

**Untersuchungen zum Fettsäure- und
Propionatmetabolismus in *Candida albicans***

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

durchgeführt am
Leibniz-Institut für Naturstoff-Forschung und Infektionsbiologie e.V.
Hans-Knöll-Institut, Jena

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

von

Diplom-Biologe Christian Otzen
geboren am 21.11.1978 in Kiel

1. Gutachter:

2. Gutachter:

3. Gutachter:

Datum der öffentlichen Verteidigung:.....

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	i
Abkürzungsverzeichnis	iv
1 Zusammenfassung	1
2 Abstract	3
3 Einleitung.....	5
3.1 Hefen.....	5
3.2 <i>Candida albicans</i> : Ein opportunistischer Krankheitserreger	5
3.3 <i>Candida albicans</i> : Morphologie	7
3.3.1 Hefen, Hyphen und Pseudohyphen	7
3.3.2 Weiße Zellen und Opaque-Zellen	7
3.3.3 Biofilme	8
3.3.4 Die Regulation der Morphologie durch wirtsabhängige Faktoren und Quorum Sensing.....	8
3.4 Allgemeine Virulenzfaktoren von <i>C. albicans</i>	9
3.5 Allgemeine Funktionen des Metabolismus	10
3.6 Die Bedeutung des Metabolismus für den Kommensalismus und die Virulenz von <i>C. albicans</i>	11
3.7 Verbindungen zwischen Morphologie, Metabolismus und Virulenz.....	12
3.8 Physiologische und regulatorische Unterschiede der Glucose-Assimilation von <i>C. albicans</i> und <i>S. cerevisiae</i>	14
3.9 Physiologische und regulatorische Unterschiede der Assimilation alternativer Kohlenstoffquellen von <i>C. albicans</i> und <i>S. cerevisiae</i>	15
3.10 Propionat.....	17
3.11 Die intrazelluläre Bildung von Propionyl-CoA.....	19
3.11.1 Die Bildung von Propionyl-CoA während des Aminosäurekatabolismus	19

3.11.2	Die Bildung von Propionyl-CoA während des Fettsäurekatabolismus	22
3.12	Verschiedene Möglichkeiten des Propionyl-CoA-Abbaus	24
3.12.1	Der Methylmalonyl-CoA-Weg	24
3.12.2	Der Methylcitratzyklus.....	25
3.12.3	Die modifizierte β -Oxidation.....	26
4	Zielsetzung	28
5	Publikationsliste.....	29
5.1	Publikation A	29
	Phylogenetic and phenotypic characterisation of the 3-ketoacyl-CoA thiolase gene family from the opportunistic human pathogenic fungus <i>Candida albicans</i>	29
5.2	Publikation B	30
	<i>Candida albicans</i> Utilizes a Modified β -Oxidation Pathway for the Degradation of Toxic Propionyl-CoA.....	30
6	Publikation A	31
	Phylogenetic and phenotypic characterisation of the 3-ketoacyl-CoA thiolase gene family from the opportunistic human pathogenic fungus <i>Candida albicans</i>	31
7	Publikation B	51
	<i>Candida albicans</i> Utilizes a Modified β -Oxidation Pathway for the Degradation of Toxic Propionyl-CoA.....	51
8	Diskussion	76
8.1	Unterschiede des Propionatkatabolismus von <i>S. cerevisiae</i> und <i>C. albicans</i>	76
8.2	Effekte der Kohlenstoffquellen Propionat und Valerat auf das Wachstum von <i>C. albicans</i>	78
8.3	Potentielle Auswirkungen einer peroxisomalen Akkumulation von Propionyl-CoA auf den Metabolismus und die Virulenz von <i>C. albicans</i>	80
8.4	CaOsm2p verbindet den Propionatmetabolismus mit Prozessen der anaeroben Respiration.....	82

8.5 Der ungeklärte Mechanismus der Acetyl-CoA-Translokation aus den Mitochondrien	84
8.6 <i>C. albicans</i> vermeidet die Bildung von Propionyl-CoA während des Aminosäurekatabolismus	86
8.7 Propionat aktiviert möglicherweise Regulatoren des Kohlenstoff- und Aminosäuremetabolismus.....	89
8.8 Die Aldehyd-Dehydrogenasen CaAld5p und CaAld6p haben neue und zusätzliche metabolische Funktionen	90
8.9 Die Relevanz der modifizierten β -Oxidation für die kommensale und für die pathogene Lebensweise von <i>C. albicans</i>	93
9 Zusammenfassung und Ausblick.....	96
Bibliographie	99
Wissenschaftliche Leistungen	118
Danksagung	121
Eigenständigkeitserklärung.....	122
Anhang	123
Beschreibung zusätzlich angewandter Materialien und Methoden	123
Herstellung zusätzlicher <i>C. albicans</i> -Deletionsstämme	123
Zusätzliche Wachstumsversuche auf Fest- und in Flüssigmedien.	123
Transkriptom-Analyse zur Untersuchung der differentiellen Genregulation in <i>C. albicans</i> in Abhängigkeit verschiedener Kohlenstoffquellen	123
Synthese des 3-Isopropylmalat-mono-Methylesters.....	124
Liste zusätzlich verwendeter Primer.....	125

Abkürzungsverzeichnis

ATP	Adenosintriphosphat	pH	pH-Wert
Bp	Basenpaar	pK-Wert	pH-Wert bei dem Säure und Base in gleicher Menge vorliegen
°C	Grad Celsius		
cAMP	Zyklisches Adenosinmono-Phosphaat	Ras	„Rat sarcoma“, G-Protein
CMM	Candida Minimal Medium	rpm	Umdrehungen pro Minute
CoA	Coenzym A	YPD	Hefe-Pepton-Glukose-Medium
2D	Zwei-dimensional		
cDNA	komplementäre DNA		
Δ	Deletion		
DNA	Desoxiribonukleinsäure		
et al	et alii (und andere)		
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid		
FMN	Flavin-mono-Nukleotid		
GCN	„General Control non-Derepressable“		
GCMS	Gas Chromatography Mass Spectrometry		
HPLC	„High Pressure Liquid Chromatography“		
M	Molar		
MAP	Mitogen-aktiviertes Protein		
Mbp	Megabasenpaare		
NAD	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid		
NMR	Nuclear Magnetic Resonance		
OD	optische Dichte		

1 Zusammenfassung

Die vorliegende Dissertationsschrift behandelt gemeinsame und voneinander verschiedene Aspekte von Fettsäure- und Propionatkatabolismus des opportunistisch humanpathogenen Hefepilzes *Candida albicans*. Im letzten Schritt der peroxisomalen β -Oxidation katalysieren 3-Ketoacyl-CoA-Thiolasen die Verkürzung von Fettsäuren durch Abspaltung von Acetyl-CoA. Mittels einer phänotypischen Charakterisierung von Gendelektionsmutanten der drei putativen 3-Ketoacyl-CoA-Thiolasen von *C. albicans* (*CaPOT1*, *CaFOX3*, *CaPOT13*) wurde deren individueller Beitrag zur β -Oxidation untersucht. Den Ergebnissen zufolge ist das Gen *CaPOT1* essentiell für die Verwertung von gesättigten und ungesättigten Fettsäuren. Dem Gen des putativen Isoenzym *CaFOX3* wurde eine unterstützende Funktion des Fettsäurekatabolismus bei höheren Temperaturen zugeschrieben. Für *CaPOT13* konnte keine essentielle Funktion für den Metabolismus dargestellt werden. Eine phylogenetische Analyse unter Einbeziehung von 3-Ketoacyl-CoA-Thiolasen anderer filamentöser Pilze legte die Vermutung nahe, dass *CaPOT13* möglicherweise ein evolutionäres Relikt darstellt und früher an einem mitochondrialen Stoffwechselweg zur Fettsäureoxidation beteiligt war. Ein Vergleich der Verwertungsspektren von Fettsäuren zeigte Spezies-spezifische Unterschiede zwischen *C. albicans* und dem opportunistisch humanpathogenen filamentösen Ascomyceten *Aspergillus fumigatus*. Während kein Wachstum von *C. albicans* auf Octan-, Dodecan-, Laurin-, Linol- oder Linolensäure möglich ist und Hexan, Myristin-, Palmitin- und Stearinsäure nur eine geringe Wachstumsrate zuließen, konnte *A. fumigatus*, mit Ausnahme von Octan- und Dodecansäure, sämtliche dieser Fettsäuren mit ähnlicher Effizienz zum Wachstum nutzen. Der Hauptteil dieser Arbeit bestand in der Untersuchung der modifizierten β -Oxidation bei *C. albicans*. Dieser Stoffwechselweg dient dem Abbau von toxischem Propionyl-CoA und verbindet Enzyme der peroxisomalen β -Oxidation mit spezifischen mitochondrialen Enzymen. Damit wurde die Existenz eines dritten Abbauweges für Propionyl-CoA, neben dem Methylcitratzyklus und dem Methylmalonyl-CoA-Weg, bestätigt. Die Identifizierung dieses Stoffwechselweges gelang mit Hilfe einer Kombination von Proteomanalysen, *in silico*-Sequenzvergleichen von Enzymen, der Charakterisierung von Gendelektionsmutanten sowie GFP-Reporterstämmen und chromatographischen

Methoden. Zusätzlich konnte die erste eukaryotische 3-Hydroxy-Propionyl-CoA-Dehydrogenase (CaHpd1p) *in vitro* charakterisiert werden. Die modifizierte β -Oxidation beginnt mit der Umwandlung von Propionyl-CoA in Acrylyl-CoA, welches unter Mitwirkung von CaFox2p, einem Enzym der peroxisomalen β -Oxidation, in 3-Hydroxypropionyl-CoA umgewandelt wird. 3-Hydroxypropionyl-CoA wird anschließend in die Mitochondrien überführt und der CoA-Ester durch die putative Acyl-CoA-Hydrolase CaEhd3p hydrolysiert. Dadurch entstehendes 3-Hydroxypropionat wird durch die 3-Hydroxypropionat-Dehydrogenase CaHpd1p erst zum Malonatsemialdehyd oxidiert und dieses durch die putative Aldehyd-Dehydrogenase CaAld6p in Acetyl-CoA und CO₂ gespalten. Die Unterbrechung der modifizierten β -Oxidation durch eine *CaHPD1*-Deletion resultierte in einer signifikanten Verminderung der Virulenz von *C. albicans* im murinen Infektionsmodell für disseminierte Candidiasis. Daher ist anzunehmen, dass der Abbau von Propionyl-CoA eine wichtige Funktion zur Etablierung systemischer Infektionen mit diesem Pilz darstellt. Im Hinblick auf neuere Untersuchungen zur kommensalen Lebensweise von *C. albicans* könnte der modifizierten β -Oxidation auch in dieser Hinsicht eine besondere Rolle zukommen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit spezifizieren die Funktionen dreier putativer Isoenzyme der peroxisomalen β -Oxidation und beschreiben mit der modifizierten β -Oxidation eine physiologische Besonderheit des opportunistischen Krankheitserregers *C. albicans*. Im Hinblick auf die Ergebnisse anderer Autoren eröffnen diese Aspekte neue Perspektiven für die zukünftige Erforschung der Virulenz und des Kommensalismus von *C. albicans*.

2 Abstract

This doctoral thesis deals with the elucidation of different aspects of fatty acid and propionate metabolism of the opportunistic humanpathogenic yeast *C. albicans*.

Acyl-CoA-thiolases catalyse the last reaction of the peroxisomal β -oxidation, which is the generation of acetyl-CoA by the sequential cleavage of C2-units from oxidised fatty acids. A phenotypic characterisation of deletion mutants of the 3-ketoacyl-CoA thiolases from *C. albicans* (*CaPOT1*, *CaFOX3*, *CaPOT13*) were characterised by growth analyses at incubation temperatures of 30°C and 37°C. The results showed that *CaPOT1* is the keto-thiolase that is essential for the growth of *C. albicans*, in case fatty acids are the only available carbon source. In contrast, a deletion of *CaFOX3* affects growth mainly at elevated temperatures. Therefore, *CaFOX3* was assigned as supportive for β -Oxidation at higher incubation temperatures. Deletion of *CaPOT13* revealed no growth defects. Phylogenetic analysis of the 3-keto-acyl-CoA thiolase family implicated that *CaPOT13* might depict a relict from an ancestral mitochondrial β -Oxidation. Therefore, *CaPOT13* could be regarded as a DNA fossil. A comparative study of the usage of fatty acids showed that *C. albicans* does not grow on octanic, dodecanic, lauric, linolic or linolenic acid. Furthermore, only low growth rates were observed with hexanoic, myristic, palmitic or stearic acid. In contrast, *Aspergillus fumigatus*, a filamentous opportunistic humanpathogenic ascomycete, was able to use all fatty acids except octanic and dodecanic acid. Besides studying keto-thiolases, the main focus of this work was the elucidation of a putative degradation pathway for toxic propionyl-CoA. This study identified the first described eukaryotic 3-hydroxypropionate dehydrogenase *CaHpd1p*, which plays a crucial role in a modified β -oxidation for the degradation of propionyl-CoA in *C. albicans*. This modified β -oxidation comprises enzymes of the peroxisomal β -oxidation as well as specific mitochondrial enzymes. Thus, besides the methylcitrate cycle and the methylmalonyl-CoA pathway the existence of a third pathway for propionyl-CoA degradation was confirmed. In order to identify the enzymes of this degradation pathway, a combination of 2D-proteom analysis and *in silico* sequence analysis was applied. Genes of candidate enzymes were deleted and the resulting mutants were characterised by various growth assays. The modified β -Oxidation starts with the transformation of propionyl-CoA to acrylyl-CoA and subsequently to 3-

hydroxypropionyl-CoA by enzymes of the peroxisomal β -oxidation, including CaFox2p. 3-Hydroxypropionyl-CoA is transported into mitochondria where the CoA-ester is hydrolysed by the putative hydrolase CaEhd3p, thereby yielding 3-hydroxypropionate. This compound is converted to malonyl semialdehyde by the 3-hydroxypropionate dehydrogenase CaHpd1p and subsequently oxidised to Acetyl-CoA and CO₂ by the putative aldehyde dehydrogenase CaAld6p. The mitochondrial localisation of CaEhd3p and CaHpd1p was confirmed by GFP-reporter strains. The accumulation of 3-hydroxy propionate in a *CaHPD1* Δ deletion strain was detected by the combined use of HPLC-, GCMS and NMR-techniques and confirmed the metabolic origin of 3-hydroxypropionate from propionate. A biochemical characterisation of the enzyme additionally supported the role of CaHpd1p in the degradation of propionyl-CoA. Finally, the modified β -oxidation was shown to contribute to the virulence of *C. albicans* in an infection model of disseminated candidiasis.

In summary, the results from this study specify the functional role of three putative isoenzymes of fatty acid β -oxidation and confirm the existence of a modified β -oxidation for propionyl-CoA degradation in *C. albicans*. Both aspects provide substantial contributions to the understanding of the physiology of *C. albicans*. In regard to previous results by other authors, these aspects provide new perspectives for future research on commensalism and virulence of this opportunistic pathogen.

3 Einleitung

3.1 Hefen

Die Bezeichnung „Hefen“ schließt verschiedene Organismen der Domäne der Fungi (Pilze) ein, nämlich aus den Phyla der Basidiomyceten (Ständerpilze), der Zygomyceten (Jochpilze) und der Ascomyceten (Schlauchpilze). Letzteres enthält die Ordnung der Saccharomyceten, der „Echte Hefen“, mit etwa 1000 Spezies. Saccharomyceten sind eukaryotische Organismen und leben als Saprophyten oder Parasiten in enger Verbindung zu Pflanzen, Tieren und Menschen. Es sind einzellige Lebewesen von runder bis ovaler Form, mit einem Durchmesser von 4 – 10 µm. Ihre Vermehrung geschieht vornehmlich auf vegetativem Weg durch Knospung. Dabei entwickelt sich nach der mitotischen Teilung des Zellkerns eine Knospe an der Zellwand der Mutterzelle (Forst & Prillinger, 1988; Kutzman, 2011; Weber, 1993). Der zweite Zellkern wandert in diese ein, worauf die Knospe auf die Größe der Mutterzelle heranwächst. Schließlich wird die Knospe durch ein Septum von der Mutterzelle getrennt. Einige Saccharomyceten bilden unter Umständen Hyphen und können ausgeprägte Mycelien entwickeln (Manning & Mitchell, 1980). Das Vorkommen und die Art der sexuellen Fortpflanzung wurde bisher nicht für alle Vertreter der Saccharomyceten beschrieben. Es gibt jedoch Beispiele für sexuelle (*Saccharomyces cerevisiae*) und parasexuelle (*Candida albicans*) Fortpflanzung (Alby, Schaefer, & Bennett, 2009; Bennett & Johnson, 2003; Haber, 2012; Hull & Johnson, 1999). Unter den Saccharomyceten findet sich mit *Saccharomyces cerevisiae* („Bäckerhefe“), der bisher am besten erforschte Eukaryot. Dessen Genom wurde 1996 als erstes eukaryotisches Genom überhaupt vollständig sequenziert und er zählt zu den wichtigsten Modellorganismen der Wissenschaft (Goffeau *et al.*, 1996; Ostergaard, Olsson, & Nielsen, 2000). Außerdem dient *S. cerevisiae* einer breiten industriellen Verwendung, vor allem zur Herstellung von Lebensmitteln (Suh, Blackwell, Kurtzman, & Lachance, 2006).

3.2 *Candida albicans*: Ein opportunistischer Krankheitserreger

Neben *S. cerevisiae* ist *C. albicans* ein wichtiger Vertreter der Saccharomyceten. Gemeinsam mit seinen nächsten Verwandten bildet *C. albicans* eine spezielle Gruppe, die CUG-Klade. Bezeichnend für alle Mitglieder dieser Klade ist, dass bei

ihnen das CUG-Codon als Serin anstelle von Leucin translatiert wird. Die CUG-Klade ist in eine haploide und eine diploide Subklade unterteilt. Zur diploiden Subklade gehören *Candida albicans*, *Candida dubliniensis*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* und *Lodderomyces elongisporus*. Zur haploiden Subklade zählen *Candida guilliermondii*, *Debaryomyces hansenii* und *Candida lusitanae* (Butler *et al.*, 2009). Das Genom von *C. albicans* wurde vollständig sequenziert und in enger Anlehnung an das *S. cerevisiae*-Genom vorläufig annotiert. Es besteht aus 8 Chromosomenpaaren mit einer haploiden Gesamtgröße von ca. 16 Mbp (Chibana *et al.*, 2005; Jones *et al.*, 2004). Als Kommensale kann dieser Pilz bei 70-90 % der Menschen als Teil der mikrobiellen Flora des gastrointestinalen Trakts, im urogenitalen Trakt und in geringer Keimzahl auf der Haut nachgewiesen werden. Allerdings verursacht *C. albicans* unter Umständen auch oberflächliche Infektionen der urogenitalen und gastrointestinalen Schleimhäute und lebensbedrohliche systemische Infektionen. Im Verlauf solcher Infektionen können schließlich alle inneren Organe des Patienten besiedelt werden. Oft münden diese Infektionen in eine Sepsis und enden mit dem Tod des Patienten (Delaloye & Calandra, 2014). Zur Risikogruppe für solche Erkrankungen gehören Patienten, die aufgrund von Krankheiten wie z. B. AIDS, Leukämie oder nach Organtransplantationen, über ein geschwächtes Immunsystem verfügen oder eine immunsuppressive Therapie durchlaufen müssen. Neben älteren Menschen und Neugeborenen haben auch Patienten unter intensivmedizinischer Versorgung ein erhöhtes Risiko an einer Pilzinfektion zu erkranken (Aliaga *et al.*, 2014; Ampel, 1996; Agvald-Ohman, C.; Klingspor, H. Hjelmqvist, and C. Edlund. 2008; Bille, Marchetti, & Calandra, 2005; Muskett *et al.*, 2011). Mit einem Anteil von 9% an nosokomialen Blutinfektionen ist *C. albicans* diesbezüglich der vierthäufigste Erreger, verbunden mit einer hohen Mortalitätsrate von ca. 40% (Wisplinghoff *et al.*, 2004; Wisplinghoff *et al.*, 2014). Neben *C. albicans* werden auch andere Vertreter der Gattung *Candida* immer häufiger als Erreger von nosokomialen Infektionen identifiziert. Dabei handelt es sich vor allem um *C. glabrata*, aber auch um zwei Mitglieder der CUG-Klade, nämlich *C. parapsilosis* und *C. tropicalis* (Kullberg & Oude Lashof, 2002; Pfaller & Diekema, 2004; Wisplinghoff *et al.*, 2014). Die Zunahme lebensbedrohlicher Pilzinfektionen durch *C. albicans* und verwandten Arten basiert nicht nur auf der

steigenden Zahl immunsupprimierter Patienten, sondern auch auf der Resistenzentwicklung gegenüber einer ohnehin geringen Anzahl wirksamer Medikamente (Alexander *et al.*, 2013; Sardi, Scorzoni, Bernardi, Fusco-Almeida, & Mendes Giannini, 2013).

3.3 *Candida albicans*: Morphologie

3.3.1 Hefen, Hyphen und Pseudohyphen

C. albicans ist ein polymorpher Pilz, d.h. er kann in unterschiedlichen, reversiblen morphologischen Erscheinungsformen beobachtet werden. Diese werden grob in drei verschiedene Formen unterteilt: Hefen, Pseudohyphen und echte Hyphen (Merson-Davies & Odds, 1989; Mitchell, 1998; Odds, 1985, 1994). Als Hefen zeigen sich die Zellen in der typischen runden bis ovalen Form. Pseudohyphen entstehen durch unvollständige Zellteilungen, bei denen Tochterzellen nicht vollständig von der Mutterzelle abgeschnürt werden, bevor sie selbst neue Knospen bilden. Dadurch entstehen Zellketten, wobei die ovoide Form der darin enthaltenen Zellen unterschiedliche Längen aufweisen kann (Sudbery, 2011). Im Gegensatz zu Pseudohyphen zeigen echte Hyphen keine Verengungen an den Septen zwischen den einzelnen Zellen und besitzen parallele Zellwände. Die Länge einer Hyphenzelle übertrifft die einer Hefezelle um ein Vielfaches (Sudbery, 2001, 2011). Die Beschreibung der verschiedenen Morphologien suggeriert, dass *C. albicans* in konkreten Formen vorkommt oder abrupte Wechsel seiner Gestalt vornimmt. Nach Merson-Davies und Odds (1989) sollten die Hefeform und die Hyphenformen jedoch als extreme Ausprägungen der Morphologie betrachtet werden. Die dazwischenliegenden Formen stellen einen kontinuierlichen Übergang zwischen diesen Extremen dar. Die Bezeichnung „Pseudohyphe“ vereint daher unterschiedliche morphologische Abstufungen beim Wechsel zwischen Hefe und echter Hyphe (Merson-Davies & Odds, 1989).

3.3.2 Weiße Zellen und Opaque-Zellen

Neben dem Wechsel zwischen Hefe und Hyphe ist *C. albicans* in der Lage von der rundlich, ovalen Hefeform (Weiße Zellen) zu einem Zelltyp von ovaler, elongierter Gestalt (Opaque-Zellen) zu wechseln (Lohse & Johnson, 2009; Slutsky *et al.*, 1987). Opaque-Zellen stellen die paarungskompetente Zellform von *C. albicans* dar. Der Wechsel in den Opaque-Zustand wird von Transkriptionsfaktoren kontrolliert,

deren Gene sich in den Paarungsloci a und α befinden. Unter Laborbedingungen scheinen ausschließlich homozygote a/a - oder α/α -Zellen diesen Wechsel zu vollziehen (Hull & Johnson, 1999; Morschhauser, 2010). Ergebnisse neuerer Untersuchungen deuten jedoch an, dass heterozygote a/α -Zellen *in vivo* zur Ausprägung eines intermediären Phänotyps von Weißen Zellen und Opaque-Zellen fähig sein könnten (Pande, Chen, & Noble, 2013). Weißen Zellen und Opaque-Zellen sind gleichermaßen zum morphologischen Wechsel zwischen Hefe und Hyphe fähig. Jedoch unterliegt dieser Wechsel jeweils unterschiedlichen Regulationsmechanismen (Si, Hernday, Hirakawa, Johnson, & Bennett, 2013).

3.3.3 Biofilme

C. albicans bildet auf mukösen und synthetischen Oberflächen Biofilme. Dies sind komplexe Strukturen aus Hefe- und Hyphenzellen, eingebettet in eine Matrix aus Zellwandpolysacchariden. Die Biofilmentwicklung verläuft bei *C. albicans* in drei Stufen. Zunächst behaften einzelne Hefezellen eine Oberfläche und bilden Mikrokolonien. Die mittlere Phase der Biofilmentwicklung ist durch die erhebliche Zunahme von Zellen und sekretierten Zellwandpolysacchariden gekennzeichnet. Im reifen Stadium des Biofilms sind die Zellen gänzlich in einer extrazellulären Matrix aus Zellwandpolysacchariden eingeschlossen (Chandra *et al.*, 2001). Essentiell für die Biofilmbildung ist für *C. albicans* die Fähigkeit zum phänotypischen Wechsel zwischen Hefe und Hyphe (Baillie & Douglas, 1999; Ramage, Vandewalle, Wickes, & Lopez-Ribot, 2001).

3.3.4 Die Regulation der Morphologie durch wirtsabhängige Faktoren und Quorum Sensing

Die Morphologie von *C. albicans* wird über eine Vielfalt externer Signale beeinflusst. Zu diesen Signalen gehören zunächst die Temperatur und der pH-Wert des umgebenden Mediums. Allgemein lässt sich sagen, dass Pseudohyphen oder echte Hyphen ab einer Temperatur von 37°C und einem neutralen pH-Wert auftreten. Die Abnahme von Temperatur und pH-Wert geht hingegen mit der Bildung von Hefezellen einher. Die Bildung echter Hyphen kann durch eine Reihe wirtsabhängiger Faktoren ausgelöst werden. Dazu zählen Serum und menschliches Blut ohne weiße Blutzellen. Auch Nährstoffe wie Glucose, Fructose, Galaktose oder Sucrose wirken bei einer Temperatur von 37°C hyphenbildend. Dasselbe gilt für

Stickstoffmangel und eine erhöhte CO₂-Konzentration. Neben den genannten Beispielen gibt es noch weitere äußere Faktoren und Bedingungen die Morphogenese von *C. albicans* beeinflussen (Han, Cannon, & Villas-Boas, 2011). Die Morphogenese von *C. albicans* wird nicht ausschließlich durch äußere Faktoren gesteuert, sondern auch durch sogenannte Quorum Sensing-Moleküle. Diese Moleküle sind essentieller Bestandteil von Regulationsmechanismen der Zellmorphologie und der Biofilmbildung (Han *et al.*, 2011). Erstmals beschrieben wurde der Quorum Sensing-Mechanismus anhand eines Antagonisten der Hyphenbildung, dem Farnesol (Chen & Fink, 2006; Hogan, 2006a, 2006b; Hornby *et al.*, 2001; Nickerson, Atkin, & Hornby, 2006). Die Bildung von Hyphen wird hingegen durch die Alkohole Tyrosol und Estradiol stimuliert (Chen, Fujita, Feng, Clardy, & Fink, 2004; Cheng *et al.*, 2006).

3.4 Allgemeine Virulenzfaktoren von *C. albicans*

Die morphologische Plastizität ist für *C. albicans* ein wichtiger Virulenzfaktor (Mayer, Wilson, & Hube, 2013). So geht die Hyphenbildung von *C. albicans* mit der aktiven Schädigung von Wirtsgewebe durch Proteasen, Lipasen und Phospholipasen einher (Mayer, Wilson & Hube, 2013; Rooney & Klein, 2002). Hefezellen sind hingegen für die Disseminierung von Infektionen von Bedeutung (Bendel, Hess, Garni, Henry-Stanley, & Wells, 2003). Ein Verlust der Fähigkeit zum reversiblen Hefe-Hyphe-Übergang resultiert in einer attenuierten Virulenz von *C. albicans* (Berman & Sudbery, 2002; Lo *et al.*, 1997). Opaque-Zellen verursachen vornehmlich Hautinfektionen, Weiße Zelle dagegen innere Infektionen (C. Kvaal *et al.*, 1999; C. A. Kvaal, Srikantha, & Soll, 1997; Lachke, Lockhart, Daniels, & Soll, 2003). Die Biofilmbildung ist ein wichtiger Resistenzmechanismus gegenüber antimykotischen Wirkstoffen und immunologischen Abwehrmechanismen des Wirts und eine Ursache für rezidive Infektionen mit *C. albicans*. Außerdem sind Biofilme auf medizinischen Instrumenten eine Quelle für nosokomiale Infektionen (Mathe & Van Dijck, 2013; Mayer, Wilson, Hube, 2013; Taff, Mitchell, Edward, & Andes, 2013). Gelangt *C. albicans* während einer disseminierten systemischen Infektion in den Blutkreislauf, kann dieser Pilz verschiedenste Organe des Körpers besiedeln und als Nahrungsquelle erschließen (Fleck, Schöbel, & Brock, 2011; Mayer *et al.*, 2013). Dazu stehen diesem Pilz eine Reihe virulenzassoziierter Faktoren zur

Verfügung, zu denen neben der morphologischen Plastizität auch Adhäsine (z.B. ALS-Proteine), Invasine (Als3p, Ssa1p) und sekretierte Aspartylpeptidasen (SAPs) gehören (Mayer, Wilson, Hube, 2013; J. Naglik, Albrecht, Bader, & Hube, 2004; J. R. Naglik, Challacombe, & Hube, 2003; Schaller, Borelli, Korting, & Hube, 2005). In den verschiedenen Körperrischen wird der Pilz mit ebenso unterschiedlichen und veränderlichen Nährstoffangeboten konfrontiert. Dementsprechend gilt ein flexibler Metabolismus als essentielles Fitnessattribut für *C. albicans*. Insbesondere während der Interaktion mit Immuneffektorzellen des Wirts ist diese Eigenschaft, neben einer robusten Stressantwort auf veränderliche pH-Werte der Umgebung, reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und reaktive Stickstoffspezies (RNS), von großer Wichtigkeit (Mayer *et al.*, 2013, Lorenz *et al.*, 2004).

3.5 Allgemeine Funktionen des Metabolismus

Der Metabolismus (Stoffwechsel) umfasst die Menge aller biochemischen Reaktionen eines Organismus. Er bildet die Basis für dessen Wachstum und Vermehrung, durch die Bereitstellung von „Baustoffen“ und Energie für den Aufbau von Zellstrukturen. Die einzelnen Reaktionen werden von katalytisch wirksamen Proteinen, den Enzymen, ausgeführt. Mehrere Einzelreaktionen lassen sich zu sogenannten Stoffwechselwegen zusammenfassen. Die Stoffwechselwege des zentralen Kohlenstoffmetabolismus dienen der Nährstoffassimilierung, der Speicherung chemischer Energie durch die Herstellung von Reduktionsäquivalenten und der Synthese von Adenosintriphosphat (ATP). Er liefert die Energie und die Ausgangsstoffe für die Biosynthese komplexer Zellstrukturen. Der zentrale Kohlenstoffmetabolismus umfasst die Stoffwechselwege der Glykolyse, der Gluconeogenese, des Pentosephosphatweges, des Citrat- und des Glyoxylatzyklus und der β -Oxidation der Fettsäuren. Außerdem umfasst er Synthesewege für Speicherstoffe (Glykogen, Fettsäuren, Lipide) und Strukturmoleküle (Zellwandpolysaccharide, Aminosäuren, Nukleotide). Die verschiedenen Stoffwechselwege sind in unterschiedlichen Zellkompartimenten lokalisiert und daher durch Membranen gegeneinander abgegrenzt. Innerhalb dieser Kompartimente herrschen definierte pH-Werte und Ionenkonzentrationen, um optimale Bedingungen für die katalytischen Funktionen der Enzyme zu gewährleisten. Über den Membranen können außerdem

Stoffgradienten aufgebaut werden, die für den Ablauf vieler Reaktionen unerlässlich sind. Die Aktivität der einzelnen Stoffwechselwege des Metabolismus ist veränderlich und kann entsprechend den verfügbaren Nahrungsquellen und den Bedürfnissen der Zelle angepasst werden. Dazu dient ein komplexes regulatorisches Netzwerk aus membranständigen Rezeptoren, Signaltransduktionskaskaden und Effektorproteinen zur Regulierung von Gen- und Enzymaktivitäten (Berg, Tymoczko, Stryer, Häcker, & Held, 2007).

3.6 Die Bedeutung des Metabolismus für den Kommensalismus und die Virulenz von *C. albicans*

C. albicans besiedelt als Kommensale vornehmlich den intestinalen Trakt seines Wirts. Eine im Darm befindliche Pilzzelle konkurriert im kommensalen Status mit anderen dort ansässigen Mikroben um Nährstoffe (Brock, 2009). Neueren Untersuchungen zufolge könnten unter diesen Bedingungen Fettsäuren eine bevorzugte Kohlenstoffquelle darstellen (Pande *et al.*, 2014). Deren Assimilierung würde insbesondere die peroxisomale β -Oxidation, den Glyoxylatzyklus und die Gluconeogenese erfordern (Berg *et al.*, 2007, Pande *et al.*, 2014; Püschel *et al.*, 2001). Vor allem das menschliche Blut ist mit einer Konzentration von ca. 6-8 mM verhältnismäßig reich an Glucose. Diese wäre daher im Verlaufe einer systemischen Infektion eine wichtige Nahrungsquelle für *C. albicans*. Glucose wird von der Zelle zunächst über die Glykolyse in Pyruvat umgewandelt (Berg *et al.*, 2007; Brock, 2009; Fleck *et al.*, 2011). Tatsächlich führt die Inkubation von *C. albicans* mit menschlichem Blut zu glykolytischer Genaktivität (Barelle *et al.*, 2006). Eine basale Aktivität glykolytischer Gene wurde jedoch auch in Zellen detektiert, welche über Aminosäuren statt Glucose als Kohlenstoffquelle verfügten und in Zellen einer Kultur, die sich in der stationären Wachstumsphase befand. Man vermutet daher, dass glykolytische Genaktivität bei *C. albicans* generell mit dem aktiven Wachstum einer Zellpopulation verbunden ist (Barelle *et al.*, 2006). Andererseits wurde auch gluconeogenetische Genaktivität bei Inkubation mit menschlichem Blut beobachtet und auf Mischpopulationen von freien und von Makrophagen phagozytierten Zellen zurückgeführt (Fradin *et al.*, 2003). Durch die Phagozytose gelangen die Zellen in eine Glucose-arme Umgebung. Eine koordinierte Adaption von Metabolismus und Morphologie erlaubt dem Pilz jedoch

auf gluconeogenetischer Basis das Hyphenwachstum einzuleiten und schließlich die Plasmamembran des Makrophagen zu durchstoßen und auf diese Weise aus dem Phagosom auszubrechen (Lorenz *et al.*, 2004). Im Einklang hiermit wurde in mehreren Publikationen eine stark eingeschränkte Virulenz bei Mutanten der Isocitratlyase (CaIc1p), dem Schlüsselenzym des Glyoxylatzyklus, bestätigt (Barelle *et al.*, 2006; Lorenz & Fink, 2001; Piekarska *et al.*, 2008). Die Bedeutung eines funktionellen Glyoxylatzyklus ergibt sich vor allem aus der generellen Beteiligung dieses Stoffwechselweges an gluconeogenetischen Prozessen. In diesem Zusammenhang wird auch der Virulenzdefekt einer *C. albicans*-Mutante (Cafox2 Δ) ohne funktionelle β -Oxidation auf einen gestörten Glyoxylatzyklus zurückgeführt. Aus nicht näher untersuchten Gründen bewirkt die Deletion der peroxisomalen Hydratase/Epimerase CaFOX2 eine Vergrößerung der Struktur der Peroxisomen. Dies könnte möglicherweise den Metabolitransport zwischen den Zellkompartimenten beeinträchtigen und so den besagten Virulenzdefekt hervorrufen (Brock, 2009; Piekarska *et al.*, 2008; Piekarska *et al.*, 2006; Ramirez & Lorenz, 2007). Die Deletion von Genen der Gluconeogenese (CaPCK1) oder der Glykolyse (CaPYK2) beeinträchtigt ebenfalls die Virulenz von *C. albicans* bei disseminierten Infektionen. Im Vergleich ergibt sich, dass die Virulenz am stärksten durch eine disfunktionale Glykolyse (Capyk2 Δ) vermindert wird. An nächster Stelle durch einen unterbrochenen Glyoxylatzyklus (Caicl1 Δ) und schließlich durch eine gestörte Gluconeogenese (Capck1 Δ) (Barelle *et al.*, 2006). Dies spiegelt die Verfügbarkeit einer Mischung verschiedener Nährstoffquellen im Infektionsprozess wieder.

