auffällig vergrößerte Vakuole, was die Bedeutung von PtdIns 3-P in der Vakuolenhomöostase unterstreicht. Dieser Phänotyp steht im Zusammenhang mit der PI 3-Phosphat-5-Kinase CaFab1p, die PtdIns 3-P als Lipidsubstrat zu PtdIns(3,5)P₂ umsetzt. CaFab1p ist am Vesikeltransport von *C. albicans* und *S. cerevisiae* beteiligt (Cooke *et al.*, 1998, Gary *et al.*, 1998; Bonangelino *et al.*, 2002; Augsten *et al.*, 2002). Bei beiden Organismen zeigen die *fab1* Nullmutanten stark vergrößerten Vakuolen. Da angenommen wird, dass bei der Invagination von Membranen des MVB und der Vakuole PtdIns(3,5)P₂ eine wichtige Rolle spielt, können diese Defekte im „turnover“ der Vakuolenmembran eine Erklärung für die vergrößerte Vakuole der *C. albicans fab1* Nullmutante und der *VPS34* Lipidkinasemutante darstellen. PtdIns(3,5)P₂ reguliert in *S. cerevisiae* ebenfalls den Efflux der Vakuolenmembran hin zu früheren sekretorischen Kompartimenten. Eine solche Balance zwischen anterogradem und reterogradem vakuolärem Transport, vermittelt durch PtdIns(3,5)P₂, ist gleichfalls erforderlich für die Vakuolemembranhomöostase.

Die Untersuchung der *VPS34* Lipidkinasemutante mit dem Vakuolenfarbstoff Quinacrine zeigt, dass eine fehlende PtdIns 3-P Generierung durch CaVps34p einen Ansäuerungsdefekt der Vakuole von *C. albicans* bedingt. Die Vakuole ist ein saures Zellorganell, dessen pH-Wert durch die vakuoläre ATPase (vATPase) aufrechterhalten wird. In *C. albicans* wurde eine *in vitro*-Interaktion zwischen CaVps34p und Vma7p, einer Untereinheit der vATPase belegt (Eck *et al.*, im Druck). Vma7p ist für die Assemblierung dieses Multiproteinkomplexes notwendig (Graham *et al.*, 1994; Nelson *et al.*, 1994; Tomashek *et al.*, 1996, Graham *et al.*, 2000). Aufgrund der geringfügigen Modifikationen des CaVps34Tp Proteins wird vermutet, dass die Interaktion mit Vma7p in der Lipidkinasemutante nicht gestört ist. Der Ansäuerungsdefekt der Lipidkinasemutante ist vermutlich auf den defekten Vesikeltransport zur Vakuole bei fehlender PtdIns 3-P Produktion zurückzuführen. In *S. cerevisiae* wurde gezeigt, dass sich die vATPase in Membranen entlang des gesamten Transportwegs zur Vakuole befindet. Die durch sie vermittelte sukzessive Ansäuerung der Vesikel, die ihr Maximum in der Vakuole erreicht, ist entscheidend für den korrekten Proteintransport (Stevens & Forgac, 1997). Ein Beispiel für die Bedeutung des Vesikeltransportes bei der Vakuolenansäuerung sind Untersuchungen von Pep12p, einem Protein des vakuolären tSNARE-Komplexes, das für die Endosomenfusion entscheidend ist. *S. cerevisiae pep12* Mutanten zeigen keine Quinacrinfärbung der Vakuole (Preston *et al.*, 1989). Sollte die vATPase auch in *C. albicans* durch den Vesikeltransport zur Vakuole gelangen, könnte sich auf diese Weise ein Defekt dieses Prozesses auch auf den pH-Wert des Organells auswirken.

Die Untersuchungen der *VPS34* Lipidkinasemutante demonstrieren die entscheidende Rolle des „second messengers“ PtdIns 3-P beim Vesikeltransport und bei der Vakuolenfunktion von *C. albicans*.

4.2.2 Die Lipidkinasaktivität von CaVps34p beeinflusst die Hyphenbildung

Die Bildung von Hyphen ist ein wichtiger Virulenzfaktor von *C. albicans* und entscheidend für die Etablierung des Erregers im Wirtsorganismus. Die PI 3-Kinase CaVps34p beeinflusst die Hyphenbildung bei unterschiedlichen Induktionsbedingungen (Bruckmann *et al.*, 2001). In dieser Arbeit wurde demonstriert, dass dabei die Lipidkinaseaktivität von CaVps34p Ausschlag gebend ist. Der Verlust dieser Enzymfunktion verursacht denselben Defekt beim Wechsel zwischen der Hefe und Hyphe wie ein *vps34* „Knock-out“. Da in *C. albicans* verschiedene hypheninduzierende Signalwege nachgewiesen sind, die durch unterschiedliche Faktoren induziert werden, wurde untersucht, bei welchem die Lipidkinaseaktivität von CaVps34p involviert ist. Die *VPS34* Lipidkinasemutante zeigt, wie die Nullmutante, keine Hypheninduktion durch Serum oder Nährstoffmangel auf festem Nährmedium und einen Hyphenbildungsdefekt in Flüssigmedium nach Seruminduktion. Der Transkriptionsfaktor Efg1p ist ein starker Regulator von morphogenetischen Prozessen in *C. albicans* unter diesen Induktionsbedingungen (Stoldt *et al.*, 1997). Eine homozygote *efg1* Mutante ist nicht zur Hyphenbildung nach Induktion durch Serum oder Mangelbedingungen in der Lage. Eine Beeinflussung des Efg1p-Signalweges durch CaVps34p ist wahrscheinlich. CaVps34p ist allerdings nicht in die Transkription des *EFG1*-Gens involviert, da die *vps34* Nullmutante keine Veränderung der Expression des Transkriptionsfaktors zeigt (Kitanovic *et al.*, im Druck). Am Efg1p-Signalweg sind sowohl Ras1p als auch der „second messenger“ cAMP und die ProteinkinaseA involviert. Der beobachtete Defekt des Efg1p-Signalweges bei Verlust der Lipidkinaseaktivität von CaVps34p kann im Zusammenhang mit Proteinsortierungsdefekten stehen. Dies lassen die beobachteten Defekte des Vesikeltransports der *VPS34* Lipidkinasemutante vermuten. Eine Störung im Transport von Rezeptoren, die Sensoren für hypheninduzierende Umweltfaktoren darstellen, zur Zellmembran aufgrund der fehlenden Enzymaktivität von CaVps34p ist wenig wahrscheinlich. So konnte bei *S. cerevisiae* gezeigt werden, dass die Ausbildung sekretorischer Vesikel, die für den Transport neu synthetisierter Proteine zur Zellmembran verantwortlich sind, in einem *Vps34p* inaktiven Stamm nicht gestört ist (Gurunathan *et al.*, 2002). Allerdings ist eine Störung von Reifungsprozessen der Proteine entlang des Wegs vom ER zum späten Golgi denkbar. Es besteht ebenfalls die Möglichkeit, dass das Recycling

und „Turnover“ solcher Membranrezeptoren aufgrund von Endozytosedefekten bei einem Verlust der PI 3-Kinaseaktivität gestört ist. So konnte in einem Vps34p inaktiven *S. cerevisiae* Stamm ein Defekt im Recycling und „Turnover“ des α -Faktor-Rezeptors Ste3p festgestellt werden (Munn & Riezman, 1994). Die speziellen Rezeptoren für die Signaltransduktion hypheninduzierender Umweltsignale in *C. albicans* sind bisher nicht definiert.

Die Bedeutung der Lipidkinaseaktivität von CaVps34p bei der Hyphenbildung unter mikroaerophilen Bedingungen wurde ebenfalls nachgewiesen. Die Lipidkinasemutante zeigt unter diesen Induktionsbedingungen denselben Phänotyp wie die Nullmutante. Ein Sauerstoffmangel induziert in *C. albicans* die Aktivierung des Transkriptionsfaktors Czf1p und dadurch den Wechsel zur hyphalen Wachstumsform. CaVps34p ist in diesen Signalweg involviert, wobei die Lipidkinaseaktivität essentiell ist. Die *vps34* Nullmutante zeigt eine erhöhte Expression von *CZF1* (Kitanovic *et al.*, im Druck). Efg1p ist ein negativer Modulator des Czf1p-Signalweges und dadurch Repressor der Hyphenbildung unter mikroaerophilen Bedingungen (Sonneborn *et al.*, 1999; Brown *et al.*, 1999). Da die Lipidkinaseaktivität von CaVps34p in den Efg1p-Signalweg involviert ist, kann die Verbindung zwischen dieser Enzymfunktion von CaVps34p und *CZF1*-Expression durch Efg1p hergestellt werden. Dies erfolgt nicht über die Transkription von *EFG1*, wie oben erläutert.

4.2.3 Der Verlust der Lipidkinaseaktivität von CaVps34p beeinflusst die Adhäsion von *C. albicans* an Wirtszellen

Die Adhäsion und die damit einhergehende Besiedlung von Wirtsoberflächen ist ein wichtiger Pathogenitätsfaktor von *C. albicans*. Die *VPS34* Lipidkinasemutante zeigt eine deutlich verringerte Adhäsion an humane Buccalzellen. Dieser Defekt ist mit der *vps34* Nullmutante vergleichbar. Die Bedeutung der Lipidkinaseaktivität von CaVps34p bei der Adhäsion von *C. albicans* an Wirtszellen wird dadurch demonstriert. Verschiedene Bestandteile der Zellwand des Pilzes, wie Glycoproteine, Polysaccharide und Lipide, beeinflussen die Adhäsion. Hydrophobe Wechselwirkungen zwischen der Pilz- und Wirtszelloberfläche bewirken eine unspezifische Adhäsion, während Rezeptoren der Oberfläche, sogenannte Adhäsine, eine spezifische Interaktion ermöglichen. Solche Adhäsine werden umfangreich prozessiert, z.B. durch Einbau verschiedener Kohlehydrate, und durch Vesikel zur Zelloberfläche transportiert und in die Zellmembran bzw. Zellwand eingebaut. Eine Erklärung für den Phänotyp der Lipidkinasemutante sind Störungen in der Prozessierung, Reifung und Sekretion von Adhäsinen, die aufgrund von Defekten in der Proteinsortierung an ER und Golgi bei fehlender PI 3-Kinaseaktivität auftreten. Einflüsse von CaVps34p auf das

endozytosevermittelte „Turnover“ von Adhäsinen der Zellmembran können eine weitere Rolle bei der Adhäsion spielen. Bisher untersuchte Adhäsine von *C. albicans* sind unmittelbar mit dem Wechsel zwischen Hefe und Hyphenform gekoppelt. Ein prominentes Beispiel dafür ist das Hypthal Wall Protein 1 (Hwp1), welches nur in Hyphen exprimiert wird (Sharkay *et al.*, 1999). In unserer Arbeitsgruppe konnte durch eine Zwei-Hybrid-Analyse eine Interaktion zwischen Hwp1p und CaVps34p gezeigt werden (unveröffentlichte Daten, Eck *et al.*). Ein Einfluss der Interaktion von CaVps34p mit Hwp1p beim beobachteten Adhäsionsdefekt ist wenig wahrscheinlich, da die Adhäsion von *C. albicans*-Hefezellen untersucht wurde und bei der mikroskopischen Auswertung keine Hyphenbildung festgestellt werden konnte.