3.7 Verbindungen zwischen Morphologie, Metabolismus und Virulenz

Die Hyphenbildung bei *C. albicans* ist ein multifaktorieller Prozess, welcher durch eine Vielzahl äußerer Faktoren (z.B. 37°C, Serum, neutraler pH, Glucose, Nährstoffmangel) stimuliert wird. Diese Faktoren aktivieren über Rezeptoren ein Netzwerk intrazellulärer Signalkaskaden (Ras-cAMP-, MAPK-Signalwege) um schließlich über spezifische Transkriptionsfaktoren morphogenetische Gene zu aktivieren und die Zellmorphologie zu verändern (Bockmuhl & Ernst, 2001; Sabina & Brown, 2009; Sudbery, 2011). Damit einhergehend verändern sich auch die

physiologischen Eigenschaften der Zelle. Weiße Zellen und Hefe-Zellen betreiben beispielsweise einen bevorzugt fermentativen Metabolismus. Untersuchungen von Opaque-Zellen deuten dagegen auf einen oxidativen Metabolismus in diesen Zellen hin (Lan *et al.*, 2002; Doedt *et al.*, 2004). Die Transkriptionsfaktoren CaEfg1p, CaEfh1p, CaCph1p, CaTup1p und CaGcn4p funktionieren als regulatorische Bindeglieder von Metabolismus, Morphologie und Virulenzfaktoren (Bockmuhl & Ernst, 2001; Braun & Johnson, 2000; Doedt *et al.*, 2004; Leng, Lee, Wu, & Brown, 2001; Lorenz *et al.*, 2004; Pierce, Dignard, Whiteway, & Kumamoto, 2013; Sohn, Urban, Brunner, & Rupp, 2003). Durch ihr koordiniertes Zusammenspiel und über weitere Transkriptionsfaktoren regulieren sie den Wechsel zwischen den verschiedenen Wachstumsformen und den entsprechenden metabolischen Eigenschaften von *C. albicans*. Außerdem sind sie an der Regulierung virulenzspezifischer Gene und an der Biofilmbildung beteiligt (Chamilos *et al.*, 2006; Korting *et al.*, 2003; Leng *et al.*, 2001; Lin *et al.*, 2013; Murad, d'Enfert, *et al.*, 2001). Genetische Veränderungen dieser regulatorischen Netzwerke beeinflussen die Zellmorphologie und die Ausprägung des Stoffwechsels in *C. albicans*. Die Deletion des Gens für den Transkriptionsrepressor CaTup1p erzeugt zum Beispiel hyperfilamentierende Zellen und bewirkt die Derepression von Genen der alternativen Kohlenstoffassimilierung (Gluconeogenese, Citrat- und Glyoxylatzyklus, β -Oxidation) (Murad, *et al.*, 2001; Murad, *et al.*, 2001). Gendeletionsmutanten von *CaEFG1* und dessen Nebenregulator *CaEFH1* sind unfähig den Übergang zum Hyphenwachstum zu vollziehen. Auf der anderen Seite ist insbesondere CaEfg1p zur Ausprägung einer stabilen und typischen Hefemorphologie notwendig. Die Form einer *Caefg1* Δ -Mutante erinnert jedoch an Opaque-Zellen. Zudem kann diese Mutante den fermentativen Metabolismus der Hefe-Zellen nicht ausprägen (Doedt *et al.*, 2004). Zusätzlich vermittelt CaEfg1p das GCN-Signal zur Pseudohyphenbildung bei Aminosäuremangel. Dieser Prozess wird durch CaGcn4p, dem Hauptregulator des Aminosäuremetabolismus, gesteuert und ist bei *Caefg1* Δ - und *Cagcn4* Δ -Mutanten nicht zu beobachten (Tripathi *et al.*, 2002). CaCph1p ist ein Aktivator der Hyphenbildung und des Galaktosemetabolismus. Beide Zellprozesse sind in einer *Cacph1* Δ -Mutante gestört (Liu, Kohler, & Fink, 1994; Martchenko *et al.*, 2007).

3.8 Physiologische und regulatorische Unterschiede der Glucose-Assimilation von *C. albicans* und *S. cerevisiae*

Glucose gilt für *S. cerevisiae* als auch für *C. albicans* als bevorzugte Kohlenstoffquelle, jedoch unterscheiden sich die Strategien zu ihrer Verwertung. *S. cerevisiae* geht dabei nach dem Prinzip „entweder-oder“ vor. Dies verdeutlicht sich im Hinblick auf den nach dem englischen Biochemiker H. G. Crabtree bezeichneten Crabtree-Effekt (Crabtree, 1929; De Deken, 1966). *S. cerevisiae* ist ein Crabtree-positiver Organismus. Kennzeichnend dafür ist dessen Eigenschaft, Glucose auch unter aeroben Bedingungen zu Alkohol und CO₂ zu vergären. Überschreitet der Glucosegehalt des Nährmediums 100 mg/L, werden im Zuge der Glucoserepression Gene des respirativen Stoffwechsels reprimiert und der Citratzyklus in seiner Aktivität gedrosselt, während die glykolytische Aktivität noch gesteigert wird. Folglich wird glykolytisch erzeugtes Pyruvat in Ethanol und Acetat umgewandelt, statt über den Citratzyklus und die respiratorische Kette abgebaut zu werden. Wenn keine Glucose mehr verfügbar ist, wird der respirative Stoffwechsel wieder aktiviert und alternative Kohlenstoffquellen, wie z.B. Ethanol, assimiliert (Barelle *et al.*, 2006; Pronk, Yde Steensma, & Van Dijken, 1996). *C. albicans* wird in vielen Publikationen ebenfalls als Glucose-sensitive Hefe beschrieben (Barelle *et al.*, 2006; Lorenz, Bender, & Fink, 2004; Ramirez & Lorenz, 2007; Rodaki *et al.*, 2009). Die regulatorischen Mechanismen zur Kontrolle der Glucoserepression unterscheiden sich jedoch im Detail. In beiden Hefen sind darin die Proteinkinase Snf1p und die Transkriptionsrepressoren Mig1p und Mig2p involviert. Die *C. albicans*-ScMig1p-Homologe CaMig1p und CaMig2p besitzen vermutlich teilweise redundante Funktionen und reprimieren ein ähnliches Repertoire von Genen wie ScMig1 (Murad, d'Enfert, *et al.*, 2001; Sabina & Brown, 2009). CaMig1p unterscheidet sich jedoch von ScMig1p durch eine fehlende Snf1-Phosphorylierungsstelle. Daher bleibt der genaue Mechanismus zur Regulation der Katabolitrepression durch CaMig1p und CaMig2p bisher ungewiss (DeVit & Johnston, 1999; Zaragoza, Rodriguez, & Gancedo, 2000). Außerdem erwies sich ein *CaSNF1*-knockout als letal, was auf wichtige zusätzliche Funktionen dieser Proteinkinase in *C. albicans* hinweist (Petter, Chang, & Kwon-Chung, 1997; Zaragoza *et al.*, 2000). Auch die positive Regulation des Kohlehydratmetabolismus

durch die Transkriptionsfaktoren CaTye7 und CaGal4p entspricht nicht dem Mechanismus in *S. cerevisiae* (Askew *et al.*, 2009; V. Brown *et al.*, 2006). Im Unterschied zu CaTye7p hat ScTye7p einen geringen Einfluss auf den Kohlenhydratstoffwechsel, da dieser über die Transkriptionsfaktoren ScGcr1p und ScGcr2p reguliert wird. Beide Faktoren fehlen in *C. albicans* (Askew *et al.*, 2009). Zudem reguliert ScGal4p den Galaktose- anstelle des Glucosemetabolismus (Martchenko *et al.*, 2007). Desweiteren produziert *C. albicans* größere Alkoholmengen während des anaeroben als während des aeroben Glucoseabbaus. Rozpedowska *et al.* (2011) erinnerte dieses Verhalten an den Pasteureffekt, welcher die sauerstoffabhängige Repression des fermentativen Glucoseabbaus beschreibt (Niimi, Kamiyama, & Tokunaga, 1988; Rozpedowska *et al.*, 2011). Im Unterschied zu *S. cerevisiae* ist *C. albicans* dazu fähig, nach dem Prinzip „Sowohl als auch“, Glucose und alternative Kohlenstoffquellen parallel zu assimilieren (Sandai *et al.*, 2012). Ursächlich für dieses Phänomen sind Unterschiede in der Katabolitinaktivierung. Diese führt bei *S. cerevisiae* zur Ubiquitinierung und dem anschließenden Abbau von Enzymen des Glyoxylatzyklus (ScIcl1p) und der Gluconeogenese (ScPck1p, ScFbp1p). Den homologen Proteinen in *C. albicans* fehlen dazu die notwendigen Ubiquitin-Bindestellen, weshalb diese Enzyme längere Zeit aktiv bleiben (Sandai *et al.*, 2012).

3.9 Physiologische und regulatorische Unterschiede der Assimilation alternativer Kohlenstoffquellen von *C. albicans* und *S. cerevisiae*

Neben der Glucoseassimilierung unterscheiden sich *C. albicans* und *S. cerevisiae* auch bezüglich der Assimilierung alternativer Kohlenstoffquellen. Dies gilt insbesondere für die peroxisomalen Stoffwechselfunktionen der β -Oxidation und des Glyoxylatzyklus. Obwohl diese Stoffwechselwege in beiden Hefen konserviert sind, werden sie in jeweils unterschiedlicher Weise reguliert (Carlson, 1999; Ruijter & Visser, 1997; Schuller, 2003; Turcotte, Liang, Robert, & Soontorngun, 2010). Zum Beispiel haben die Transkriptionsfaktoren Cat8p und Adr1p trotz hoher Sequenzähnlichkeit wahrscheinlich jeweils unterschiedliche regulatorische Aufgaben. Während ScCat8p Gene des Glyoxylatzyklus und der Gluconeogenese reguliert, konnte dem *C. albicans*-Homolog CaCat8p keine derartige Funktion

zugeordnet werden. Auch die Funktion des Transkriptionsregulators CaAdr1p, dessen *S. cerevisiae*-Homolog den Ethanolabbau reguliert, ist bisher nicht geklärt. Gänzlich unterschiedliche Transkriptionsfaktoren regulieren zudem die Biogenese der Peroxisomen und die Aktivität von Genen des Fettsäureabbaus durch die β -Oxidation. Homologe der entsprechenden Transkriptionsfaktoren ScPip2p und ScOaf1p fehlen *C. albicans*. Stattdessen hat der Transkriptionsfaktor CaCtf1p maßgeblichen Einfluss auf die Regulation beider Prozesse in *C. albicans* (Carlson, 1999; Ruijter & Visser, 1997; Schuller, 2003; Turcotte, Liang, Robert, & Soontorngun, 2010). In Wachstumsversuchen mit Gendelektionsmutanten der β -Oxidation zeigen sich zudem Spezies-spezifische Phänotypen. Während eine *S. cerevisiae*-Mutante ohne peroxisomale Hydratase/Epimerase (*Scfox2 Δ*) einzig Fettsäuren nicht als Kohlenstoffquelle verwerten kann, verhindert dieselbe Mutation in *C. albicans* (*Cafox2 Δ*) zusätzlich das Wachstum auf Acetat, Ethanol, Citrat und Lactat. Diese Forschungsergebnisse betonen die Wichtigkeit peroxisomaler Stoffwechselwege (β -Oxidation, Glyoxylatzyklus) und der Gluconeogenese für *C. albicans* und deuten auf einen vornehmlich oxidativen anstelle eines fermentativen Metabolismus hin (Piekarska *et al.*, 2008; Ramirez & Lorenz, 2007). Unterstützung findet diese Einschätzung durch die Existenz zahlreicher putativer Isoenzyme der β -Oxidation in *C. albicans*. So verfügt *S. cerevisiae* über lediglich eine Acyl-CoA-Oxidase (ScPox1p) zur Katalyse der ersten Reaktion der peroxisomalen β -Oxidation (Hiltunen *et al.*, 2003). Im Genom von *C. albicans* finden sich dagegen vier putative Acyl-CoA-Oxidasen (*CaPOX1*, *CaPXP2*, *CaPOX1-3*, *CaACD99*) (Abb. 5) (Chibana *et al.*, 2005; Jones *et al.*, 2004). Mitochondriale Acyl-CoA Dehydrogenasen zum Fettsäure-Abbau fehlen hingegen in beiden Spezies, sind jedoch in den meisten filamentösen Pilzen zu finden (Butler *et al.*, 2009). Im Vergleich der Verfügbarkeit von Isoenzymen in *S. cerevisiae* und *C. albicans* fällt auch die finale Reaktion der β -Oxidation auf. Hier finden sich drei putative Isoenzyme im Genom von *C. albicans* (*CaPOT1*, *CaFOX3*, *CaPOT13*) (Abb. 5) und nur eines im Genom von *S. cerevisiae* (*ScPOT1*) (Hiltunen *et al.*, 2003). Eine experimentelle Prüfung der spezifischen Funktionen der entsprechenden Enzyme von *C. albicans* wurde bisher jedoch nicht durchgeführt. Wie bereits erwähnt, ist *C. albicans* außerdem zur parallelen Assimilierung von Glucose und alternativen

Kohlenstoffquellen fähig und vermeidet dadurch eine strikte Bevorzugung des fermentativen Metabolismus in Gegenwart von Glucose (Sandai *et al.*, 2012).

3.10 Propionat

Propionat ist das Salz der Propionsäure, einer gesättigten Monocarbonsäure aus drei Kohlenstoffatomen. Natürlicherweise entsteht Propionat während der Propionsäuregärung. Diese dient der ATP-Synthese durch die Umwandlung von Lactat in Acetat. Die Propionat-Bildung dient dabei der Reoxidation von Reduktionsäquivalenten (NADH_2) aus der Acetat-Bildung. Dazu steht Bakterien der Gattungen *Propionibacterium*, *Selenomonas*, *Veillonella* und *Peptostreptococcus* der Methylmalonyl-CoA-Weg (Abb. 1) zur Verfügung. Dieser ermöglicht die Reoxidation von NADH_2 aus der Acetatbildung durch Reduktion von Oxalacetat und Fumarat. Dieser Stoffwechselweg beinhaltet mit dem Cobalamin-abhängigen (Coenzym B12) Enzym der Methylmalonyl-CoA-Mutase (MMCM) und dem Biotin-abhängigen Enzym der Propionyl-CoA-Carboxylase (PCC) zwei charakteristische Enzyme (Cypionka, 2010; Georg Fuchs, 2006).

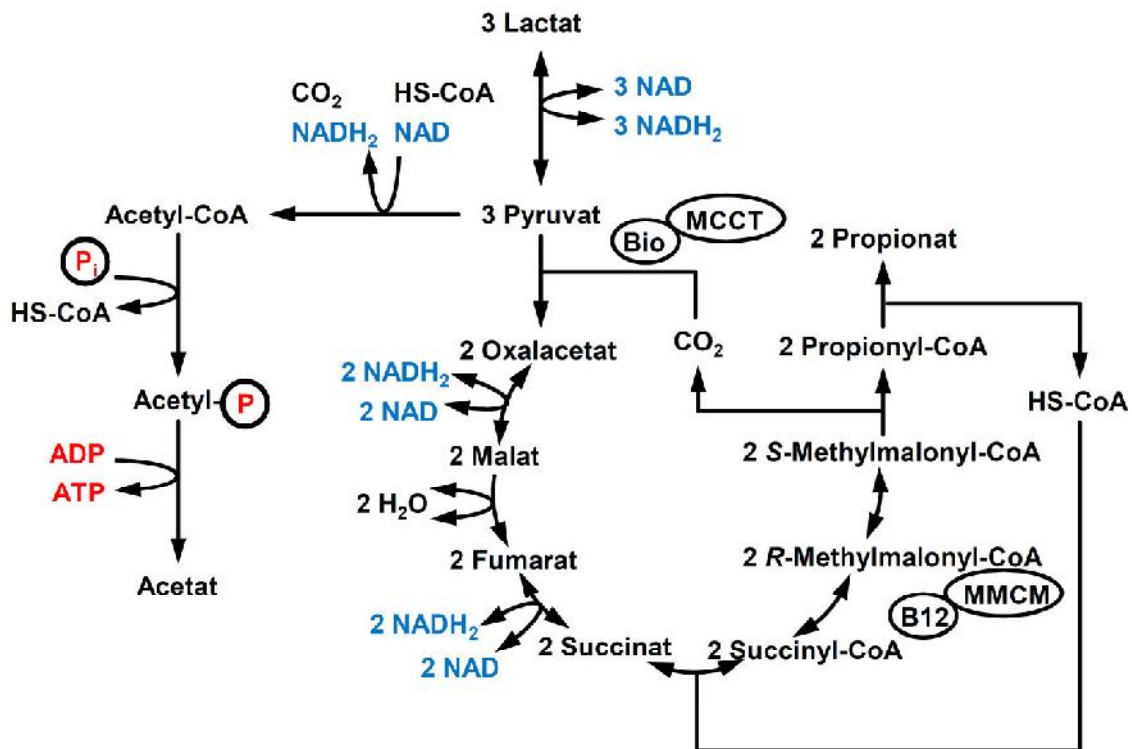


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Propionsäuregärung I – Der Methylmalonyl-CoA-Weg.

Der Acrylyl-CoA-Weg (Abb. 2) wird als alternative Möglichkeit der Propionatbildung von *Clostridium propionicum*, *Bacteroides ruminicola* und *Megasphaera elsdenii*

verwendet. Hier wird die Reoxidation von NADH_2 in der Reduktion von Acrylyl-CoA zu Propionyl-CoA ermöglicht. Namensgebend für diesen Stoffwechselweg ist die Bildung von Acrylyl-CoA aus Lactyl-CoA durch das Enzym Lactyl-CoA-Dehydratase (LCD) (Cypionka, 2010; Georg Fuchs, 2006).

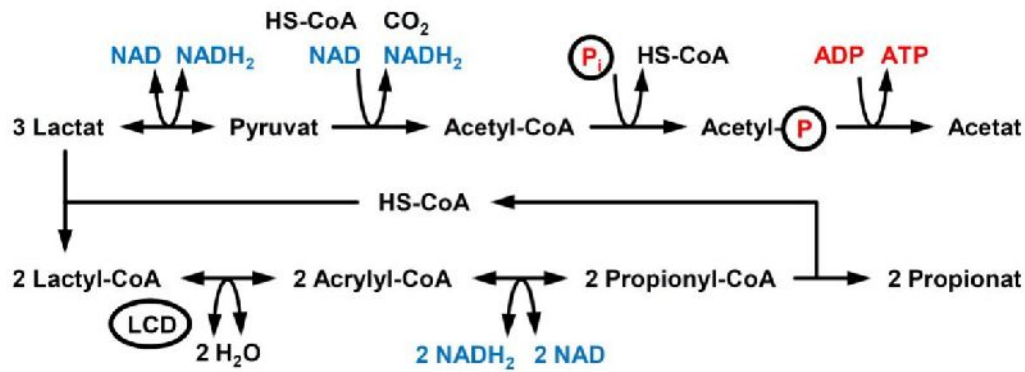


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Propionsäuregärung II-Der Acrylyl-CoA-Weg

Aufgrund seiner inhibierenden Wirkung auf den mikrobiellen Stoffwechsel wird Propionat in der Futter- und Lebensmittelindustrie als Konservierungsmittel (E 280 bis E 283) eingesetzt (Classen, 2001; Piper *et al.*, 2001; Suhr & Nielsen, 2004). Dissoziiertes Propionat kann über einen Protonen-Symporter ins Cytosol einer Zelle gelangen oder als undissoziiertes Molekül frei über die zellulären Membranen diffundieren und im Cytosol dissoziieren (Casal, Cardoso, & Leao, 1996; Paiva, Devaux, Barbosa, Jacq, & Casal, 2004). Beide Vorgänge haben eine Ansäuerung des Cytosols zur Folge, wodurch die Bildung von Protonengradienten und damit essentielle Mechanismen, wie die ATP-Synthese, gestört werden (Mira, Teixeira, & Sa-Correia, 2010). In der Zelle wird Propionat über eine ATP-abhängige Reaktion aktiviert. Dabei wird die Carboxylgruppe des Propionat mit Coenzym A über eine Thioesterbindung verbunden, wodurch Propionyl-CoA entsteht. Die Bildung von Propionyl-CoA muss von der Zelle kontrolliert werden, da diese Substanz in höheren Konzentrationen toxisch auf den Primärstoffwechsel wirkt. Bei Untersuchungen des gram-negativen Bakteriums *Escherichia coli* und den filamentösen Pilzen *Aspergillus nidulans* und *Aspergillus fumigatus* wurde nachgewiesen, das Propionyl-CoA in höheren Konzentrationen die Aktivität des Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes, der Succinyl-CoA-Synthetase und der ATP-Citrat-Lyase hemmt (Brock & Buckel, 2004; Brock, Fischer, Linder, & Buckel, 2000; Maerker, Rohde, Brakhage, & Brock, 2005; Piper, Calderon, Hatzixanthis, &

Mollapour, 2001). Auch der Sekundärstoffwechsel wird durch die Anreicherung von Propionyl-CoA beeinträchtigt, wie anhand von Untersuchungen der Polyketidsynthese in *A. fumigatus* und *A. nidulans* gezeigt wurde (Maerker *et al.*, 2005; Zhang, Brock, & Keller, 2004). Ein gestörter Propionatstoffwechsel führt beim Menschen zu schweren Azidämien (Morath *et al.*, 2008; Schwab *et al.*, 2006).

3.11 Die intrazelluläre Bildung von Propionyl-CoA

3.11.1 Die Bildung von Propionyl-CoA während des Aminosäurekatabolismus

Propionyl-CoA kann potentiell während des Abbaus der Aminosäuren Valin, Methionin, Isoleucin und Threonin entstehen, wie es zum Beispiel bei Säugetieren der Fall ist (Berg *et al.*, 2007; Harris *et al.*, 2005; Hsia *et al.*, 1971). Die Reaktionsfolgen der entsprechenden Stoffwechselwege werden im Folgenden kurz dargestellt (Abb. 3). Der Abbau von Valin und Isoleucin beginnt mit deren Deaminierung und Umwandlung in die jeweiligen α -Ketosäuren 3-Methyl-2-Ketobutanoat und 3-Methyl-2-Ketopentanoat. Dabei überträgt eine Transaminase die Aminogruppe auf α -Ketoglutarat, welches auf diese Weise in die Aminosäure Glutamat umgewandelt wird. Die α -Ketosäuren werden anschließend über einen α -Ketosäure-Dehydrogenase-Komplex oxidativ decarboxyliert und so in die verzweigt-kettigen Acyl-CoA-Ester 2-Methyl-Propionyl-CoA und 2-Methyl-Butanoyl-CoA überführt. Die Acyl-CoA-Ester werden schrittweise durch spezifische Acyl-CoA-Dehydrogenasen und Enoyl-CoA-Hydratasen in 3-Hydroxy-Isobutyryl-CoA, bzw. 3-Hydroxy-2-Methylbutyryl-CoA umgewandelt. Nach der Hydrolyse der CoA-Ester werden 3-Hydroxy-Isobutyryl-CoA bzw. Hydroxy-2-Methylbutyryl-CoA über spezifische Hydroxyacyl-Dehydrogenasen in Methylmalonat-Semialdehyd und 2-Methyl-Acetoacetyl-CoA umgewandelt. Methylmalonat-Semialdehyd wird schließlich oxidativ decarboxyliert und dabei in Propionyl-CoA und CO₂ gespalten. Aus 2-Methyl-Acetoacetyl-CoA entsteht in einer CoA-Transferase-Reaktion Acetyl-CoA und Propionyl-CoA (Berg *et al.*, 2007; Gerd P. Püschel, 2011; Harris, Joshi, Jeoung, & Obayashi, 2005). Der Abbau von Methionin beginnt mit der Bildung von S-Adenosylmethionin, welches unter Abspaltung einer Methylgruppe in S-Adenosylhomocystein umgewandelt wird. Aus S-Adenosylhomocystein entsteht durch die Hydrolyse des Thioesters Adenosin und Homocystein. Letzteres dient

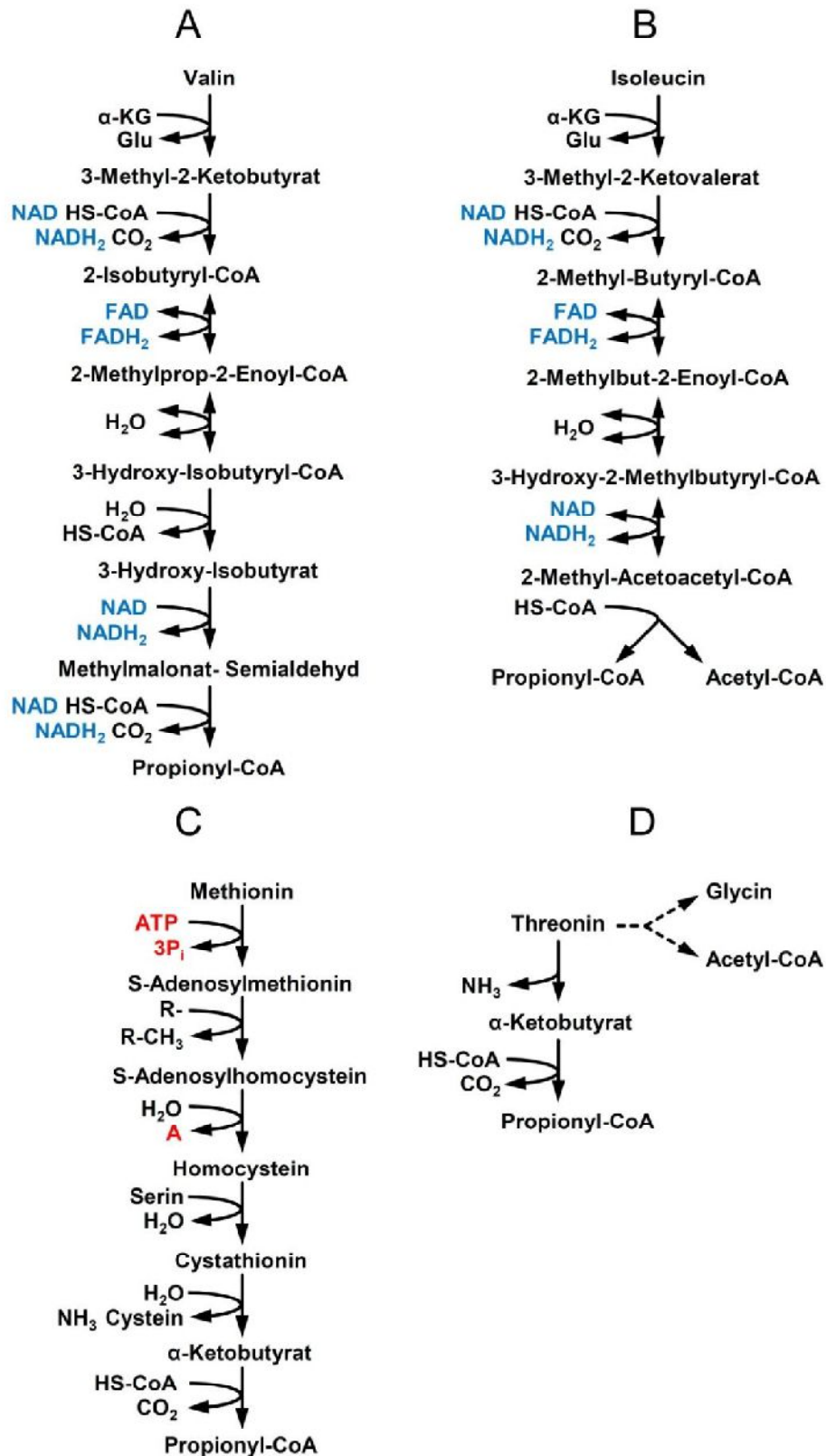


Abbildung 3: Schematische Darstellung der intrazellulären Bildung von Propionyl-CoA aus Aminosäuren in Säugetieren. Der Abbau der Aminosäuren A) Valin, B) Isoleucin, C) Methionin und Threonin führt zur intrazellulären Bildung von Propionyl-CoA. D) Threonin kann in Propionyl-CoA oder alternativ in Acetyl-CoA und Glycin umgewandelt werden.

gemeinsam mit Serin der Cystathionin- β -Synthase als Substrat zur Bildung von Cystathionin. Dieses wird von der Cystathionin- γ -Lyase durch Cystein-Abspaltung und Deaminierung in α -Ketobutyrat umgewandelt. Letzteres wird über einen α -Ketosäure-Dehydrogenase-Komplex decarboxyliert und auf diese Weise in Propionyl-CoA überführt. Dasselbe geschieht mit α -Ketobutyrat, welches durch Deaminierung aus Threonin entsteht. Threonin kann über einen alternativen Stoffwechselweg auch zu Glycin und Acetyl-CoA abgebaut werden (Gerd P. Püschel, 2011).

Die artspezifischen Unterschiede der Stoffwechselwege zum Abbau der verzweigt-kettigen Aminosäuren Valin und Isoleucin ermöglichen *S. cerevisiae* die Bildung von Propionyl-CoA in diesen beiden Fällen zu vermeiden (Abb. 4). Stattdessen werden Valin und Isoleucin über den Ehrlich-Abbau in Fuselalkohole umgewandelt und anschließend sekretiert. Dieser Stoffwechselweg beginnt mit der Deaminierung der Aminosäure zur α -Ketosäure. Darauf folgt eine Decarboxylierung zum Aldehyd und die Reduktion zum Alkohol. Diesem Stoffwechselschema zufolge können Hefen diese Aminosäuren zwar als Stickstoffquelle, jedoch nicht als Kohlenstoffquelle verwerten (Hazelwood, Daran, van Maris, Pronk, & Dickinson, 2008). Methionin kann von *S. cerevisiae* ebenfalls über den Ehrlich-Abbau in den Fuselalkohol Methionol umgewandelt werden. Es gibt jedoch Hinweise auf einen alternativen Stoffwechselweg. Darin würde eine Demethiolase Methionin oder die entsprechende α -Ketosäure (4-Methylthio- α -Ketobutyrat) in α -Ketobutyrat umwandeln. Ein entsprechendes Enzym konnte bisher allerdings nicht charakterisiert werden. Neben der putativen Demethylierung von Methionin und dessen Ketosäure ist auch hier die Dehydratisierung von Threonin eine Quelle für α -Ketobutyrat, welches *S. cerevisiae* als Vorstufe der Isoleucin-Synthese dienen kann (Dickinson, 2000; Dickinson *et al.*, 1997; Hazelwood *et al.*, 2008; Perpète *et al.*, 2006). Alternativ kann α -Ketobutyrat durch eine weitere Dehydrierung über einen Ketosäure-Dehydrogenase-Komplex zu Propionyl-CoA umgesetzt werden (Sinclair, Dawes, & Dickinson, 1993). Man vermutet, dass *C. albicans* und *S. cerevisiae* über dieselben katabolischen Stoffwechselwege zum Abbau der Aminosäuren Valin, Isoleucin, Threonin und Methionin verfügen (Jones *et al.*, 2004;

Remm *et al.*, 2001). Eine konkrete experimentelle Darstellung dieser Stoffwechselwege in *C. albicans* wurde jedoch bisher nicht vorgenommen.

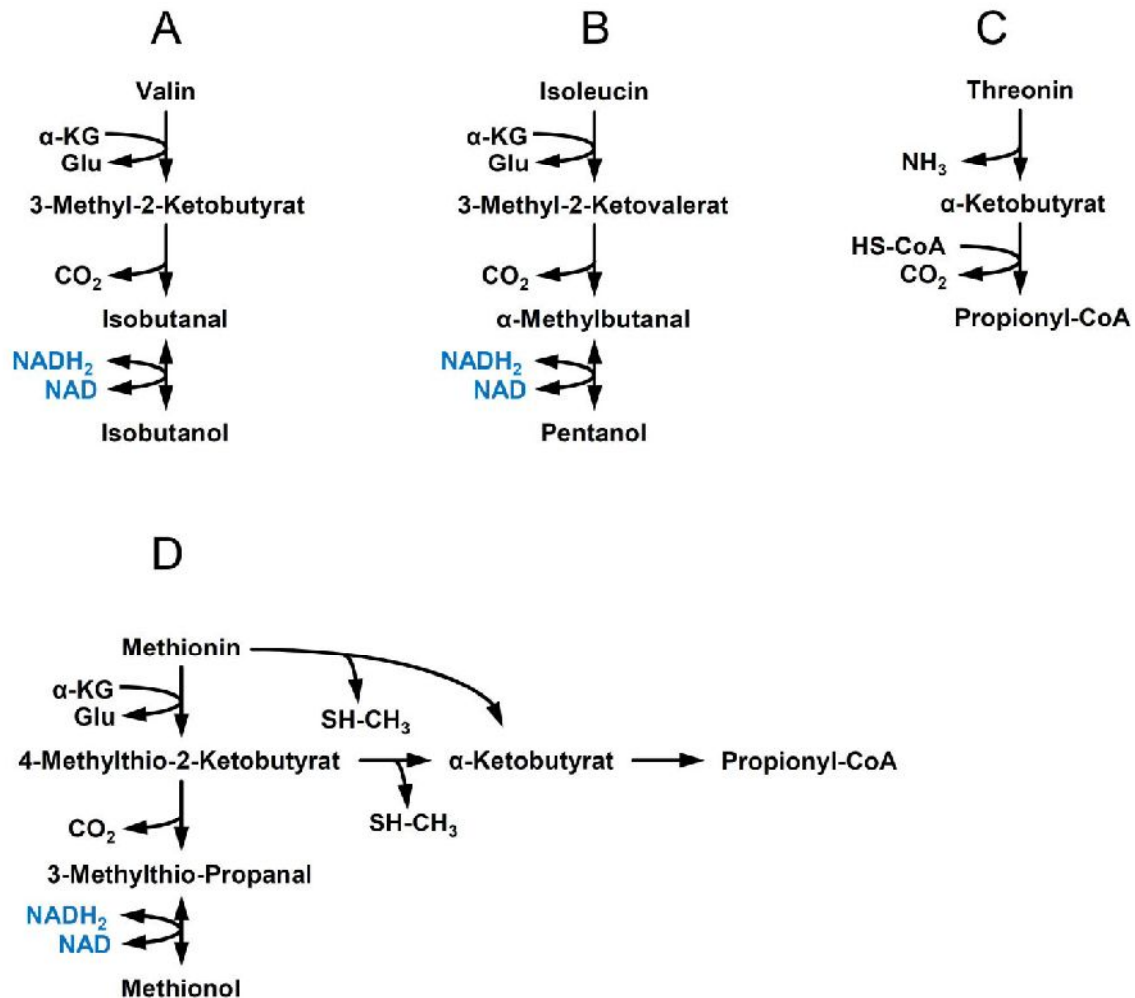


Abbildung 4: Schematische Darstellung der intrazellulären Bildung von Fuselalkoholen und Propionyl-CoA aus Aminosäuren in *S. cerevisiae*. A) B) Der Abbau der Aminosäuren Valin und Isoleucin über den Ehrlich-Abbau führt zur Bildung von Fuselalkoholen. Diese Form des Abbaus verhindert die Nutzung dieser Aminosäuren als Kohlenstoffquelle. C) Der Threoninabbau führt zur Bildung von Propionyl-CoA. D) Der Abbau von Methionin über den Ehrlich-Abbau führt zur Bildung des Fuselalkohols Methionol. Alternativ kann Methionin möglicherweise in Propionyl-umgewandelt werden.

3.11.2 Die Bildung von Propionyl-CoA während des Fettsäurekatabolismus

In *C. albicans* und *S. cerevisiae* verläuft der Abbau von Fettsäuren über deren schrittweise Spaltung in Acetyl-CoA durch die peroxisomale β -Oxidation (Abb. 5). Für die Katalyse der Reaktionen dieses Stoffwechselweges stehen *C. albicans* eine Vielzahl putativer Isoenzyme zur Verfügung, deren spezifische Funktionen bisher

jedoch nicht experimentell dargestellt wurden (Jones *et al.*, 2004; Remm *et al.*, 2001). Zu Beginn dieses Stoffwechselweges überträgt eine Acyl-CoA-Synthetase unter ATP-Verbrauch Coenzym A auf einen Acylrest, um diesen für die weiteren Schritte der β -Oxidation zu aktivieren. Eine Acyl-CoA-Oxidase (CaPox1p, CaPxp2p, CaPox1-3p, CaAcd99p) fügt anschließend zwischen dem C2- und dem C3-Atom des Acyl-CoA-Esters eine Doppelbindung ein. Dabei werden Reduktionsäquivalente auf Sauerstoff übertragen, so dass neben einem Trans-2-Enoyl-CoA auch ein Molekül H_2O_2 entsteht. Die Hydratisierung des Trans-2-Enoyl-CoA zum 3-Hydroxyacyl-CoA sowie die anschließende Dehydratisierung zum 3-Ketoacyl-CoA

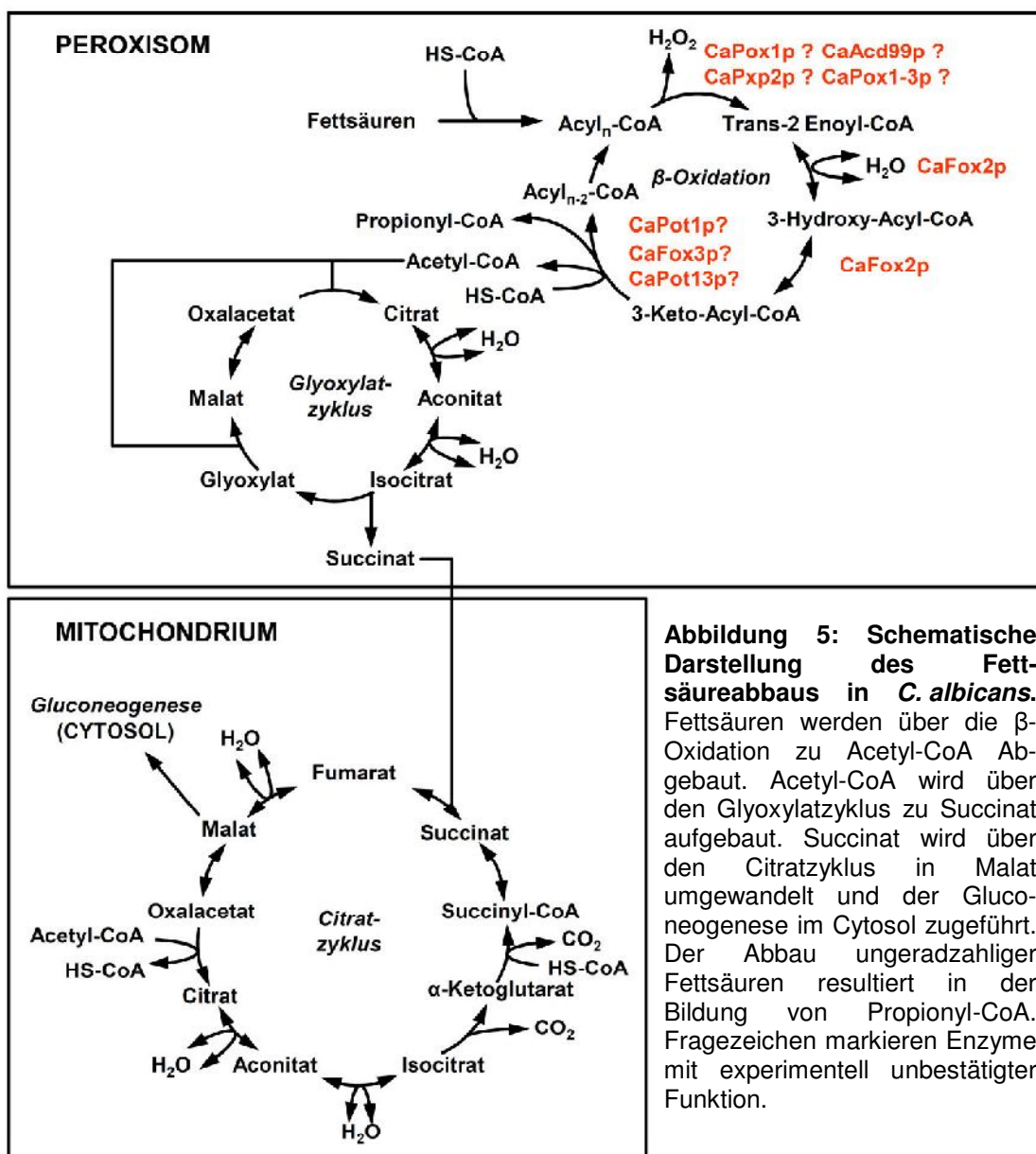


Abbildung 5: Schematische Darstellung des Fettsäureabbaus in *C. albicans*. Fettsäuren werden über die β -Oxidation zu Acetyl-CoA abgebaut. Acetyl-CoA wird über den Glyoxylatzyklus zu Succinat aufgebaut. Succinat wird über den Citratzyklus in Malat umgewandelt und der Gluconeogenese im Cytosol zugeführt. Der Abbau ungeradzahlicher Fettsäuren resultiert in der Bildung von Propionyl-CoA. Fragezeichen markieren Enzyme mit experimentell unbestätigter Funktion.

werden von der peroxisomalen Hydratase/Epimerase (CaFox2p) katalysiert. Vom 3-Ketoacyl-CoA wird in der folgenden Thiolyse, durch eine 3-Ketoacyl-CoA-Thiolase (CaPot1p, CaFox3p, CaPot13p), unter Aufnahme von einem Coenzym A, Acetyl-CoA abgespalten. Das um eine C2-Einheit verkürzte Acyl-CoA-Molekül wird erneut der ersten Reaktion der β -Oxidation zugeführt, so dass eine Fettsäure schließlich vollständig zu Acetyl-CoA-Einheiten abgebaut wird (Berg *et al.*, 2007). Pilze, viele Bakterien und Pflanzen sind in der Lage Acetyl-CoA über den Glyoxylatzyklus zu Succinat aufzubauen (Abb. 5). Succinat gelangt anschließend in die Mitochondrien und wird über den Citratzyklus in Malat umgewandelt. Letzteres gelangt anschließend in das Cytosol und dient als Ausgangssubstrat für die Gluconeogenese (Berg *et al.*, 2007; Ensign, 2006; Kornberg & Krebs, 1957; Lorenz *et al.*, 2008; Lorenz & Fink, 2001, 2002; Pallotta, Fratianni, & Passarella, 1999). Die vorangegangene Beschreibung gilt lediglich für Fettsäuren mit einer geraden Anzahl von Kohlenstoffatomen. Dahingegen resultiert der Abbau von ungeradzahigen Fettsäuren während des letzten Zyklus der β -Oxidation in der Bildung von einem Molekül Propionyl-CoA (Abb. 5). Propionyl-CoA kann über verschiedene Stoffwechselwege abgebaut und so in Intermediate des Ana- oder Katabolismus umgewandelt werden (Berg *et al.*, 2007; Horn, 2012; Tabuchi, 1974).

3.12 Verschiedene Möglichkeiten des Propionyl-CoA-Abbaus

3.12.1 Der Methylmalonyl-CoA-Weg

Die reversiblen Reaktionen des Methylmalonyl-CoA-Weges werden von Säugetieren dazu genutzt Propionyl-CoA zu Succinyl-CoA abzubauen (Abb. 6). Der Abbau beginnt mit der Umsetzung des Propionyl-CoA zu S-Methylmalonyl-CoA durch die Biotin-abhängige Propionyl-CoA-Carboxylase. Die Methylmalonyl-CoA-

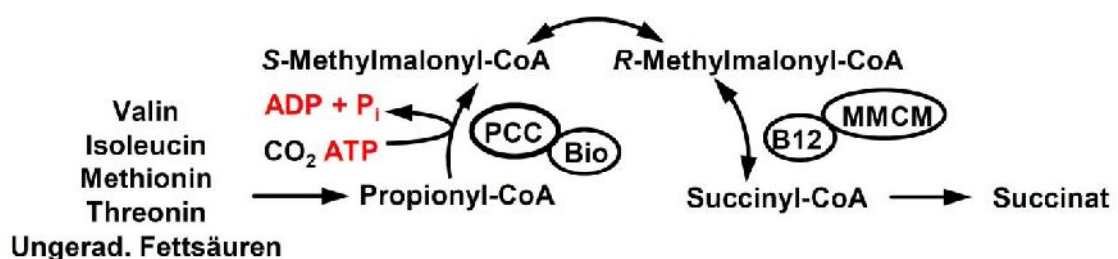


Abbildung 6: Schematische Darstellung des Methylmalonyl-CoA-Weges zum Abbau von Propionyl-CoA. Der Methylmalonyl-CoA-Weg dient Säugetieren zur Umwandlung von Propionyl-CoA in Succinat. Er beinhaltet mit der Methylmalonyl-CoA-Mutase (MMCM) ein Coenzym B12- und mit der Propionyl-CoA-Carboxylase (PCC) ein Biotin-abhängiges Enzym.

Racemase wandelt daraufhin das *S*-Methylmalonyl-CoA in *R*-Methylmalonyl-CoA um. Der letzte Schritt in dieser Reaktionsfolge ist die Umsetzung von *R*-Methylmalonyl-CoA zu Succinyl-CoA durch die Cobalamin-abhängige Methylmalonyl-CoA-Mutase. Succinyl-CoA ist ein Intermediat des Citratzyklus und wird als solches weiterverwertet (Berg *et al.*, 2007; Horn, 2012). Für Pilze kommt der Abbau von Propionyl-CoA über den Methylmalonyl-CoA-Weg nicht in Frage, da Pilze nicht zur Cobalamin-Synthese fähig sind und auch kein extern zugeführtes Cobalamin verwerten können. Daher benötigen sie einen alternativen Abbauweg für Propionyl-CoA (Ledley, Crane, Klish, & May, 1991). Säugetieren fehlt ebenfalls die Möglichkeit zur Cobalamin-Synthese. Sie besitzen jedoch einen intrinsischen Faktor zur Aufnahme von externem Cobalamin (Seetharam & Alpers, 1982). Störungen des Methylmalonyl-CoA-Weges führen beim Menschen zur Bildung von 3-Hydroxypropionat, Methylisocitrat und Propionylglycin. Diese Substanzen stellen jedoch keine natürlichen Intermediate des Propionatabbaus im Menschen dar und entstehen wahrscheinlich durch unspezifische Stoffwechselreaktionen (Schwab *et al.*, 2006).

3.12.2 Der Methylcitratzyklus

Organismen die nicht zur Cobalamin-Synthese fähig sind, verwenden häufig den Methylcitratzyklus zum Abbau von Propionyl-CoA (Abb. 7). Dieser wurde für Bakterien und filamentöse Pilze beschrieben und ist in eukaryotischen Zellen in den Mitochondrien lokalisiert (Brock, Darley, Textor, & Buckel, 2001; Gerike, Hough, Russell, Dyll-Smith, & Danson, 1998; Tabuchi, 1974; Textor *et al.*, 1997). Der Methylcitratzyklus beginnt mit der Bildung von 2-Methylcitrat aus Propionyl-CoA und Oxalacetat durch die Methylcitratsynthase. Über zwei aufeinander folgende De- und Rehydratisierungs-Reaktionen wird 2-Methylcitrat zunächst durch die 2-Methylcitrat-Dehydratase zu 2-Methylaconitat und anschließend über eine Aconitase zu Methylisocitrat umgesetzt (Maerker *et al.*, 2005). Methylisocitrat wird schließlich von der Methylisocitrat-Lyase in Succinat und Pyruvat gespalten (Grimm *et al.*, 2003). Succinat wird durch Enzyme des Citratzyklus in Oxalacetat umgewandelt und steht schließlich zur Bildung eines weiteren Methylcitrat-Moleküls zur Verfügung. Pyruvat kann in die Stoffwechselintermediate Oxalacetat, Acetyl-CoA und Alanin umgewandelt werden und ist damit ein Intermediat vieler anaboler und kataboler

Stoffwechselprozesse (Berg *et al.*, 2007). Bisherige Untersuchungen legen nahe, dass der Methylcitratzyklus in *S. cerevisiae* zum Abbau von Propionyl-CoA aus dem Aminosäurekatabolismus dient. Dafür spricht die spezifische Induktion des Gens der Methylcitratlyase *ScICL2* durch die Verwendung von Threonin als einziger Kohlenstoffquelle (Luttik *et al.*, 2000). Ein funktioneller Methylcitratzyklus ist für den opportunistisch humanpathogenen Ascomyceten *A. fumigatus* eine nachweislich wichtige Virulenzdeterminante (Ibrahim-Granet *et al.*, 2008).

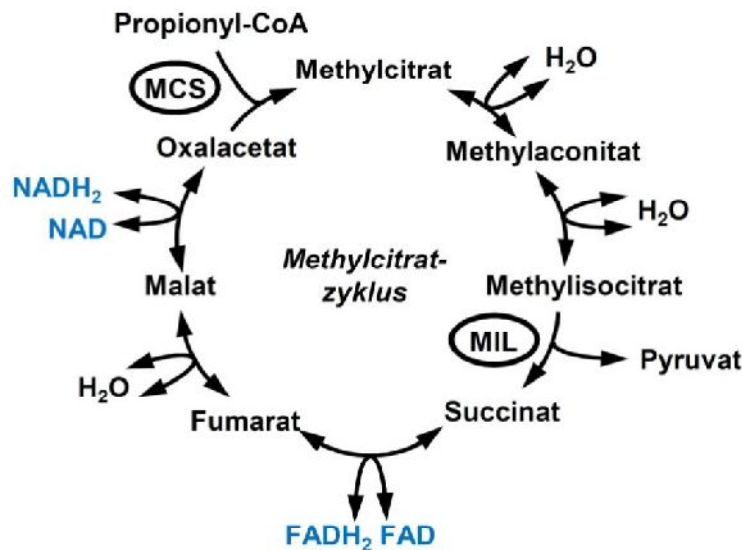


Abbildung 7: Schematische Darstellung des Methylcitratzyklus. Der Methylcitratzyklus dient filamentösen Pilzen und einigen Bakterien zur Umwandlung von Propionyl-CoA in Pyruvat. Die Methylcitratsynthase (MCS) katalysiert die Bildung von Methylcitrat aus Propionyl-CoA und Oxalacetat. Methylcitrat wird in Methylisocitrat umgewandelt und anschließend durch die Methylisocitratlyase (MIL) in Pyruvat und Succinat gespalten. In Eukaryoten ist dieser Stoffwechselweg in den Mitochondrien lokalisiert.

3.12.3 Die modifizierte β -Oxidation

Die modifizierte β -Oxidation stellt neben dem Methylmalonyl-CoA-Weg und dem Methylcitratzyklus eine hypothetische alternative zum Abbau von Propionyl-CoA dar. Im Verlauf einer normalen β -Oxidation würde Propionyl-CoA zunächst zu Acrylyl-CoA oxidiert und dieses im Anschluss zu 3-Hydroxypropionyl-CoA hydratisiert werden. Daran fügen sich die Dehydrierung zum 3-Ketopropionyl-CoA und dessen thiolytische Spaltung in Acetyl-CoA und Formyl-CoA an. In der modifizierten Form der β -Oxidation würde Propionyl-CoA nur die ersten zwei Schritte der β -Oxidation durchlaufen, als 3-Hydroxypropionyl-CoA in einen alternativen Prozess eintreten und schließlich zu Acetyl-CoA und CO_2 oxidiert. Tatsächlich wurde 3-Hydroxypropinat als Zwischenprodukt des Abbaus von ^{13}C -markiertem Propionat im Modellorganismus *Arabidopsis thaliana*, in einigen Insekten, dem Bakterium *Rhodococcus erythropolis* und dem Saccharomyceten *Candida rugosa* gefunden (Halarnkar & Blomquist, 1989; Hasegawa *et al.*, 1982;

Lee *et al.*, 2009; Miyakoshi *et al.*, 1987). Jedoch wurden bisher keine Gene oder Enzyme eindeutig einer modifizierten β -Oxidation von Propionyl-CoA zugeordnet. (Lucas, Filley, Erb, Graybill, & Hawes, 2007).

4 Zielsetzung

Das Ziel dieser Arbeit bestand in der Aufklärung des Katabolismus von Propionat und von Propionyl-CoA erzeugenden Kohlenstoffquellen in *C. albicans*.

Die Annotierung des *C. albicans* Genoms beruht zu großen Teilen auf Sequenzvergleichen mit dem Genom des eukaryotischen Modellorganismus *S. cerevisiae*. Neben vielen gemeinsamen Aspekten der Stoffwechselphysiologie, wurden bei vergleichenden Analysen auch zahlreiche Unterschiede sichtbar. Dies betrifft unter anderem die Existenz einer Vielzahl potentiell redundanter Isoenzyme, wie z.B. die Existenz von drei 3-Ketoacyl-Thiolasen in *C. albicans*, die an dem finalen Schritt der Fettsäure- β -Oxidation beteiligt sein könnten. Der Beitrag dieser Isoenzyme zum Fettsäurestoffwechsel bzw. deren Rolle in einem Stoffwechselweg zur Detoxifizierung von Propionyl-CoA sollte im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden. Bei der vorläufigen Annotierung des *C. albicans* Genoms wurden keine Gene für einen der bekannten Stoffwechselwege zum Abbau von Propionyl-CoA gefunden. Dieser Abbau verläuft in Säugetieren und einigen Bakterien über den Cobalamin-abhängigen Methylmalonyl-CoA-Weg. Da Pilze nicht zur Cobalamin-Synthese fähig sind, verwenden sie meist alternativ den Methylcitratzyklus zum Abbau von Propionyl-CoA. Aufgrund der toxischen Eigenschaften von Propionyl-CoA, das als Intermediat des Abbaus verschiedener Aminosäuren und Fettsäuren mit ungeradzahligem Kohlenstoffkette entsteht, muss *C. albicans* über einen alternativen Stoffwechselweg des Propionyl-CoA-Abbaus verfügen. Die Aufklärung dieses Stoffwechselweges ist von besonderem Interesse, da Störungen des Propionyl-CoA-Abbaus nachweislich die Virulenz opportunistischer Krankheitserreger signifikant senken können. Außerdem deutet sich hieraus ein weiterer wichtiger Unterschied zum Modellorganismus *S. cerevisiae* an. Ein speziesspezifischer Stoffwechselweg zum Abbau von Propionyl-CoA in *C. albicans* würde daher einen wichtigen Beitrag zum Verständnis des pathogenen Potentials dieses Pilzes leisten.

5 Publikationsliste

5.1 Publikation A

Phylogenetic and phenotypic characterisation of the 3-ketoacyl-CoA thiolase gene family from the opportunistic human pathogenic fungus
Candida albicans

Otzen, C.; Müller, S.; Jacobsen, I. D.; Brock, M. (2013)

In dieser Arbeit wurde der individuelle Beitrag dreier Acyl-CoA-Thiolasen zur β -Oxidation von Fettsäuren untersucht. Neben der Charakterisierung von Deletionsmutanten der Acyl-CoA Thiolasen *CaPOT1*, *CaFOX3* und *CaPOT13* wurde eine phylogenetische Analyse dieser Enzyme durchgeführt. In dieser erwies sich *CaPOT13* als evolutionäres Relikt ohne vitale Funktion. Ein Zusammenhang zwischen den Funktionen der Acyl-CoA-Thiolasen und der Virulenz von *C. albicans* konnte nicht dargestellt werden, womit Untersuchungen anderer Autoren bestätigt wurden (Piekarska *et al.*, 2006). Vergleichende Wachstumsanalysen ergaben außerdem Unterschiede der Verwertbarkeit einiger Fettsäuren für die Ascomyceten *C. albicans* und *Aspergillus fumigatus*.

Die Arbeiten zu dieser Publikation wurden unter Aufsicht von Dr. habil. M. Brock durchgeführt. Die Herstellung der Deletionsmutanten und die vergleichenden Wachstumsversuche wurden vom Erstautor durchgeführt. Die phylogenetische Analyse wurde von Dr. S. Müller erstellt. Die Hühnerei-Infektionsversuche wurden mit Beteiligung des Erstautors unter Aufsicht von Dr. habil. I. D. Jacobsen durchgeführt. Die Anzucht des *A. fumigatus* Wildtyps erfolgte durch Dr. habil. M. Brock. Das Manuskript wurde vom Erstautor und Dr. habil. M. Brock verfasst.

Der Substantielle Anteil der Arbeit (ca.70%) wurde vom Erstautor beigetragen.

Dr. habil. M. Brock

Veröffentlichte Publikation

FEMS Yeast Res.; **13** (6): 553-64

5.2 Publikation B

Candida albicans Utilizes a Modified β -Oxidation Pathway for the Degradation of Toxic Propionyl-CoA

Otzen, C.; Bardl, B.; Jacobsen, I. D.; Nett, M.; Brock, M. (2014)

Nach den Ergebnissen dieser Arbeit verbindet *C. albicans* peroxisomale Enzyme der β -Oxidation (CaFox2p) und zuvor uncharakterisierte mitochondriale Enzyme (CaEhd3p, CaHpd1p, CaAld6p) in einem Stoffwechselweg zum spezifischen Abbau von toxischem Propionyl-CoA. Der Metabolitenfluss, sowie die Lokalisation wichtiger Enzyme der modifizierten β -Oxidation und die spezifische Funktion einer 3-Hydroxypropionat-Dehydrogenase (CaHpd1p) konnte in dieser Arbeit dargestellt werden. Die Unterbrechung der modifizierten β -Oxidation führte bei *C. albicans* im murinen Infektionsmodell disseminierter Candidiasis zu verminderter Virulenz und ist daher offenbar ein wichtiger Faktor zur Etablierung systemischer Infektionen. Dieser Stoffwechselweg unterscheidet *C. albicans* von anderen filamentösen Pilzen und stellt möglicherweise eine spezifische Anpassung an dessen Lebensweise dar.

Die Arbeit wurde unter Aufsicht von Dr. habil. M. Brock durchgeführt. Die Identifizierung der Gene, die Herstellung der Deletionsmutanten und Reporterstämme, die Durchführung sämtlicher Wachstumsversuche und Lokalisierungsstudien wurden vom Erstautor durchgeführt. Unter Beteiligung des Erstautors war B. Bardl mit der Durchführung der GCMS- und HPLC-Messungen sowie Dr. habil. M. Nett mit den NMR-Messungen zur Darstellung des Metabolitflusses betraut. Die heterologe Expression und *in vitro*-Charakterisierung des Enzyms CaHpd1p erfolgte durch Dr. habil. M. Brock. Die Tierversuche wurden mit Beteiligung des Erstautors von Dr. habil. I. D. Jacobsen durchgeführt. Das Manuskript wurde vom Erstautor und Dr. habil. M. Brock verfasst.

Der substantielle Anteil der Arbeit (ca80%) wurde vom Erstautor beigetragen.

Dr. habil. M. Brock

Veröffentlichte Publikation

J Biol Chem.; **289** (12): 8151-69

6 Publikation A

Phylogenetic and phenotypic characterisation of the 3-ketoacyl-CoA thiolase gene family from the opportunistic human pathogenic fungus

Candida albicans

Otzen, C.; Muller, S.; Jacobsen, I. D.; Brock, M. (2013)

Veröffentlichte Publikation

FEMS Yeast Res.; **13** (6): 553-64

Phylogenetic and phenotypic characterisation of the 3-ketoacyl-CoA thiolase gene family from the opportunistic human pathogenic fungus *Candida albicans*

Christian Otzen¹, Sebastian Müller², Ilse D. Jacobsen³ & Matthias Brock^{1,4}

¹Microbial Biochemistry and Physiology, Leibniz Institute for Natural Product Research and Infection Biology, Hans Knoell Institute, Jena, Germany;

²Systems Biology/Bioinformatics, Leibniz Institute for Natural Product Research and Infection Biology, Hans Knoell Institute, Jena, Germany;

³Microbial Pathogenicity Mechanisms, Leibniz Institute for Natural Product Research and Infection Biology, Hans Knoell Institute, Jena, Germany and ⁴Institute for Microbiology, Friedrich-Schiller University, Jena, Germany

Correspondence: Matthias Brock, Microbial Biochemistry and Physiology, Leibniz Institute for Natural Product Research and Infection Biology, Hans Knoell Institute, Beutenbergstr. 11a, 07745 Jena, Germany. Tel.: ++49 (0) 3641 532 1710; fax: ++49 (0) 3641 532 0809; e-mail: Matthias.brock@hki-jena.de

Present address: Sebastian Müller, Department of Plant Sciences, University of Cambridge, Downing Street, Cambridge, CB2 3EA, UK

Received 8 March 2013; revised 24 May 2013; accepted 4 June 2013.
Final version published online 4 July 2013.

DOI: 10.1111/1567-1364.12057

Editor: Richard Calderone

Keywords

gene duplication; beta-oxidation; fatty acids; virulence; embryonated chicken eggs.

Introduction

Candida albicans is an important opportunistic pathogen of humans (Kim & Sudbery, 2011). This organism is frequently found as a commensal on mucosal surfaces such as the oral cavity, vaginal mucosa or the digestive tract (Gow & Hube, 2012). However, depending on the underlying health status of the host (surgery, broad spectrum antibiotics, immunosuppressive regimen), *C. albicans* can invade the surrounding tissues and may eventually cause life-threatening invasive and disseminated infections (Pfaller & Diekema, 2007; Sudbery, 2011). During invasive growth and dissemination, *C. albicans* is frequently confronted with different immune effector cells such as

Abstract

Gene families are common to all kingdoms of life and most likely derived from gene duplications with subsequent specification for the adaptation to environmental conditions. However, the exact contribution of single members to cellular physiology is difficult to predict. Here, we analysed a family of 3-ketoacyl-CoA thiolases composed of Pot1p, Fox3p and Pot13p from the dimorphic yeast *Candida albicans* and studied their contribution to fatty acid utilisation and virulence. The presence of three 3-ketoacyl-CoA thiolases in *C. albicans* contrasts the existence of only one single gene in closely related *Saccharomycetales* such as *Saccharomyces cerevisiae*. Phylogenetic analyses revealed that two of the thiolases, Pot1p and Fox3p, were closely related to the *S. cerevisiae* Pot1p. The third protein clustered with yet uncharacterised thiolases from filamentous fungi. Single, double and triple mutants were generated for phenotypic characterisations. While Pot1p was of general importance for utilisation of fatty acids, Fox3p partially contributed to fatty acid utilisation at elevated temperatures. No phenotype was detectable for *pot13* deletions. When virulence of the different mutants was assessed in an embryonated chicken egg infection model, no significant attenuation was observed for any of the mutants, confirming previous assumptions that β -oxidation is dispensable for *C. albicans* virulence.

macrophages or neutrophils that phagocytose *C. albicans* yeast cells (Cheng *et al.*, 2012). A special feature of *C. albicans* is its dimorphic growth behaviour, in which it can switch between yeast cell growth and filament formation (Shareck & Belhumeur, 2011). Thus, once phagocytosed, yeast cells can escape the hostile environment of phagocytes by the formation of hyphae that destroy the surrounding membranes of the phagocyte (Ghosh *et al.*, 2009). However, growth and hyphal elongation require uptake and utilisation of environmental nutrients that allow biomass formation and gain of energy (Brock, 2009; Fleck *et al.*, 2011).

Fatty acids are essential for the synthesis of cellular membranes and are ubiquitous in all living organisms.

However, besides the importance of fatty acid synthesis for cellular components, fatty acids also provide an energy-rich nutrient source. A common pathway for utilisation of fatty acids is the so-called β -oxidation pathway. Here, fatty acids are activated to the corresponding CoA ester (Black & DiRusso, 2007) followed by oxidation *via* an acyl-CoA dehydrogenase (or fatty acyl-CoA oxidase; depending on the subcellular localisation) in which a double bond is introduced forming an enoyl-CoA. A subsequent hydration of the double bond by an enoyl-CoA hydratase followed by a 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase leads to a 3-ketoacyl-CoA that finally releases an acetyl-CoA unit by the action of a 3-ketoacyl-CoA thiolase (Poirier *et al.*, 2006). This multistep process shortens the original fatty acid by two carbon units, and the cycle proceeds until the complete fatty acid is converted into acetyl-CoA units. In eukaryotes, a peroxisomal and mitochondrial localisation of the β -oxidation pathway has been described (Poirier *et al.*, 2006). However, although this also holds true for fungi, *Saccharomyces* seem to have lost the mitochondrial pathway and solely rely on the peroxisomal path (Shen & Burger, 2009).

Although microorganisms can use fatty acids as sole nutrient source, they simultaneously require the anaplerosis of oxaloacetate, which is a key intermediate of gluconeogenesis. This anaplerosis is generally performed by the so-called glyoxylate cycle, which is characterised by the key enzymes, isocitrate lyase and malate synthase, and leads to the generation of oxaloacetate from two acetyl-CoA units (Dunn *et al.*, 2009). Thus, glyoxylate cycle and fatty acid degradation appear as tightly linked metabolic pathways. To study the physiologic adaptation of yeast cells during the confrontation with macrophages, *S. cerevisiae* was used as a model. Gene expression analyses revealed that especially expression of genes from the glyoxylate cycle was highly induced (Lorenz & Fink, 2001). Similarly, Northern blot analyses on *C. albicans* cells phagocytosed by macrophages showed a high abundance of isocitrate lyase and malate synthase RNA. Due to the fact that *C. albicans* isocitrate lyase mutants showed significant attenuation in virulence, it was concluded that fatty acids or their breakdown products might provide an important nutrient source during the infection process (Lorenz & Fink, 2001, 2002). A more detailed analysis of the transcriptome of *C. albicans* cells phagocytosed by macrophages confirmed the induction not only of glyoxylate cycle genes, but also of genes essential for fatty acid β -oxidation and genes required for gluconeogenesis. These analyses further supported the idea of an important role of fatty acids as nutrients during pathogenic growth (Lorenz *et al.*, 2004).

On the other hand, studies directly addressing the importance of β -oxidation implied that utilisation of

fatty acids during pathogenesis of *C. albicans* might be dispensable (Piekarska *et al.*, 2006). A homozygous *pex5* mutant defective in peroxisomal import was unable to use oleic acid as a nutrient source. However, when subsequently tested in a murine model for systemic candidiasis, no attenuation in virulence was observed. By contrast, a *fox2* mutant that was simultaneously analysed in this study revealed attenuation in virulence similar to that of isocitrate lyase mutants. Fox2p is the bifunctional peroxisomal enoyl-CoA hydratase/3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase and also essential for the utilisation of fatty acids. This result implied that fatty acid oxidation might indeed be important for virulence. However, a *fox2* mutant was impaired for growth not only on fatty acids, but also on other nonfermentable carbon sources such as acetate, ethanol or lactate. Therefore, it was assumed that the virulence defect of a *fox2* mutant might have been due to a general dysfunction of peroxisomes (Piekarska *et al.*, 2006). This assumption was supported by a more detailed analysis of the *fox2* mutant that revealed the production of giant peroxisomes (Piekarska *et al.*, 2008). This observation is in agreement with aberrant peroxisome morphology in human fibroblasts from patients with disorders in the 3-hydroxyacyl-CoA dehydratase/3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase (Funato *et al.*, 2006). It was therefore speculated that in *C. albicans*, the aberrant peroxisome morphology might hinder the transport of metabolites required for the peroxisomal glyoxylate cycle. Indeed, combination of the *fox2* deletion with a deletion of *pex5* restored growth on nonfermentable nutrient sources due to a redirection of the glyoxylate cycle to the cytoplasm (Piekarska *et al.*, 2008). Unfortunately, a final confirmation of the minor importance of β -oxidation in virulence by testing the double mutant in a murine infection model had not been described.

Besides the uncertainty on the exact impact of β -oxidation on virulence of *C. albicans*, it remains unclear which of the genes present in the *C. albicans* genome are essential for the metabolism of fatty acids. Although *C. albicans* only contains a single enoyl-CoA hydratase/3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase encoded by *FOX2*, the genome sequence displays several enzyme isoforms for all other reactions of this pathway. *FAA2-1*, *FAA2-2*, *FAA2-3*, *FAA2-4* and *FAA4* seem to encode enzymes activating fatty acids to the corresponding CoA esters. *POX1*, *POX2* and *POX1-3* seem to encode acyl-CoA oxidases, and finally, *POT1*, *FOX3* and *POT13* (the latter also known as *POT1-2*) have been annotated as 3-ketoacyl-CoA thiolase releasing the acetyl-CoA units from the oxidised fatty acids.

In this study, we performed phylogenetic analyses on the 3-ketoacyl-CoA thiolases to identify their evolutionary origin. Furthermore, we constructed single, double and

triple mutants to investigate the impact of the three 3-ketoacyl-CoA thiolases on the metabolism of fatty acids. Finally, the respective mutants were tested in a chicken embryo infection model to address the question of the importance of β -oxidation in virulence.

Materials and methods

Phylogeny and tree construction

To investigate the relationship among Pot1p, Pot2p and Pot13p within basidiomycota and ascomycota, we performed a search using the BLAST module of EPOS 0.92svn (Griebel *et al.*, 2008) using various thiolase protein sequences as template sequences. For each query, the most similar sequences were retrieved until one of the other two sequences was found. All sequences in between were kept to ensure a maximum resolution for inferring the relationship among the three thiolases as well as an appropriate placement in the phylogeny. After removing redundant sequences, such as duplicates, the search resulted in a set of 141 sequences (see Supporting Information, Table S1). Sequences were aligned with the CLUSTALW module of Epos. Because the appropriate substitution model was not known for reconstructing a phylogenetic tree, we employed ProtTest 2.4 (Abascal *et al.*, 2005), which resulted in the LG matrix being the most appropriate substitution model, followed by the WAG and JTT matrices. For reconstructing the phylogenetic tree, we applied a maximum-likelihood approach applying the RAxML module of Epos and setting the JTT matrix as substitution model because the LG and WAG matrices were not available and performed 500 runs to obtain bootstrap values. The resulting tree was subsequently rooted using *Candida albicans* Erg10p (XP_710124) as outgroup.