4.2.4 Aktivitäten von CaVps34p unabhängig von der Lipidkinase sind an der Stresstoleranz, bei Detoxifikationsprozessen und beim Wachstum unter alkalischen Bedingungen beteiligt

Die Lipidkinaseaktivität von CaVps34p erfüllt eine wichtige Funktion im Vesikeltransport zur Vakuole und beeinflusst das Vakuolenmilieu. Die Vakuole ist in verschiedene Zellfunktionen involviert. Neben ihren Aufgaben bei Degradationsprozessen und der Speicherung von Nährstoffen dient sie als Reservoir für mono- und divalente Kationen. In Zusammenhang mit der Fähigkeit der Vakuole eine hohe Konzentration an Ionen aufzunehmen steht die Entgiftungsfunktion dieses Organells in der Zelle. Aufgrund der vermuteten Bedeutung dieser Prozesse für die Virulenz von *C. albicans*, wurde der Einfluss der Lipidkinaseaktivität von CaVps34p bei der Reaktion auf Umweltstress untersucht.

Das Wachstum der *VPS34* Lipidkinasemutante bei hohen Salzkonzentrationen zeigt, dass die Lipidkinaseaktivität von CaVps34p nicht entscheidend bei der Reaktion von *C. albicans* auf hyperosmotischen Stress ist. *C. albicans* unterscheidet sich dabei von *S. cerevisiae*, wo PtdIns 3-P eine herausragende Funktion bei der Reaktion auf Osmostress erfüllt. PtdIns 3-P stellt das Substrat der PI 3-Phosphat 5-Kinase Fab1p dar und ist somit die Voraussetzung für die Bildung des „second messengers“ PtdIns(3,5)P₂. Dieses Phosphoinosid hat eine wichtige regulatorische Funktion beim Wachstum von *S. cerevisiae* im hochosmolaren Milieu. Dies zeigt der Anstieg der Konzentration dieses Moleküls in der Hefezelle nach Änderung der Osmolarität und die Sensitivität der inaktiven *fab1* Mutante auf hyperosmotischen Stress (Cooke *et al.*, 1998; Bonangelino *et al.*, 2002). Im Gegensatz dazu zeigt die *C. albicans fab1* Nullmutante keine Hypersensitivität gegenüber osmotischem Stress (Augsten *et al.*, 2002) und unterscheidet sich somit auch in der Zellfunktion von *S. cerevisiae*.

Um die Bedeutung der Lipidkinaseaktivität von CaVps34p genau zu definieren, wurde zuerst die Rolle des Proteins beim Wachstum unter hohen NaCl- und KCl-Konzentrationen bestimmt. Es ist kein Unterschied im Wachstum der Lipidkinasemutante und der *vps34* Nullmutante unter osmotisch relevanten Salzkonzentrationen mit Glukose oder Galaktose als C-Quelle zu beobachten. Aus diesem Grund kann vermutet werden, dass die Produktion des zellulären Osmolyts Glycerol keine Rolle bei der beobachteten Osmosensitivität spielt. Die *VPS34* Mutanten zeigen keine Sensitivität auf hohe Sorbitolkonzentrationen. Dieses Resultat lässt vermuten, dass die beobachtete Sensitivität gegenüber hohen NaCl- und KCl-Konzentrationen auf die Giftwirkung der Ionen und nicht auf den Wasserverlust oder die Turgoränderung der Zelle nach Veränderung des osmotischen Milieus zurückzuführen ist. Bei weiteren Untersuchungen wurde eine verringerte Toleranz der Nullmutante gegenüber den Kationen Zn^{2+} , Mn^{2+} und Cu^{2+} , welche schon in geringen osmotisch irrelevanten Konzentrationen toxisch wirken, demonstriert. Dies bestätigt die Vermutung das CaVps34p in der Kationenentgiftung involviert ist.

Die *VPS34* Lipidkinasemutante zeigt im Vergleich zu *vps34* Nullmutante eine geringere Sensitivität gegenüber den Metallsalzen $MnCl_2$ und $ZnCl_2$. Dagegen ist bei beiden *VPS34* Mutanten eine vergleichbare Sensitivität auf $CuCl_2$ zu beobachten. Diese Resultate sowie die Toleranz der Lipidkinasemutante gegenüber NaCl und KCl zeigen, dass eine Aktivität von CaVps34p, die unabhängig von der Lipidkinaseaktivität ist, die Kationenentgiftung von *C. albicans* beeinflusst. Dabei können Proteinkinaseaktivität und/oder Proteininteraktionen eine Rolle spielen. Bei anderen PI 3-Kinasen ist neben einer intrinsischen Proteinkinaseaktivität eine Transphosphorylierungsaktivität belegt. Ein durch CaVps34p phosphoryliertes Protein ist bisher nicht identifiziert. Die Wechselwirkung mit unbekanntem Interaktionspartnern kann den unterschiedlichen Phänotyp der beiden untersuchten *VPS34* Mutanten erklären. Bei der Modulierung des Ionentransports durch CaVps34p sind verschiedene Transportprozesse und Interaktionspartner vorstellbar. Ionen werden durch Membrantranslokatoren aus dem Zytoplasma entfernt. Diese Proteine befinden sich sowohl in der Zytoplasmamembran als auch in Endomembranen, wie denen der Vakuole, dem Golgi oder dem ER. Endomembranen sind als Funktionsorte von Vps34p beschrieben. Dies lässt vermuten, dass CaVps34p die Aktivität von Ionentranslokatoren von ER, Golgi bzw. Vakuole beeinflusst.

Die Vakuole besitzt eine bedeutende Funktion bei der Speicherung und Entgiftung von Ionen. In der Membran dieses Organells sind Ionenpumpen vorhanden, die einen aktiven Transport ermöglichen. Der für H^+ -Antiporter benötigte Protonengradient wird durch die vakuoläre ATPase aufgebaut. Beispiele für solche Endomembrantransporter in *S. cerevisiae* sind der Na^+/H^+ Austauscher Nhx1p, der identisch mit dem Vps-Protein Vps44p ist (Bowers *et al.*, 2000) und von dem ein *C. albicans*-Homolog existiert sowie die Proteine Zrc1p, Cot1p

oder Zrt3p, die der sogenannten Cation Diffusion Facilitator (CDF) Familie angehören und Metalltransporter darstellen (MacDiarmid *et al.*, 2002). Sowohl in der *C. albicans* VPS34 Lipidkinasemutante als auch in der Nullmutante ist ein Ansäuerungsdefekt der Vakuole nachgewiesen, weshalb ein Kationen-Antiport entgegen einem Protonengradienten an der Vakuolenmembran nicht die Unterschiede in der Kationensensitivität beider Mutanten erklärt. Die Modulation der Aktivität einer Ionen-ATPase, die einen solchen Gradienten nicht benötigt, durch Wechselwirkung mit dem CaVps34Tp Protein der Lipidkinasemutante kann dagegen die Unterschiede in der Sensitivität der Mutanten erklären.

Aktive Ionentransportprozesse in die Zisternen des Golgi-Apparates und des endoplasmatischen Reticulums (ER) sind nachgewiesen. Beispiele in *S. cerevisiae* dafür sind die $\text{Ca}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$ -ATPase Pmr1p im Golgi, die an der Salztoleranz beteiligt ist und von der ein *C. albicans*-Homolog existiert (Park *et al.*, 2001), oder der Zink Transporter des ER's Zhf1p, welcher der CDF Proteinfamilie angehört (Clemens *et al.*, 2002). ER und Golgi sind als Funktionsorte der PI 3-Kinase Vps34p im Vesikeltransport beschrieben, so dass eine Interaktion des Proteins mit Ionentranslokatoren dieser Endomembransysteme vorstellbar ist.

Ebenfalls wichtig für den Ionentransport aus dem Zytoplasma sind Translokatoren der Plasmamembran. In *C. albicans* ist der Na^+/H^+ Antiporter Cnh1p untersucht (Soong *et al.*, 2000), von dem ein Homolog Nha1p in *S. cerevisiae* nachgewiesen ist (Prior *et al.*, 1996). Weiter Ionentranslokatoren in *S. cerevisiae* sind die Na^+ -ATPasen Ena1-4p (Wieland *et al.*, 1995). Das Internalisieren von Plasmamembranproteinen durch Endozytose stellt neben der Regulation der Transkription eine Möglichkeit der Modulation der Funktion von Ionentransportern der Plasmamembran dar. Da CaVps34p zwar an Endozytoseprozessen beteiligt ist, dabei aber nur den letzten Schritt der Endosomenfusion mit der Vakuole beeinflusst, ist die Entfernung von Plasmamembranproteinen von der Zelloberfläche und damit eine Regulation der Aktivität dieser Proteine nach Ausschalten von CaVps34p möglich. Defekte treten allerdings vermutlich bei der vakuolären Degradation auf, da der Transport zu diesem Organell gestört ist. Ste3p ist ein Rezeptorprotein von *S. cerevisiae*, dessen „Turnover“ Vps34p abhängig ist (Munn & Riezman, 1994). Da die Endozytose sowohl in der VPS34 Lipidkinasemutante als auch in der Nullmutante gestört ist, erklärt dies allerdings nicht die Unterschiede der Mutanten bei der Entgiftung der Kationen.

Beide VPS34 Mutanten zeigen die gleiche Sensitivität auf Cu^{2+} Ionen. Bei der Entgiftung dieses Metallions sind offenbar Zellfunktionen involviert, die durch den Verlust der Lipidkinaseaktivität von CaVps34p beeinträchtigt werden. Bei der Entgiftung von Cu^{2+} erfüllt die Plasmamembran-ATPase von *C. albicans* eine wichtige Funktion (Weissmann *et al.*, 2000). Dies stellt einen Unterschied zu den beiden anderen untersuchten Metallionen Zn^{2+} und Mn^{2+} dar, bei denen von einer Speicherung und Entgiftung in Endomembransystemen

wie Vakuole, ER und Golgi ausgegangen wird. Die erhöhte Sensitivität der *VPS34* Lipidkinase- sowie der Nullmutante lässt sich aus diesem Grund durch eine fehlerhafte Lokalisierung der Plasmamembran-ATPase aufgrund von Defekten im Vesikeltransport erklären.

Zusammengefasst weist die Toleranz der Lipidkinasemutante gegenüber hohen Kationenkonzentrationen im Medium auf eine Modulation von Kationentranslokatoren durch Interaktion mit CaVps34p hin, die nicht von der Lipidkinaseaktivität des Proteins abhängt. Die *VPS34* Lipidkinasemutante zeigt allerdings nicht die gleiche Toleranz gegenüber den untersuchten mono- und divalenten Kationen wie der Wildtyp. Es ist anzunehmen, dass dies auf den Wachstumsdefekt der Lipidkinasemutante in YPD-Medium zurückzuführen ist. Dieser Effekt kann mit den beschriebenen Defekten des Vesikeltransports und der Vakuolenfunktion nach Verlust der Lipidkinaseaktivität von CaVps34p, welche auch die Entgiftungsprozesse beeinflussen, zusammenhängen.