Additionally, pairwise distances among the thiolases were calculated using the Prodist module of the PHYLIP package (Felsenstein, 1989) and using the WAG model due to the absence of an LG model. These distances were used to obtain an accurate measure of evolutionary proximity among the thiolases.

Media and culture conditions

For routine cultivation, *C. albicans* strains were grown in 20 mL YPD medium (1% yeast extract, 2% peptone and 2% glucose) at 30 °C and 200 rpm on a rotary shaker. For growth analyses in dependence of the carbon source, a chemically defined *Candida* minimal medium (CMM) without proline (Dumitru *et al.*, 2004) but with ammonium sulphate was used. For plate assays, 2% agar was added prior to sterilisation. CMM contained per litre:

4 g KH_2PO_4 , 3.2 g NaH_2PO_4 , 5 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.7 g $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$. This mixture was adjusted to pH 6.5, sterilised and supplemented with 0.0075% sterile mineral stock (composition per 100 mL in 0.1 M HCl: 0.5 g $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{ H}_2\text{O}$, 0.5 g $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$, 0.8 g $\text{MnCl}_2 \times 4 \text{ H}_2\text{O}$, 0.5 g FeSO_4) and 0.03% vitamin stock solution (composition per 100 mL in 20% ethanol: 2 mg biotin, 20 mg thiamine/HCl, 20 mg pyridoxine/HCl). Fatty acids were either added to a final concentration of 0.15% (w/v) as sodium salts or neutralised prior to supplementation. The following fatty acids were used: butyrate (C4), hexanoate (C6), caprylate (C8), decanoate (C10), laurate (C12), myristate (C14), palmitate (C16), palmitoleic acid (C16:1; *cis*-9), stearate (C18), oleic acid (C18:1; *cis*-9), linoleic acid (C18:2; *cis*, *cis*-9, 12) and linolenic acid (C18:3; *cis*, *cis*, *cis*-9, 12, 15). Glucose and acetate were used in a range between 0.5% and 2% (w/v). Similarly, when growth of the *A. fumigatus* wild-type strain CBS144.89 was tested, the same fatty acids and concentrations as described for *C. albicans* were used. As basal medium for *A. fumigatus* cultivations, the *Aspergillus* minimal medium (pH 6.5) with Hutner's trace elements was used (<http://www.fgsc.net/methods/anidmed.html>), but nitrate was replaced by ammonium sulphate. To visualise faint mycelial growth on plates, 0.2% charcoal was added to solid media prior to sterilisation.

Media for phenotypic characterisation of *C. albicans* mutants

To test different stress parameters on *C. albicans* mutants, various test compounds were added to solid media. As basal medium, CMM with 1% glucose and with mineral and vitamin solution was used. The following compounds were added (final concentration): 350 and 450 $\mu\text{g mL}^{-1}$ Congo red; 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$ calcofluor-white; 30 mM DTT; 0.01% SDS; 1 M, 1.3 M and 1.5 M sodium chloride; 800 $\mu\text{g mL}^{-1}$ hygromycin B; and 1 mM hydrogen peroxide. Additionally, growth analyses were performed, in which the ammonium sulphate concentration was reduced to either 1 or 5 mM. Furthermore, in terms of the carbon source utilisation, glucose was replaced by 2% ethanol.

Growth tests of gene deletion mutants

Candida albicans mutants and complemented strains were pregrown in two consecutive 20 mL YPD cultures and washed three times with ice-cold PBS. Cells were adjusted to about 3.3×10^5 cells per μL and serially diluted (1 : 10 dilutions). From each dilution, 3 μL was spotted onto CMM agar plates containing the respective carbon source or stress-inducing compound. Plates were incu-

bated at 30 and 37 °C. Photographs were taken after 1 day (YPD), 2 days (glucose) and 4 days (acetate and fatty acids). Growth assays were carried out at least twice with two independent deletion strains. For testing stress sensitivity, growth assays were carried out twice with one deletion strain at both 30 and 37 °C. Photographs were taken after 3 days. To confirm the inability of *pot1* mutants to grow on long-chain fatty acids, CMM liquid medium was supplemented with oleic acid and inoculated with either the wild-type SC5314 or the *pot1* mutant strains. Growth was monitored by removing aliquots and counting of cells in a Neubauer chamber.

Generation of deletion mutants

POT1, *POT13*, *FOX3*, *FOX2* mutants and combinations thereof were all generated by the same gene deletion strategy using the reusable SAT1 flipper cassette (nourseothricin resistance) to select for transformants (Reuss *et al.*, 2004). About 200–500 bp of the flanking regions of the corresponding open reading frame was amplified by PCR. For a complete list of oligonucleotides used in this study, refer to Table S2. The following pairs of oligonucleotides were used: *POT1* 5'-flank = P11 + P12; *POT1* 3'-flank = P13 + P14; *POT13* 5'-flank = P23 + P24; *POT13* 3'-flank = P25 + P26; *FOX3* 5'-flank = P17 + P18; *FOX3* 3'-flank = P19 + P20; *FOX2* 5'-flank = P1 + P2; *POT1* 3'-flank = P3 + P4. All PCR products were cloned into the PCR cloning vector pJET1.2 (Fermentas). The resulting plasmids were digested with either *ApaI* and *XhoI* for the 5'-flanking regions or *SacI* and *SacII* for the 3'-flanking regions. Both fragments of the corresponding open reading frame were subsequently cloned into the respective cloning sites of plasmid pSSU1 surrounding the SAT1 flipper cassette. This resulted in a SAT1 gene flanked by the upstream and downstream untranslated regions of the gene of interest. Plasmids were digested with *ApaI* and *SacI* prior to transformation of *C. albicans* by electroporation. As parental strain for gene deletions, the wild-type strain SC5314 was used.

Transformation, marker regeneration and mutant analysis

The electroporation was conducted with 1.6 kV, 200 Ω and 25 μF for 5 ms as described previously (Reuss *et al.*, 2004). After addition of 1 M sorbitol, the volume was separated into two aliquots (pools A and B). Cells were regenerated by incubation in liquid YPD medium at 30 °C without shaking for at least 4 h with subsequent colony formation on YPD agar plates containing 100 μg mL⁻¹ nourseothricin (Werner Bioagents, Jena, Germany). Transformants were generally visible 48 h after

transformation. To regenerate the nourseothricin selection marker for deletion of the second allele, clones from pools A and B were incubated with 20 mL YPM (1% yeast extract, 2% peptone and 2% maltose per litre) for at least 18 h at 30 °C and 200 rpm and subsequently screened for nourseothricin sensitivity. Resulting strains were checked by PCR analyses for the loss of the SAT1 flipper cassette, and one clone from each A and B pool was used for the deletion of the second allele. Homozygous mutants were identified by PCR using the 5'-oligonucleotide for the amplification of the 5'-flanking region and a specially designed 3'-deletion control oligonucleotide that binds within the corresponding open reading frame (see Table S3). Additionally, homozygous gene deletions were confirmed by Southern blot analyses (data not shown).

Complementation of deletion mutants

For complementation of homozygous deletion mutants, the SAT1 flipper was removed from the second allele as described above. One allele was re-introduced into deletion strains as described previously (Reuss *et al.*, 2004). In brief, the 5'-flanking region of the gene together with its corresponding open reading frame was amplified by PCR and cloned into the pJet1.2 vector and subsequently transferred into the vector pSAP2KS1 that contains the SAT1 cassette. Then, the 3'-flanking region of the respective gene was cloned downstream of the SAT1 cassette. In case of the *FOX2* complementation, the removal of an internal *SacI* restriction site was required, which was performed by fusion PCR, leading to a conservative base exchange at positions 2354–2359. Transformation of mutants was carried out according to the protocol used for gene deletions and resulted in a complementation at the original locus. To remove the nourseothricin resistance marker, complemented strains were grown in YPM (10 g yeast extract, 20 g peptone and 20 g maltose per litre) for 18 h at 30 °C and 200 rpm on a rotary shaker. The successful excision of the resistance marker was confirmed by screening for nourseothricin resistance and subsequent Southern blot analysis (data not shown).

Chicken embryo infection model

Virulence studies using the chicken embryo infection model were performed as described previously (Jacobsen *et al.*, 2011). In brief, fertilised 'weiße Leghorn' chicken eggs were obtained from a local breeder and stored at 8 °C for a maximum of 7 days prior to incubation. Incubation was performed at 37.6 °C and 50–60% relative humidity in a specialised incubator (BSS 300; Grumbach, Germany). Vitality of embryos was assessed daily by candling, and infection on the chorioallantoic membrane

(CAM) at developmental day 10 was performed by applying a 0.1-mL inoculum in PBS containing 1×10^7 yeast cells from a fresh YPD culture on top of the artificial air chamber. The holes were sealed with paraffin and survival monitored for up to 7 days. Twenty eggs were infected for each group. Survival data were plotted as Kaplan–Meier curves and were statistically analysed by log rank test using GRAPHPAD PRISM version 5.00 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA).

Results

Phylogeny of *C. albicans* 3-ketoacyl-CoA thiolases

Analysis of the *C. albicans* genome revealed three 3-ketoacyl-CoA thiolase candidate genes (*POT1*, *POT13* and *FOX3*) contrasting the presence of the single 3-ketoacyl-CoA thiolase Pot1p in *S. cerevisiae*. To analyse the phylogenetic relationship of the *C. albicans* 3-ketoacyl-CoA thiolases with enzymes from other fungi, a phylogenetic tree was generated that contained sequences mainly from *Saccharomycotina* and *Pezizomycotina* from the phylum *Ascomycota* and 3-ketoacyl-CoA thiolases from *Basidiomycota*. Acetoacetyl-CoA thiolases were used as outgroup in the tree construction.

All protein sequences (141 sequences) were checked by MITOPROT (<http://ihg.gsf.de/ihg/mitoprot.html>) and pTARGET (<http://golgi.unmc.edu/ptarget/>) for the subcellular localisation, that is, peroxisomes vs. mitochondria. In case different localisations were predicted by both tools, the MITOPROT result was preferred when a N-terminal cleavage site for the import signal peptide was detected. Subsequently, the phylogenetic tree was reconstructed by a maximum-likelihood approach using the JTT matrix as substitution model.

Analysis of the phylogenetic tree (Fig. 1) indicated that *C. albicans* Pot1p and Fox3p are closely related and clustered with Pot1p from *S. cerevisiae*. All enzymes from this clade seem to encode peroxisomal enzymes, which is in agreement with the assumption that β -oxidation in yeasts is limited to this compartment due to the presence of only a single bifunctional enoyl-CoA hydratase/3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase located in the peroxisomes (Shen & Burger, 2009). In contrast, Pot13p, which has conserved homologues in other yeasts from the CUG clade, seems to contain a functional signal peptide for mitochondrial import and clustered with ketoacyl-CoA thiolases from *Pezizomycotina* of either peroxisomal or mitochondrial localisation.

To confirm the close relationship of *C. albicans*, Pot1p and Fox3p, with *S. cerevisiae* Pot1p and the more distantly relation of Pot13p, phylogenetic distances were

calculated (Table 1). Indeed, *C. albicans* Pot1p and Fox3p had a similar distance to *S. cerevisiae* Pot1p, but were even more closely related to each other. In contrast, Pot13p showed a very distant relationship to either of the other thiolases. Thus, while Pot1p and Fox3p may have evolved from an evolutionary recent gene duplication event, evolution of Pot13p was not directly linked to this event and may have derived from an ancient ketoacyl-CoA thiolase precursor that also led to the evolution of 3-ketoacyl-CoA thiolases in other fungi.

Growth of *C. albicans* and *A. fumigatus* on fatty acids of different chain length

To test the utilisation of saturated and unsaturated fatty acids of different chain length by *C. albicans*, we performed growth experiments on plates that were incubated at either 30 or 37 °C. For comparison, the filamentous ascomycete *Aspergillus fumigatus* was tested in parallel (Fig. 2), because Aspergilli are assumed to possess both mitochondrial and peroxisomal β -oxidation pathways (Hynes *et al.*, 2008).

Growth of *A. fumigatus*, which can grow at temperatures of up to 55 °C, was generally enhanced at elevated temperatures (data not shown), whereas *C. albicans* showed similar growth at 30 and 37 °C.

Fatty acids with a chain length of eight or ten C atoms supported growth neither of *A. fumigatus* nor of *C. albicans*, supporting earlier observations that these fatty acids possess an antimicrobial activity (Legras *et al.*, 2010). *C. albicans* was also unable to grow on fatty acids with a chain length of 12 C atoms, whereas *A. fumigatus* was able to utilise this fatty acid (Fig. 2). However, when fatty acids with a chain length of 8–12 C atoms were added in a concentration of 0.15% to media containing 100 mM glucose, growth of neither *C. albicans* nor *A. fumigatus* was supported. This indicates that these fatty acids can cause toxic effects in the presence of alternative nutrient sources. Differences between *C. albicans* and *A. fumigatus* were also observed on unsaturated fatty acids. *A. fumigatus* utilised all unsaturated fatty acids including linoleic (C18:2) and linolenic acid (C18:3), but the latter fatty acids did not support growth of *C. albicans*. This observation is in agreement with the increased number of thiolases present in the genome of filamentous fungi (see also Fig. 1) and the existence of a mitochondrial pathway for fatty acid β -oxidation (Shen & Burger, 2009).

Generation of *C. albicans* 3-ketoacyl-CoA thiolase mutants

To study the contribution of the three 3-ketoacyl-CoA thiolases Pot1p, Pot13p and Fox3p, specific gene deletions on both alleles were performed to obtain homozygous

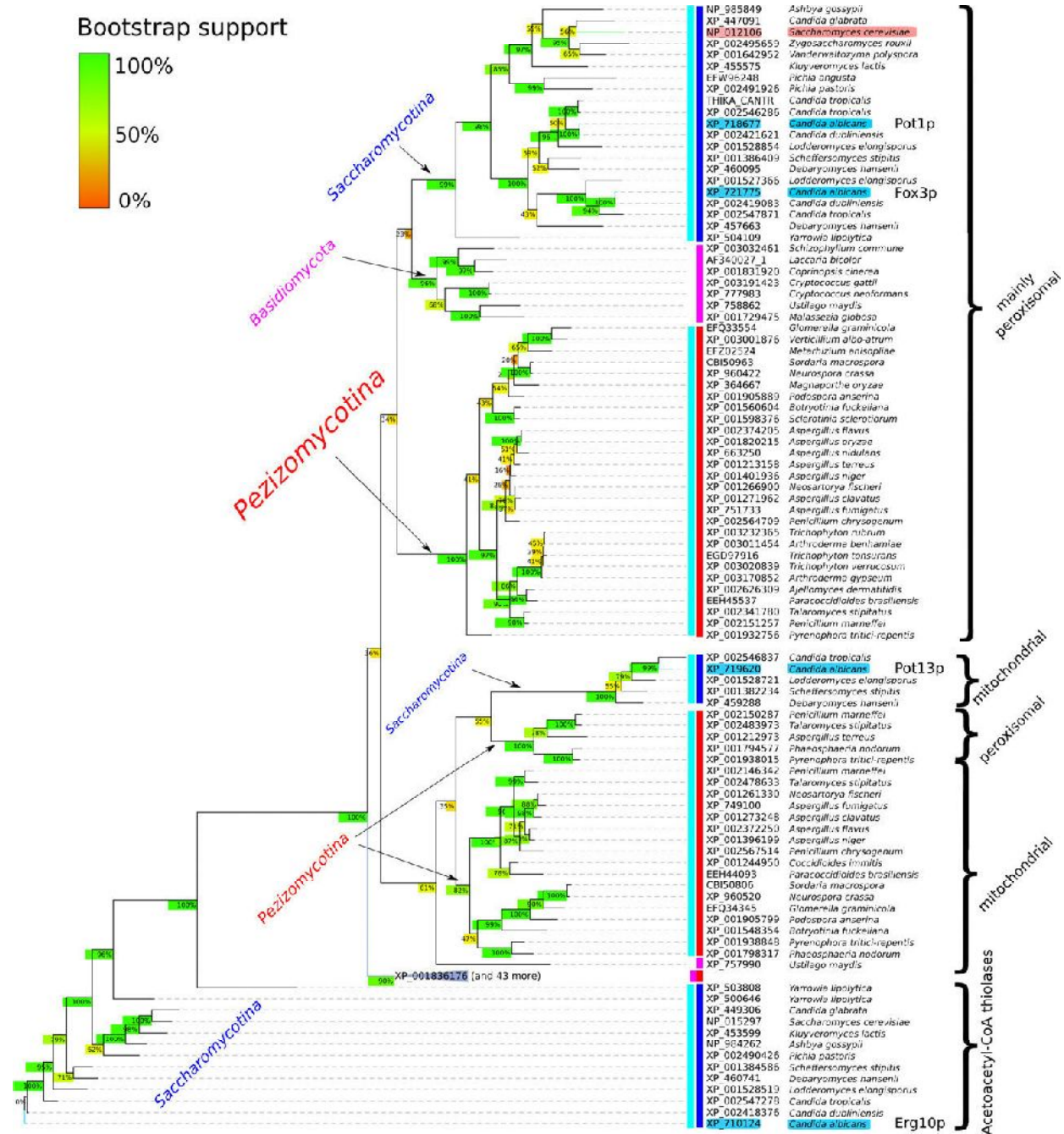


Fig. 1. Phylogenetic tree of 3-ketoacyl-CoA thiolases from fungal phyla of *Ascomycetes* and *Basidiomycetes*. Affiliation to respective phyla is indicated by vertical colour bars: *Pezizomycotina* (red), *Basidiomycota* (purple), *Saccharomycotina* (dark blue) and *Ascomycotina* (light blue). Erg10p thiolases shown at the bottom served as outgroup. A clade above Erg10 thiolases consisting of *Pezizomycotina* thiolases (mainly predicted to be mitochondrial) is collapsed, but respective sequences are listed in Table S1. *C. albicans* thiolases as well as *S. cerevisiae* 3-ketoacyl-CoA thiolase are highlighted using blue and orange background colours, respectively. Bootstrap support for each branch is coloured according to the legend on the top left. NCBI accession numbers are listed left alongside their corresponding species name. Note the clustering of CUG clade Pot1p and Fox3p with *S. cerevisiae* Pot1p, whereas Pot13p clustered with distantly related 3-ketoacyl-CoA thiolases from *Pezizomycotina*.

mutants. We also constructed a double mutant deleted in *POT1* and *FOX3* and a triple mutant with all three 3-ketoacyl-CoA thiolase coding genes deleted. As control,

we generated a strain deleted in the *FOX2* gene encoding the bifunctional enoyl-CoA hydratase/3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase. Because no other Fox2p homologue exists

Table 1. Phylogenetic distances of *C. albicans* Pot1p, Fox3p, Pot13p and Erg10p with *S. cerevisiae* Pot1p. The close phylogenetic relationship between Pot1p, Fox3p and *S. cerevisiae* Pot1p is highlighted by bold numbers

	CaPot1p	CaFox3p	CaPot13p	ScPot1p	CaErg10p
CaPot1p	0	0.485	1.068	0.618	1.638
CaFox3p	0.485	0	0.997	0.661	1.643
CaPot13p	1.068	0.997	0	1.009	1.649
ScPot1p	0.618	0.661	1.009	0	1.737
CaErg10p	1.638	1.643	1.649	1.737	0

in *C. albicans*, it can be assumed that degradation of all fatty acids is dependent on this enzyme. All gene deletions were performed in the genetic background of the *C. albicans* wild-type strain SC5314. Subsequently, all mutants were complemented by re-introducing the respective deleted gene(s) on one allele. None of the 3-ketoacyl-CoA thiolase single, double or triple mutants displayed a significantly altered growth phenotype under osmotic stress, in the presence of hydrogen peroxide and the stressors calcofluor-white and Congo red (data not shown). Thus, in the presence of glucose, 3-ketoacyl-CoA thiolases appear dispensable for stress resistance.

Utilisation of fatty acids by 3-ketoacyl-CoA thiolase mutants

To assess the specific contribution of the 3-ketoacyl-CoA thiolases in the utilisation of fatty acids, we inoculated the same set of plates as used for the determination of fatty acid utilisation by the wild-type strain and incubated plates at 30 and 37 °C. As expected from wild-type analyses, none of the mutants was able to grow on fatty acids with a chain length of 8–12 C atoms, linoleic (C18:2) and linolenic acid (C18:3) (data not shown). Furthermore, as already described by others (Piekarska *et al.*, 2006), the *fox2Δ/Δ* strain showed reduced growth on acetate and was unable to grow on any of the fatty acids (Fig. 3). This confirms that this bifunctional enoyl-CoA hydratase/3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase is of general essential importance for fatty acid metabolism.

In contrast to the *fox2Δ/Δ* strain, the *pot13Δ/Δ* strain revealed no growth defect and grew identical to the wild type on all fatty acids tested (Fig. 3). Similarly, Fox3p appears dispensable when cells are grown at 30 °C, revealing only a slight reduction in colony formation in the presence of some fatty acids. However, at 37 °C, growth of a *fox3Δ/Δ* strain was impaired on virtually all fatty acids tested, with the strongest effect on fatty acids with a chain length of 14 and 16 C atoms.

In comparison with the *pot13Δ/Δ* and the *fox3Δ/Δ* strains, deletion of the *POT1* gene had the most severe

phenotype (Fig. 3). Except on butyrate, where some residual growth was observed, the *pot1Δ/Δ* mutant showed the same phenotype as the enoyl-CoA hydratase/3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase mutant *fox2Δ/Δ*. Thus, although growth analyses imply that Fox3p contributes to the utilisation of fatty acids especially at elevated temperatures, Pot1p is the most important 3-ketoacyl-CoA thiolase. Furthermore, the phenotype of *pot1Δ/Δ* was dominant in the double- and triple-deletion mutants (Fig. 3). Although weak colony spots were observed at longer chain length at the highest inoculation dose (Fig. 3), the *pot1* single, double and triple mutants were unable to grow on these fatty acids as tested on liquid media containing oleic acid (not shown). While the wild type showed a rapid increase in cell number, the mutants did not show growth even after four days at 30 °C. Therefore, spots on these plates seem to derive from intact cells added at inoculation, whereas the lack of spots at fatty acids with shorter chain length appears due to toxic effects and cell lysis. Therefore, no alternative pathway for the utilisation of fatty acids seems to exist in *C. albicans*. All strains were complemented on one allele, which restored the respective parental phenotype (Supporting Information, Fig. S1).

Virulence studies in a chicken embryo infection model

To address the question of the contribution of ketoacyl-CoA thiolases on virulence, a chicken embryo model was used. In this model system, yeast cells are applied to the chorioallantoic membrane at day 10 of embryonic development. Infection is characterised by hyphal formation, invasive growth and a strong proinflammatory immune response. Therefore, this model reflects aspects of systemic *C. albicans* infections in mice (Jacobsen *et al.*, 2011). To assess virulence, groups of 20 embryonated eggs were infected with 1×10^7 yeast cells of the respective 3-ketoacyl-CoA thiolase mutants. Survival of embryos was monitored daily for 7 days. Evaluation of survival curves (Fig. 4) revealed no attenuated virulence for any of the mutants. Thus, although eggs are rich in phospholipids, the penetration of the chorioallantoic membrane and subsequent invasion of blood vessels appear independent of fatty acid degradation.

Discussion

In this study, we analysed the phylogeny of the three ketoacyl-CoA thiolases present in the genome of *C. albicans* and investigated their contribution to fatty acid degradation and virulence. Additionally, we compared the ability to utilise different fatty acids between the filamentous ascomycete *A. fumigatus* and *C. albicans*.

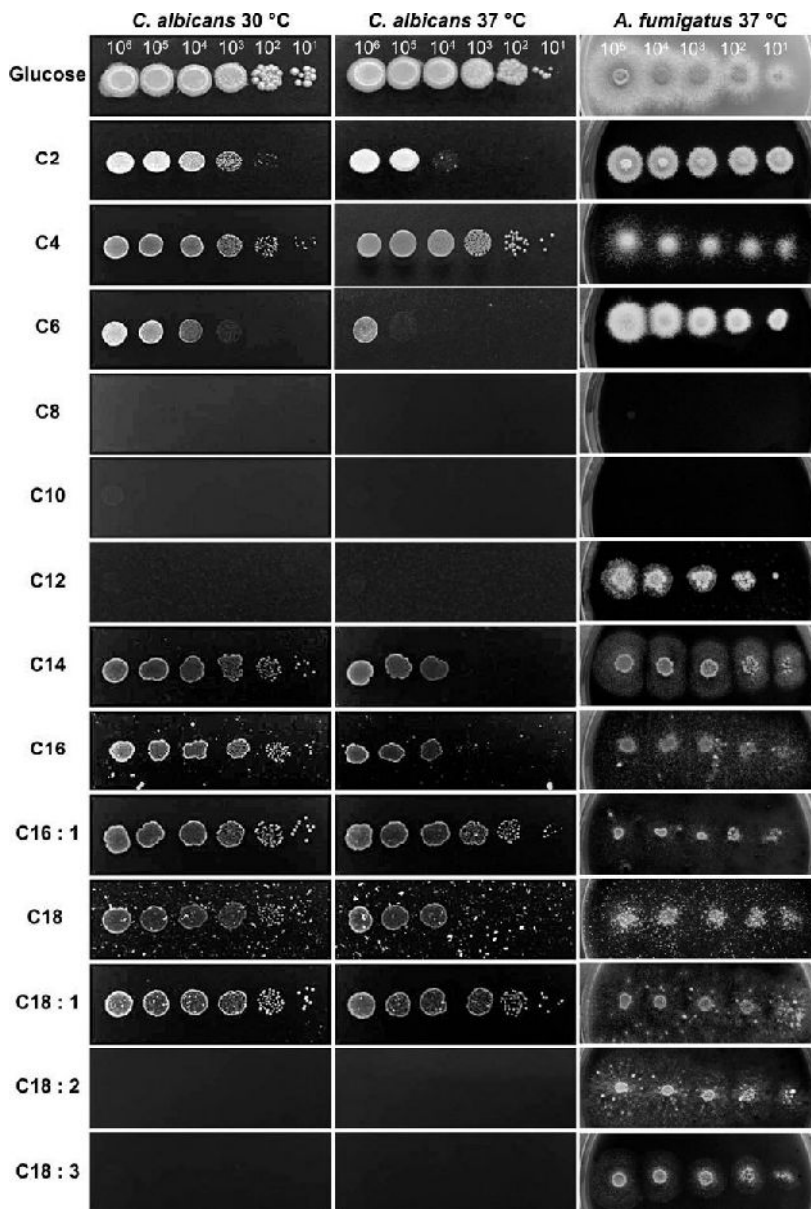


Fig. 2. Growth of *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus* on fatty acids of different chain lengths. Minimal media have been supplemented with the following carbon sources: glucose; acetic acid = C2; butyric acid = C4; hexanoic acid = C6; caprylic acid = C8; capric acid = C10; lauric acid = C12; myristic acid = C14; palmitic acid = C16; palmitoleic acid = C16:1; stearic acid = C18; oleic acid = C18:1; linoleic acid = C18:2; linolenic acid = C18:3. *C. albicans* yeast cells or *A. fumigatus* conidia were spot-inoculated in 10-fold dilutions as indicated. Plates were incubated for 48–72 h at 30 or 37 °C. Note that plates that did not reveal growth after 72-h incubation were incubated further for up to 7 days without visible colony formation.

Both fungi were unable to grow on octanoic and decanoic acid. This is in agreement with previous studies showing that these fatty acids passively diffuse over the membranes, leading to a proton influx that leads to a collapse of the internal proton gradient when not counteracted by the activity of proton export pumps (Stevens & Hofmeyr, 1993). However, *C. albicans* was also unable to grow on dodecanoate that supported growth of *A. fumigatus* to some extent (Fig. 2). Because in this study media for both *C. albicans* and *A. fumigatus* were adjusted to pH 6.5, we can exclude that this difference in growth was due to pH effects, which affects the amount of the free acid of the respective fatty acid and may alter

growth phenotypes as previously observed in studies on CoA-transferase mutants (Fleck & Brock, 2008, 2009). Therefore, our results imply that in *C. albicans*, dodecanoic acid may diffuse at higher rates over the membranes causing intracellular collapse of the proton potential. Alternatively, fatty acyl-CoA synthetases in *A. fumigatus* might possess a higher activity for activation of this fatty acid, thereby reducing its toxicity. Nevertheless, when either of these fatty acids was used in combination with glucose, neither *C. albicans* nor *A. fumigatus* was able to grow. This is in agreement with studies on the killing efficiency of fatty acids on *C. albicans* that showed that especially capric acid (C10) and lauric acid (C12) possess a high activity to

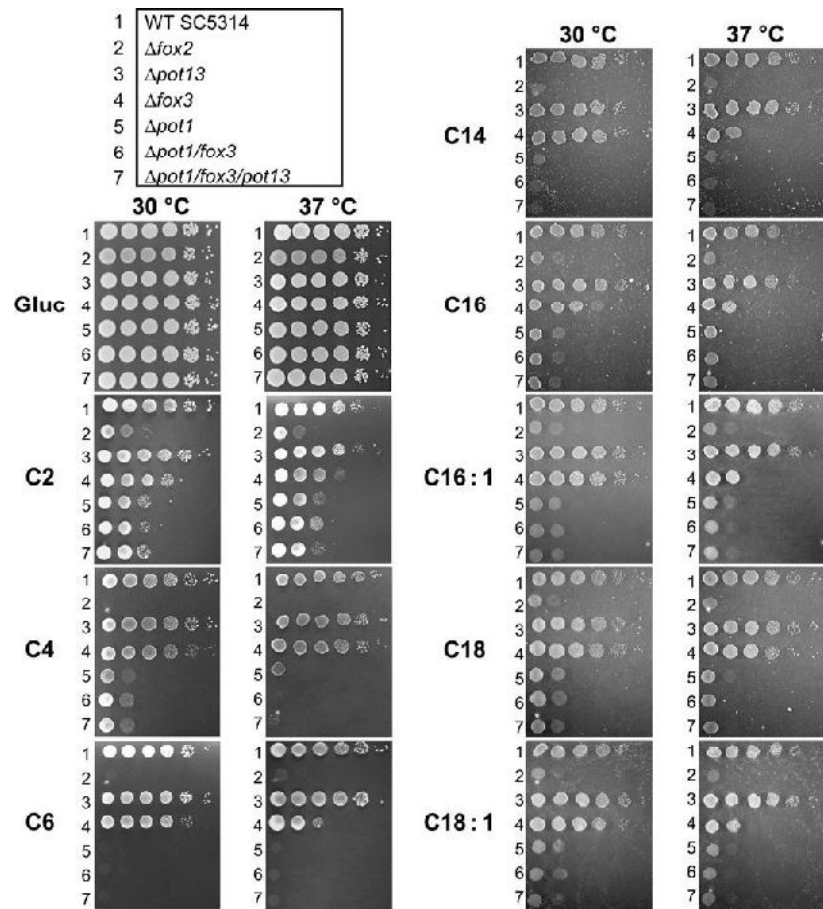


Fig. 3. Growth analysis of *Candida albicans* 3-ketoacyl-CoA thiolase mutants in comparison with a FOX2 deletion mutant and the parental wild-type strain SC5314. Incubation was performed at 30 and 37 °C. Tenfold dilutions were spotted on plates in the order depicted in the scheme at the top. No growth was observed for any of the strains on caprylic acid, capric acid, lauric acid, linoleic acid and linolenic acid and is therefore not shown (see also Fig. 2). Growth on the following carbon sources is presented: glucose; acetic acid = C2; butyric acid = C4; hexanoic acid = C6; myristic acid = C14; palmitic acid = C16; palmitoleic acid = C16:1; stearic acid = C18; oleic acid = C18:1.

inactivate *C. albicans* cells (Bergsson *et al.*, 2001). Interestingly, *C. albicans* was also unable to utilise long-chain highly unsaturated fatty acids such as linoleic and linolenic

acid, but the reason for this remains unclear. However, previous investigations on fatty acids present in bovine whey revealed that long-chain unsaturated and especially

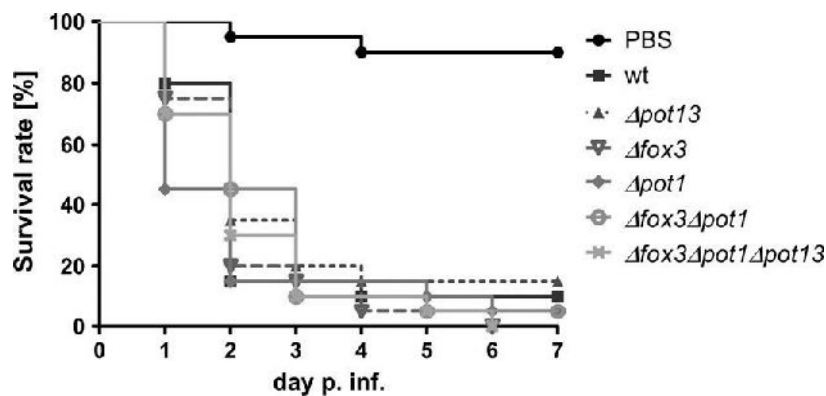


Fig. 4. Virulence test in an embryonated chicken egg infection model. Virulence was determined for all thiolase single mutants and the double and the triple mutants. Eggs were infected at developmental day 10 with 1×10^7 yeast cells, and viability was monitored for a total of seven days. PBS mock infection served as control. Data present values from 20 eggs per group, and survival data were plotted as Kaplan–Meier curves and statistically analysed by log rank test. None of the mutants showed a statistically significant alteration in virulence in comparison with the wild type.

polyunsaturated fatty acids such as linoleic acid efficiently inhibited germ tube formation of *C. albicans* yeast cells (Clément *et al.*, 2007). In contrast, the growth-supporting effect of these fatty acids on *A. fumigatus* implies that an extended armetarium of *A. fumigatus* fatty acid utilisation enzymes allows utilising a broadened spectrum of fatty acids.

Phylogenetic analysis revealed that the two enzymes Pot1p and Fox3p clustered closely with the single *S. cerevisiae* 3-ketoacyl-CoA thiolase Pot1p. Furthermore, the third *C. albicans* 3-ketoacyl-CoA thiolase Pot13p contains a putative mitochondrial import sequence and clustered with peroxisomal and mitochondrial 3-ketoacyl-CoA thiolase from filamentous ascomycetes. This result was rather unexpected because *C. albicans* only contains a single peroxisomal enoyl-CoA hydratase/3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase and has been assumed to possess no mitochondrial pathway for the degradation of fatty acids (Shen & Burger, 2009). This raises the question why three 3-ketoacyl-CoA thiolases are present in the CUG clade of the *Saccharomycetaceae* but not in other relatives of this family.

First, the existence of Pot13p is difficult to explain. Without an additional enoyl-CoA hydratase that acts within mitochondria, fatty acid degradation is interrupted, and no mitochondrial 3-ketoacyl-CoA thiolase would be required to be maintained within the genome. However, due to its phylogenetic relationship with enzymes from other ascomycetes, Pot13p might have been maintained from a common ancestor of the ascomycetes that has already been lost in other *Saccharomycetaceae* during or after the separation of the CUG clade (Dujon *et al.*, 2004). In agreement with this assumption, no altered phenotype of a *pot13* mutant was observed in regard to stress response, fatty acid degradation and virulence. However, we cannot exclude that Pot13p acts as a thiolase on a fatty acid-like substrate that has not been produced or was not present under the applied conditions. Nevertheless, under standard growth conditions and during virulence, this enzyme seems to be completely dispensable.