Die *VPS34* Lipidkinasemutante zeigt eine im Vergleich zur *vps34* Nullmutante verringerte Rapamycinsensitivität. Da sowohl die Lipidkinase- als auch die Nullmutante einen Defekt der Autophagozytose zeigen, kann dieser durch Rapamycingabe induzierte Prozess keine Erklärung für die unterschiedliche Sensitivität der *VPS34* Mutanten in der Reaktion auf dieses Makrolid darstellen. Eine Erklärung für die Rapamycinsensitivität der Nullmutante ist dagegen ein Defekt von Endgiftungsmechanismen der Zelle. So zeigt die *vps34* Nullmutante eine deutliche Sensitivität gegen verschiedene Antimykotika (Kitanovic *et al.*, im Druck). In *C. albicans* wird ein verstärkter Efflux von antibiotisch wirksamen Substanzen hauptsächlich durch Proteine mit einer ATP-bindenden Kasette (ABC-Transporter) und Transporter der „major facilitator superfamily„ (MFS) vermittelt (Ramage *et al.*, 2002; Lyons & White, 2000). Die Entgiftung verschiedener antifungaler Agenzien erfolgt über diese Membrantranslokatoren, welche sowohl in der Zytoplasmamembran als auch der Vakuolenmembran lokalisiert sind. Eine Interaktion und Aktivitätsmodulation eines solchen Transporters mit CaVps34p, durch eine Lipidkinase-unabhängige Wechselwirkung kann die verringerte Sensitivität der Lipidkinasemutante erklären.

Neben der Kationensensitivität wurde der Einfluss der Lipidkinaseaktivität auf die Temperatursensitivität von *C. albicans* untersucht. Beide *VPS34* Mutanten zeigen eine im Vergleich zum Wildtyp verstärkte Sensitivität gegenüber Temperaturstress. Dabei besitzt die *VPS34* Lipidkinasemutante eine größere Toleranz gegen hohe Temperaturen als die *vps34* Nullmutante. Eine Überschneidung in der Reaktion von *C. albicans* auf Kationen- und Hitzestress erklärt diese Beobachtung. Bei *S. cerevisiae* konnten solche Überschneidungen auf Ebene der Transkription festgestellt werden (Rep *et al.*, 2000). Dieser Effekt wird

dadurch begründet, dass in der Natur häufig verschiedene Stressarten gleichzeitig auftreten und dass ein spezifischer Stress Zellfunktionen stört, die einer weiteren Stressart induzieren. So kann die beobachtete stärkere Temperaturtoleranz der Lipidkinasemutante im Vergleich zur Nullmutante mit zellulären Entgiftungsmechanismen, vergleichbar zum Kationenstress, erklärt werden. Der Unterschied der *VPS34* Mutanten in der Reaktion auf hohe Temperaturen ist offenbar nicht so ausgeprägt wie der nach Induktion durch Kationenstress. Dies zeigt, dass das Überleben von *C. albicans* bei Hitzestress stärker vom Vesikeltransport und der Vakuolenfunktion beeinflusst wird als dies bei hohen Kationenkonzentrationen der Fall ist.

Drastische Unterschiede zwischen *VPS34* Lipidkinase- und Nullmutante traten beim Wachstum unter neutralen bis alkalischen Bedingungen auf. So ist die Nullmutante nur bei einem sauren pH-Wert des Kulturmediums in der Lage zu wachsen. Der Verlust der Lipidkinaseaktivität von CaVps34p wirkt sich allerdings nicht auf das Überleben von *C. albicans* im basischen Milieu aus.

Bei Untersuchungen des pH-abhängigen Wachstums von *S. cerevisiae* wird der Einfluss der Vakuolenansäuerung durch die vakuoläre ATPase belegt (Nelson *et al.*, 1994). Auch die in *C. albicans* untersuchten *vma7* Nullmutanten, bei denen die Untereinheit der vakuolären ATPase deletiert ist, zeigen wie die *vps34* Nullmutante sowohl einen Defekt der Vakuolenansäuerung als auch im Wachstum bei alkalischen pH (Poltermann *et al.*, im Druck). Für Vma7p ist eine *in vitro*-Wechselwirkung mit CaVps34p nachgewiesen (Eck *et al.*, im Druck). In diesem Zusammenhang ist das pH-unabhängige Wachstum der *VPS34* Lipidkinasemutante trotz eines Ansäuerungsdefektes der Vakuole bemerkenswert. Dies zeigt, dass das Wachstum von *C. albicans* unter alkalischen Bedingungen nicht von der Fähigkeit zur Vakuolenansäuerung abhängt und dass diese beiden Phänotypen offenbar über unterschiedliche Signalwege, in denen CaVps34p involviert ist, reguliert werden. Die Interaktion von CaVps34p mit Vma7p ist scheinbar entscheidend für das Wachstum unter alkalischen pH. Diese Wechselwirkung ist trotz der Modifikation der PI-Kopfgruppeninteraktionsregion von CaVps34Tp möglich, da die Lipidkinasemutante in alkalischem Medium wächst. Zu dem Defekt der Vakuolenansäuerung beider *VPS34* Mutanten kommt es dagegen vermutlich nicht durch Störung der CaVps34p-Vma7p-Wechselwirkung sondern durch Defekte des Vesikeltransports aufgrund fehlender PtdIns 3-P Bildung, die den Transport der vATPase zur Vakuole verhindern.

Der Rim101p Signalweg spielt bei *C. albicans* eine Hauptrolle bei der Adaption auf neutralen-alkalischen pH und wird durch den Zinkfinger Transkriptionsfaktor Rim101p bestimmt (Davis *et al.*, 2000). Verschiedene Studien zeigen Verbindungen zwischen dem Rim101p-Signalweg und MVB-Sortierungsprozessen. So ist das MVB Protein Bro1p (Nikko

et al., 2003, Odorizzi *et al.*, 2003) ein Homolog des Regulators der pH-Antwort Rim20p in *S. cerevisiae* und *C. albicans* (Davis *et al.*, 2000, Xu & Mitchell, 2001). Außerdem zeigen verschiedene Protein-Interaktionsstudien eine Wechselwirkung von Rim20p mit der ESCRT-III Untereinheit Snf7p/Vps32p und Vps4p, einer AAA-ATPase die für die Dissoziation und das Recycling von ESCRT-III erforderlich ist (Ito *et al.*, 2001; Vincent *et al.*, 2003; Bowers *et al.*, 2004). Dass ein indirekter Einfluss über ein vom MVB-Weg geregeltes Rezeptorturnover auf den Rim101p-Weg auszuschließen ist, belegen Untersuchungen mit *vps27*, *doa4*, *vps2*, *vps24* und *vps4* Nullmutanten, die zwar Störungen bei der Degradation von Plasmamembranproteinen zeigen, der Rim101p-Signalweg aber korrekt stattfindet (Xu *et al.*, 2004). Es wird vermutet, dass ESCRT Komponenten einen spezifischen Signaltransduktionsweg regeln und der MVB-Weg für ein Signal sorgt, das die Transkription nach pH-Änderung reguliert. CaVps34p und/oder Vma7p können als Teil eines solchen Komplexes von MVB-Proteinen durch Interaktion mit dem Rim101p Regulator Rim20p in die Antwort auf alkalischen pH involviert sind. Dass die Lipidkinaseaktivität von CaVps34p dabei keine Rolle spielt, zeigt die Unabhängigkeit des Rim101p-Wegs von dem PtdIns 3-P bindendem Protein Vps27p.

Eine andere Erklärung für die unterschiedliche Reaktion der *vps34* Nullmutante und der Lipidkinasemutante auf neutralen-alkalischen pH, ist eine Interaktion von CaVps34p mit Vps10p, einem Sortierungsrezeptor von vakuolären Hydrolasen im Golgi. Untersuchungen einer *vps10* Mutante in *S. cerevisiae* belegten, dass eine Sortierung der Proteine Carboxypeptidase Y (CPY) bzw. Proteinase A zur Vakuole unter neutralen bis basischen Bedingungen Vps10p abhängig ist, im sauren Milieu aber unabhängig von diesem Rezeptor erfolgt (Seaman *et al.*, 1997; Harsay & Schekman, 2002). Eine Interaktion von CaVps34p mit Vps10p ist vorstellbar und mehrfach bei *S. cerevisiae* diskutiert worden. Diese Wechselwirkung kann zu einer Modulation des Sortierungsprozesses führen, was einen korrekten Transport von Proteinen zur Vakuole auch unter alkalischen Bedingungen ermöglicht. Die korrekte Sortierung bestimmter Proteine ist vermutlich entscheidend für die Lebensfähigkeit von *C. albicans*. Eine solche Wechselwirkung mit Vps10p scheint auch mit dem veränderten CaVps34Tp Protein, dessen Lipidkinaseaktivität ausgeschaltet wurde, möglich zu sein. Fehlt das komplette Protein findet der Vps10p abhängige Sortierungsschritt nicht statt, was den Phänotyp der *C. albicans vps34* Nullmutante in neutralen bis alkalischem Medium erklären könnte.

4.2.5 Die Lipidkinaseaktivität von CaVps34p hat keinen Einfluss auf die Chlamydosporenbildung

Die Bildung von großen, sphärischen, dickwandigen Chlamydosporen ist charakteristisch für die polymorphe Hefe *C. albicans*. Chlamydosporen stellen eine dormante Zellform dar, scheinen aber aufgrund ihres schnellen Vitalitätsverlustes irrelevant für das Überleben des Organismus über längere Zeit.

Die *VPS34* Lipidkinasemutante zeigt keine Beeinflussung der Chlamydosporenbildung. Im Gegensatz dazu ist die *vps34* Nullmutante nicht in der Lage Chlamydosporen auszubilden. Dies belegt den Einfluss von CaVps34p unabhängig von der Lipidkinaseaktivität auf diesen morphologischen Wechsel. Die biologische Funktion und Regulation der Ausbildung von Chlamydosporen ist immer noch weit gehend unklar. Bisher wurden verschiedenen Gene von *C. albicans* identifiziert deren Verlust zu Störungen in der Bildung von Chlamydosporen führt. Dazu gehören der Transkriptionsfaktor der Hyphenbildung Efg1p (Sonneborn *et al.*, 1999), die in Stressreaktionen involvierte MAP-Kinase Hog1p (Alonso-Monge *et al.*, 2003), Sch9p, eine Proteinkinase mit vielfältigen Funktionen bei der Stressresistenz, die für die Mitochondrienbiosynthese erforderlichen mitochondriale ATP-abhängige RNA-Helikase Suv3p sowie Isw2p, Teil des Chromatin Remodulations-Komplex in *S. cerevisiae* (Nobile *et al.*, 2003). Es existiert ebenfalls eine Verbindung zwischen der Regulatoren der pH-Antwort Rim13p und Mds3p und der Bildung von Chlamydosporen (Nobile *et al.*, 2003). Eine Erklärung für die Chlamydosporenbildung der *VPS34* Lipidkinasemutante kann die stärkere Stressresistenz und der effizientere Entgiftungsmechanismus der Lipidkinasemutante darstellen, da schon mit Hog1p und Sch9p Proteine der Stressantwort identifiziert wurden, die einen Defekt der Chlamydosporenbildung aufweisen.