In contrast to Pot13p, the enzymes Pot1p and Fox3p seem to have derived from a gene duplication event specific for *Saccharomycetaceae* from the CUG clade. Due to the closer phylogenetic distance of *C. albicans* Pot1p to *S. cerevisiae* Pot1p, it appears that *POT1* was the parental gene that had been duplicated after the whole-genome duplication that marked the separation of the *Candida* CUG clade. The benefit from this duplication might derive from a supportive function in β -oxidation at elevated temperatures as deduced from markedly reduced growth of the *fox3* mutant at 37 °C. However, Fox3p might only have a supportive function because *POT1* was

essential on all fatty acids tested. Nevertheless, gene duplication and subsequent specification of the resulting duplicates for a specific environmental condition or to encounter new substrates for metabolism appear common among fungi (Müller *et al.*, 2011; Fazius *et al.*, 2012), and *FOX3* adds another example for such a process.

Despite the essential need for 3-ketoacyl-CoA thiolases, especially Pot1p, for fatty acid metabolism, none of the mutants displayed attenuation in virulence when tested in an embryonated chicken embryo model. Therefore, we conclude that although glyoxylate cycle and fatty acid beta-oxidation are induced during host–pathogen interactions and isocitrate lyase mutants display a virulence defect (Lorenz & Fink, 2001, 2002; Lorenz *et al.*, 2004), fatty acids do not provide an essential nutrient source during infection. These data also correlate with assumptions made from the analysis of *C. albicans fox2* and *pex5* mutants (Piekarska *et al.*, 2006, 2008). However, we cannot exclude that 3-ketoacyl-CoA thiolases contribute to *C. albicans* survival and virulence in specific niches, for example the gastrointestinal tract or oral cavity.

In conclusion, of three 3-ketoacyl-CoA thiolase genes in *C. albicans*, only two seem to encode enzymes directly involved in the degradation of fatty acids. Pot1p, the closest homologue to Pot1p from *S. cerevisiae*, is the most important 3-ketoacyl-CoA thiolase, based on the severe growth defects of deletion mutants on fatty acids. Fox3p may have derived from a gene duplication of Pot1p and seems to have adapted to support growth on fatty acids at elevated temperatures. Finally, despite induction of genes required for fatty acid utilisation especially after phagocytosis by macrophages (Lorenz & Fink, 2002), this induction may derive from a general stress response due to nutrient or glucose limitation rather than a specific induction from fatty acid utilisation because independent mutants and infection models revealed no virulence defects.

Acknowledgements

This work was supported by funding of the HKI and the priority programme 1160 from the German Science Foundation to MB, the Jena School for Microbial Communication to CO and the International Leibniz Research School to SM. We are grateful to Peter Staib for providing the *SAT1* flipper cassette. All authors declare no conflict of interests.

References

- Abascal F, Zardoya R & Posada D (2005) ProtTest: selection of best-fit models of protein evolution. *Bioinformatics* **21**: 2104–2105.

- Bergsson G, Arnfinnsson J, Steingrímsson O & Thormar H (2001) *In vitro* killing of *Candida albicans* by fatty acids and monoglycerides. *Antimicrob Agents Chemother* **45**: 3209–3212.
- Black PN & DiRusso CC (2007) Yeast acyl-CoA synthetases at the crossroads of fatty acid metabolism and regulation. *Biochim Biophys Acta* **1771**: 286–298.
- Brock M (2009) Fungal metabolism in host niches. *Curr Opin Microbiol* **12**: 371–376.
- Cheng SC, Joosten LA, Kullberg BJ & Netea MG (2012) Interplay between *Candida albicans* and the mammalian innate host defense. *Infect Immun* **80**: 1304–1313.
- Clément M, Tremblay J, Lange M, Thibodeau J & Belhumeur P (2007) Whey-derived free fatty acids suppress the germination of *Candida albicans in vitro*. *FEMS Yeast Res* **7**: 276–285.
- Dujon B, Sherman D, Fischer G *et al.* (2004) Genome evolution in yeasts. *Nature* **430**: 35–44.
- Dumitru R, Hornby JM & Nickerson KW (2004) Defined anaerobic growth medium for studying *Candida albicans* basic biology and resistance to eight antifungal drugs. *Antimicrob Agents Chemother* **48**: 2350–2354.
- Dunn MF, Ramírez-Trujillo JA & Hernández-Lucas I (2009) Major roles of isocitrate lyase and malate synthase in bacterial and fungal pathogenesis. *Microbiology* **155**: 3166–3175.
- Fazius F, Shelest E, Gebhardt P & Brock M (2012) The fungal alpha-aminoadipate pathway for lysine biosynthesis requires two enzymes of the aconitase family for the isomerization of homocitrate to homoisocitrate. *Mol Microbiol* **86**: 1508–1530.
- Felsenstein J (1989) PHYLIP – Phylogeny Inference Package (Version 3.2). *Cladistics* **5**: 164–166.
- Fleck CB & Brock M (2008) Characterization of an acyl-CoA: carboxylate CoA-transferase from *Aspergillus nidulans* involved in propionyl-CoA detoxification. *Mol Microbiol* **68**: 642–656.
- Fleck CB & Brock M (2009) Re-characterisation of *Saccharomyces cerevisiae* Ach1p: fungal CoA-transferases are involved in acetic acid detoxification. *Fungal Genet Biol* **46**: 473–485.
- Fleck CB, Schöbel F & Brock M (2011) Nutrient acquisition by pathogenic fungi: nutrient availability, pathway regulation, and differences in substrate utilization. *Int J Med Microbiol* **301**: 400–407.
- Funato M, Shimozaawa N, Nagase T *et al.* (2006) Aberrant peroxisome morphology in peroxisomal beta-oxidation enzyme deficiencies. *Brain Dev* **28**: 287–292.
- Ghosh S, Navarathna DH, Roberts DD, Cooper JT, Atkin AL, Petro TM & Nickerson KW (2009) Arginine-induced germ tube formation in *Candida albicans* is essential for escape from murine macrophage line RAW 264.7. *Infect Immun* **77**: 1596–1605.
- Griebel T, Brinkmeyer M & Böcker S (2008) EPOs: a modular software framework for phylogenetic analysis. *Bioinformatics* **24**: 2399–2400.
- Gow NA & Hube B (2012) Importance of the *Candida albicans* cell wall during commensalism and infection. *Curr Opin Microbiol* **15**: 406–412.
- Hynes MJ, Murray SL, Khew GS & Davis MA (2008) Genetic analysis of the role of peroxisomes in the utilization of acetate and fatty acids in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* **178**: 1355–1369.
- Jacobsen ID, Grosse K, Berndt A & Hube B (2011) Pathogenesis of *Candida albicans* infections in the alternative chorio-allantoic membrane chicken embryo model resembles systemic murine infections. *PLoS ONE* **6**: e19741.
- Kim J & Sudbery P (2011) *Candida albicans*, a major human fungal pathogen. *J Microbiol* **49**: 171–177.
- Legras JL, Erny C, Le Jeune C *et al.* (2010) Activation of two different resistance mechanisms in *Saccharomyces cerevisiae* upon exposure to octanoic and decanoic acids. *Appl Environ Microbiol* **76**: 7526–7535.
- Lorenz MC & Fink GR (2001) The glyoxylate cycle is required for fungal virulence. *Nature* **412**: 83–86.
- Lorenz MC & Fink GR (2002) Life and death in a macrophage: role of the glyoxylate cycle in virulence. *Eukaryot Cell* **1**: 657–662.
- Lorenz MC, Bender JA & Fink GR (2004) Transcriptional response of *Candida albicans* upon internalization by macrophages. *Eukaryot Cell* **3**: 1076–1087.
- Müller S, Fleck CB, Wilson D, Hummert C, Hube B & Brock M (2011) Gene acquisition, duplication and metabolic specification: the evolution of fungal methylisocitrate lyases. *Environ Microbiol* **13**: 1534–1548.
- Pfaller MA & Diekema DJ (2007) Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev* **20**: 133–163.
- Piekarska K, Mol E, van den Berg M *et al.* (2006) Peroxisomal fatty acid beta-oxidation is not essential for virulence of *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* **5**: 1847–1856.
- Piekarska K, Hardy G, Mol E *et al.* (2008) The activity of the glyoxylate cycle in peroxisomes of *Candida albicans* depends on a functional beta-oxidation pathway: evidence for reduced metabolite transport across the peroxisomal membrane. *Microbiology* **154**: 3061–3072.
- Poirier Y, Antonenkov VD, Glumoff T & Hiltunen JK (2006) Peroxisomal beta-oxidation—a metabolic pathway with multiple functions. *Biochim Biophys Acta* **1763**: 1413–1426.
- Reuss O, Vik A, Kolter R & Morschhäuser J (2004) The SAT1 flipper, an optimized tool for gene disruption in *Candida albicans*. *Gene* **341**: 119–127.
- Shareck J & Belhumeur P (2011) Modulation of morphogenesis in *Candida albicans* by various small molecules. *Eukaryot Cell* **10**: 1004–1012.
- Shen YQ & Burger G (2009) Plasticity of a key metabolic pathway in fungi. *Funct Integr Genomics* **9**: 145–151.
- Stevens S & Hofmeyr J-HS (1993) Effects of ethanol, octanoic and decanoic acids on fermentation and the passive influx

of protons through the plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol* **38**: 656–663.

Sudbery PE (2011) Growth of *Candida albicans* hyphae. *Nat Rev Microbiol* **9**: 737–748.

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

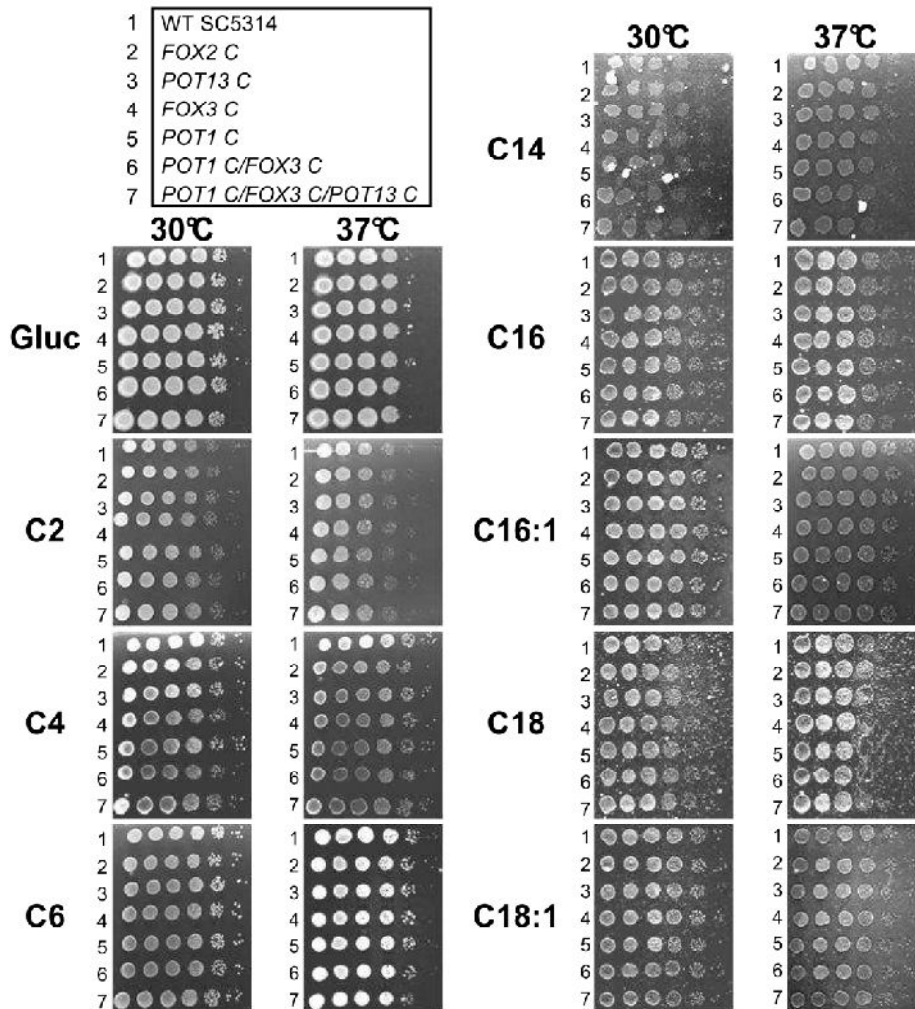
Fig. S1. Growth analysis of complemented *C. albicans* 3-ketoacyl-CoA thiolase and *FOX2* mutants in comparison with the parental wild-type strain SC5314.

Table S1. Protein data description.

Table S2. List of all oligonucleotides used in this study.

Table S3. Combinations of oligonucleotides used in this study.

Figure S1



Growth analysis of complemented *C. albicans* 3-kethothiolase and *FOX2* mutants in comparison to the parental wild type strain SC5314. This figure is complementary to Fig. 3 from the main text. All homozygous mutants were complemented for each respective gene on one allele, which is indicated by a “C”. Incubation was performed at 30 and 37°C. Ten-fold dilutions were spotted on plates in the order depicted in the scheme at the top. No growth was observed for any of the strains on caprylic acid, capric acid, lauric acid, linoleic acid and linolenic acid and is, therefore, not shown (see also Fig. 2). Growth on the following carbon sources is presented: glucose; acetic acid = C2; butyric acid = C4, hexanoic acid = C6; myristic acid = C14; palmitic acid = C16; palmitoleic acid = C16:1; stearic acid = C18; oleic acid = C18:1. All complemented mutants behave identical to the wild type.

Table S1. Protein data description

NCBI-ID	pTarget	Mitoprot					
XP_718677	P	-3	24	not	predictable		0,3657
XP_721775	P	-10	12	not	predictable		0,1246
XP_719620	P	1	32	39	0,9651	MFKKSANDIVVIAAKRTPITKSIKGLSRLFPPEEILYQ	
XP_002421621	P	-3	24	not	predictable		0,3665
XP_002546286	P	-6	24	not	predictable		0,1264
XP_001528854	C	-9	15	not	predictable		0,0392
XP_001386409	P	-4	24	not	predictable		0,219
XP_460095	P	-8	20	not	predictable		0,1129
XP_457663	P	1	24	not	predictable		0,1744
XP_002419083	P	-10	12	not	predictable		0,1232
XP_002547871	P	-8	12	not	predictable		0,2854
XP_455575	C	3	8	not	predictable		0,1213
NP_985849	C	0	25	not	predictable		0,219
XP_001642952	C	4	27	not	predictable		0,2055
XP_447091	P	0	22	not	predictable		0,0244
XP_001527366	P	-14	4	not	predictable		0,0384
THIKA_CANTR	P	-5	24	not	predictable		0,1839
XP_002495659	C	0	9	not	predictable		0,043
XP_002491926	P	-5	1	not	predictable		0,1021
XP_504109	P	-6	1	not	predictable		0,0638
EFW96248	P	-6	18	not	predictable		0,0337
AF340027_1	P	2	19	not	predictable		0,1258
XP_001831920	P	0	18	not	predictable		0,3136
XP_002374205	P	2	27	not	predictable		0,3292
XP_001820215	P	2	27	not	predictable		0,3276
XP_663250	P	0	25	not	predictable		0,1271
XP_364667	M	-2	27	not	predictable		0,1154
XP_960422	P	-1	23	not	predictable		0,0503
EFZ02524	M	-2	23	not	predictable		0,0582
XP_001905889	P	0	27	not	predictable		0,1947
XP_002151257	P	2	29	not	predictable		0,738
XP_751733	P	3	27	not	predictable		0,389
CBI50963	P	-1	23	not	predictable		0,0502
XP_001729475	P	-2	13	not	predictable		0,1093
XP_002564709	P	2	27	not	predictable		0,1807
XP_001271962	P	1	27	not	predictable		0,3726
XP_001266900	P	3	27	not	predictable		0,4133
XP_001932756	P	1	10	not	predictable		0,1359
XP_002626309	M	-1	29	not	predictable		0,6786
XP_003032461	P	2	12	not	predictable		0,1146
EGD97916	M	1	26	not	predictable		0,5193
XP_001401936	P	3	27	not	predictable		0,2117
XP_002341780	P	1	21	not	predictable		0,2164
EEH45537	P	6	29	not	predictable		0,7044
XP_003170852	P	2	26	not	predictable		0,6304
XP_001560604	P	-3	25	not	predictable		0,3099
XP_003232365	P	1	26	not	predictable		0,4939
XP_003020839	M	6	78	18	0,7912	MFGGRKAAAYKAQHPRY	
XP_003011454	M	6	78	18	0,7556	MFGGRKVAAYKAQHPRY	
XP_001598376	P	1	33	not	predictable		0,6645
EFQ33554	P	-1	19	not	predictable		0,0159
EGD93917	P	5	31	not	predictable		0,7363

Table S1. Protein data description

XP_001803652	C	1	27	not	predictable	0,458	
XP_002790448	C	1	23	not	predictable	0,0511	
XP_003177728	P	5	31	not	predictable	0,7404	
XP_001213158	M	3	27	not	predictable	0,2718	
XP_003020195	M	4	31	not	predictable	0,734	
XP_003232042	P	4	31	not	predictable	0,7333	
XP_003191423	M	0	25	29	0,8271		MTSAIQNITNSIPSLGRARLLINSSDDV
XP_003001876	P	-3	20	not	predictable	0,0272	
XP_003012136	P	6	31	not	predictable	0,7388	
XP_001935515	M	1	27	not	predictable	0,2484	
XP_001208809	M	4	32	not	predictable	0,4303	
XP_002146282	P	-1	28	not	predictable	0,2792	
XP_003037254	P	0	20	not	predictable	0,0493	
XP_757237	M	1	29	17	0,4668		MAQRITQLASHLDPRS
EEQ88774	C	-1	23	not	predictable	0,0267	
XP_658654	P	3	28	not	predictable	0,1822	
XP_001399468	M	5	32	36	0,8014		MSSAQQLTSIANQLSGPGAASAKQRVLSKNPDDI
XP_001392657	P	2	29	not	predictable	0,1447	
XP_777983	P	0	25	29	0,7213		MASTIQNITNSIPSLGRARLLINSSDDV
XP_001727684	P	2	28	not	predictable	0,1078	
EGF78621	M	4	32	not	predictable	0,0885	

Table S1. Protein data description

XP_758862	P	0	15	not	predictable	0,0404	
XP_001210542	M	2	28	16	0,1182		MASERLSSILSHLRG
XP_002481108	M	5	19	not	predictable	0,2388	
XP_367070	P	-2	26	not	predictable	0,3415	
XP_001268993	M	2	29	16	0,372		MAADRLNSLLSHLRP
XP_752635	P	3	29	16	0,4178		MAADRLSLLNHLRP
CBI55793	M	2	27	not	predictable	0,5732	
XP_958712	M	0	27	not	predictable	0,416	
XP_001557898	M	3	28	not	predictable	0,4494	
EEH47096	M	4	17	not	predictable	0,0287	
XP_002559707	M	0	29	not	predictable	0,2079	
XP_002152075	M	1	19	not	predictable	0,2417	
XP_663482	M	5	24	not	predictable	0,308	
XP_001836176	M	0	23	not	predictable	0,197	
XP_001821954	M	6	32	not	predictable	0,5738	
XP_001261330	M	-1	39	29	0,9381		MASPIPRGLRQVLQKSPSDIVILSALRT
XP_001264498	P	5	46	16	0,3678		MAADRLSLLNHLRP
XP_001590467	M	1	28	not	predictable	0,4266	
XP_001244950	P	0	39	29	0,828		MAGSVPRGLKQILQKSPSDIVILSSLRT
XP_002560268	P	6	29	not	predictable	0,8885	
XP_749100	M	-1	39	29	0,7919		MASPVPRGLRQVLQKSPSDIVILSALRT
XP_001396199	M	-2	39	29	0,9013		MASPIPRGLRQVLQKSPSDIVILSSLRT
EFQ33727	M	-1	27	not	predictable	0,4539	
XP_002478583	M	1	28	not	predictable	0,4022	
XP_002372250	P	-2	39	29	0,6375		MASPIPQGLRQVLQKSPNDIVILSSLRT
XP_001903311	P	0	27	not	predictable	0,294	
XP_001273248	M	-1	39	29	0,9131		MASPVPRGLRQVLQKSPSDIVILSALRT
XP_002629380	M	6	18	not	predictable	0,015	
XP_755468	M	6	31	not	predictable	0,7304	
XP_002478633	P	1	39	29	0,9239		MTAPIPRGLKQVLQKSPSDIVILSSVRT
XP_001260604	M	6	31	not	predictable	0,7296	

Table S1. Protein data description

XP_001275425	M	6	31	not	predictable	0,5765
EEH44093	P	5	39	29	0,9125	MSGTVQKGLQRILKKSPSDVILSSLRT
XP_003002853	M	1	19	not	predictable	0,1071
XP_002146342	P	-2	39	29	0,8599	MASPIPRGLKQVLQKSPSDIVLSSVRT
EFY99500	C	4	27	not	predictable	0,5434
XP_757990	M	1	21	not	predictable	0,9217
XP_002546837	P	-2	32	not	predictable	0,9123
XP_001528721	P	-3	38	24	0,8091	MPPVSPLLKKSADIVLSALRT
XP_001382234	P	-3	38	not	predictable	0,7316
XP_459288	P	-2	37	23	0,8446	MSAASLLKKKGSDIVLSALRS
XP_001938015	M	0	38	not	predictable	0,9257
XP_002483973	M	2	25	not	predictable	0,1514

Table S1. Protein data description

XP_002150287	P	0	7	not	predictable	0,637
XP_001794577	P	0	38	not	predictable	0,6774
XP_001212973	P	-1	7	not	predictable	0,5018
EFQ34345	P	-4	37	27	0,6976	MSVPKGLSSVLKKAQSDVILSSLRT
CBI50806	P	-1	38	not	predictable	0,1824
XP_001905799	M	-2	37	not	predictable	0,6909
XP_002567514	M	-2	39	29	0,9348	MASPIPRGLRQVLQKSSNDIVLSSLRT
XP_001938848	P	4	38	28	0,5015	MAFVQKGLKNILQKSPNDVFLSALRT
XP_001548354	P	-1	16	18	0,5925	MSTGPLRRGLSQILKGD
XP_960520	P	-3	38	not	predictable	0,1887
XP_001798317	M	1	39	29	0,5645	MAGFAQKGLKNILQKNPRDVFVLSALRT
XP_002912115	M	2	32	20	0,9979	MFLRRVANLSPGGPVFRRRA
NP_012106	C	1	9	not	predictable	0,1813
XP_449306	P	0	47	not	predictable	0,0623
XP_453599	P	-1	43	not	predictable	0,215
NP_984262	P	-2	45	not	predictable	0,0193
XP_002490426	P	-4	28	not	predictable	0,1256
XP_503808	P	6	52	49	0,9486	MRLTLPRLNAAAYIVGAARTPVGKFNGLKSVSAIDLGI TAAKAAVQRS
NP_015297	C	0	43	not	predictable	0,1653
XP_710124	M	-1	47	not	predictable	0,0236
XP_002418376	M	0	47	not	predictable	0,0302
XP_002547278	M	0	49	not	predictable	0,1074
XP_001384586	M	-5	29	not	predictable	0,1132
XP_001528519	M	-2	30	not	predictable	0,3211
XP_460741	M	-2	46	not	predictable	0,09
XP_500646	C	-4	41	not	predictable	0,1183

Protein sequences and descriptions are publicly available at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

Table S2: List of oligonucleotides used in this study. Bold letters in sequences denote restriction sites used in cloning procedures.

No .	Name	Sequence	Tm (°C)	Description
1	FOX2_5`ApaI_for	GGG CCC TTT TCC TTA TTT CCA TCT G	63	Amplification FOX2 5`-flanking region, FOX2 complementation, Higuchi-PCR
2	FOX2_5`XhoI_rev	CTC GAG ATA ATG ATA TGC ACA GTA CCA AAG C	65.5	Amplification FOX2 5`-flanking region
3	FOX2_3`SacII_for	CCG CGG AAG AAG ATG AAG AAG AAG ACG	66.5	Amplification FOX2 3`-flanking region
4	FOX2_3`SacI_rev	GAG CTC TCT TTG GTG CTG GGA A	62.1	Amplification FOX2 3`-flanking region
5	FOX2_DC_rev	GTG TTG GTT CTT CAA GTA TTC TGG	59.3	FOX2 deletion control, use with oligo FOX2_5`ApaI_for
6	FOX2_Comploligo_BamHI_rev	AGA TCT TAG ATC TTA GCT TTG TCA CCA AC	62.4	FOX2 complementation, Fusion-PCR
7	FOX2H_for	ACC AAA GAG GGC TAC AGA TTA C	58	FOX2 complementation, Fusion-PCR
8	FOX2H_rev	GTA ATC TGT AGC CCT CTT TGG T	58	FOX2 complementation, Fusion-PCR
9	FOX2DFC_for	CCG CGG ACG CAG TAA AAT TGC CAT TTA GTT TT	67	FOX2 complementation, Amplification FOX2 3`-flanking region
10	FOX2DFC-rev	GAG CTC GAT TCA AAT TGC ATA AAC GTT CTG	61.3	FOX2 complementation, Amplification FOX2 3`-flanking region
11	POT1_5`ApaI_for	GGG CCC CAC ATA ATC TTG ATT CCC T	64.6	Amplification POT1 5`-flanking region, POT1 complementation
12	POT1_5`XhoI_rev	CTC GAG CTG GGT TCT TTT GAG TAA GGG A	66.6	Amplification POT1 5`-flanking region
13	POT1_3`SacII_for	CCG CGG CTT CTA TGT GTA TCG GTA GTG G	69.5	Amplification POT1 3`-flanking region
14	POT1_3`SacI_rev	GAG CTC ACA GAA AAA GAC AAT GCC GAG AC	66.7	Amplification POT1 3`-flanking region
15	POT1_DC_rev	TCA ATA AAA CAC CAG CAG CAC C	58.4	POT1 deletion control, use with oligo POT1_5`ApaI_for
16	POT1_Comploligo_BglII_rev	AGA TCT ATT CCT TAA TCA ATA TGG AGG C	60.7	POT1 complementation, use with oligo POT1_5`ApaI_for
17	FOX3_5`ApaI_for	GGG CCC AAA GAA TCC GAG GCC AAA TAC C	69.5	Amplification FOX3 5`-flanking region, FOX3 complementation

Table S2: List of oligonucleotides used in this study. Bold letters in sequences denote restriction sites used in cloning procedures.

No .	Name	Sequence	Tm (°C)	Description
18	FOX3_5`XhoI_rev	CTC GAG CAA GTA GGG AAC AGT TCT TGG	66.5	Amplification FOX3 5`-flanking region
19	FOX3_3`sacI_for	CC GCG G`TTT AGG AAT GTG GTT GGT TGT AAG	68.1	Amplification FOX3 3`-flanking region
20	FOX3_3`sacII_rev	GAG CTC CTA TCA CAA TGT GTT GCA AAT CTC ACC C	69.5	Amplification FOX3 3`-flanking region
21	FOX3dc_rev	CAA CAC CAC CAG CTA AAC C	58.4	FOX3 deletion control, use with oligo FOX3_5`apaI_for
22	FOX3_CompIoligo_BglII_rev	AGA TCT TAT TCT CTA ACC AAA ACA GAA GCA	61.3	FOX3 complementation, use with FOX3_5`apaI_for
23	POT13_5`ApaI_for	GGG CCC GGA AAC GAG TAT TGA CTA GAT CG	69.5	Amplification POT13 5`-flanking region, POT13 complementation
24	POT13_5`xhoI_rev	CTC GAG AGA ACA AGC GTC TTT AAT GAT TGC	65.4	Amplification POT13 5`-flanking region
25	POT13_3`sacII_for	CCG CCG TAG TAG ATC ATA CGC AAT ACA CGA	68.1	Amplification POT13 3`-flanking region
26	POT13_3`sacI_rev	GAG CTC AGC CAA CAA TAA ACA GAA GGC C	66.6	Amplification POT13 3`-flanking region
27	POT13 DC_rev	AAA TCA GTT TTG TAG CCT TGT CTG	57.6	POT13 deletion control, use with oligo POT13_5`ApaI_for
28	POT13_CompIoligo_BglII_rev	AGA TCT ACT CGT TAG CAA ACA AGG C	61.3	POT13 complementation, use with oligo POT13_5`ApaI_for

Table S3: Combinations of oligonucleotides used in this study

Oligonucleotide combinations	Purpose
1;2	Amplification FOX2 5'-flanking region
3;4	Amplification FOX2 3'-flanking region
3;4	FOX2 Southern probe
1;5	FOX2 deletion control
6; 7	FOX2 Fusion 1; FOX2 complementation
1;8	FOX2 Fusion 1; FOX2 complementation
1; 6	FOX2 Fusion 2; FOX2 complementation
9; 10	Amplification FOX2 3'-flanking region for complementation
11; 12	Amplification POT1 5'-flanking region
13; 14	Amplification POT1 3'-flanking region
11; 12	POT1 Southern probe
11; 15	POT1 deletion control
11; 16	POT1 complementation
17; 18	Amplification FOX3 5'-flanking region
19; 20	Amplification FOX3 3'-flanking region
19; 20	FOX3 Southern probe
17; 21	FOX3 deletion control
17; 22	FOX3 complementation
23; 24	Amplification POT13 5'-flanking region
25; 26	Amplification POT13 3'-flanking region
23; 24	POT13 Southern probe
23; 27	POT13 deletion control
23; 28	POT13 complementation

7 Publikation B

Candida albicans Utilizes a Modified β -Oxidation Pathway for the Degradation of Toxic Propionyl-CoA

Otzen, C.; Bardl, B.; Jacobsen, I. D.; Nett, M.; Brock, M. (2014)

Veröffentlichte Publikation

J Biol Chem.; **289** (12): 8151-69

Candida albicans Utilizes a Modified β -Oxidation Pathway for the Degradation of Toxic Propionyl-CoA*^[S]

Received for publication, September 11, 2013, and in revised form, January 26, 2014. Published, JBC Papers in Press, February 4, 2014, DOI 10.1074/jbc.M113.517672

Christian Otzen[‡], Bettina Bardl[§], Ilse D. Jacobsen[¶], Markus Nett^{||}, and Matthias Brock^{‡,***1}

From [‡]Microbial Biochemistry and Physiology, [§]Bio Pilot Plant, [¶]Microbial Immunology, and ^{||}Secondary Metabolism of Predatory Bacteria, Leibniz-Institute for Natural Product Research and Infection Biology, Hans Knoell Institut, Beutenbergstrasse 11a, 07745 Jena and the ^{***}Institute for Microbiology, Friedrich Schiller University Jena, 07745 Jena, Germany

Background: Propionyl-CoA is a common metabolic intermediate that requires degradation to avoid intoxication of cellular metabolism.

Results: A key enzyme involved in a modified β -oxidation pathway in *Candida albicans* has been identified.

Conclusion: Although fungi generally use the methyl citrate cycle to degrade propionyl-CoA, CUG clade yeasts form an exception.

Significance: The modified β -oxidation pathway could provide a target for new antifungal compounds.

Propionyl-CoA arises as a metabolic intermediate from the degradation of propionate, odd-chain fatty acids, and some amino acids. Thus, pathways for catabolism of this intermediate have evolved in all kingdoms of life, preventing the accumulation of toxic propionyl-CoA concentrations. Previous studies have shown that fungi generally use the methyl citrate cycle for propionyl-CoA degradation. Here, we show that this is not the case for the pathogenic fungus *Candida albicans* despite its ability to use propionate and valerate as carbon sources. Comparative proteome analyses suggested the presence of a modified β -oxidation pathway with the key intermediate 3-hydroxypropionate. Gene deletion analyses confirmed that the enoyl-CoA hydratase/dehydrogenase Fox2p, the putative 3-hydroxypropionyl-CoA hydrolase Ehd3p, the 3-hydroxypropionate dehydrogenase Hpd1p, and the putative malonate semialdehyde dehydrogenase Ald6p essentially contribute to propionyl-CoA degradation and its conversion to acetyl-CoA. The function of Hpd1p was further supported by the detection of accumulating 3-hydroxypropionate in the *hpd1* mutant on propionyl-CoA-generating nutrients. Substrate specificity of Hpd1p was determined from recombinant purified enzyme, which revealed a preference for 3-hydroxypropionate, although serine and 3-hydroxyisobutyrate could also serve as substrates. Finally, virulence studies in a murine sepsis model revealed attenuated virulence of the *hpd1* mutant, which indicates generation of propionyl-CoA from host-provided nutrients during infection.

Candida albicans is an important opportunistic pathogen of humans (1), which is frequently found on mucosal surfaces such as the oral cavity, vaginal mucosa, or the digestive tract (2). Depending on the health status of its host, it can turn from a

harmless commensal into a pathogen causing invasive mucosal or even life-threatening systemic infections. Epidemiologic studies have revealed that *C. albicans* is responsible for up to 15% of nosocomial bloodstream infections (3). Of note, nosocomial candidemia is connected with high mortality rates of about 40% (3). The ability to thrive in various host niches is the basis for the establishment of infections (4, 5). A prominent example is the metabolic switch from fermentative to nonfermentative growth upon phagocytosis by granulocytes (6–9). Although the bloodstream provides glucose as a preferred carbon source for the pathogen as indicated by increased expression of glycolytic genes (*PFK2* and *PYK1*) (9), *C. albicans* is subjected to glucose starvation after phagocytosis (7, 9). To escape the hostile environment of phagocytes, the cells undergo a morphogenetic switch from yeast to hyphae (10) and invade the surrounding tissues. For this process, it has been shown that mutations in glycolysis, gluconeogenesis, and the glyoxylate cycle decrease virulence (9, 11, 12), indicating that the adaptation to the available nutrient sources is critical for a successful infection process.

Besides glucose, host-derived fatty acids, lipids, and proteins likely serve as additional nutrients for *C. albicans*. However, previous studies have shown that metabolism of fatty acids via β -oxidation seems dispensable for virulence (13, 14). Although a *fox2* mutant, which is unable to utilize fatty acids as nutrient sources, revealed attenuated virulence, this effect was mainly attributed to the formation of giant peroxisomes causing transport defects into the peroxisomal compartment (15). Nevertheless, the efficient removal of propionyl-CoA as a side product from the degradation of some amino acids and odd-chain fatty acid can be assumed to be important for the proliferation within the host.

Accumulation of propionyl-CoA causes severe metabolic disorders not only in microorganisms but also in humans, where it is associated with life-threatening propionic aciduria and methylmalonic acidemia (16, 17). Investigations on mutants of the filamentous fungi *Aspergillus nidulans* (18, 19) and *Aspergillus fumigatus* (20) revealed that elevated propionyl-CoA concentrations interfere with the pyruvate dehydrogenase complex and the

* This work was supported by funds from the Hans-Knoell-Institute and the Jena School for Microbial Communication.

[S] This article contains supplemental Table S1.

¹ To whom correspondence should be addressed: Microbial Biochemistry and Physiology, Friedrich-Schiller University Jena and Leibniz-Institute for Natural Product Research and Infection Biology, Hans Knoell Institute, Beutenbergstr. 11a, 07745 Jena, Germany. Tel.: 49-3641-532-1710; Fax: 49-3641-532-0809; E-mail: Matthias.brock@hki-jena.de.