4.2.5 Die Lipidkinaseaktivität von CaVps34p ist entscheidend für die Virulenz von *C. albicans*

Nachdem gezeigt werden konnte, dass der Verlust der Lipidkinaseaktivität von CaVps34p verschiedenen Pathogenitätsfaktoren von *C. albicans* beeinflusst, wurde die Virulenz der *VPS34* Lipidkinasemutante im Maus-Candidosis-Modell untersucht. In dem Modell einer disseminierten Candidose führt der Verlust der PI 3-Kinaseaktivität zu einer Avirulenz der Mutante. Die Untersuchung der Nierenbesiedelung der infizierten Mäuse zeigte eine verringerte Zahl von Pilzzellen der *C. albicans* *VPS34* Lipidkinase- und Nullmutante in diesem Organ verglichen mit dem Wildtyp. Diese Beobachtung demonstriert, dass beide Mutanten zu einer hämatogenen Ausbreitung und Etablierung im Wirt in der Lage sind, dabei

aber keine Symptome einer Candidiasis auslösen. Dieser Sachverhalt ist auf die beschriebenen Defekte von Virulenzfaktoren bei Verlust der Lipidkinaseaktivität von CaVps34p zurückzuführen. Besondere Bedeutung haben dabei vermutlich Defekte der Hyphenbildung und der Adhäsion an Wirtszellen. Die Entgiftung von Kationen und das Wachstum bei erhöhter Temperatur bzw. unter neutralen bis alkalischen Umweltbedingungen, bei denen Unterschiede zwischen Lipidkinase- und Nullmutante beobachtet wurden, spielen offenbar eine untergeordnete Rolle bei der Virulenz von *C. albicans* in diesem Infektionsmodell.

Eine Erklärung für die essentielle Bedeutung der Lipidkinaseaktivität von CaVps34p für die Virulenz von *C. albicans* ist ein virulenzassoziiertes Signalweg, in dem das PtdIns 3-P bindende Protein CaVac1p downstream von CaVps34p wirkt. Die Avirulenz der *vac1* Nullmutante im Maus-Modell einer systemischen Candidiasis spricht für diese Theorie (unveröffentlichte Daten, Franke *et al.*). CaFab1p, ein weiteres PtdIns 3-P bindendes Protein, ist dagegen nicht virulenzassoziiert (Augsten *et al.*, 2002). Dieser Signalweg, in dem ebenfalls die Lipidkinaseaktivität von CaVps34p involviert ist, ist irrelevant für die Virulenz von *C. albicans*.

4.3 Übersicht der Zusammenhänge zwischen den Aktivitäten von CaVps34p und den Zellfunktionen

Zellfunktionen bzw. Phänotypen beeinflusst durch die	
Lipidkinaseaktivität von CaVps34p	Proteininteraktionen von CaVps34p
Vesikeltransport zur Vakuole	Ionen-transport
Vakuolenhomöostase	Entgiftungsmechanismen
Vakuolenansäuerung	pH-abhängiges Wachstum
Hyphenbildung	Kationen-, Temperatur- und
Adhäsion an Wirtszellen	Rapamycinsensitivität

Tabelle 3: Übersicht der *in vivo* Aktivität von CaVps34p.

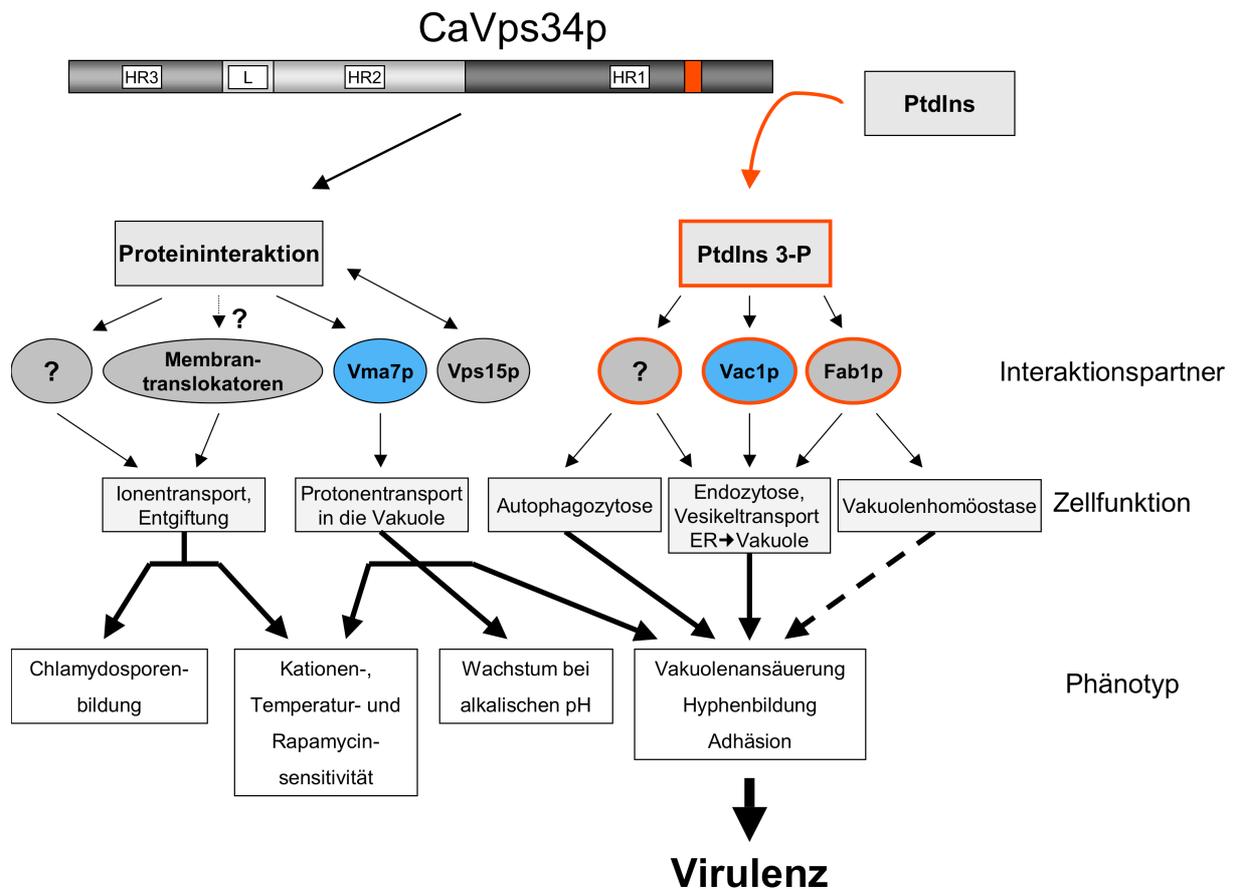


Abbildung 20: Übersicht der Zellfunktionen von CaVps34p in *C. albicans*. CaVps34p ist schematisch dargestellt. Die drei Homologieregionen (HR) und die Linker-Region (L) sind gekennzeichnet. In der katalytischen Domäne (HR1) ist die PI-Kopfgruppeninteraktionsregion rot markiert. Die Lipidkinaseaktivität von CaVps34p wird durch einen roten Pfeil und die Umsetzung von PtdIns zu PtdIns 3-P (rot gerahmtes Kästchen) dargestellt. Die bereits untersuchten PtdIns 3-P bindenden Proteine von *C. albicans* sind durch Ellipsen mit roten Rahmen markiert. Vermutete Interaktionspartner von PtdIns 3-P in *C. albicans* (z.B. Vps27p, Vam7p) sind ebenfalls eingezeichnet (?).

Als weitere Aktivität von CaVps34p wird die Proteininteraktion aufgeführt. Diese umfasst sowohl Protein-Protein-Wechselwirkungen als auch die Proteinkinaseaktivität von CaVps34p. Nachgewiesene bzw. potentielle Interaktionspartner (?) dieser Aktivitäten sind durch schwarz gerahmte Ellipsen dargestellt. Die hellgrau unterlegten Kästchen kennzeichnen die einzelnen Zellfunktionen, die durch die Wechselwirkung der jeweiligen Interaktionspartner mit PtdIns 3-P bzw. CaVps34p beeinflusst werden. Die dadurch induzierten Phänotypen von *C. albicans* sind in den weißen Kästen darunter aufgeführt. Entscheidend für die Virulenz sind dabei vor allem die Hyphenbildung und die Adhäsion an Wirtszellen. Interaktionspartner (Vma7p, Vac1p), die für die Virulenz entscheidend sind, sind blau markiert.

5. Zusammenfassung

Die Phosphatidylinositol 3-Kinase CaVps34p aus *C. albicans* ist ein multifunktionelles Protein mit Lipid- und Proteinkinaseaktivität. Das Enzym ist am vesikulären Proteintransport und an der Virulenz der humanpathogenen Hefe beteiligt. Struktur-Funktions Untersuchungen von CaVps34p hinsichtlich der beiden Enzymaktivitäten bildeten die Grundlage für die Aufklärung der Rolle der Lipidkinaseaktivität bei den zellulären Funktionen des Proteins in *C. albicans*.

Es wurden verschiedene CaVps34p Mutanten generiert und deren Lipid- bzw. Proteinkinaseaktivität *in vitro* betrachtet. Der Austausch von sechs Aminosäuren der PI-Kopfgruppeninteraktionsstelle gegen die der korrespondierenden Region des PI 3-Kinase verwandten *C. albicans* Tor Proteins ermöglichte die Generierung des CaVps34Tp Proteins, dessen Lipidkinaseaktivität disruptiert ist, die Fähigkeit zur Autophosphorylierung aber aufrechterhalten bleibt. Eine Erweiterung der Substratspezifität durch Austausch der erwähnten Region von CaVps34p durch die korrespondierende der Klasse I PI 3-Kinase p110 γ konnte dagegen nicht erreicht werden. Des Weiteren konnte durch Konstruktion zweier CaVps34p-Mutanten mit mutierten C-terminalen Serin, S999Ap und S1013Ap, ermittelt werden, dass im Gegensatz zu PI 3-Kinasen der Klasse I ein spezifischer Serinrest des C-Terminus von CaVps34p nicht an der Autophosphorylierung beteiligt ist.

Um die Rolle der Lipidkinaseaktivität von CaVps34p *in vivo* zu untersuchen erfolgte die Konstruktion eines Lipidkinase-defekten *Candida*-Stammes durch Integration eines hybriden *VPS34TOR* Gens, äquivalent zu den Modifikationen im CaVps34Tp, in das Genom von *C. albicans*. Der Lipidkinase-defekte Stamm zeigt Defekte in der Vakuolenmorphologie und im Vesikeltransport sowie ein eingeschränktes Hyphenwachstum und reduzierte Adhärenz an Wirtszellen. Zudem konnte eine Avirulenz im Maus-Candidiasis-Modell nach Deletion der Lipidkinaseaktivität von CaVps34p nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse belegen die Bedeutung der Lipidkinaseaktivität von CaVps34p im vesikelvermittelten Proteintransport und der Virulenz von *C. albicans*. Daneben zeigt der Lipidkinase-defekte Stamm eine im Vergleich zu *vps34* Nullmutante größere Toleranz gegenüber Stress ausgelöst durch erhöhte Temperatur und Konzentration an Na⁺, K⁺, Mn²⁺ bzw. Zn²⁺ sowie alkalischen pH und das antibiotisch wirksame Rapamycin. Überdies ist die Lipidkinasemutante im Gegensatz zu Nullmutante zur Chlamydosporenbildung in der Lage. Die Unterschiede zwischen den *VPS34* Mutanten deuten auf eine Funktion von CaVps34p unabhängig von der Lipidkinaseaktivität bei Entgiftungsmechanismen des Organismus hin. Translokatoren der Zellmembran bzw. der Endomembranen stellen dabei mögliche Targets dar.