Propionyl-CoA Degradation in *C. albicans*

succinyl-CoA synthetase. Additionally, secondary metabolite production is affected under propionyl-CoA accumulation (21). Furthermore, *A. fumigatus* mutants, which are unable to metabolize propionyl-CoA, display strongly attenuated virulence in a murine infection model for pulmonary aspergillosis, indicating that propionyl-CoA is indeed formed from nutrients provided by the host (22). Thus, detoxification of propionyl-CoA appears of general importance to maintain normal cellular functions. However, it is worth noting that humans and fungi use strikingly different metabolic pathways for propionyl-CoA degradation.

In humans, propionyl-CoA is converted into the citric acid cycle intermediate succinyl-CoA, which requires a carboxylation to (*R*)-methylmalonyl-CoA, an isomerization to (*S*)-methylmalonyl-CoA, and finally, a rearrangement of the carbon skeleton to succinyl-CoA via coenzyme B₁₂-dependent methylmalonyl-CoA mutase (23, 24). In contrast, most fungi seem to use the so-called methyl citrate cycle for the degradation of propionyl-CoA (24). This pathway, which is also present in several bacteria (25), results in the α -oxidation of propionate to pyruvate and is characterized by an initial condensation of propionyl-CoA and oxaloacetate to form methyl citrate (19), a dehydration to methyl-cis-aconitate (26), a rehydration to methyl isocitrate (26), and finally, a cleavage via methylisocitrate lyase into pyruvate and succinate (27–30). Although the reactions of this pathway resemble those of the citric acid and the glyoxylate cycle, the methyl citrate cycle uses its own specific set of enzymes.

Interestingly, a third pathway for the degradation of propionyl-CoA has been described but has not been studied in detail at the molecular level. This pathway seems to proceed via a modified β -oxidation pathway and is characterized by the formation of β -hydroxypropionate. β -Hydroxypropionate has been detected in plant seedlings incubated in the presence of ¹³C-labeled propionate (31), in insects (32), in some selected bacteria such as *Rhodococcus erythropolis* (33), and most strikingly, in the yeast *Candida rugosa* (34, 35). It has been assumed that propionyl-CoA first enters the β -oxidation pathway of fatty acid degradation. Here, a fatty acyl-CoA oxidase or dehydrogenase forms acrylyl-CoA, which is hydrated to β -hydroxypropionyl-CoA. In a complete β -oxidation cycle, the hydroxyacyl-CoA is oxidized to the ketoacyl-CoA and finally cleaved by ketoacyl-CoA thiolases under the release of an acetyl-CoA unit (14). This results in a residual acyl-CoA shortened by two carbon atoms which, in case of propionyl-CoA, would consist of the one carbon unit formyl-CoA. However, the detection of the key-metabolite β -hydroxypropionate suggests that the latter two reactions are not efficiently carried out. It has therefore been proposed that hydroxypropionyl-CoA exits the β -oxidation pathway and is converted by a series of reactions via hydroxypropionate, malonate semialdehyde and malonate to acetyl-CoA and CO₂ (31, 32). However, evidence for enzymes performing these reactions still has only partially been provided.

Because previous studies on *A. fumigatus* demonstrated that the accumulation of intermediates from propionate degradation affects virulence (22), we were interested in elucidating the respective pathway in the dimorphic and pathogenic yeast *C. albicans*. To identify the responsible pathway, we performed growth analyses, two-dimensional proteomics, gene deletions,

metabolite analyses, recombinant protein production, and enzyme characterizations. Additionally, virulence of a selected mutant was studied in a murine infection model to investigate the impact of propionyl-CoA degradation on host infection.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Media, Culture Conditions, and Growth Analyses—For standard cultivation, *C. albicans* strains were grown in 20 ml of YPD (per liter: 10 g of yeast extract, 20 g of peptone, and 20 g of glucose) or *Candida* minimal medium (CMM)² (14). Liquid cultures were generally incubated at 30 °C and 200 rpm on a rotary shaker. Solid media were prepared by the addition of 2% agar. CMM was supplemented with one of the following carbon sources: 50 mM glucose, 50 mM sodium acetate, 50 mM sodium propionate, 10 mM sodium butyrate, 10 mM sodium valerate, or 10 mM sodium hexanoate. Amino acids as nutrient sources were generally added in a final concentration between 10 and 50 mM and replaced the nitrogen source (NH₄)₂SO₄. For spot dilution growth analyses, *C. albicans* SC5314 wild type, mutants, and complemented strains were pre-grown in YPD, washed three times with ice-cold phosphate-buffered saline (PBS), adjusted to 3.3 × 10⁵ cells/μl, and serially diluted (1:10 dilutions). From each dilution, 3 μl were spotted onto YPD and CMM agar plates containing the above mentioned carbon sources. When propionate or valerate were tested as substrates in spot dilution assays, ethanol from the vitamin solution was omitted to prevent initial growth of *C. albicans* by ethanol utilization. Plates were incubated at 30 and 37 °C. Plates were analyzed after 1 day on YPD, 2 days on glucose, or 4 days on all other nutrient sources. Growth analyses were carried out in triplicate with at least two independent deletion and complemented strains. Growth curves from liquid media were recorded by removing aliquots at different time points, dilution of samples in PBS, and determination of optical density at 600 nm on a Lambda25 UV-visible double beam spectrophotometer (PerkinElmer Life Sciences).

Sample Preparation for Two-dimensional Gel Analysis—*C. albicans* SC5314 wild-type cells were preincubated for 14 h in CMM + 50 mM glucose and collected by centrifugation at 3000 × *g* at 4 °C for 10 min and washed three times with PBS. CMM containing either 50 mM glucose, acetate, or propionate were inoculated at an OD₆₀₀ of 0.2. Glucose cultures were incubated at 30 °C for 8 h and acetate and propionate cultures for 18 h. Cells were collected by centrifugation at 4000 × *g* at 20 °C for 10 min; the supernatant was discarded, and the pellet was resuspended in a minimal volume of trichloroacetic acid (TCA) solution (3.99 g of TCA, 0.09 g of DTT in 30 ml of acetone). Cells were disrupted using a speed mill (Analytik Jena, Jena, Germany) in the presence of zirconia beads (0.5–0.7 mm, Roth, Karlsruhe Germany). Cell lysis was performed by two intervals of 2 min with 2-min cooling on ice. Samples were stored at –20 °C for 16 h to allow for complete protein precipitation and centrifuged at 12,000 × *g* for 15 min. The precipitate was

²The abbreviations used are: CMM, *Candida* minimal medium; BisTris, 2-[bis(2-hydroxyethyl)amino]-2-(hydroxymethyl)propane-1,3-diol; CHES, 2-(cyclohexylamino)ethanesulfonic acid; CAPS, 3-(cyclohexylamino)propanesulfonic acid.

washed twice with 1 ml of washing solution (0.09 g of DTT in 30 ml of 90% acetone) and air-dried. After all residual acetone had evaporated, 300 μ l of lysis buffer (7 M urea, 2 M thiourea, 2% CHAPS, 30 mM Tris, 1% Zwittergent, 0.8% Pharmalyte 3-10, 20 mM DTT) was added and mixed by vigorous shaking. Samples were incubated in an ultrasonic bath for 10 min and subsequently incubated at -80°C for 1 h. Samples were thawed at room temperature and centrifuged at $12,000 \times g$ and 4°C for 20 min. The supernatant was collected, and protein concentration was determined by the protein assay kit from Bio-Rad using bovine serum albumin as standard.

First Dimension Isoelectric Focusing and SDS-PAGE for Second Dimension—Isoelectric focusing and second-dimension electrophoresis were performed with some modifications as described previously (36). In brief, for isoelectric focusing, 11-cm Immobilize dry strips, pH 3–11NL (GE Healthcare), were used. Strips were rehydrated in rehydration buffer as recommended by the manufacturer. Isoelectric focusing was performed using an Ettan II isoelectric focusing system (GE Healthcare). To a 100- μ g protein sample in a maximum volume of 100 μ l, 2.5 μ l of DeStreak reagent (GE Healthcare) and 1 μ l of IPG-buffer 3-11 NL (0.5%, GE Healthcare) were added, and the solution was applied to the strips by cup loading. The following program was used for isoelectric focusing: 0–3 h at 300 V; 3–7-h gradient to 600 V; 7–8-h gradient to 1000 V; 11–15-h gradient to 8000 V and hold for additional 24,000 V-h. Prior to second-dimension electrophoresis on 12.5% Criterion Precast gels (Tris/HCl, 1.0 mM for 11-cm IPG Strips, Bio-Rad), strips were equilibrated in reducing equilibration buffer containing iodoacetamide for protein acetylation (36). Gels were run for 1 h at constant 200 V. After fixation for at least 2 h in fixing solution (40% (v/v) methanol and 7% acetic acid), gels were washed in distilled water and stained with Coomassie Brilliant Blue G-250 (37). The gels were neutralized for 5 min in 100 mM Tris/*o*-phosphoric acid, pH 6.5, and kept at 4°C in water until analyzed.

Protein Identification from Two-dimensional Gels—Stained gels were scanned and manually overlaid for spot selection. Protein spots of interest were manually excised from the gels and subjected to a tryptic digest (200 ng of trypsin; Promega, Mannheim, Germany). Protein fragments were extracted and prepared for MALDI-TOF/TOF analysis (38). An aliquot of the extracted peptides was mixed with the same amount of α -cyano-4-hydroxycinnamic acid matrix solved in TA30 (30% acetonitrile + 70% of 0.1% TFA). 2 μ l were spotted onto a 800/384 anchor chip target (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). Peptide mass analysis and peptide sequence determination were performed on a Bruker ultraflex TOF/TOF with Bruker Compass 1.2 software suite, including FlexControl (hardware control) and FlexAnalysis 3.0 (peak list creation). The following parameter settings for peak list generation were used: signal-to-noise ratio = 4; maximum number of peaks = 500; algorithm = SavitzkyGolay (width = 0.15 *m/z*, cycles = 4). The Proteinscape 1.3 software was used to collect peak lists that were sent to the Mascot in-house server 2.1.03 equipped with a monthly updated NCBI nonredundant database (taxonomy, fungi) for protein identification. For MS analysis, a peptide mass fingerprint search was performed with the following parameter settings: peptide mass tolerance ± 50 ppm,

peptide charge state = 1+; maximum of missed cleavages = 0–1. For further analysis, an MS/MS ion search was used. The parameters were set to peptide mass tolerance = ± 300 ppm; fragment mass tolerance = ± 1 Da; maximum of missed cleavages = 1. For statistical analysis, a based Mowse score was calculated automatically by the Proteinscape software.

Generation of Gene Deletion and Complementation Constructs—The deletion cassettes were generated by procedures described previously (14, 39). For a list of oligonucleotides used for the different PCR amplifications refer to Table 1. In brief, about 200–500 bp of the 5'- and 3'-flanking regions from each gene of interest were amplified by PCR with phusion polymerase (Thermo Scientific, Schwerte, Germany) using a Speed Cycler (Analytik Jena, Jena, Germany). PCR products were cloned into the PCR cloning vector pJET1.2 (Thermo Scientific). Fragments were released from pJET1.2 by either *Apal* + *XhoI* restriction for the 5'-flanking region or *SacI* + *SacII* restriction for the 3'-flanking region and cloned into the corresponding sites of vector pSSU1 comprising the SAT1 flipper cassette (39). The pSSU1 vector, including the flanking regions, was digested with *Apal* + *SacI* to remove the vector backbone prior to transformation of *C. albicans*.

For complementation of homozygous mutants, the gene of interest, including 200–500 bp of the upstream flanking region, was amplified from genomic DNA of the SC5314 wild-type strain. PCR products were subcloned into pJET1.2, released by *Apal* + *BglII* restriction, and subcloned into the *Apal* + *BglII* restricted plasmid pSAP2KS1, which contains the *SAT1* resistance marker. Subsequently, the 3'-flanking region used for gene deletion (described above) was cloned downstream from the *SAT1* cassette of pSAP2KS1. Complementation fragments were released by *Apal* + *SacI* and used for transformation of the deletion mutants.

Transformation of *C. albicans* and Selection Marker Regeneration—Transformation of *C. albicans* was performed by electroporation similar to described procedures (39). After the pulse, 1 ml of 1 M sorbitol was added, and the suspension was divided in two aliquots (A and B) that were regenerated in YPD at 30°C for at least 4 h. Aliquots were spread on YPD agar plates containing 100 μ g/ml nourseothricin (Werner Bioagents, Jena, Germany). Transformants became visible after 48–72 h. To ensure that independent clones were subsequently investigated, transformants from both aliquots (A and B) were propagated. To regenerate nourseothricin sensitivity for subsequent transformations, the *SAT1* selection marker of the flipper cassette was removed by cultivation of transformants in 20 ml of YPM medium (per liter: 10 g of yeast extract, 20 g of peptone, 20 g of maltose) (39). Cells were incubated for at least 18 h at 30°C and 200 rpm. Cells from these cultures were screened for nourseothricin sensitivity. Homozygous deletion mutants were identified by PCR using the 5'-oligonucleotide from the amplification of the 5'-flanking region and a specifically designed 3'-deletion control oligonucleotide that hybridized to the corresponding gene of interest (Table 1). Selected transformants were additionally checked by Southern hybridization using digoxigenin-labeled probes (Roche Diagnostics).

Generation of EHD3-GFP and HPD1-GFP Fusion Constructs—To investigate the subcellular localization of Hpd1p and Ehd3p,

Propionyl-CoA Degradation in *C. albicans*

TABLE 1

List of oligonucleotides used in this study

Pairs of oligonucleotides are indicated.

Pair No.	Primer Name	Primer Sequence ^a	Function ^b
1	<i>EHD3</i> 5'Apal for	GGG CCC AAT GTT GTA GGG CAA ACC AGG	<i>EHD3</i> 3'-flanking region
	<i>EHD3</i> 5'XhoI rev	CTC GAG ATA AGG TTG GGA CAA TGG AAT GG	
2	<i>EHD3</i> 3'SacII for	CCG CGG TTA TAA CCA ATA CAT ACA TCA ATA	<i>EHD3</i> 5'-flanking region
	<i>EHD3</i> 3'SacI rev	GAG CTC TGT GTA TCT GAT TAG TGT TAC TAA	
3	<i>EHD3</i> 5'Apal for	GGG CCC AAT GTT GTA GGG CAA ACC AGG	<i>EHD3</i> deletion control
	<i>EHD3</i> DC rev	ATC CAG CAA AAT AGG CAT C	
4	<i>EHD3</i> 5'Apal for	GGG CCC AAT GTT GTA GGG CAA ACC AGG	<i>EHD3</i> complementation fragment
	<i>EHD3</i> 3'ColiQo BallI rev	AGA TCT ATT TAT TTT GTA GGC TCT TCT TTC C	
5 ^c	<i>HPD1</i> 5'Apal 1 for	GGG CCC ATA TGC TCT AGA GCT GAT AGA CG	<i>HPD1</i> 3'-flanking region (first allele)
	<i>HPD1</i> 5'XhoI 1 rev	CTC GAG TTG GTG GTG TTA AAG GCA ACC	
6 ^c	<i>HPD1</i> 5'Apal 2 for	GGG CCC GAT TAC ATC GGT TAT TGA AGA ATA	<i>HPD1</i> 3'-flanking region (second allele)
	<i>HPD1</i> 5'XhoI 2 rev	CTC GAG TGA ATA TGT AAA AAG AAA AGG TCG	
7 ^c	<i>HPD1</i> 3'SacII 1 for	CCG CGG TTA GTC CAT AGT CTA AAT ATG AGA G	<i>HPD1</i> 5'-flanking region (first allele)
	<i>HPD1</i> 3'SacI 1 rev	GAG CTC TTA GAA ATG GAC AAT ACT ACA GGG	
8 ^c	<i>HPD1</i> 3'SacII 2 for	CCG CGG TTA ATC CAA GGT TTT GCC TTG GG	<i>HPD1</i> 5'-flanking region (second allele)
	<i>HPD1</i> 3'SacI 2 rev	GAG CTC ATT TAT GCA ATA GAA GGT GTT TCA	
9	<i>HPD1</i> 5'Apal 1 for	GGG CCC ATA TGC TCT AGA GCT GAT AGA CG	<i>HPD1</i> deletion control
	<i>HPD1</i> DC rev	ACA ATG TTC CCT TTC TTG CTC C	
10	<i>HPD1</i> 5'Apal 1 for	GGG CCC ATA TGC TCT AGA GCT GAT AGA CG	<i>HPD1</i> complementation fragment
	<i>HPD1</i> 3'ColiQo BallI rev	AGA TCT TAT TTT CTT TTG ACA TCA ATT ACA	
11	<i>ALD5</i> 5'Apal for	GGG CCC GAC TTT TTC AAC TGT TTC GTC CC	<i>ALD5</i> 3'-flanking region
	<i>ALD5</i> 5'XhoI rev	CTC GAG AAT GAT AGA ATA ATG AGG AGG AAG	
12	<i>ALD5</i> 3'SacI for	CCG CGG CTT AGA ATT TAG GTT CGT GTT GAG	<i>ALD5</i> 5'-flanking region
	<i>ALD5</i> 3'SacII rev	GAG CTC TTT GTA GAT TGG ATT GGG CGT AG	
13	<i>ALD5</i> 5'Apal for	GGG CCC GAC TTT TTC AAC TGT TTC GTC CC	<i>ALD5</i> deletion control
	<i>ALD5</i> DC rev	CAG TAG AAC CAG TGA AAG CAA C	
14	<i>ALD5</i> 5'Apal for	GGG CCC GAC TTT TTC AAC TGT TTC GTC CC	<i>ALD5</i> complementation fragment
	<i>ALD5</i> 3'ColiQo BallI rev	GGA TCC TTA GTT TGG TGG GTT GAT TTT C	
15	<i>ALD6</i> 5'Apal for	GGG CCC TCT ACT ACA AAG ACA TAC CGC C	<i>ALD6</i> 3'-flanking region
	<i>ALD6</i> 5'XhoI rev	CTC GAG TGG TGA AAA GAA TTA AGT CTC CC	
16	<i>ALD6</i> 3'SacI for	CCG CGG CAT TTA CTG GAT CTC GTG GTT C	<i>ALD6</i> 5'-flanking region
	<i>ALD6</i> 3'SacII rev	GAG CTC ACC ATT ATC AGC AGT AAT ATC GC	
17	<i>ALD6</i> 5'Apal for	GGG CCC TCT ACT ACA AAG ACA TAC CGC C	<i>ALD6</i> deletion control
	<i>ALD6</i> DC rev	CAC GTA AAA CAT CAC CTT GAG C	
18	<i>ALD6</i> 5'Apal for	GGG CCC TCT ACT ACA AAG ACA TAC CGC C	<i>ALD6</i> complementation fragment
	<i>ALD6</i> 3'ColiQo BallI rev	AGA TCT ATT CTT ATT GTT GAA TTG GCA TTG	
19	IF <i>EHD3UF_f</i>	AAC CTT ATA ATA TTC TCG AGG TCA AAG TAA ACC TAC TAT GTC TTT AG GTC TTT AG	<i>ACT1</i> promoter fragment for p <i>ACT1-EHD3_N-GFP</i> fusion
	IF <i>Act1_r</i>	TTT GAA TGA TTA TAT TTT TTT AAT ATT AAT ATC TTA CCT ACA AAT AAA ATG TCT AAA GGT GAA GAA TTG TTC ACAA CCA	
20	IF <i>Ehd3GFP_f</i>	TAG GAA CTT CCT CGA GTT ATT TGT ACA ATT CAT CCA TAC CGT	<i>GFP</i> -fragment for p <i>ACT1-EHD3_N-GFP</i> fusion
	IF <i>GFPpSSU1_r</i>	TAG GAA CTT CCT CGA GTT ATT TGT ACA ATT CAT CCA TAC CGT	
21	IF <i>Act1Ehd3_f</i>	ATA TAA TCA TTC AAA ATG TTA AGA TTA AAC AAT TCT ATT AGT TTA TTG	144 bp 5'- <i>EHD3</i> -fragment for p <i>ACT1-EHD3_N-GFP</i> fusion
	IF <i>GFPEHD3trunc_r</i>	TTC ACC TTT AGA CAT ATG GTT TTT CAC TGA ACT CAA TAC AAC	
22	IF <i>pSSU1EHD3_f</i>	AAA AGC TGG GTA CCG GGC CCT TAA AAA ATG TTG TAG GGC AAA CCA	p <i>EHD3-EHD3</i> -fragment for p <i>EHD3-EHD3-GFP</i> Fusion
	IF <i>EHD3_r</i>	TTT ATT TGT AGG TAA TCC CAT TTG ATG	
23	IF <i>Ehd3GFP_f</i>	TTA CCT ACA AAT AAA ATG TCT AAA GGT GAA GAA TTG TTC AC	<i>GFP</i> -fragment for p <i>EHD3-EHD3-GFP</i> fusion
	IF <i>GFPpSSU1_r</i>	TAG GAA CTT CCT CGA GTT ATT TGT ACA ATT CAT CCA TAC CGT	
24	IF <i>pSSU1HPD1_f</i>	AAA AGC TGG GTA CCG GGC CCA TAT GCT CTA GAG CTG ATA GAC G	p <i>HPD1-HPD1</i> - fragment for p <i>HPD1-HPD1-GFP</i> fusion
	IF <i>HPD1GFP_r</i>	TTC ACC TTT AGA CAT TTT TCT TTT GAC ATC	
25	<i>GFP_f</i>	ATG TCT AAA GGT GAA GAA TTG TTC AC	<i>GFP</i> -fragment for p <i>HPD1-HPD1-GFP</i> fusion
	IF <i>GFPpSSU1_r</i>	TAG GAA CTT CCT CGA GTT ATT TGT ACA ATT CAT CCA TAC CGT	
26	<i>HPD1</i> 5'Apal 1 for	GGG CCC ATA TGC TCT AGA GCT GAT AGA CG	p <i>HPD1-HPD1-GFP</i> strain control
	IF <i>GFPpSSU1_r</i>	TAG GAA CTT CCT CGA GTT ATT TGT ACA ATT CAT CCA TAC CGT	
27	<i>EHD3</i> 5'Apal for	GGG CCC AAT GTT GTA GGG CAA ACC AGG	p <i>ACT1-EHD3_N-GFP</i> strain control p <i>EHD3-EHD3-GFP</i> strain control
	IF <i>GFPpSSU1_r</i>	TAG GAA CTT CCT CGA GTT ATT TGT ACA ATT CAT CCA TAC CGT	

^a Cleavage sites for the restriction enzymes Apal, XhoI, SacI, or SacII and the InFusion recombination sites are highlighted in boldface.

^b Description of the application for which the primer pairs were used.

^c Two independent deletion cassettes were required to delete the first and second allele of *HPD1*.

fusions with the enhanced green fluorescent protein (GFP) were generated. Two kinds of independent constructs were generated as follows: (i) complete open reading frames together with their natural promoter fused with GFP and (ii) for Ehd3p a GFP fusion of an N-terminal fragment comprising the first 48 amino acids (144 bp) under control of the constitutively active actin promoter *pACT1*. All constructs contained the *SAT1* resistance marker and replaced one wild-type allele in strain SC5314. Primer pairs for generating PCR fragments are listed in Table 1, and fusion of fragments was performed from 15-bp overlaps. To enable homologous integration into the respective locus, GFP constructs were flanked by the 5'- and 3'-flanking regions that were also used to delete the respective gene in the wild type. In brief, to generate the *pEHD3-EHD3-GFP* cassette, PCR fragments were amplified with primer pairs 22 and 23. The deletion plasmid for *EHD3* was restricted with *Apal* and *XhoI*, and the restriction fragment comprising the plasmid with the *SAT1* cassette and the 3'-flanking region were gel-purified. The PCR products and the plasmid were fused using the In-Fusion® HD cloning kit (Takara Bio Europe/Clontech). Similarly, the *pHPD1-HPD1-GFP* cassette was generated with primer pairs 24 and 25 and fused with the respective *Apal/XhoI*-restricted plasmid used for *HPD1* deletion.

For constitutive expression of truncated N-terminal fragments, *pACT1* was amplified with primer pair 19. The 144-bp *EHD3* fragment was generated with primer pair 21. The PCR fragments were fused with the gel-purified *XhoI*-restricted *EHD3* deletion plasmid resulting in construct *pACT1-EHD3_{N-term}-GFP*. Transformation cassettes were released by *Apal/SacI* restriction and used for transformation as described above. Transformants were checked by PCR for the integration of the fusion constructs with the respective primer pairs 26 and 27.

Fluorescence Intensity Levels, Staining of Mitochondria and Fluorescence Microscopy—Fluorescence intensity from *pEHD3-EHD3-GFP* and *pHPD1-HPD1-GFP* containing transformants was determined from cell-free extracts of cells grown exponentially on CMM with either glucose, acetate, valerate, or propionate as carbon sources. In brief, cells of the untransformed wild type and two independent transformants from each construct were harvested, resuspended in 50 mM Tris/HCl, pH 8.0, with 150 mM NaCl and 10% glycerol, and disrupted in a speed mill. Protein concentrations of cell-free extracts were determined, and serial 2-fold dilutions starting at 20 µg/100 µl were prepared in black 96-well plates with transparent bottom (Nunc/Thermo Fisher Scientific). GFP fluorescence was determined on a FLUOstar Omega Microplate reader (BMG Labtec) with the following settings: bottom reading, signal gain of 2100, excitation filter at 485 nm, emission filter at 520 nm, scan matrix 5 × 5 with 15 flashes per scan point. Fluorescence intensity values were exported to Microsoft Excel, and wild-type background fluorescence from the respective carbon sources and protein concentrations was subtracted from values of the transformants. Intensities were normalized to 1 µg/100 µl resulting in background-corrected relative fluorescence units/µg of protein. Mitochondria were stained by incubating cells for 30 min in the presence of MitoTracker Red 580 (Invitrogen) with subsequent washing in medium without MitoTracker. Cells were mounted in ProLong Gold antifade reagent (Invitrogen), and microscopy was performed on a Zeiss AXIO Imager. M1

under oil immersion with a Zeiss Plan-APOCHROMAT 100× objective. Mitochondria were visualized by using filter set 14, and GFP fluorescence was visualized by use of filter set 09. Images were adjusted within the MetaMorph software (Molecular Devices), and overlays were created by the “Overlay Images” tool.

Recombinant Production and Purification of Hpd1p in *Escherichia coli*—The sequence of the *HPD1* gene (orf19.5565) was obtained from the CGD website, and the translated open reading frame was checked for a putative mitochondrial import sequence by Mitoprot. A cleavage site was detected at amino acid position 17 with a probability for mitochondrial import of 97%. Therefore, this sequence was omitted for recombinant production in *E. coli*. For generating a version with an N-terminal His tag, the gene was amplified from genomic DNA of SC5314 with oligonucleotides *BamHI_HPDI_ATG_f* (5'-GGA TCC ACC AAT TAC GGG TTT ATT GG-3') and *NotI_HPDI_TAA_re* (5'-GCG GCC GCT TAT TTT CTT TTG ACA TCA ATT ACA TC-3'), cloned in pJET1.2, and excised by *BamHI* + *NotI* restriction. The fragment was subcloned in a modified pET43 vector in-frame with the His tag sequence (40, 41). For generation of a version with C-terminal His tag, the gene excluding the mitochondrial import sequence and the terminal stop codon was amplified with oligonucleotides *IF_pet29HPDI_f* (5'-aag gag ata tac ata tgA CCA ATT ACG GGT TTA TTG GTT TG-3'; overhang in lowercase letters) and *IF_pet29HPDI_r* (5'-aca ggt ttt cgg atc cTT TTC TTT TGA CAT CAA TTA CAT CAC-3'; overhang in lowercase letters) and directly cloned by In-Fusion® PCR cloning (Takara Bio Europe/Clontech) in an *NdeI* + *BamHI*-restricted pET29a vector (Merck). Both expression plasmids were used for transformation of *E. coli* BL21 Rosetta2 (DE3) cells (Merck). Protein production was induced either by cultivation in Overnight Express Instant TB medium or in minimal M9 medium by the addition of 0.5 mM isopropyl 1-thio-β-D-galactopyranoside at an OD₅₅₀ of 0.8. Additionally, incubation temperatures between 18 and 30 °C were tested. Cell pellets were collected by centrifugation, resuspended in buffer A (50 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 10% glycerol, pH 8.0), and disrupted by sonication. Lysates were cleared by centrifugation, filtered over a filter with 0.45-µm pore size, and loaded on a nickel-Sepharose 6 Fast Flow (GE Healthcare) gravity-flow column (1-ml bed volume). After a stringency wash with 6 column volumes of buffer B (buffer A + 30 mM imidazole), the protein was eluted in buffer C (buffer A + 200 mM imidazole). Purity of the proteins was checked by SDS-PAGE using NuPAGE BisTris 4–12% gradient gels (Invitrogen) in a MES-buffered running system. Fractions were combined, concentrated, and desalted by centrifugal filter devices (Merck). 50% glycerol was added, and the protein was stored at -20 °C without significant loss of activity. Protein concentrations were determined by use of the protein assay kit from Bio-Rad using bovine serum albumin as standard.

Enzyme Assays—All enzyme assays were performed at 22 °C using a Lambda25 UV-visible spectrophotometer (PerkinElmer Life Sciences). Citrate synthase and methylcitrate synthase activity was determined from *C. albicans* cell lysates by detection of CoASH release using 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) as described previously (18). Hydroxypropionate dehydrogenase activity was determined by modification of a previ-

Propionyl-CoA Degradation in *C. albicans*

ously described procedure (42). The standard assay contained the following: 200 mM CHES, pH 9.5, 3 mM NAD, 36 mM 3-hydroxypropionate, purified enzyme and water to a final volume of 1 ml. The reaction was initiated by the addition of 3-hydroxypropionate. The following alternative substrates replaced 3-hydroxypropionate in the standard assay: (*S*)-3-hydroxyisobutyrate (10 mM), (*R*)-3-hydroxyisobutyrate (10 mM) and *L*-serine (40 mM). NADP replaced NAD in the standard assay to investigate the cofactor specificity. EDTA was added at 5 mM prior to addition of enzyme and substrate to test for metal dependence. For determination of pH and buffer dependence, the following buffers were used (all at 200 mM): Tris/HCl, pH 7.0, 8.0, and 9.0; CHES, pH 9.0, 9.5, 10.0; potassium carbonate, pH 9.5, 10.0, 10.5; glycine, pH 9.5, 10.0, 10.5; CAPS, pH 10.0, 10.5, 11.0. The K_m values were determined by varying the concentration of one substrate, whereas that of the co-substrate was kept constant. At least five different substrate concentrations were tested. Data were plotted double reciprocally in Lineweaver-Burk diagrams, and K_m values and maximum activities were calculated by use of the Microsoft Excel software from the interception points of y and x axis of a linear regression curve (R^2 values for all regression curves were >0.95). Turnover numbers were calculated assuming one active site per enzyme subunit. 3-Hydroxypropionate dehydrogenase from cell lysates of *C. albicans* strains was determined in the standard assay with three replicates from each strain and growth condition.

Sample Preparation for HPLC and GC/MS Analysis—Cells of the *C. albicans* wild-type SC5314 and the *hpd1* mutant were pre-grown at 30 °C and 200 rpm for 14 h in four cultures of 50 ml of YPD medium. Cells were collected by centrifugation for 5 min at $3000 \times g$ and 4 °C, washed three times with PBS, and finally resuspended in 5 ml of PBS. Samples of each strain were pooled. For each strain, four cultures of 100 ml of CMM with 20 mM acetate and 20 mM propionate as carbon sources were inoculated with the respective cell suspension to give an OD₆₀₀ of 15. One culture was directly collected by a 5-min centrifugation at $4000 \times g$ at 4 °C. The other cultures were collected after 2, 4, and 6 h. The OD₆₀₀ was again adjusted to 15 by dilution with fresh medium, and 100-ml aliquots were used for further processing. After centrifugation, the supernatants were discarded, and the cell pellets were directly frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C until analyzed. Cells were thawed on ice and resuspended in a minimal volume of 0.1 M HCl before they were transferred to microtubes equipped with zirconia beads (0.5–0.7 mm, Roth, Karlsruhe Germany). Cell disruption was carried out using a speed mill (Analytik Jena, Jena, Germany) with three disruption intervals of 2 min. Cells were cooled for 2 min on ice between the intervals. Samples were centrifuged for 30 min at $12,000 \times g$ and at 4 °C, and supernatants were either directly used for HPLC analysis or further processed for GC/MS analysis. The same procedure of sample preparation was followed for the *hpd1* mutant when samples were prepared for NMR analysis. However, only a 6-h time point was selected, and 20 mM 2-[¹³C]propionate replaced the unlabeled propionate from above. To process samples for GC/MS analysis, all chemical reagents were of analytical grade. Methoxyamine hydrochloride and pyridine were purchased from Sigma. *N*-Methyl-*N*-trimethylsilyltrifluoroacetamide was purchased from Mach-

erey-Nagel (Düren, Germany). 3-Hydroxypropionic acid was purchased from TCI (Zwijndrecht, Belgium). 50 μ l of the supernatant was transferred in a GC/MS glass vial and evaporated to dryness under vacuum (Concentrator Plus, Eppendorf, Hamburg). The sample derivatization was performed according to the protocol of Roessner *et al.* (43) by adding 80 μ l of methoxyamine hydrochloride (2 g/100 ml in pyridine) and 80 μ l of *N*-methyl-*N*-trimethylsilyltrifluoroacetamide to the dried sample. After each addition, a domestic microwave oven was used for heating (270 watts for 5 min) (44). Control standards were treated in an identical manner.

GC/MS, HPLC, and NMR Analyses—GC/MS analysis was performed using a GC-QqQ-MS (Agilent 7890A, 7000 MS). One μ l of the sample was injected into a VF 5-ms column (30 m with 5 m of EZguard, 0.25 mm inner diameter, and 0.25- μ m film thickness, Agilent, Waldbronn, Germany). The injection was performed in split mode (15:1), and the temperature of the injector was set to 290 °C. The oven program started at 50 °C (2 min) and rose up with a rate of 10 °C/min to 320 °C (11 min). Electron ionization was conducted at 70 eV, and data were collected in full scan mode (m/z 30–600).

Quantification of 3-hydroxypropionate was performed using an HPLC system (Jasco, Japan) equipped with a diode array detector and a refractive index detector). Samples were chromatographed over an Aminex HPX-87H column (9 μ m, 300 \times 7.8 mm, Bio-Rad) with 0.005 M H₂SO₄ as mobile phase. The column temperature was 50 °C. The flow rate of the mobile phase was set to 0.5 ml/min, and 50 μ l of the sample was injected. Quantification was achieved using external standard calibration method.

NMR spectra were recorded at 300 K on a Bruker Avance III 500 spectrometer with methanol-*d*₄ as solvent and internal standard. The ¹H NMR spectrum of 3-[2-¹³C]hydroxypropionic acid showed two signals at 2.50 ppm (2H, dt, $J = 127.8, 6.3$ Hz, H-2) and 3.80 ppm (2H, dt, $J = 6.3, 2.3$ Hz, H-3), respectively. The ¹H-decoupled ¹³C NMR spectrum included resonances at 38.2 ppm (carbon 2) and 58.9 ppm (carbon 3). A signal for the quaternary carbon of the carboxylic acid function (carbon 1) was not detected, which is likely due to signal dispersion caused by the homonuclear coupling to carbon 2.

Murine Model of Hematogenously Disseminated Candidiasis—8–10-Week-old female BALB/c mice (18–20 g; Charles River, Germany) were used for the experiments. The animals were housed in groups of five in individually ventilated cages and cared for in strict accordance with the principles outlined in the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes in compliance with the German Animal Welfare Act. Protocols were approved by the responsible Federal State authority (Thüringer Landesamt für Lebensmittelsicherheit und Verbraucherschutz) and its ethics committee. *C. albicans* strains were grown for 14 h at 30 °C, washed three times with PBS, and adjusted to 2.5×10^6 cells/ml. Mice were challenged intravenously on day 0 with 2.5×10^4 cfu/g body weight via the lateral tail vein. The health status of the mice was examined at least twice a day by a veterinarian. Body surface temperature and body weight were recorded daily. Mice showing severe signs of illness, like isolation from the group, apathy, hypothermia, and

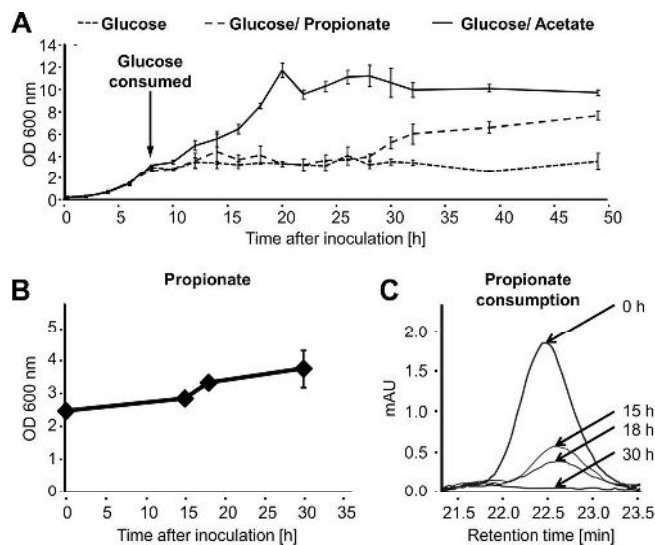


FIGURE 1. Propionate utilization by *C. albicans*. A, growth analysis of *C. albicans* wild type on 5 mM glucose, 5 mM glucose + 50 mM acetate, and 5 mM glucose + 50 mM propionate media. An arrow indicates the time point of total glucose consumption in all cultures. In medium supplemented with acetate, growth continues after glucose consumption. On medium supplemented with propionate, a 20-h lag phase follows glucose consumption after which biomass starts to increase. No further increase is observed from cultures growing without acetate or propionate supplementation. Data points show mean values with standard deviations from three independent cultures. B, growth of *C. albicans* on 20 mM propionate as sole carbon source. Cells were inoculated at high density, and aliquots were removed for propionate detection by HPLC analysis. C, HPLC-based determination of propionate consumption from cultures shown in B. After 30 h, no residual propionate is detected from the culture medium.

drastic weight loss, were euthanized by application of 200 μ l of ketamine hydrochloride (50 mg/ml). Gross pathological alterations were recorded during necropsy.

RESULTS

Propionate Consumption by *C. albicans*—To test for the ability of *C. albicans* to utilize propionate, growth analyses were performed. Of note, *Saccharomyces cerevisiae* is unable to utilize propionate as the sole carbon source but metabolizes it via the methyl citrate cycle in the presence of glucose (45). Because of the phylogenetic relation between *S. cerevisiae* and *C. albicans*, both belonging to the Saccharomycetales, we initially monitored growth of the *C. albicans* wild-type strain SC5314 on glucose, glucose/acetate, and glucose/propionate medium and simultaneously determined the consumption of glucose (Fig. 1). As long as glucose was present in the culture media, no difference among the three conditions was observed. After glucose consumption, cells continued to grow in the presence of acetate with only a short lag phase. In contrast, the adaptation to propionate caused an interruption of cell growth for \sim 20 h, after which an additional slight increase in biomass formation was observed. This result shows that glucose is the preferred carbon source and suppresses the use of alternative carbon sources. However, after glucose depletion, both acetate and propionate support growth, although the latter supports it only to a limited extent. To confirm the utilization of propionate, we inoculated *C. albicans* in a medium with propionate as the sole carbon source and monitored growth and propionate consumption. As indicated in Fig. 1, the slow increase in biomass

was accompanied by the consumption of propionate. Thus, *C. albicans* utilizes, albeit at low rates, propionate as sole carbon source and does not require the co-metabolism of glucose.

Utilization of Methyl Citrate Cycle or Methylmalonyl-CoA Pathway in *C. albicans*—To identify genes involved in propionyl-CoA degradation, we first screened the genome for genes coding for enzymes of the methyl citrate cycle. For this analysis, the methylcitrate synthases Cit3p from *S. cerevisiae* (46) and McsA from *A. fumigatus* (20) served as templates. Analysis revealed the sole presence of the putative citrate synthase Cit1p (orf19.4393), but no additional methylcitrate synthase. To check for a specific methylisocitrate lyase, Icl2p from *S. cerevisiae* (30) and MclA from *A. fumigatus* (25) were used as templates, but they only revealed the phylogenetically closely related isocitrate lyase Icl1p (orf19.6844) from *C. albicans* (4, 11, 25). When the putative methylcitrate dehydratase from *S. cerevisiae* (accession number NP_015326) or *A. fumigatus* (accession number EDP47611) was used for BLASTP analyses, no homologue was detected in the *C. albicans* genome. To verify the absence of methyl citrate cycle activity in *C. albicans*, strain SC5314 was grown on glucose or propionate containing media and tested for citrate and methylcitrate synthase activity. Specific citrate synthase activity on glucose was 0.5 units/mg, whereas methylcitrate synthase activity was near the background level with \sim 1 milliunit/mg. On propionate, citrate synthase activity increased to 5.1 units/mg, which is in agreement with glyoxylate cycle induction on nonfermentable nutrient sources (4, 9). However, methylcitrate synthase remained low with \sim 6 milliunits/mg. Thus, the absence of genes specifically contributing to a methyl citrate cycle in combination with the lack of methylcitrate synthase activity on propionate indicates that *C. albicans* does not utilize the methyl citrate cycle for the degradation of propionyl-CoA.

To identify genes required for a functional methylmalonyl-CoA pathway, we selected the essential coenzyme B₁₂-dependent methylmalonyl-CoA mutase (23) for genome analyses. Methylmalonyl-CoA mutases from different species are highly conserved, and the enzymes from *Homo sapiens* (accession number AAA59569), the bacterium *Rhodobacter sphaeroides* (accession number ACJ71672), and the nematode *Caenorhabditis elegans* (accession number CAA84676) display between 63 and 75% amino acid identity. However, no methylmalonyl-CoA mutase was found in the *C. albicans* genome. It is therefore unlikely that *C. albicans* uses the methylmalonyl-CoA pathway for propionate degradation.

Two-dimensional Gel Proteomic Analyses for Identification of Proteins Involved in Propionate Degradation—Because *C. albicans* neither uses the methyl citrate cycle nor the methylmalonyl-CoA pathway, an alternative pathway for propionyl-CoA degradation was required. Because of the very long adaptation phase of *C. albicans* to utilize propionate, we decided to perform proteomic analyses on cells actively growing on this carbon source. To allow for a selection of proteins of interest, we compared the protein spot pattern of propionate-grown cells with those from cells grown on glucose and acetate medium. We excised about 80 major protein spots from each condition and focused especially on those proteins that

Propionyl-CoA Degradation in *C. albicans*

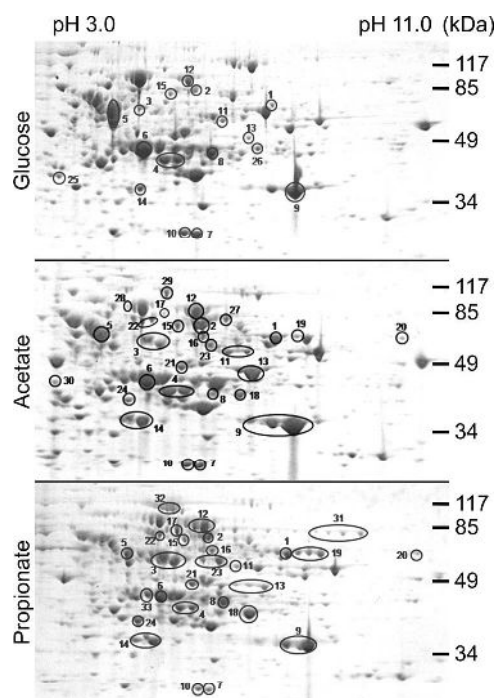


FIGURE 2. Proteomic analysis of protein extracts from *C. albicans* wild type cultivated on glucose, acetate, or propionate medium. Protein extracts were prepared from cells in the exponential growth phase and separated by two-dimensional gel electrophoresis. Major or unique spots from different conditions were analyzed by MALDI-TOF-MS analysis. Proteins assigned to catabolic processes of GO term analyses (see also Table 2) are highlighted and marked by numbered 1–33. Details on all proteins identified can be found in supplemental Table S1.

were apparently unique or highly abundant under the respective conditions (Fig. 2).

Among the ~250 spots analyzed, we identified 73 different proteins (supplemental Table S1). This low number was mainly due to post-translational modifications that led to multiple identifications of the same protein from different spots on one gel. 33 of these proteins were assigned to catabolic processes of primary carbon metabolism by GO-term analyses and are shown in Table 2. Among these, 15 proteins were identified from all three growth conditions and were associated with central metabolic pathways such as acetyl-CoA metabolism, fermentation, glycolysis, and the citric acid cycle. Additionally, a dihydrolipoamide-containing dehydrogenase subunit was found, which is part of several dehydrogenase complexes in central metabolic pathways. There were nine proteins that were detected from acetate and propionate but not from glucose-grown cells. These proteins were specific for acetate metabolism, the glyoxylate cycle, the pentose phosphate pathway, and β -oxidation. Moreover, a protein, which is proposed to be associated with valine metabolism, was identified. Finally, we also detected proteins that were unique to specific growth conditions. On glucose, two subunits of the pyruvate dehydrogenase complex were identified, indicating a higher abundance of this complex during growth on glucose. On acetate, the acetyl-CoA synthetase Acs1p and enzymes of the citric acid cycle were identified, which indicates an increased turnover of metabolites via this pathway and is in agreement with activity of the glyoxylate cycle for anaplerosis of oxaloacetate. On propionate, a putative fumarate reductase was identified that is difficult to assign a specific function without

further investigation. Additionally, two enzymes of the β -oxidation, namely the bifunctional enoyl-CoA hydratase/hydroxyacyl-CoA dehydrogenase Fox2p and the main 3-ketoacyl-CoA thiolase Pot1p (14), were identified. Taken together, enzymes involved in β -oxidation of fatty acids were highly abundant in cells grown on propionate, which implies that propionyl-CoA might enter the β -oxidation pathway for further degradation.

Selection of Target Genes for Knock-out Experiments—As mentioned previously, a pathway for propionyl-CoA degradation via a modified β -oxidation pathway has been suggested for plants (31), some insects (32), some bacteria (33, 47), and a relative of *C. albicans*, which is *C. rugosa* (34, 35). Based upon substrate labeling studies, possible reactions leading to the key intermediate 3-hydroxypropionate and, eventually, to acetate or acetyl-CoA formation have been postulated. Additional information on the enzymes involved in these reactions is, however, lacking, although candidate genes have been proposed for the plant *Arabidopsis thaliana* (31) as indicated in the scheme in Fig. 3. Based on our proteomics experiment and genome analyses, we speculated on the respective candidates in *C. albicans*.

While entering the β -oxidation pathway, propionyl-CoA becomes oxidized to acrylyl-CoA, which could be performed by one of the fatty acyl-CoA oxidases. A likely candidate from our analyses was Pox1-3p, because it was identified from acetate- and propionate-grown cells. However, an involvement of other isoenzymes cannot be excluded. Subsequently, a hydration of acrylyl-CoA leads to the formation of 3-hydroxypropionyl-CoA. Because there is only a single peroxisomal bifunctional enoyl-CoA hydratase/hydroxyacyl-CoA dehydrogenase present in the genome of *C. albicans* (13–15, 48), it is extremely likely that this step is performed by Fox2p. In addition, Fox2p was identified as a highly abundant protein in propionate-grown cells. However, if Fox2p is involved in this reaction, it needs to release 3-hydroxypropionyl-CoA rather than converting it to 3-ketopropionyl-CoA, which does not belong to the assumed intermediates of a 3-hydroxypropionate pathway (31, 32). In contrast, removal of hydroxypropionyl-CoA to a different compartment such as the mitochondria followed by the action of a thioester hydrolase would lead to the formation of 3-hydroxypropionate. Although we did not identify a respective protein in our proteomic approach, we used the proposed *A. thaliana* candidate proteins (31) as template for genome analyses. Indeed, we were able to identify Ehd3p as a putative candidate in *C. albicans*, which has been predicted as a hydroxyisobutyryl-CoA hydrolase with putative mitochondrial localization. 3-Hydroxypropionate could then undergo a dehydrogenase reaction to malonate semialdehyde, and a candidate from our analyses was the protein encoded by orf19.5565 that had been annotated as a putative 3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase from valine metabolism. In agreement with a putative mitochondrial localization of Ehd3p, the protein encoded by orf19.5565 also contains a putative mitochondrial import sequence and was detected from acetate and propionate grown cells. Finally, it has been assumed that additional dehydrogenase reactions convert malonate semialdehyde to either malonate with subsequent decarboxylation to acetate or via a coen-

TABLE 2

Proteins with the GO-term “carbon metabolism” from proteomic analyses of glucose-, acetate-, or propionate-grown cells

For a complete list of all proteins identified and their respective scores from analysis refer to supplemental Table S1.

Biological Process	Predicted Function	Spot No.	Accession No.	Gene Name	Systematic Name	Growth Condition
Acetate Metabolism	Acetyl-CoA Hydrolase/Transferase	1	gi 68482646	<i>ACH1</i>	orf19.3171	Glucose, Acetate and Propionate
	Acetyl CoA Synthetase	2	gi 68484803	<i>ACS2</i>	orf19.1064	
Fermentation	Aldehyde Dehydrogenase	3	gi 68481547	<i>ALD5</i>	orf19.5806	
	Alcohol Dehydrogenase	4	gi 68467815	<i>ADH1</i>	orf19.3997	
	Pyruvate Decarboxylase	5	gi 68480872	<i>PDC11</i>	orf19.2877	
Glycolysis	Enolase	6	gi 68488457	<i>ENO1</i>	orf19.395	
	Phosphoglycerate Mutase	7	gi 68469783	<i>GPM1</i>	orf19.903	
	3-Phosphoglycerate Kinase	8	gi 68489602	<i>PGK1</i>	orf19.3651	
	Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase	9	gi 68472227	<i>TDH3</i>	orf19.6814	
	Triose-Phosphate Isomerase	10	gi 68472093	<i>TPI1</i>	orf19.6745	
Dehydrogenase Subunit	Putative Dihydrolipoamide Dehydrogenase	11	gi 68487498	<i>LPD1</i>	orf19.6127	Acetate and Propionate
Citric Acid Cycle	Aconitase	12	gi 68479387	<i>ACO1</i>	orf19.6385	
	Citrate Synthase	13	gi 68481855	<i>CIT1</i>	orf19.4393	
	Mitochondrial Malate Dehydrogenase	14	gi 68466091	<i>MDH1-1</i>	orf19.4602	
	Succinate Dehydrogenase	15	gi 68480862	<i>SDH12</i>	orf19.2871	
Acetate Metabolism	Carnitine Acetyl Transferase	16	gi 68466067	<i>CAT2</i>	orf19.4591	Acetate and Propionate
Fermentation	Aldehyde Dehydrogenase	17	gi 68490378	<i>ALD6</i>	orf19.742	
	Alcohol Dehydrogenase	18	gi 68476713	<i>ADH2</i>	orf19.5113	
Glyoxylate Cycle	Isocitrate Lyase	19	gi 68487782	<i>ICL1</i>	orf19.6844	
	Malate Synthase	20	gi 68464883	<i>MLS1</i>	orf19.4833	
Pentose Phosphate Pathway	Putative 6-Phosphogluconate Dehydrogenase	21	gi 68467359	<i>GND1</i>	orf19.5024	
	Putative Transketolase	22	gi 68476711	<i>TKL1</i>	orf19.5112	
β -Oxidation of Fatty Acids	Predicted Acyl-CoA Oxidase	23	gi 68468339	<i>POX1-3</i>	orf19.1652	
Valine Metabolic Process	Putative 3-Hydroxyisobutyrate Dehydrogenase	24	gi 68473605	<i>HPD1</i>	orf19.5565	
Pyruvate Dehydrogenase Complex	Putative Pyruvate Dehydrogenase	25	gi 68477571	<i>PDB1</i>	orf19.5294	Acetate
	Putative Pyruvate Dehydrogenase Alpha Chain	26	gi 68481122	<i>PDA1</i>	orf19.3097	
Acetate Metabolism	Putative Acetyl-CoA Synthetase	27	gi 68483295	<i>ACS1</i>	orf19.1743	Propionate
Citric Acid Cycle	Aconitase	28	gi 68487910	<i>ACO2</i>	orf19.6632	
	Putative 2-Oxoglutarate Dehydrogenase	29	gi 68491108	<i>KGD1</i>	orf19.6165	
Anaerobic Respiration	Putative Succinate-CoA Ligase Beta Subunit	30	gi 68488751	<i>orf19.710</i>	orf19.710	
	Putative Mitochondrial Fumarate Reductase	31	gi 68467323	<i>OSM2</i>	orf19.5005	
β -Oxidation of Fatty Acids	3-Hydroxyacyl-CoA Epimerase	32	gi 68492311	<i>FOX2</i>	orf19.1288	Propionate
	Putative Peroxisomal 3-Oxoacyl-CoA Thiolase	33	gi 68474608	<i>POT1</i>	orf19.7520	

Propionyl-CoA Degradation in *C. albicans*

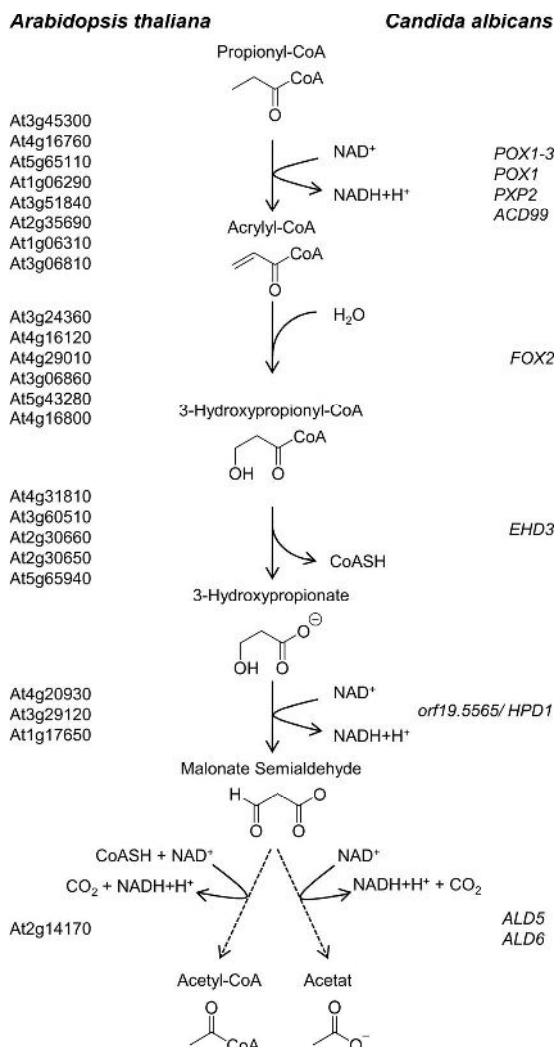


FIGURE 3. Scheme of the modified β -oxidation pathway via 3-hydroxypropionate. Candidate genes predicted for the plant *A. thaliana* (31) are shown on the left side and candidate genes for *C. albicans* on the right side of the pathway. Propionyl-CoA enters the β -oxidation pathway and is oxidized to 3-hydroxypropionyl-CoA. This intermediate exits the β -oxidation pathway by hydrolysis of the CoA ester and is further oxidized to either acetate or acetyl-CoA.

zyme A-acylating aldehyde dehydrogenase directly to acetyl-CoA. At least one additional dehydrogenase would be required for these reactions, and we identified Ald6p, an enzyme with a putative mitochondrial localization, from acetate- and propionate-grown cells. Furthermore, Ald5p that does not display a sequence for mitochondrial import was present under all conditions. Both aldehyde dehydrogenase candidates displayed 49.6 and 51.6% identity to the putative *A. thaliana* candidate At2g14170. The conversion of propionyl-CoA to acetate or acetyl-CoA would subsequently require the glyoxylate bypass for gluconeogenesis, and in agreement, isocitrate lyase and malate synthase were found in both acetate- and propionate-grown cells.

In summary, a complete set of enzymes required for propionyl-CoA degradation via a modified β -oxidation pathway is present in *C. albicans*, and most of the candidates were identified from propionate-grown cells. However, because several of the proteins were not specifically produced in the presence of

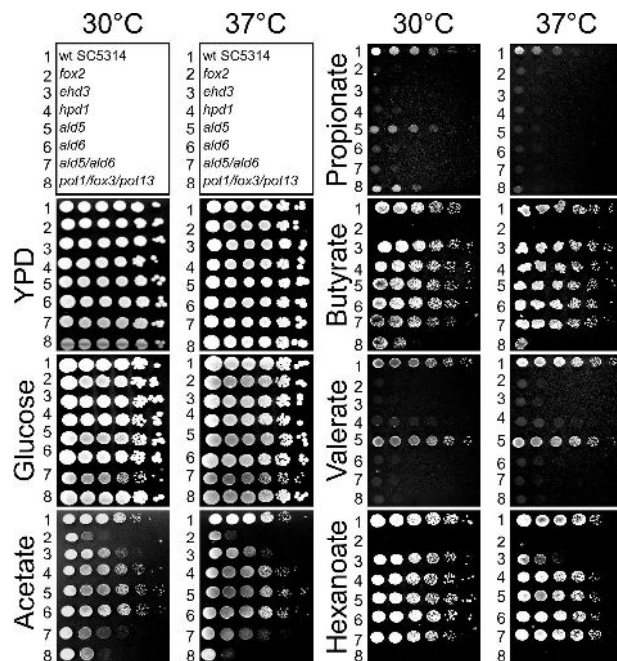


FIGURE 4. Growth analysis of *C. albicans* wild type and deletion mutants on solid media containing different carbon sources. Serial dilutions (10^6 to 10^1 cells/spot) were used for inoculation, and plates were incubated at either 30 or 37 °C. The scheme on top denotes the order of strains on all plates. Lane 1, SC5314 wild-type strain; lane 2, homozygous *fox2* deletion strain; lane 3, homozygous *ehd3* deletion strain; lane 4, homozygous *hpd1* (orf19.5565) deletion strain; lane 5, homozygous *ald5* deletion strain; lane 6, homozygous *ald6* deletion strain; lane 7, homozygous mutant with *ald5* and *ald6* deletions; lane 8, homozygous triple mutant with deletion of the ketoacyl-CoA thiolases *pot1*, *fox3*, and *pot13*. Strains complemented on one allele showed no altered phenotype in comparison with the wild type (data not shown).

propionate, but also on acetate, their *in vivo* contribution to propionyl-CoA degradation remained to be elucidated. For this purpose, we investigated previously generated *fox2* and 3-ketoacyl-CoA thiolase mutants (14) for their contribution to propionate metabolism. Furthermore, we generated homozygous mutants of *ehd3*, *orf19.5565*, *ald5*, *ald6*, and a double knockout of *ald5* and *ald6* for phenotypic characterization.

Selection of Carbon Sources for Characterization of Mutant Strains—The genes from the selection above were deleted in the background of the *C. albicans* SC5314 wild-type strain utilizing the re-usable *SAT1* flipper cassette (39). To characterize these mutants, seven different solid media were used in a screening approach (Fig. 4). All strains were analyzed for their growth behavior on YPD and glucose medium as positive controls. Furthermore, we tested growth on the carboxylic acids acetate, propionate, butyrate, valerate, and hexanoate. Acetate does not require the β -oxidation pathway, because its activation directly results in a single acetyl-CoA unit. Butyrate and hexanoate require one or two rounds of β -oxidation to yield two and three units of acetyl-CoA, respectively. Finally, although propionate might not require a complete round of β -oxidation, but branches into a modified β -oxidation pathway, valerate contains five carbon atoms and could first undergo one complete cycle of “normal” β -oxidation that leads to the formation of acetyl-CoA and propionyl-CoA. For the breakdown of the latter, the modified β -oxidation pathway would also be required.

Propionyl-CoA Degradation in *C. albicans*

Phenotypic Characterization of the β -Oxidation Mutants *fox2* and *pot1/pot13/fox3*—As expected, a *fox2* mutant (lane 2 in Fig. 4) and the triple 3-ketoacyl-CoA thiolase *pot1/pot13/fox3* mutant (lane 8 in Fig. 4) displayed no growth defects on YPD and glucose medium (14) but showed reduced growth on the nonfermentable carbon source acetate. Although a β -oxidation pathway is not required on acetate, studies on a *fox2* mutant showed that peroxisomal morphology is altered, which negatively affects the glyoxylate cycle (15). The same could be true for the 3-ketoacyl-CoA thiolase triple mutant. Both mutants were also defective in utilization of butyrate, valerate, and hexanoate that require the β -oxidation pathway. However, the *fox2* mutant was completely unable to grow on propionate, whereas growth of the triple 3-ketoacyl-CoA thiolase mutant was similar to that on acetate. This indicates that Fox2p is an essential enzyme required for propionyl-CoA degradation, which is in agreement with the modified β -oxidation pathway. Furthermore, a branch in the β -oxidation pathway at the level of Fox2p would also avoid action of the 3-ketoacyl-CoA thiolases, which is in agreement with the observed phenotype. Thus, Fox2p but none of the 3-ketoacyl-CoA thiolases appears essential for propionyl-CoA degradation.

Phenotypic Characterization of the *ehd3* Mutant—Ehd3p displays 33.2% identity and 53% similarity to the putative hydroxyisobutyryl-CoA hydrolase CHY1 from *A. thaliana* (accession number Q9LJK1) and was therefore selected as a candidate gene involved in a modified β -oxidation pathway. Furthermore, Ehd3p is also 37.7% identical (54.4% similarity) to the human hydroxyisobutyryl-CoA hydrolase (accession number NP_055177), which has been shown to be highly active with 3-hydroxypropionyl-CoA as substrate (49). Therefore, we speculated that Ehd3p might perform the hydrolysis of 3-hydroxypropionyl-CoA, and we speculated for a growth defect on propionate and valerate but not on the other carbon sources tested. In agreement, the *ehd3* mutant displayed no growth defect on YPD, glucose, butyrate (lane 3 in Fig. 4) or the amino acid valine (Fig. 5C). The latter finding was unexpected, because classic valine degradation produces 3-hydroxyisobutyrate and propionyl-CoA as intermediates (50, 51). Some growth inhibition was observed on acetate and hexanoate, but this was more pronounced at elevated temperatures than at 30 °C. Interestingly, reduced growth on hexanoate could be complemented by carnitine supplementation (data not shown). The most striking effects of the *ehd3* mutant were observed on valerate and propionate, where growth was nearly completely abolished and could not be restored by the addition of carnitine (data not shown). Additionally, growth of the *ehd3* mutant was also completely abolished in liquid medium (Fig. 5A). This is in accordance with an essential role of Ehd3p in the hydrolysis of 3-hydroxypropionyl-CoA to provide 3-hydroxypropionate for subsequent enzymatic reactions. Furthermore, from the inability to grow on valerate, we speculated that accumulating 3-hydroxypropionyl-CoA could cause toxic effects on Fox2p.

Growth of the *ehd3* mutant on butyrate was not affected and on acetate and hexanoate only slightly affected. This indicates that Ehd3p is not essential for β -oxidation or growth on acetyl-CoA units. In contrast, valerate must first undergo one β -oxidation cycle leading to acetyl-CoA and propionyl-CoA. Although this

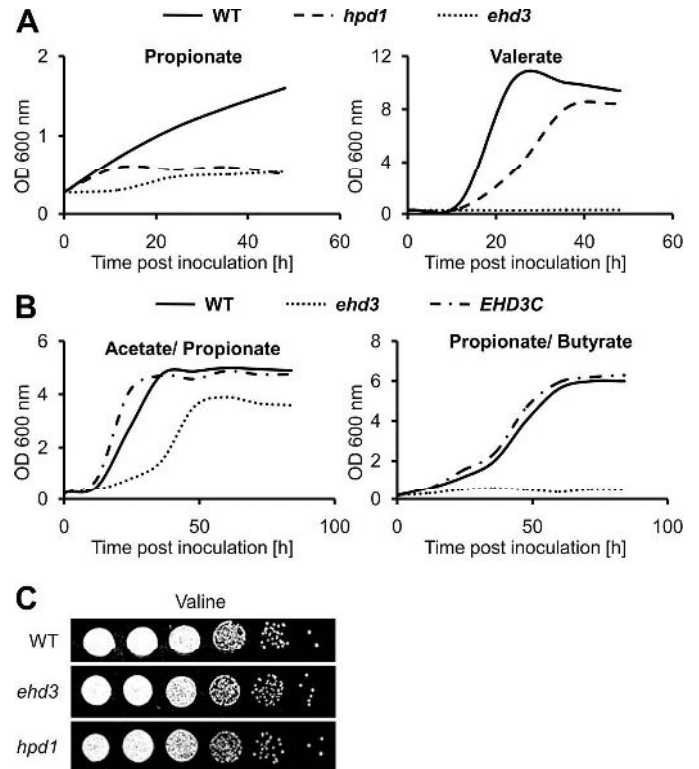


FIGURE 5. Growth analysis of wild type, $\Delta/hpd1$ (*hpd1*) mutant, and $\Delta/\Delta ehd3$ (*ehd3*) mutant on liquid media and on valine-containing solid media. A, growth of wild type, *hpd1* deletion mutant, and *ehd3* deletion mutant on propionate and valerate medium. The *hpd1* mutant shows some initial biomass formation on propionate, but growth is completely abolished at later time points. On valerate, the mutant shows a decreased growth rate and reduced final biomass. The *ehd3* deletion mutant only reveals very limited growth after a 15–20-h lag phase and is unable to grow on valerate. Mean values from three independent parallel cultures are shown. B, growth of the *ehd3* deletion mutant and its complemented strain in comparison with the wild type on mixed carbon sources. Although the mutant is able to grow at a reduced rate in the presence of acetate with propionate, no growth is observed when butyrate is supplemented with propionate. Mean values from three independent parallel cultures are shown. C, growth analysis on valine-containing solid media. The homozygous *ehd3* and *hpd1* deletion mutants show no altered growth phenotype in comparison with the wild type.

acetyl-CoA could be sufficient for energy metabolism and biomass formation, the *ehd3* mutant was completely blocked on valerate, implying that accumulating hydroxypropionyl-CoA could specifically inhibit subsequent β -oxidation cycles at the level of Fox2p. To test this hypothesis, we incubated the *ehd3* mutant and the wild type on acetate/propionate and on butyrate/propionate medium. As expected from an inhibition of Fox2p, no growth was observed for the *ehd3* mutant on butyrate/propionate medium (Fig. 5B), whereas growth on acetate/propionate medium was only slightly inhibited (Fig. 5B). This agrees with a specific inhibitory effect of 3-hydroxypropionyl-CoA on fatty acid degradation and its minor toxicity toward general acetyl-CoA metabolism. In summary, Ehd3p seems responsible for hydroxypropionyl-CoA hydrolysis, and the protein appears essential for the proposed modified β -oxidation pathway. Furthermore, the inability to efficiently remove hydroxypropionyl-CoA seems to cause a metabolic intoxication toward fatty acid degradation.

Phenotypic Characterization of the *orf19.5565* Mutant—The protein encoded by *orf19.5565* was detected by proteomic anal-

Propionyl-CoA Degradation in *C. albicans*

yses and had been annotated as a putative 3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase from valine catabolism, whereby enzymatic characteristics had not yet been determined. However, 3-hydroxyisobutyrate dehydrogenases from *Pseudomonas putida* (42) and *Bacillus cereus* (52) had been shown to be also active as 3-hydroxypropionate dehydrogenases. Thus, we expected that a deletion of orf19.5565 might affect growth on propionate and valerate but not on any of the other carbon sources tested. Indeed, growth of the mutant (lane 4 in Fig. 4) on YPD, glucose, acetate, butyrate, and hexanoate was indistinguishable from that of the wild type. Furthermore, growth on valine (Fig. 5C) was not affected, implying a different pathway for valine degradation in *C. albicans*. However, consistent with a contribution in propionyl-CoA degradation, colony formation on propionate was no longer observed, and growth on valerate was strongly reduced. Additionally, when tested in liquid cultures, the mutant only revealed some initial growth on propionate that was due to minor amounts of ethanol from the vitamin mix. After this consumption, further growth was completely abolished. Additionally, although the mutant was able to grow on valerate, growth and total biomass formation were reduced. This indicates that orf19.5565 is essential for propionyl-CoA degradation and might indeed act as a 3-hydroxypropionate dehydrogenase.

Phenotypic Characterization of *ald5* and *ald6* Mutants—The two aldehyde dehydrogenases Ald6p and Ald5p were identified from our proteomic approach (Table 2). Because 3-hydroxypropionate dehydrogenase would lead to the formation of malonate semialdehyde, further degradation requires at least one additional oxidation to form either malonate with a subsequent decarboxylation to acetate or a one-step reaction, in which acetyl-CoA is produced. The latter reaction has been described for methylmalonate-semialdehyde dehydrogenases (acylating CoA) from *Bacillus subtilis* (53, 54) and, most strikingly, from rat liver (EC 1.2.1.18, accession number Q02253) (55, 56) to which Ald6p displays 50.6% identity. In contrast, identity of Ald5p to the rat liver enzyme was only 29.1%. This made Ald6p a likely candidate for the proposed enzymatic reaction.

A deletion of *ALD5* (Fig. 4, lane 5) reduced growth on propionate especially at elevated temperatures, but growth on valerate was similar to that of the wild type. This indicates that Ald5p might contribute to but is not essential for degradation of propionyl-CoA. Further analyses revealed that Ald5p seems generally required for growth on amino acids, but this was not followed in detail. In contrast to the *ald5* mutant, the *ald6* mutant (Fig. 4, lane 6) revealed growth defects on propionate and valerate similar to the *ehd3* and orf19.5565 mutant, whereas colony formation on all other media tested appeared virtually unaffected. Thus, Ald6p might indeed act as an aldehyde dehydrogenase converting malonate semialdehyde to acetyl-CoA. Additionally, as indicated for Ehd3p and the protein encoded by orf19.5565, Ald6p also possesses a putative mitochondrial localization signal. Therefore, production of mitochondrial acetyl-CoA allows further oxidation via the citric acid cycle. Interestingly, a double mutant deleted in *ald5* and *ald6* (Fig. 4, lane 7) also showed growth defects on glucose, acetate, and butyrate medium, implying that at least one of

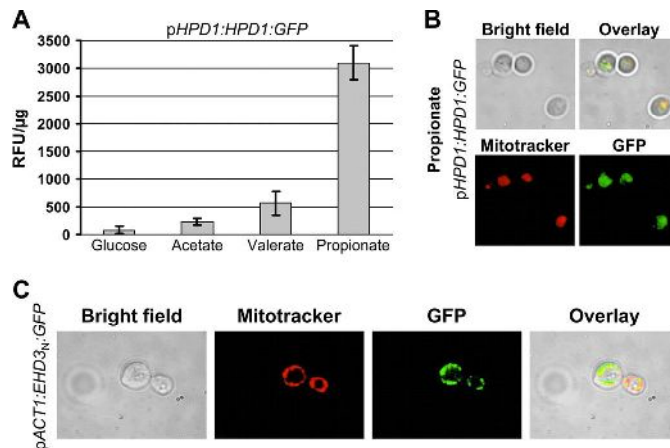


FIGURE 6. Analysis of *HPD1-GFP* and *EHD3-GFP* fusion strains. A, fluorescence intensity of the *HPD1-GFP* fusion under control of its natural *HPD1* promoter (*pHPD1*). Background fluorescence from the wild type has been subtracted, and values are given as relative fluorescence units/ μg of total protein ($\text{RFU}/\mu\text{g}$). Data represent mean values from two independent transformants measured in at least three serial dilutions. Error bars indicate standard deviations. *EHD3-GFP* fusion strains showed no fluorescence above background levels and are not depicted. B, fluorescence microscopy of a representative *pHPD1-HPD1-GFP* fusion strain grown in the presence of propionate. Mitochondria were stained with MitoTracker Red. C, subcellular localization of GFP fused with an N-terminal fragment of Ehd3p under the control of the constitutively expressed actin promoter *pACT1* (*pACT1-EHD3_N-GFP*). Mitochondria were stained with MitoTracker Red.

these dehydrogenases is also required for other metabolic processes independent of propionyl-CoA degradation.