Literaturverzeichnis

Abeliovich H, Klionsky DJ (2001). Autophagy in yeast: mechanistic insights and physiological function. *Microbiol Mol Biol Rev* 65: 463-479.

Alonso-Monge R, Navarro-Garcia F, Roman E, Negredo AJ, Eisman B, Nombela C, Pla J (2003). The Hog1 mitogen-activated protein kinase is essential in the oxidative stress response and chlamyospore formation in *Candida albicans*. *Eukaryotic Cell* 2: 351-361.

Augsten M, Hübner C, Nguyen M, Künkel W, Härtl A, Eck R (2002). Defective hyphal induction of a *Candida albicans* phosphatidylinositol 3-phosphate 5-kinase null mutant on solid media does not lead to decreased virulence. *Infect Immun* 70: 4462-4470.

Babst M, Katzmann DJ, Estepa-Sabal EJ, Meerloo T, Emr SD (2002a). Escrt-III: an endosome-associated heterooligomeric protein complex required for mvb sorting. *Dev Cell* 3: 271-282.

Babst M, Katzmann DJ, Snyder WB, Wendland B, Emr SD (2002b). Endosome-associated complex, ESCRT-II, recruits transport machinery for protein sorting at the multivesicular body. *Dev Cell* 3: 283-289.

Bagnat M, Keranen S, Shevchenko A, Simons K (2000). Lipid rafts function in biosynthetic delivery of proteins to the cell surface in yeast. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 3254–3259.

Bailey A, Wadsworth E, Calderone R (1995). Adherence of *Candida albicans* to human buccal epithelial cells: host-induced protein synthesis and signalling events. *Infect Immun* 63: 569-572.

Bailey DA, Feldmann PJF, Bovey M, Gow NAR, Brown AJP (1996). The *Candida albicans* *HYR1* gene, which is activated in response to hyphal development, belongs to a gene family encoding yeast cell wall proteins. *J Bacteriol* 178: 5353-5360.

Barlowe C (1997). Coupled ER to Golgi transport reconstituted with purified cytosolic components. *J Cell Biol* 139: 1097–1108.

Barrowman J, Sacher M, Ferro-Novick S (2000). TRAPP stably associates with the Golgi and is required for vesicle docking. *EMBO J* 19: 862–869.

Beck-Sagué CM, Jarvis WR (1993). Secular trends in the epidemiology of nosocomial fungal infections in the United States, 1980-1990. *J Infect Dis* 167: 1247-1251.

Benli M, Doring F, Robinson DG, Yang X, Gallwitz D (1996). Two GTPase isoforms, Ypt31p and Ypt32p, are essential for Golgi function in yeast. *EMBO J* 15: 6460–6475.

Berkower C, Loayza D, Michaelis S (1994). Metabolic instability and constitutive endocytosis of STE6, the α -factor transporter of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* 5:1185-98.

Birnboim HC, Dooly J (1979). A rapid alkaline extraction for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7: 1513-1523.

Birse CE, Irwin MY, Fonzi WA, Sypherd PS (1993). Cloning and characterization of *ECE1*, a gene expressed in association with cell elongation of the dimorphic pathogen *Candida albicans*. *Infect Immun* 61: 3648-3655.

Bonangelino CJ, Nau JJ, Duex JE, Brinkman M, Wurmser AE, Gary JD, Emr SD, Weisman LS (2002). Osmotic stress-induced increase of phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate requires Vac14p, an activator of the lipid kinase Fab1p. *J Cell Biol* 156: 1015-1028.

Bondeva T, Pirola L, Bulgarelli-Leva G, Rubio I, Wetzker R, Wymann MP (1998). Bifurcation of lipid and protein kinase signals of PI3K γ to the protein kinases PKB and MAPK. *Science* 282: 293-296.

Bowers K, Levi BP, Patel FI, Stevens TH (2000). The sodium/proton exchanger Nhx1p is required for endosomal protein trafficking in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* 11: 4277-4294.

Bowers K, Lottridge J, Helliwell SB, Goldthwaite LM, Luzio JP *et al.* (2004). Protein-protein interactions of ESCRT complexes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Traffic* 5: 194-210.

Braun BR, Johnson AD (1997). Control of filament formation in *Candida albicans* by the transcriptional repressor TUB1. *Science* 277: 105-109.

Braun BR, Johnson AD (2000). *TUB1*, *CPH1* and *EFG1* make independent contributions to filamentation in *Candida albicans*. *Genetics* 155: 57-67.

Brown DHJr, Giusani AD, Chen X, Kumamoto C (1999). Filamentous growth of *Candida albicans* in response to physical environmental cues and its regulation by the unique CZF1 gene. *Mol Microbiol* 34: 651-662.

Bruckmann A, Künkel W, Härtl A, Wetzker R, Eck R (2000). A phosphatidylinositol 3-kinase of *Candida albicans* influences adhesion, filamentous growth and virulence. *Microbiology* 146: 2755-2764.

Bruckmann A, Künkel W, Augsten K, Wetzker R, Eck R (2001). The deletion of *CaVPS34* in human pathogenic yeast *Candida albicans* causes defects in vesicle-mediated protein sorting and nuclear segregation. *Yeast* 18: 343-353.

Bryant NJ, Stevens TH (1998). Vacuole biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*: protein transport pathways to the yeast vacuole. *Microbiol Mol Biol Rev* 62: 230–247.

Burd CG, Emr SD (1998). Phosphatidylinositol(3)-phosphate signalling mediated by specific binding to RING FYVE domains. *Mol Cell* 2: 157-162.

Burda P, Padilla SM, Sarkar S, Emr SD (2002). Retromer function in endosome-to Golgi retrograde transport is regulated by the yeast Vps34 PtdIns 3-kinase. *J Cell Sci* 115: 3889-3900.

Calderone RA (1989). Host parasite relationships in candidiasis. *Mycoses* 32: 12-17.

Calderone RA, Fonzi WA (2001). Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends in Microbiology* 9: 327-335.

Calvin NM, Hanawalt PC (1988). High-efficiency transformation of bacterial cells by electroporation. *J Bacteriol* 170: 2796-2801.

Catlett NL, Weismann LS (2000). Divide and multiply: Organelle partitioning in yeast. *Curr Opin Cell Biol* 12: 509–516.

Cavalli V, Corti M, Gruenberg J (2001). Endocytosis and signaling cascades: a close encounter. *FEBS Lett* 498: 190-196.

Cheever ML, Sato TK, de Beer T, Kutateladze TG, Emr SD, Overduin M (2001). Phox domain interaction with PtdIns3P targets the Vam7 t-SNARE to vacuole membranes. *Nat Cell Biol* 3: 613-618.

Chu WS, Magee BB, Magee PT (1993). Construction of an Sfil macrorestriction map of the *Candida albicans* genome. *J Bacteriol* 175: 6637-6651.

Clemens S, Bloss T, Vess C, Neumann D, Nies DH, zur Nieden U (2002). A transporter in the endoplasmic reticulum of *Schizosaccharomyces pombe* cells mediates zinc storage and differentially affects transition metal tolerance. *J Biol Chem* 277: 18215-18221.

Cooke FT, Dove SK, McEwen RK, Painter G, Holmes AB, Hall MN, Michell RH, Parker PJ (1998). The stress-activated phosphatidylinositol 3-phosphate 5-kinase Fab1p is essential for vacuole function in *S. cerevisiae*. *Curr Biol* 8: 1219-22.

Csank C, Schröppel K, Leberer E, Marcus D, Mohamed O, Meloche S, Thomas DY, Whiteway M (1998). Roles of the *Candida albicans* mitogen-activated protein kinase homolog, Cek1p, in hyphal development and systemic candidiasis. *Infect Immun* 66: 2713-2721.

Conibear E, Stevens TH (1995). Vacuolar biogenesis in yeast: Sorting out the sorting proteins. *Cell* 83: 513-516.

Conibear E, Stevens TH (1998). Multiple sorting pathways between the late Golgi and the vacuole in yeast. *Biochim Biophys Acta* 1404: 211-230.

Conibear E, Stevens TH (2000). Vps52p, Vps53p, and Vps54p form a novel multisubunit complex required for protein sorting at the yeast late Golgi. *Mol Biol Cell* 11: 305-323.

Cowles CR, Snyder WB, Burd CG, Emr SD (1997). Novel Golgi to vacuole delivery pathway in yeast: identification of a sorting determinant and required transport component. *EMBO J* 15: 2769-2782.

Czapalla C, Culo M, Muller EC, Brock C, Reusch HP, Spicher K, Krause E, Nurnberg B (2003). Identification and characterization of the autophosphorylation sites of phosphoinositide 3-kinase isoforms beta and gamma. *J Biol Chem* 278:11536-45.

Davis DA, Bruno VM, Loza L, Filler SG, Mitchell AP (2002). *Candida albicans* Mds3p, a conserved regulator of pH responses and virulence identified through insertional mutagenesis. *Genetics* 162: 1573-1581.

Davis D, Wilson RB, Mitchell AP (2000). RIM101-dependent and independent pathways govern pH responses in *Candida albicans*. *Mol Cell Biol* 20: 971-978.

Dean DA, Burchard KW (1998). Surgical perspective on invasive *Candida* infections. *World J Surg* 22: 127-34

De Backer MD, Maes D, Vandoninck S, Logghe M, Contreras R, Luyten WHML (1999). Transformation of *Candida albicans* by electroporation. *Yeast* 15: 1609-1618.

Deitch EA (1990). The role of intestinal barrier failure and bacterial translocation in the development of systemic infection and multiple organ failure. *Arch Surg* 125: 403-4.

D'Hondt K, Heese-Peck A, Riezman H (2000). Protein and lipid requirement for endocytosis. *Annu Rev Genet* 34: 255–295.

Doi M, Homma M, Chindamporn A, Tanaka K (1992). Estimation of chromosome number and size by pulse-field gel electrophoresis (PFGE) in medically important *Candida-species*. *J Gen Microbiol* 138: 2243-2251.

Dower WJ, Miller JF, Ransdale CW (1989). High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res* 16: 6127-6145.

Eck R, Bruckmann A, Wetzker R, Künkel W (2000). A phosphatidylinositol 3-kinase of *Candida albicans*: molecular cloning and characterization. *Yeast* 16: 933-944.

Edmond MB, Wallace SE, McClish DK, Pfaller MA, Jones RN, Wenzel RP (1999). Nosocomial bloodstream infections in the United States hospitals : a three-year analysis. *Clin Infect Dis* 29: 239-244.

Egner R, Mahe Y, Pandjaitan R, Kuchler K (1995). Endocytosis and vacuolar degradation of the plasma membrane-localized Pdr5 ATP-binding cassette multidrug transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 15: 5879-87.

Ernst JF (2000). Transcription factors in *Candida albicans*-environmental control of morphogenesis. *Microbiology* 146, 1763-1774.

Filler SG, Ibe BO, Ibrahim AS et al. (1994). Mechanisms by which *Candida albicans* induces endothelial cell prostaglandin synthesis. *Infect Immun* 62: 1064-9.

Filler SG, Swerdloff JN, Hobbs C et al. (1995). Penetration and damage of endothelial cells by *Candida albicans*. *Infect Immun* 63: 976-83.

Filler SG, Pfunder AS, Spellberg BJ (1996). *Candida albicans* stimulates cytokine production and leukocyte adhesion molecule expression by endothelial cells. *Infect Immun* 64: 2609-17.

Finken-Eigen M, Muller S, Kohrer K (1997). Cloning and characterisation of a dominant-negative *vps1* allele of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 378: 1187–1189.

Gary JD, Wurmser AE, Bonangelino CJ, Weisman LS, Emr SD (1998). Fab1p is essential for PtdIns(3)P 5-kinase activity and the maintenance of vacuolar size and membrane homeostasis. *J Cell Biol* 143: 65-79.

Ghannoum MA, Abu-Elteen KH (1990). Pathogenicity determinants of *Candida*. *Mycoses* 33: 265-82.

Giamarellou H, Antoniadou A (1996). Epidemiology, diagnosis, and therapy of fungal infections in surgery. *Infect Control Hosp Epidemiol* 17: 558-64.

Graham LA, Hill KJ, Stevens TH (1994). VMA7 encodes a novel 14-kDa subunit of the *Saccharomyces cerevisiae* vacuolar H(+)-ATPase complex. *J Biol Chem* 269: 25974-7.

Graham LA, Powell B, Stevens TH (2000). Composition and assembly of the yeast vacuolar H(+)-ATPase complex. *J Exp Biol* 203 Pt 1: 61-70.

Grotte M, Lazar T (1999). The ins and outs of yeast vacuole trafficking. *Protoplasma* 209: 9-18.

Gotte M, Lazar T, Yoo JS, Scheglmann D, Gallwitz D (2000). The full complement of yeast Ypt/Rab-GTPases and their involvement in exo- and endocytic trafficking. *Subcell Biochem* 34: 133–173.

Gurunathan S, David D, Gerst JE (2002). Dynamin and clathrin are required for the biogenesis of a distinct class of secretory vesicles in yeast. *EMBO J* 21: 602-614.

Harris SL, Waters MG (1996). Localisation of yeast early Golgi mannosyltransferase, Och1p, involves retrograde transport. *Cell* 132: 985–998.

Harsay E, Bretscher A (1995). Parallel secretory pathway to the cell surface in yeast. *J Cell Biol* 131: 297–310.

Harsay E, Schekman R (2002). A subset of yeast vacuolar protein sorting mutants is blocked in one branch of the exocytic pathway. *J Cell Biol* 156: 271-285.

Hoyer LL, Payne TL, Bell M, Myers AM, Scherer S (1998). *Candida albicans* ALS3 and insights into the nature of the ALS gene family. *Curr Genet* 33: 451-459.

Huang WP, Klionsky DJ (2002). Autophagy in yeast: a review of the molecular machinery. *Cell Struc Func* 27: 409-420.

Hube B, Monod M, Schofield DA, Brown AJP, Gow NAR (1994). Expression of seven members of the gene family encoding secretory aspartyl proteinases in *Candida albicans*. *Mol Microbiol* 14: 87-99.

Hutchins MU, Klionsky DJ (2001). Vacuolar localisation of oligomeric α -mannosidase requires the cytoplasm to vacuole targeting and autophagy pathway components in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 276: 20491–20498.

Inone S, Wirman JA, Alexander JW et al. (1988). *Candida albicans* translocation across the gut mucosa following burn injury. *J Surg Res* 44: 479-92.

Ito T, Chiba T, Ozawa R, Yoshida M, Hattori M et al. (2001). A comprehensive two-hybrid analysis to explore the yeast protein interactome. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 4569-6574.

Jones EW, Webb GC, Hiller MA (1997). Biogenesis and function of the yeast vacuole. In *Molecular Biology of the Yeast *Saccharomyces cerevisiae** (Pringle, J.R., Broach, J.R. & Jones, E.W., eds.) vol. 3, 363–469.

Joshi KR, Solanki A, Prakash P (1993). Morphological identification of *Candida* species on glucose agar, rice agar and corn meal agar with and without Tween-80. *Indian J Pathol Microbiol* 36: 48-51.

Katzmann DJ, Babst M, Emr SD (2001). Ubiquitin-dependent sorting into multivesicular body pathway requires the function of a conserved endosomal protein sorting complex, ESCRT-I. *Cell* 106: 145–155.

Katzmann DJ, Stefan CJ, Babst M, Emr SD (2003). Vps27 recruits ESCRT machinery to endosomes during MVB sorting. *J Cell Biol* 162: 413-23.

Kihara A, Noda T, Ishihara N, Ohsumi Y (2001). Two distinct Vps34 phosphatidylinositol 3-kinase complexes function in autophagy and carboxypeptidase Y sorting in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* 152: 519-530.

Kim J, Klionsky DJ (2000). Autophagy, cytoplasm-to-vacuole targeting pathway, and pexophagy in yeast and mammalian cells. *Annu Rev Biochem* 69: 303–342.

Klionsky DJ (1998). Nonclassical protein sorting to the yeast vacuole. *J Biol Chem* 273: 10807–10810.

Klionsky DJ, Emr SD (2000). Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science* 290: 1717–1721.

Klumperman J (2000). Transport between ER and Golgi. *Curr Opin Cell Biol* 12: 445–449.

Kucharczyk R, Rytka J (2001). *Saccharomyces cerevisiae* – a model organism for the studies on vacuolar transport. *Acta Biochimica Polonica* 48: 1025-1042.

Lämmli UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.

Lang T, Schaeffeler E, Bernreuther D, Bredschneider M, Wolf DH, Thumm M (1998). Aut2p and Aut7p, two novel microtubule associated proteins are essential for delivery of autophagic vesicles to the vacuole. *EMBO J* 17: 3597–3607.

Latterich M, Watson MD. (1993). Evidence for a dual osmoregulatory mechanism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Biophys Res Commun* 191:1111-7.

Lay J, Henry LK, Clifford J, Koltin Y, Bulawa CE, Becker JM (1998). Altered expression of selectable marker *URA3* in gene-disrupted *C. albicans* strains complicates interpretation of virulence studies. *Infect Immun* 66: 5301-5306.

Leberer E, Marcus D, Broadbent ID et al. (1996). Signal transduction through homologs of the Ste20p and Ste7p protein kinases can trigger hyphal formation in the pathogenetic fungus *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 13217-13222.

Liu H, Köhler J, Fink GR (1994). Suppression of hyphal formation in *Candida albicans* by mutation of a *STE12* homolog. *Science* 266: 1723-1725.

Loayza D, Michaelis S (1998). Role for the ubiquitin-proteasome system in the vacuolar degradation of Ste6p, the a-factor transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 18:779-89.

Lyons CN, White TC (2002). Transcriptional analyses of antifungal drug resistance in *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother* 44: 2296-303.

MacDiarmid CW, Milanick MA, Eide DJ (2002). Biochemical properties of vacuolar zinc transport systems of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 277: 39187-39194.

McCullough MJ, Ross BC, Reade PC (1996). *Candida albicans*: a review of its history, taxonomy, epidemiology, virulence attributes, and methods of strain differentiation. *Int J Oral Maxillofac Surg* 25(2):136-44. Review.

McMahon HT, Wigge P, Smith C (1997). Clathrin interacts specifically with amphiphysin and is displaced by dynamin. *FEBS Lett* 413: 319–322.

McPherson PS, Garcia EP, Slepnev VI, David C, Zhang X, Grabs D, Sossin WS, Bauerfeind R, Nemoto Y, De Camilli P (1996). A presynaptic inositol-5-phosphatase. *Nature* 379(6563): 353-357.

Micheva KD, Kay BK, McPherson PS (1997). Synaptojanin forms two separate complexes in the nerve terminal. Interactions with endophilin and amphiphysin. *J Biol Chem* 272(43): 27239-45.

Misra S, Hurley JH (1999). Crystal structure of a phosphatidylinositol 3-phosphate-specific membran-targeting motif, the FYVE domain of Vps27p. *Cell* 97: 657-666.

Munn AL, Riezman H (1994). Endocytosis is required for the growth of vacuolar H⁺-ATPase-defective yeast: identification of six new *END* genes. *J Cell Biol* 127: 373-389.

Murray V (1989). Improved double-stranded DNA-sequencing using the linear polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res* 17: 8889.

Nelson H, Mandiyan S, Nelson N (1994). The *Saccharomyces cerevisiae* *VMA7* gene encodes a 14-kDa subunit of the vacuolar H(+)-ATPase catalytic sector. *J Biol Chem* 269: 24150-5.

Nikko E, Marini AM, Andre B (2003). Permease recycling and ubiquitination status reveal a particular role for Bro1 in the multivesicular body pathway. *J Biol Chem* 278: 50732-50743.

Nobile CJ, Bruno VM, Richard ML, Davis DA, Mitchell AP (2003). Genetic control of chlamyospore formation in *Candida albicans*. *Microbiology* 149: 3629-3637.

Nucci M, Anaissie E (2001). Revisiting the source of candidemia: skin or gut? *Clin Infect Dis* 33: 1959-1967.

Odds FC (1988). *Candida* and candidosis. A review and bibliography, 2nd ed. Bailliere-Tindall, London, United Kingdom.

Odorizzi G, Babst M, Emr SD (1998). Fab1p PtdIns(3)P 5-kinase function essential for protein sorting in the multivesicular body. *Cell* 95: 847-858.

Odorizzi G, Katzmann DJ, Babst M, Audhya A, Emr SD (2003). Bro1 is an endosome-associated protein that functions in the MVB pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Sci* 116: 1893-1903.

Park SY, Seo SB, Lee SJ, Na JG, Kim YJ (2001). Mutation in *PMR1*, a Ca²⁺-ATPase in Golgi, confers salt tolerance in *Saccharomyces cerevisiae* by inducing expression of *PMR2*, an Na⁺-ATPase in Plasma membrane. *J Biol Chem* 276: 28694-28699.

Pelham HBR (1999). SNAREs and the secretory pathway – lessons from yeast. *Exp Cell Res* 247: 1-8.

Peng R, Grabowski R, De Antoni A, Gallwitz D (1999). Specific interaction of the yeast *cis*-Golgi syntaxin Sed5p and the coat protein complex II component Sec24p of endoplasmic reticulum-derived transport vesicles. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 3751–3756.

Pfaller MA, Jones RN, Messer SA, Edmond MB, Wenzel RP (1998) National surveillance of nosocomial blood stream infection due to *Candida albicans*: frequency of occurrence and antifungal susceptibility in the SCOPE Program. *Diagn Microbiol Infect Dis* 31(1):327-32.

Pfaller MA, Messer SA, Hollis RJ, Jones RN, Doern GV, Brandt ME, Hajjeh RA (1999) Trends in species distribution and susceptibility to fluconazole among blood stream isolates of *Candida* species in the United States. *Diagn Microbiol Infect Dis* 33: 217-222.

Piper RC, Cooper AA, Yang H, Stevens TH (1995). *VPS27* controls vacuolar and endocytic traffic through a prevacuolar compartment in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* 131: 603-617.

Pirola L, Zvelebil MJ, Bulgarelli-Leva G, van Obberghen E, Waterfield MD, Wymann MP (2001). Activation loop sequences confer substrate specificity to phosphoinositide 3-kinase α (PI3K α). *J Biol Chem* 276: 21544-21554.

Preston RA, Murphy RF, Jones EW (1989). Assay of vacuolar pH in yeast and identification of acidification-defective mutants. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 7027-31.

Price A, Seals D, Wickner W, Ungermann C (2000). The docking stage of yeast vacuole fusion requires the transfer of proteins from a *cis*-SNARE complex to a Rab/Ypt protein. *J Cell Biol* 148: 1231–1238.

Prior C, Potier S, Souciet J, Sychrova H (1996). Characterization of the *NHA1* gene encoding a Na⁺/H⁺ antiporter of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* 287: 89-93.

Ramage G, Bachmann S, Patterson TF, Wickes BL, López-Ribot JL (2002). Investigation of multidrug efflux pumps in relation to fluconazole resistance in *Candida albicans* biofilms. *J Antimicrob Chemotherapy* 49: 973-980.

Ramon AM, Porta A, Fonzi WA (1999). Effect of environmental pH on morphological development of *Candida albicans* is mediated via the PacC-related transcription factor encoded by *PRR2*. *J Bacteriol* 181: 7524-7530.

Raymond CK, Howald-Stevenson I, Vater CA, Stevens TH (1992). Morphological classification of the yeast vacuolar protein sorting mutants: Evidence for a prevacuolar compartment in class E *vps* mutants. *Mol Biol Cell* 3: 1389-1402.

Reggiori F, Klionsky DJ (2002). Autophagy in the eukaryotic cell. *Eukar Cell* 1: 11-21.

Reggiori F, Pelham HRB (2001). Sortine of proteins into multivesikular bodies: ubiquitin-dependent and -independent targeting. *EMBO J* 20: 5176-5186.

Rep M, Krantz M, Thevelein JM, Hohmann S (2000). The transcriptional response of *Saccharomyces cerevisiae* to osmotic shock. Hot1p and Msn2p/Msn4p are required for the induction of subsets of high osmolarity glycerol pathway-dependent genes. *J Biol Chem* 275(12): 8290-8300.

Riggsby WS, Torres-Bauza LJ, Wills JW, Townes TM (1982). DNA content, kinetic complexity, and the ploidy question in *Candida albicans*. *Mol Cell Biol* 2: 853-862.

Rotin D, Staub O, Haguenaer-Tsapis R (2000). Ubiquitination and endocytosis of plasma membrane proteins: Role of Nedd4/Rsp5p family of ubiquitin-protein ligases. *J Membr Biol* 176: 1-17.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis (Herausgeber) (1989). Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977). DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Nucleic Acids Res* 23: 1481-1486.

Sankaran VG, Klein DE, Sachdeva MM, Lemmon MA (2001). High-affinity binding of a FYVE domain to phosphatidylinositol 3-phosphate requires intact phospholipid but not FYVE domain oligomerization. *Biochemistry* 40: 8581-8587.

Sato TK, Darsow T, Emr SD (1998). Vam7p, a SNAP-25-like molecule, and Vam3p, a syntaxin homolog, function together in yeast vacuolar protein trafficking. *Mol Cell Biol* 18: 5308-5319.

Sato TK, Rehling P, Peterson MR, Emr SD (2000). Class C Vps protein complex regulates vacuolar SNARE pairing and is required for vesicle docking/fusion. *Mol Cell* 6: 661-671.

Schu PV, Takegawa K, Fry MJ, Stack JH, Waterfield MD, Emr SD (1993). Phosphatidylinositol 3-Kinase Encoded by Yeast *VPS34* Gene Essential for Protein Sorting. *Science* 260: 88-91.

Seaman MNJ, Marcusson EG, Cereghino JL, Emr SD (1997). Endosome to Golgi retrieval of the vacuolar protein sorting receptor, Vps10p, requires the function of the *VPS29*, *VPS30*, and *VPS35* gene products. *J Cell Biol* 137: 79-92.

Sharkey LL, McNemar MD, Saporito-Irwin SM, Sypherd PS, Fonzi WA (1999). *HWP1* functions in the morphological development of *Candida albicans* downstream of *EFG1*, *TUP1*, and *RBF1*. *J Bacteriol* 181: 5273-9.

Shepherd PR, Withers DJ, Siddle K (1998). Phosphoinositide 3-kinase: the key switch mechanism in insulin signalling. *Biochem J* 333: 471-490.

Shieh HL, Chen Y, Brown CR, Chiang HL (2001). Biochemical analysis of fructose-1,6-bisphosphatase import into vacuole import and degradation vesicles reveals a role of *UBC1* in vesicle biogenesis. *J Biol Chem* 276: 10398-10406.

Shikegawa K, Dower WJ (1988). Electroporation of eucaryotes and prokaryotes: A general approach to the introduction of macromolecules into cells. *BioTechniques* 6 : 742-751.

Simonsen A, Wurmser A.E, Emr SD, Stenmark H (2001). The role of phosphoinositides in membrane transport. *Curr Opin Cell Biol* 13: 485-492.

Singer-Kruger B, Nemoto Y, Daniell L, Ferro-Novick S, De Camilli P (1998). TRAPP, a highly conserved novel complex on the cis-Golgi that mediates vesicle docking and fusion. *EMBO J* 17 : 2494–2503.

Sollner T, Whiteheart SW, Brunner M, Erdjument-Bromage H, Geromanos S, Tempst P, Rothman JE (1993). SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature* 362: 318–324.

Sonneborn A, Bockmühl DP, Ernst JF (1999). Chlamydospore formation in *Candida albicans* requires the Efg1p morphogenetic regulator. *Infect Immun* 67: 5514-5517.

Sonneborn A, Bockmühl DP, Gerads M, Kurpanek K, Sanglard S Ernst JF (2000). Protein kinase A encoded by *TPK2* regulates dimorphism of *Candida albicans*. *Mol Microbiol* 35: 386-396.

Sonneborn A, Tebarth B, Ernst JF (1999). Control of white-opaque phenotypic switching in *Candida albicans* by the Efg1p morphogenetic regulator. *Infect Immun* 67: 4655-4660.

Soong TW, Yong TF, Ramanan N, Wang Y (2000). The *Candida albicans* antiporter gene *CNH1* has a role in Na⁺ and H⁺ transport, salt tolerance, and morphogenesis. *Microbiol* 146: 1035-1044.

Sorkin A (2000). The endocytosis machinery. *J Cell Sci* 113: 4375–4376.

Staab JF, Bradway SD, Fidel PL, Sundstrom P (1999). Adhesive and mammalian transglutaminase substrate properties of *Candida albicans* Hwp1p. *Science* 283: 1535-1538.

Stack JH, Emr SD (1994). Vps34p required for yeast vacuolar protein sorting is a multiple specificity kinase that exhibits both protein kinase and phosphatidylinositol-specific PI 3-kinase Activities. *J Cell Biol* 269: 31552-31562.

Stack JH, DeWald DB, Takegawa K, Emr SD (1995). Vesicle-mediated protein transport: regulatory interactions between the Vps15 protein kinase and the Vps34 PtdIns 3-kinase essential for protein sorting to the vacuole in yeast. *J Cell Biol* 129: 321-334.

Stack JH, Herman PK, Schu PV, Emr SD (1993). A membrane-associated complex containing the Vps15 protein kinase and the Vps34 PI 3-kinase is essential for protein sorting to the yeast lysosome-like vacuole. *EMBO J* 12: 2195-2204.

Stahelin RV, Long F, Diraviyam K, Bruzik KS, Murray D, Cho W (2002). Phosphatidylinositol 3-phosphate induces the membrane penetration of the FYVE domains of Vps27p and Hrs. *J Biol Chem* 277: 26379-26388.

Stepp JD, Huang K, Lemmon SK (1997). The yeast adaptor protein complex, AP-3, is essential for the efficient delivery of alkaline phosphatase by the alternate pathway to the vacuole. *J Cell Biol* 139: 1761-1774.

Stevens TH, Forgac M (1997). Structure, function and regulation of the vacuolar (H⁺)-ATPase. *Annu Rev Cell Dev Biol* 13: 779-808.

Stold VR, Sonneborn A, Leuker C, Ernst JF (1997). Efg1, an essential regulator of morphogenesis of the human pathogen *Candida albicans*, is a member of a conserved class of bHLH proteins regulating morphogenetic processes in fungi. *EMBO J* 16: 1982-1991.

Stone S, Sacher M, Mao Y, Carr C, Lyons P, Quinn AM, Ferro-Novick S (1997). Bet1p activates the v-SNARE Bos1p. *Mol Biol Cell* 8: 1175-1181.

Stoyanova S, Bulgarelli-Leva G, Kirsch C, Hanck T, Klinger R, Wetzker R, Wymann MP (1997). Lipid kinase and protein kinase activities of G-protein-coupled phosphoinositide 3-kinase: structure-activity analysis and interactions with wortmannin. *Biochem J* 324: 489-495.

Suriapranata I, Epple UD, Bernreuther D, Bredschneider M, Sovarasteanu K, Thumm M (2000). The breakdown of autophagic vesicles inside the vacuole depends on Aut4p. *J Cell Sci* 113: 4025-4033.

Tall GG, Hama H, DeWald DB, Horazdovsky BF (1999). The phosphatidylinositol 3-phosphate binding protein Vac1p interacts with a Rab GTPase and Sec1p homologue to facilitate vesicle-mediated vacuolar protein sorting. *Mol Cell Biol* 10: 1873-1889.

Theiss S, Kretschmar M, Nichterlein T, Hof H, Agabian N, Hacker J, Kohler GA (2002). Functional analysis of a vacuolar ABC transporter in wild-type *Candida albicans* reveals its involvement in virulence. *Mol Microbiol* 43: 571-84

Tomashek JJ, Sonnenburg JL, Artimovich JM, Klionsky DJ (1996). Resolution of subunit interactions and cytoplasmic subcomplexes of the yeast vacuolar proton-translocating ATPase. *J Biol Chem* 271: 10397-404.

Vanhaesebroeck B, Higashi K, Raven C, Welham M, Anderson S, Brennan P, Ward SG, Waterfield MD (1999). Autophosphorylation of p110 δ phosphoinositide 3-kinase: a new paradigm for the regulation of lipid kinases in vitro and in vivo. *EMBO J* 18: 1292-1302.

Vanhaesebroeck B, Welham MJ, Kotani K, Stein R, Warne PH, Zvelebil MJ, Higashi K, Volinia S, Downward J, Waterfield M (1997). P110 δ , a novel phosphoinositide 3-kinase in leucocytes. *Proc Natl Acad Sci* 94: 4330-4335.

Vida TA, Emr SD (1995). A new vital stain for visualizing vacuolar membrane dynamics and endozytosis in yeast. *J Cell Biol* 128: 779-792.

Vincent O, Rainbow L, Tilburn J, Arst HN, Penalva MA (2003). YPXL/I is a protein interaction motif recognized by aspergillus PalA and its human homologue, AIP1/Alix. *Mol Cell Biol* 23: 1647-1655.

Walker EH, Perisic O, Ried C, Stephens L, Williams RL (1999). Structural insights into phosphoinositide 3-kinase catalysis and signalling. *Nature* 402: 313-320.

Walsh JP, Caldwell KK, Majerus PW (1991). Formation of phosphatidylinositol 3-phosphate by isomerization from phosphatidylinositol 4-phosphate. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 9184-9187.

Wang W, Sacher M, Ferro-Novick S (2000). TRAPP stimulates guanine nucleotide exchange on Ypt1p. *J Cell Biol* 151: 289-296.

Weber T, Zemelmann B, McNew JA, Westermann B, Gmachl M, Parlati F, Sollner TH, Rothman JE (1998). SNAREpins: Minimal machinery for membrane fusion. *Cell* 92: 759-772.

Weissmann Z, Berdicevsky I, Cavari BZ, Kornitzer D (2000). The high copper tolerance of *Candida albicans* is mediated by a P-type ATPase. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 3520-3552.

Wieland J, Nitsche AM, Strayle J, Steiner H, Rudolph HK (1995). The *PMR2* gene cluster encodes functionally distinct isoforms of a putative Na⁺ pump in the yeast plasma membrane. *EMBO J* 14: 3870-3882.

Wright WL, Wenzel RP (1997). Nosocomial *Candida*. Epidemiology, transmission, and prevention. *Infect Dis Clin North Am* 11(2):411-25. Review.

Wurmser AE, Emr SD (1998). Phosphoinositide signaling and turnover: PI(3)P, a regulator of membrane traffic, is transported to the vacuole and degraded by a process that requires luminal vacuolar hydrolase activities. *EMBO J* 17: 4930-4942.

Wurmser AE, Sato TK, Emr SD (2000). New component of the vacuolar class C-Vps complex couples nucleotide exchange on the Ypt7 GTPase to SNARE-dependent docking and fusion. *J Cell Biol* 151: 551–562.

Wymann MP, Bulgarelli-Leva G, Zvelebil MJ, Pirola L, Vanhaesebroeck B, Waterfield MD, Panayotou G (1996). Wortmannin inactivates phosphoinositide 3-kinase by covalent modification of Lys-802, a residue involved in the phosphate transfer reaction. *Mol Cell Biol* 16: 1722-33.

Wymann MP, Pirola L (1998). Structure and function of phosphoinositide 3-kinases. *Biochim Biophys Acta* 1436: 127-150.

Xu W, Mitchel AP (2001). Yeast PalA/Alix homolog Rim20p associates with a PEST-like region and is required for its proteolytic cleavage. *J Bacteriol* 183: 6917-6923.

Xu W, Smith FJ, Subaran R, Mitchell AP (2004). Multivesicular body-ESCRT components function in pH responses regulation in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans*. *Mol Biol Cell* vorläufige elektronische Publication.

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

Zerial M, McBride H (2001). Rab proteins as membrane organizers. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2: 107-17.

Zvelebil MJ, MacDougall L, Leervers S, Volinia S, Vanhaesebroeck B, Gout I, Panayotou G, Domin J, Stein R, Koga H, Salim K, Linacre J, Das P, Panaretou C, Wetzker R, Waterfield M (1995). Structural and functional diversity of phosphoinositide 3-kinases. *Phil Trans R Soc Lond B* 351: 217-223.

Eigene Publikationen:

1. **Günther J**, Nguyen M, Härtel A, Künkel W, Zipfel PF, Eck R (2005). Generation and functional *in vivo* characterization of a lipidkinase defective phosphatidylinositol 3-kinase Vps34p of *Candida albicans*. *Microbiology* 151: 81-89.
2. Kitanovic A, Nguyen M, Vogl G, Hartmann A, **Günther J**, Würtzner R, Künkel W, Wöfl S, Eck R (2005). Phosphatidylinositol 3-kinase *VPS34* of *Candida albicans* is involved in filamentous growth, secretion of aspartic proteases, and intracellular detoxification. *FEMS Yeast Research*, 5: 431-9.
3. Eck E, Nguyen M, **Günther J**, Künkel W, Zipfel PF (2005). Phosphatidylinositol 3-kinase Vps34p of the human pathogenetic yeast *Candida albicans* is a multifunctional protein that interacts with the putative vacuolar H⁺-ATPase subunit Vma7p. *Intern J of Med Microb*, 295: 57-66.
4. Poltermann S, Nguyen M, **Günther J**, Wendland J, Härtel A, Künkel W, Zipfel PF, Eck R (2005). The putative vacuolar ATPase subunit Vma7p of *Candida albicans* is involved in vacuole acidification, hyphal development, and virulence. *Microbiology*, 151: 1645-55.

Vorträge/Poster:

5-7.12.2002, Members meeting SFB 604, Jena. „Characterisation of the physiological role of enzymatic activities of Vps34p in *Candida albicans*.“ (Vortrag)

14-15.2.2003, DGHM FG Eukaryote Infektionserreger, Statusworkshop 2003, Institut für Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene Erlangen.

3-5.09.2003, 6th VAAM-Tagung Molekularbiologie der Pilze, Georg-August Universität Göttingen. „Characterisation of the physiological role of enzymatic activities of Vps34p in *Candida albicans*.“ (Poster)

25-27.09.2003, CellSignals Jena '03, Signaling complexes, 1st Meeting of the Joint Research Centers SFB 604 and GK 768, Jena. „Characterisation of the physiological role of enzymatic activities of Vps34p in *Candida albicans*.“ (Poster)

6.-8.11.2003, 1st Joint Workshop of the SFB 495 and SFB 604, Freudenstadt-Lauterbad. „Characterisation of the physiological role of enzymatic activities of Vps34p in *Candida albicans*.“ (Poster)

26-27.2.2004, DGHM-ÖGHM Statusworkshop Eukaryote Infektionserreger, Innsbruck. „Charakterisierung der physiologischen Rolle der enzymatischen Aktivitäten von Vps34p in *Candida albicans*.“ (Vortrag)

18-22.03.2004, 7th American Society for Microbiology Conference *Candida* and Candidiasis, Austin/Texas. „Enzymatic activities of the multifunctional phosphatidylinositol 3-kinase CaVps34p influence stress response and virulence of *Candida albicans*.“ (Poster)

25-26.02.2005, DGHM FG Eukaryote Infektionserreger, Statusworkshop 2005, Jena. „Generierung und *in vivo* Charakterisierung einer Lipidkinase-defekten Phosphatidylinositol 3-Kinase Vps34p von *Candida albicans*.“ (Vortrag)

Abkürzungsverzeichnis

Aqua dest.	destilliertes Wasser
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumine)
bp	Basenpaare
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
ddATP	2', 3'-Didesoxyadenosintriphosphat
ddCTP	2', 3'-Didesoxycytosintriphosphat
ddGTP	2', 3'-Didesoxyguanosintriphosphat
ddTTP	2', 3'-Didesoxythymidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FCS	Fötales Kälberserum
HEPES	N-2-hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HisTag	Polyhistidinpeptid (6x Histidin)
IPTG	1-Isopropyl- β -D-1-thiogalactopyranosid
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von $\lambda=600$
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PI	Phosphatidylinositol
PI 3-P	Phosphatidylinositol 3-Phosphat
PMSF	Phenylmethylsulfonyl Fluorid
PtdIns	Phosphatidylinositol

PtdIns 3-P	Phosphatidylinositol 3-Phosphat
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)aminoethan
U	Einheit (Unit)
ÜN	Über Nacht

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Abteilung Infektionsbiologie des Leibniz-Instituts für Naturstoff-Forschung und Infektionsbiologie e.V. - Hans-Knöll-Institut - angefertigt. Sie ist Teil des Teilprojekts B1 „Multiple Funktionen der Phosphatidylinositol 3-Kinase Vps34p der humanpathogenen Hefe *Candida albicans*“ des SFB's 604 „Multifunktionelle Signalproteine“. Die Förderung erfolgte durch die DFG im Rahmen des SFB's 604.

Herrn Prof. Dr. P.F. Zipfel möchte ich für seine Bereitschaft, meine Arbeit zu unterstützen und die Betreuung zu übernehmen, danken.

Meinen besonderen Dank möchte ich Dr. R. Eck für die Betreuung und Unterstützung aussprechen.

Ein herzliches Dankeschön gilt Monika Nguyen für die Unterstützung bei technischen Fragen sowie die freundliche Arbeitsatmosphäre. Herrn Dr. A. Härtl aus der Arbeitsgruppe Wirkstoffprüfung des HKI und seine Assistentinnen Frau Frais, Frau Stöckel und Frau Weber bin ich für die Durchführung der Tierversuche zu Dank verpflichtet.

In meinen Dank möchte ich meine Eltern einschließen, die mich auf meinem Weg immer unterstützt haben.

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst und keine anderen Quellen und Hilfsmittel als die angegebenen benutzt habe. Alle Stellen im Text, die anderen Werken im Wortlaut oder sinngemäß entnommen sind, wurden als Entlehnung kenntlich gemacht. Gleiches gilt für alle beigegebenen Abbildungen, Tabellen und Anlagen.

Jena, 2.03.2005

Juliane Günther

Lebenslauf

Name: Juliane Günther
Wohnort: Hermann Pistor Straße 43
07745 Jena
geb. am: 24.02.1977
geb. in: Dresden
Familienstand: ledig

Schulbildung:
1983-1991 Comenius Schule Mücka
1991-1995 Gymnasium Niesky

Studium:
1995-2001 Studium der Biologie an der Friedrich-Schiller-Universität Jena
Diplomarbeit am Hans-Knöll-Institut für Naturstoff-Forschung e.V.
Thema „ Analyse von Struktur-Funktions-Beziehungen der
Phosphatidylinositol 3-Kinase Vps34p aus *Candida albicans*“
Betreuer: Prof. Dr. E. Kothe, Dr. Raimund Eck
09.08.2001 Hochschulabschluss (Diplom-Biologin) an der FSU Jena

Berufspraxis:
08/2001-12/2001 wissenschaftliche Mitarbeiterin im Industrieprojekt „Hochdurchsatz-
Screening-Methoden zur Identifizierung und Optimierung von
Proteininteraktionen“
im Hans-Knöll-Institut für Naturstoff-Forschung e.V. Jena, Abteilung
Infektionsbiologie

01/2002-03/2005 Doktorandin im DFG-Projekt „Multiple Funktionen der
Phosphatidylinositol 3-Kinase Vps34p der humanpathogenen Hefe
Candida albicans“, (Teilprojekt der SFB Initiative „Multifunktionelle
Signalproteine“)
im Leibniz-Institut für Naturstoff-Forschung und Infektionsbiologie e.V.
- Hans-Knöll-Institut - Jena, Abteilung Infektionsbiologie