Subcellular Localization of *Ehd3p* and *Hpd1p*—*In silico* analyses by Mitoprot detected putative signal peptides for Ehd3p and Hpd1p comprising the first 24 (Ehd3p) or 16 amino acids (Hpd1p). For both proteins the probability for import was predicted as $>95\%$. Thus, we assumed a transport of 3-hydroxypropionyl-CoA to the mitochondrial compartment, which might relieve inhibition of Fox2p by this CoA ester. To confirm the subcellular localization of Ehd3p and Hpd1p and, additionally, to analyze the induction of gene expression on propionate, we generated *HPD1* and *EHD3* fusions with enhanced *GFP* under control of the respective natural promoter. In both cases, the reporter constructs replaced one allele of the respective gene in the wild type. Gene expression was analyzed by determination of background-corrected fluorescence intensities from cell-free extracts of transformants grown on glucose, acetate, valerate, or propionate medium (Fig. 6). An increase in fluorescence was clearly detected for the *HPD1-GFP* fusion on propionate and, to a lesser extent, on valerate and acetate but not on glucose (Fig. 6A). Differential staining of mitochondria from propionate-grown *HPD1-GFP* fusion cells with MitoTracker confirmed a co-localization of GFP fluorescence with the mitochondrial network (Fig. 6B). In contrast, fluorescence intensities of *EHD3-GFP* fusions did not significantly exceed the wild-type background levels regardless of the applied growth condition (data not shown). This implies a general low expression of *EHD3* under its natural promoter, which is in agreement with the lack of Ehd3p from our proteomics analyses. However, low abundance of this putative 3-hydroxypropionyl-CoA hydrolase might be required to avoid unspecific hydrolysis of related CoA esters such as acetyl-CoA or malonyl-CoA, which is in agreement with an inability to produce a full-

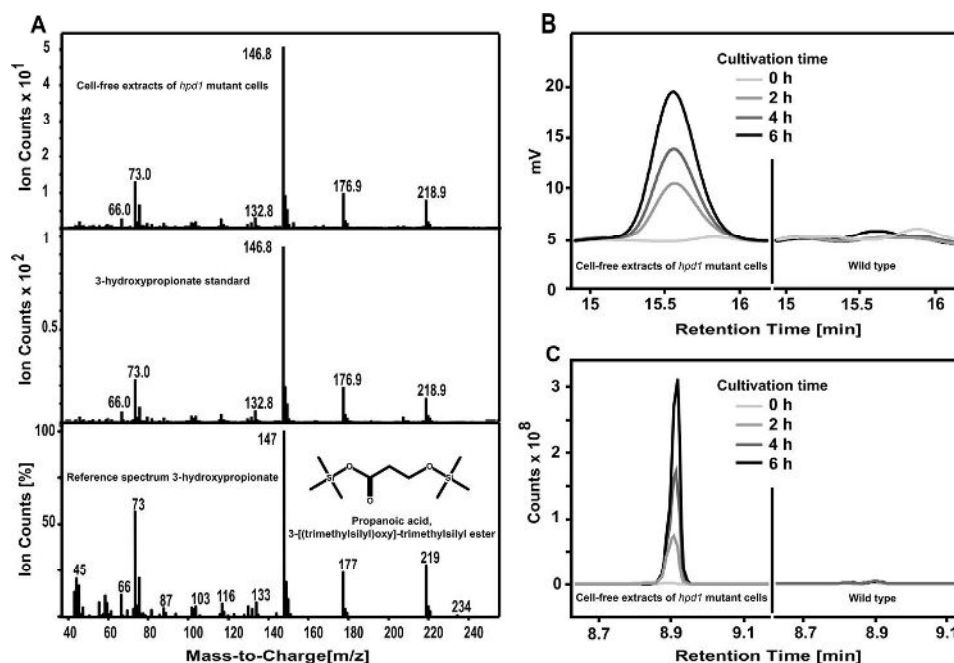


FIGURE 7. **Identification and quantification of 3-hydroxypropionic acid by HPLC and GC-MS analysis.** Silylation of 3-hydroxypropionate leads to the 3-[(trimethylsilyloxy)-trimethylsilyl] ester of propionic acid. **A**, GC-MS spectrum of silylated 3-hydroxypropionate from cell-free extracts of propionate/acetate-cultivated *hpd1* mutant cells (*upper panel*), authentic 3-hydroxypropionate (*middle panel*), and a reference spectrum from a GC-MS database (*lower panel*). **B**, HPLC quantification of 3-hydroxypropionate from cell-free extracts of the *hpd1* mutant (*left*) and wild type (*right*) cultivated on acetate + propionate medium for the indicated time points. **C**, GC-MS analysis of 3-hydroxypropionate accumulation from cell-free extracts of the *hpd1* mutant (*left*) and wild type (*right*) cultivated for the indicated time points on valerate.

length Ehd3p under control of the actin promoter (data not shown). To confirm that not only Hpd1p but also Ehd3p localizes to mitochondria, we selected the first 48 amino acids of Ehd3p for a GFP fusion under the control of the actin promoter *pACT1*. The construct replaced one wild-type allele in SC5314 and revealed GFP fluorescence co-localizing with the MitoTracker (Fig. 6C). Thus, Ehd3p and Hpd1p contain functional mitochondrial import signals supporting a relocation of the modified β -oxidation from peroxisomes to mitochondria.

Detection of 3-Hydroxypropionate—All our mutant analyses corroborated the proposed metabolism of propionyl-CoA via a modified β -oxidation pathway in which 3-hydroxypropionate is formed as a key intermediate. Therefore, we aimed at the identification of 3-hydroxypropionate from the *orf19.5565* mutant. We first cultivated the wild type and the *orf19.5565* mutant on a medium containing acetate and propionate to allow for growth of both strains. After 6 h, cells were harvested and lysed, and extracts were analyzed by GC/MS analysis using authentic 3-hydroxypropionate as internal standard. Indeed, 3-hydroxypropionate was detected from the extract of the mutant (Fig. 7). To determine the production of 3-hydroxypropionate in more detail, we quantified the production of 3-hydroxypropionate from a defined number of mutant and wild-type cells. For this purpose, both strains were pre-grown on YPD medium and shifted to acetate/propionate medium at high cell density. Samples were removed after 0, 2, 4, and 6 h, adjusted to the same optical density, and applied to the preparation of cell-free extracts. These extracts were subjected to analytical HPLC. The amount of 3-hydroxypropionate was quantified from the peak area around 15.5 min with authentic 3-hydroxypropionate as standard. Results revealed that up to

4 h no 3-hydroxypropionate was detectable in the wild type, whereas after 6 h a total amount of 2 μ mol of 3-hydroxypropionate was detected from the cell extract. For the mutant, 3-hydroxypropionate was undetectable directly after the shift at 0 h, but levels strongly increased to 16 μ mol at 2 h, 27 μ mol at 4 h, and 41 μ mol at 6 h (Fig. 7). Similarly, when wild type and mutant were incubated on valerate, the mutant, but not the wild type, showed a time-dependent accumulation of 3-hydroxypropionate as determined by GC/MS analysis (Fig. 7). These data confirmed the following: (i) 3-hydroxypropionate is produced during growth on nutrient sources that support propionyl-CoA formation, and (ii) the protein encoded by *orf19.5565* most likely acts as a 3-hydroxypropionate dehydrogenase. Subsequently, *orf19.5565* was therefore referred to as Hpd1p.

To further confirm that the observed 3-hydroxypropionate directly derives from propionate, we shifted the mutant to a medium containing 20 mM acetate and 20 mM 2- 13 C-propionate, harvested cells after 6 h, prepared cell-free extracts, and isolated 3-hydroxypropionate by HPLC. The concentrated fraction was subsequently analyzed by NMR spectroscopy. Its 1 H NMR spectrum (Fig. 8) revealed the presence of an AX system consisting of two methylene groups. The corresponding protons were vicinally coupled as indicated by their coupling constants and homonuclear correlation spectroscopy. Furthermore, it was evident that the methylene signal in the higher field was significantly split due to heteronuclear coupling to an adjacent 13 C atom ($J = 127.8$ Hz).

Recombinant Production and Characterization of Hpd1p—Accumulation of 3-hydroxypropionate in the *hpd1* (*orf19.5565*) mutant showed that the protein is directly involved in the conver-

Propionyl-CoA Degradation in *C. albicans*

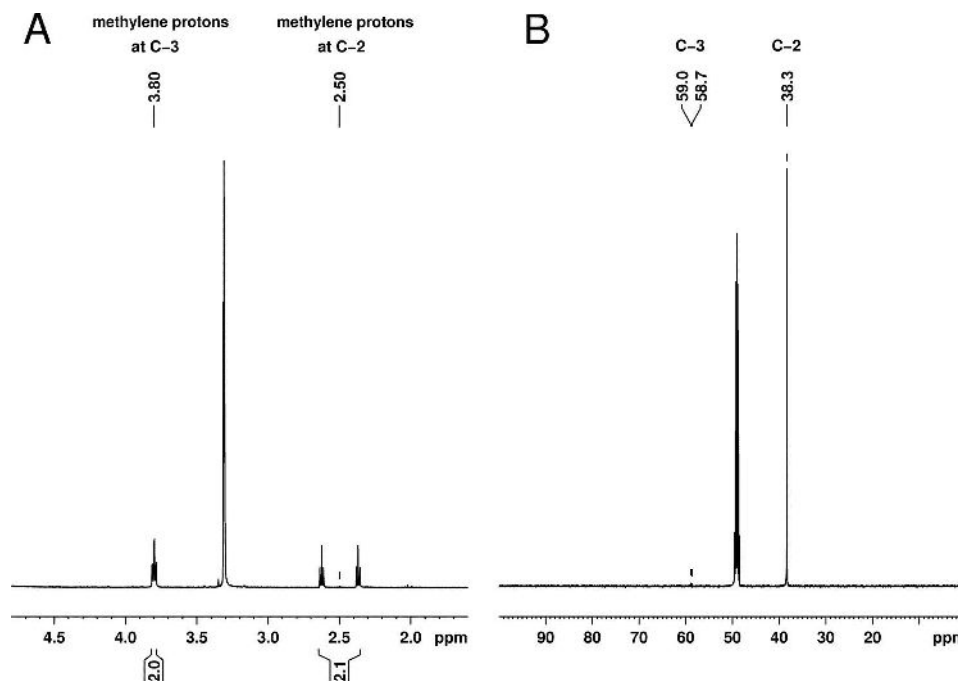


FIGURE 8. NMR analysis of 3-hydroxypropionate isolated from homozygous *hpd1* mutant cultivated for 6 h in the presence of acetate and 2-[^{13}C]propionate. A, ^1H NMR spectrum of 3-[2- ^{13}C]hydroxypropionic acid recorded at 500 Hz in methanol- d_4 . The signal of the methylene protons resonating at 2.50 ppm is split into two discrete triplets because of 1J coupling to ^{13}C . B, ^1H -decoupled ^{13}C NMR spectrum of 3-[2- ^{13}C]hydroxypropionic acid recorded at 125 MHz in methanol- d_4 . The α -carbon in 3-hydroxypropionic acid is strongly enriched in the ^1H -decoupled ^{13}C NMR spectrum, supporting the metabolic origin from 2-[^{13}C]propionate.

sion of this intermediate. Still, substrate specificity and turnover rate of 3-hydroxypropionate remained unknown. Thus, we produced a recombinant protein for biochemical characterization. To this end, we first replaced the N-terminal mitochondrial import sequence with a His tag and used a pET-vector expression system. Unfortunately, most of the protein produced in *E. coli* ended up in inclusion bodies. The soluble fraction purified by nickel-chelate chromatography yielded an enzyme of only about 20% purity with co-purification of several fragments that may have resulted from premature transcription termination. Therefore, a version with the C-terminal His tag was constructed. Again, a significant proportion of the protein was found in inclusion bodies, but a larger fraction remained soluble, and purification via nickel-chelate affinity chromatography resulted in a protein of about 90–95% purity as judged by SDS-PAGE analysis (Fig. 9A).

For biochemical characterization, we studied pH and buffer dependence of the enzymatic reaction, tested several different substrates, and determined K_m values for the assumed main substrates. First, we evaluated the effect of different buffers on enzymatic activity using 3-hydroxypropionate as a substrate (Fig. 9B). Similar to bacterial β -hydroxyisobutyrate dehydrogenases (42), an alkaline pH was strongly required for activity. However, a strong dependence on the buffer system was also observed. Thus, CHES buffer at pH 9.5 turned out to be the optimal buffer with only slightly decreased activities at the surrounding pH values of 9.0 and 10.0, and all subsequent analyses were performed using this buffer. Investigations on substrate specificity and specific activity (Table 3) revealed that 3-hydroxypropionate served as substrate supporting highest turnover rates, followed by L-serine, (S)- β -hydroxyisobutyrate, and

(R)- β -hydroxyisobutyrate. Although the additional methyl group in the hydroxyisobutyrate isomers negatively affects the maximum turnover rate, it may enhance the substrate binding. The K_m values were lowest for (S)- β -hydroxyisobutyrate followed by (R)- β -hydroxyisobutyrate, 3-hydroxypropionate, and L-serine. Furthermore, the K_m value for NAD was 10 times lower with (S)- β -hydroxyisobutyrate than with 3-hydroxypropionate. Notwithstanding that the catalytic efficiency was highest with (S)- β -hydroxyisobutyrate, the activity as 3-hydroxypropionate dehydrogenase must play an essential role under *in vivo* conditions, because deletion of *hpd1* led to an accumulation of 3-hydroxypropionate. Further characterization also showed that the enzyme was strictly dependent on the cofactor NAD, because no activity was observed when NADP was used as acceptor for reducing equivalents. EDTA added at concentrations of up to 5 mM did not affect enzymatic activity, indicating that catalysis does not require metal ions.

Contribution of Hpd1p to 3-Hydroxypropionate Dehydrogenase Activity in *C. albicans*—To confirm that Hpd1p is the major enzyme catalyzing the oxidation of 3-hydroxypropionate in *C. albicans*, we cultivated the wild type, the *hpd1* deletion mutant, and a strain complemented on one *HPD1* allele on glucose, acetate, propionate, and valerate medium. To avoid substrate limitation or the production of acetate during growth on glucose, the strains were pre-cultivated on YPD medium, washed, and transferred for 6 h to glucose and 8 h to the other carbon sources. Activity determinations from cell-free extracts (Table 4) revealed that no activity was detected when cells were shifted to glucose, which is in agreement with results from the GFP fusion constructs and our proteome analyses, in which Hpd1p was not detected. Furthermore, although the homozygous dele-

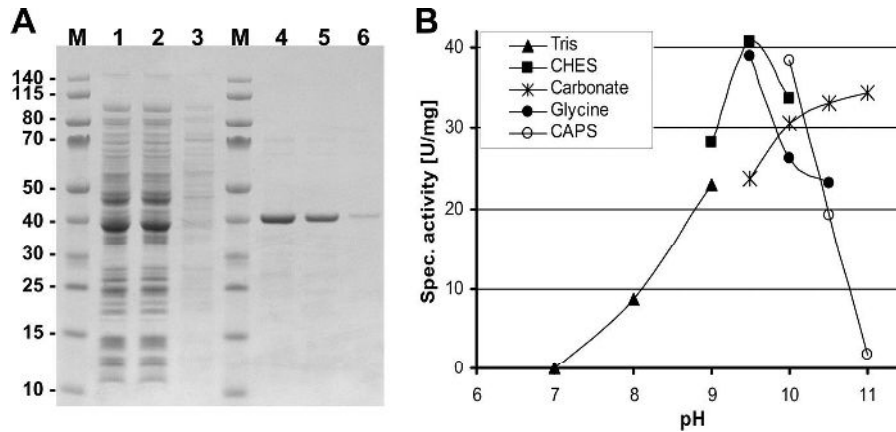


FIGURE 9. Purification and pH dependence of recombinant purified Hpd1p from *C. albicans*. A, SDS-PAGE analysis. Lane M, molecular mass marker; lane 1, cell-free extract; lane 2, column flow-through; lane 3, wash fraction; lanes 4–6, elution fractions. B, buffer and pH dependence of recombinant Hpd1p. Highest activity is observed in a range between pH 9.5 and 10.0 with CHES buffer.

TABLE 3
Biochemical characteristics of recombinant purified *C. albicans* Hpd1p

All values were determined at 22 °C in CHES buffer, pH 9.5.

Substrate	A_{spec} (exp) ^a	A_{spec} (theo) ^b	K_m	K_m (NAD)	k_{cat} ^c	K_{eff}
	units/mg	units/mg	mM	mM	s ⁻¹	M ⁻¹ s ⁻¹
3-Hydroxy-propionate	40.7 (@36 mM)	47.40	5.37	0.22	30.97	5.77 × 10 ³
(S)-β-Hydroxyisobutyrate	3.62 (@10 mM)	3.79	0.13	0.02	2.48	1.91 × 10 ⁴
(R)-β-Hydroxyisobutyrate	1.85 (@10 mM)	2.00	0.58	ND ^d	1.31	2.26 × 10 ³
L-Serine	5.16 (@30 mM)	14.40	46.7	ND ^d	9.41	2.02 × 10 ²

^a Maximum-specific activities as determined experimentally at given substrate concentrations are shown in parentheses.

^b Theoretic maximum-specific activities as deduced from Lineweaver-Burk diagrams.

^c Turnover numbers were calculated assuming one active site per subunit, a molecular mass of 39.2 kDa for the recombinant enzyme, and using the theoretical maximum activity value.

^d ND = not determined.

TABLE 4
3-Hydroxypropionate dehydrogenase activity of wild type, Δ/Δhpd1 mutant, and complemented strain (Δhpd1/HPD1)

Cultures were pregrown on YPD and shifted for 6 h to glucose and 8 h to acetate, valerate, or propionate medium. Activities are given in milliunits/mg, and mean values from three determinations with standard deviation are shown.

Strain	Glucose	Acetate	Propionate	Valerate
Wild type	1.2 ± 1.3	95.0 ± 9.7	230.1 ± 31.9	61.0 ± 8.9
Δ/Δhpd1	0 ± 0	0.2 ± 0.3	1.1 ± 1.0	0 ± 0
Δhpd1/HPD1	0.1 ± 0.2	36.9 ± 3.4	120.7 ± 6.3	52.3 ± 11.1

tion mutant showed no activity above background levels under any of the applied conditions, the wild type and the complemented mutant revealed activity in the order propionate > acetate > valerate, similar to the results obtained from the GFP fusion construct of Hpd1p (Fig. 6A). The induction on acetate and propionate additionally agrees with the identification of Hpd1p from these carbon sources by proteome analyses. Additionally, a gene dosage effect was observed for the complemented mutant that revealed lower Hpd1p activities compared with the wild type. These data clearly indicate that Hpd1p is the major 3-hydroxypropionate dehydrogenase in *C. albicans*, and accumulation of 3-hydroxypropionate in *hpd1* mutants is due to lack of this activity.

Contribution of Hpd1p to Virulence in a Murine Model of Systemic Candidiasis—Although deletion of *HPD1* only caused minor growth defects under *in vitro* conditions, the inability to yield energy and building blocks from propionyl-CoA degradation reduced growth speed and maximum biomass yield in the presence of nutrient sources that support propionyl-CoA formation. Therefore, we were interested whether deletion of

HPD1 reduces virulence in a murine model of systemic candidiasis, which could indicate that propionyl-CoA is an intermediate from the utilization of host-provided nutrients. Hence, we selected the wild-type SC5314, the homozygous *hpd1* deletion strain, and a strain complemented on one allele for systemic mouse infection. As shown in Fig. 10, virulence of the *hpd1* mutant was strongly attenuated. Wild type and complemented mutant showed similar virulence, in which 90–100% of mice succumbed to infection within 14 days. In contrast, mice infected with the *hpd1* mutant showed a strongly delayed progression of infection and only 30% of mice succumbed to infection within the 21-day observation period. This indicates that, at least in a systemic bloodstream infection model, *C. albicans* utilizes nutrients that lead to the production of propionyl-CoA, which requires the modified β-oxidation pathway for further utilization.

DISCUSSION

In this study, we aimed at the identification of the metabolic processes that enable *C. albicans* to utilize propionyl-CoA. This was of special interest, because studies on other pathogenic fungi, e.g. *A. fumigatus*, have shown that accumulating propionyl-CoA disturbs primary metabolism (20) and attenuates virulence (22). Therefore, it had been assumed that interruption of propionyl-CoA metabolism might provide a suitable target for new antifungal compounds. The methyl citrate cycle is common in Ascomycota such as *Aspergillus* species (19, 20), *Fusarium* species (57, 58), and the yeast *S. cerevisiae* (30, 46). Furthermore, genes encoding enzymes of the methyl citrate cycle have

Propionyl-CoA Degradation in *C. albicans*

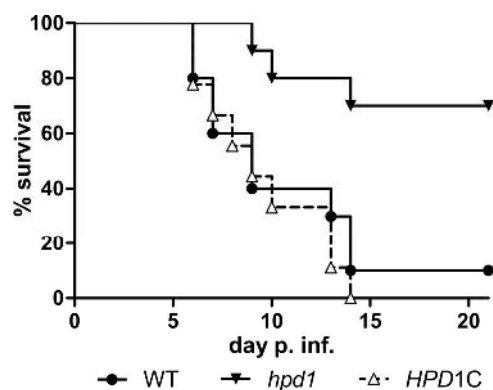


FIGURE 10. Murine infection model of disseminated candidiasis. BALB/C mice ($n = 10$ mice per strain) were infected intravenously with 2.5×10^4 cfu/g of body weight of the *hpd1* mutant, the wild type (WT), or the reconstituted mutant (HPD1C). Survival was monitored over a period of 21 days, and data are shown as Kaplan-Meier plots. The *hpd1* mutant reveals a significantly attenuated virulence ($p < 0.01$) compared with the wild type and the reconstituted mutant as calculated by the Log-rank (Mantel-Cox) test of the GraphPad Prism 5 software.

also been detected in Basidiomycota (25), which led to the assumption that this pathway is the general mechanism by which fungi degrade propionyl-CoA. However, exceptions for use of a modified β -oxidation pathway had been proposed for *C. rugosa* and *Candida catenulata* (34). However, although 3-hydroxypropionate accumulation had been described for *C. rugosa* (35), the enzymes involved in propionate metabolism had not been characterized.

As shown by our analyses, *C. albicans* neither possesses genes of a methyl citrate cycle nor of the methylmalonyl-CoA pathway. It thus appeared likely that propionyl-CoA metabolism in *C. albicans* could occur via a modified β -oxidation pathway. To test this hypothesis, we initially conducted microarray analyses (data not shown) to identify metabolic genes induced in the presence of propionate compared with those on acetate. Because of the long adaptation phase of *C. albicans* toward propionate, it was difficult to identify suitable time points for comparative analyses. Early time points of up to 4 h mainly revealed responses pointing to nutrient starvation and stress adaptation without a clear picture on the induction of genes from primary metabolism (data not shown). Therefore, we performed proteome analyses and focused on the major proteins and proteins that were found on one but not the other carbon source. This approach allowed the identification of several proteins that were responsible for propionyl-CoA degradation, underlining the power of proteomics in the analysis of new metabolic pathways.

Propionyl-CoA first enters the β -oxidation pathway as shown by the deletion of the marker gene *FOX2* that encodes the sole peroxisomal enoyl-CoA hydratase/hydroxyacyl-CoA dehydrogenase in *C. albicans* (13, 14, 48). Fox2p performs two consecutive reactions in the oxidation of fatty acids, namely the hydration of an enoyl-CoA and a subsequent dehydrogenase reaction. Because a mutant defective in all ketoacyl-CoA thiolases only showed a moderate growth defect on propionate similar to that observed on acetate (14), we conclude that propionyl-CoA degradation branches at the first part of the Fox2p reaction, which is the formation of 3-hydroxypropionyl-CoA from acrylyl-CoA.

To avoid accumulation of toxic 3-hydroxypropionyl-CoA, it has been proposed that the CoA ester is hydrolyzed (31, 32). Interestingly, our analyses showed that this reaction seems to occur within mitochondria and not in peroxisomes as proposed for plants (31), because our candidate protein Ehd3p localized to mitochondria. For the transport of 3-hydroxypropionyl-CoA to mitochondria, a carnitine shuttle system would be required, because the inner mitochondrial membrane is impermeable for peroxisomal/cytoplasmic CoA esters (60). This transport could be performed by the putative carnitine:acylcarnitine antiporter Crc1p, which is very similar to the acyl-carnitine transporter AcuH (61) from *A. nidulans* (55.6% identity) which was previously shown to be present in the mitochondrial membrane (62). Furthermore, Cat2p (also called Ctn2p), a peroxisomal and mitochondrial carnitine acyltransferase (63, 64), was detected from acetate- and propionate-grown cells (supplemental Table S1), indicating that the required machinery for the transport of 3-hydroxypropionyl-CoA is present. Carnitine acyltransferases perform reversible reactions. Although acyl-CoA esters are transformed into carnitine esters in the cytoplasm and peroxisomes, the back-reaction is performed by the same enzyme in mitochondria (60). Interestingly, *C. albicans* contains three carnitine acyltransferase isoenzymes with overlapping function, and virulence studies showed no defects of single or double deletion mutants (64). However, no triple mutant or a mutant defective in the transporter gene *CRC1* has been constructed and tested for virulence as yet. Thus, a single carnitine acyltransferase might be sufficient for hydroxypropionyl-CoA transport.

Accumulation of 3-hydroxypropionyl-CoA seems to cause toxic effects as deduced from analyses of the *ehd3* mutant. Propionate addition to the *ehd3* mutant inhibited growth on all fatty acids, but not on acetate, leading to the speculation that 3-hydroxypropionyl-CoA competitively blocks the dehydrogenase function of Fox2p. However, despite its contribution to propionyl-CoA degradation, it should also be noted that Ehd3p was annotated as an enzyme with 3-hydroxyisobutyryl-CoA hydrolase activity, which is required, at least in mammals, for the degradation of the amino acid valine (65). Studies on purified 3-hydroxyisobutyryl-CoA hydrolase from rat liver have shown that the enzyme is also highly active with 3-hydroxypropionate (66), which made it conceivable that *C. albicans* Ehd3p could act on valine and propionyl-CoA catabolism. However, deletion of *EHD3* did not affect growth on valine. This implies that either a second 3-hydroxyisobutyryl-CoA hydrolase is specifically involved in valine metabolism or that valine catabolism in *C. albicans* proceeds via a different pathway. Our preliminary results point to a mechanism of valine metabolism that is reminiscent of that in the plant *A. thaliana*. Here, mutations in the hydroxyisobutyryl-CoA hydrolases (*chy1* mutant) showed increased sensitivity toward propionate and isobutyrate but not to valine. In contrast, feeding studies with labeled valine revealed that the labeling pattern of valine was subsequently found in leucine, which indicates that valine is first converted to leucine prior to its degradation (31). Analyses on a *C. albicans* *leu1* mutant, which is defective in the putative 3-isopropylmalate dehydratase, confirmed the expected leucine auxotrophy, but the mutant was also unable to grow in the presence of

valine.³ Further studies will be performed to analyze valine degradation in *C. albicans* in more detail.

The identification of the key intermediate 3-hydroxypropionate in *C. albicans* provided substantial support for the presence of a modified β -oxidation pathway. In this study, we were able to show that the previously uncharacterized orf19.5565 (now named *HPD1*) encodes a 3-hydroxypropionate dehydrogenase, which accumulates 3-hydroxypropionate from propionate and the odd-chain fatty acid valerate. Interestingly, similar to Ehd3p, Hpd1p was also annotated as a putative enzyme from valine metabolism by acting as a 3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase. Our analyses on recombinant Hpd1p confirmed a maximum substrate turnover with 3-hydroxypropionate. The accumulation of 3-hydroxypropionate in the *hpd1* mutant and the lacking dehydrogenase activity in this mutant under inducing conditions confirms its essential contribution to propionyl-CoA degradation. Furthermore, as observed for the *ehd3* mutant, the *hpd1* mutant showed no growth defect in the presence of valine implying the following: (i) Hpd1p may have specifically adapted from valine degradation to serve for a modified β -oxidation pathway, and (ii) valine degradation in *C. albicans* does not proceed via the classical valine degradation pathway. Therefore, our analysis describes the first characterization of a eukaryotic 3-hydroxypropionate dehydrogenase that is specifically adapted to a modified β -oxidation pathway for propionyl-CoA degradation. Nevertheless, we cannot exclude that a homologue from *C. rugosa* had been purified in a previous investigation (67). *C. rugosa* had been cultivated on isobutyrate with the aim to identify a 3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase. A respective enzyme was purified, but activity was only tested with the substrates (*S*)- and (*R*)-3-hydroxyisobutyrate. Protein or gene sequences had not been determined. Thus, it cannot be excluded that the *C. rugosa* enzyme also acts as a 3-hydroxypropionate dehydrogenase. In agreement with this assumption, it should be noted that Hpd1p is conserved in all yeasts of the CUG clade. However, an orthologue is not found in the genome of *S. cerevisiae*. Bakers' yeast metabolizes propionyl-CoA via the methyl citrate cycle (30, 46) and does not require Hpd1p for a modified β -oxidation pathway. Furthermore, the valine degradation pathway in this yeast has not been explored, but it could also proceed via leucine. This would make Hpd1p dispensable.

The putative aldehyde dehydrogenase Ald6p seems to perform the final step in the conversion of propionyl-CoA to acetyl-CoA for several reasons. (i) Deletion of *ALD6* caused growth defects on carbon sources that lead to propionyl-CoA. (ii) Ald6p is >40% identical to bacterial methylmalonate semialdehyde dehydrogenase and >50% identical to the methylmalonate semialdehyde dehydrogenase from rat liver, and these enzymes have been shown to produce acetyl-CoA from malonate semialdehyde (53–56). (iii) Similar to other enzymes of the modified β -oxidation pathway, Ald6p also seems to localize to the mitochondria. Thus, acetyl-CoA is formed in mitochondria and allows direct oxidation via the citric acid cycle for energy production. This mitochondrial localization also causes a prob-

lem that may explain the very long adaptation time and low growth rate of *C. albicans* on propionate, whereas a good growth support is observed on valerate. Genome analyses imply that *C. albicans* neither possesses an ATP:citrate lyase, nor a citrate lyase. Mitochondrial acetyl-CoA is hence trapped in this compartment and cannot be used for gluconeogenic and biosynthetic purposes. In contrast, metabolism of valerate produces one peroxisomal (by normal β -oxidation) and one mitochondrial (by modified β -oxidation) acetyl-CoA. Because the peroxisomal glyoxylate cycle can generate oxaloacetate, energy gain in mitochondria and biomass production from peroxisomes is balanced. At this point, it remains open to which mechanism cytoplasmic acetyl-CoA or oxaloacetate can be produced during growth on propionate as the sole carbon source. Probably, the putative fumarate reductase is involved in this process which was found to be highly abundant only in propionate-grown cells. Further studies are required to elucidate its contribution in detail. Nevertheless, concerning the conversion of propionyl-CoA to acetyl-CoA, candidates for all key enzymes required for the branch in the modified β -oxidation pathway (Ehd3p, Hpd1p, and Ald6p) have been identified by our analyses.

Finally, we performed virulence studies using the *hpd1* mutant as a marker for propionyl-CoA degradation. Our analyses clearly indicate a contribution of this enzyme to virulence implying that propionyl-CoA is generated during the infection process. However, it needs to be investigated whether the sources of propionyl-CoA are amino acids or other compounds, such as cholesterol, as speculated for the pathogenic bacterium *Mycobacterium tuberculosis* (59, 68). However, the reduced virulence of a *C. albicans* mutant defective in propionyl-CoA metabolism implies that the modified β -oxidation pathway could provide a target for new antifungal compounds.

Acknowledgments—We thank Daniela Hildebrandt and Armin Siering for excellent technical support in gene cloning and metabolite detection by HPLC and GC/MS.

REFERENCES

- Kim, J., and Sudbery, P. (2011) *Candida albicans*, a major human fungal pathogen. *J. Microbiol.* **49**, 171–177
- Gow, N. A., and Hube, B. (2012) Importance of the *Candida albicans* cell wall during commensalism and infection. *Curr. Opin. Microbiol.* **15**, 406–412
- Moran, C., Grussemeyer, C. A., Spalding, J. R., Benjamin, D. K., Jr., and Reed, S. D. (2009) *Candida albicans* and non-*albicans* bloodstream infections in adult and pediatric patients: comparison of mortality and costs. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **28**, 433–435
- Brock, M. (2009) Fungal metabolism in host niches. *Curr. Opin. Microbiol.* **12**, 371–376
- Fleck, C. B., Schöbel, F., and Brock, M. (2011) Nutrient acquisition by pathogenic fungi: nutrient availability, pathway regulation, and differences in substrate utilization. *Int. J. Med. Microbiol.* **301**, 400–407
- Rubin-Bejerano, I., Fraser, I., Grisafi, P., and Fink, G. R. (2003) Phagocytosis by neutrophils induces an amino acid deprivation response in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**, 11007–11012
- Lorenz, M. C., Bender, J. A., and Fink, G. R. (2004) Transcriptional response of *Candida albicans* upon internalization by macrophages. *Eukaryot. Cell* **3**, 1076–1087

³ C. Otzen, B. Bardl, I. D. Jacobsen, M. Nett, and M. Brock, unpublished data.

Propionyl-CoA Degradation in *C. albicans*

8. Fradin, C., De Groot, P., MacCallum, D., Schaller, M., Klis, F., Odds, F. C., and Hube, B. (2005) Granulocytes govern the transcriptional response, morphology and proliferation of *Candida albicans* in human blood. *Mol. Microbiol.* **56**, 397–415
9. Barelle, C. J., Priest, C. L., Maccallum, D. M., Gow, N. A., Odds, F. C., and Brown, A. J. (2006) Niche-specific regulation of central metabolic pathways in a fungal pathogen. *Cell. Microbiol.* **8**, 961–971
10. Shareck, J., and Belhumeur, P. (2011) Modulation of morphogenesis in *Candida albicans* by various small molecules. *Eukaryot. Cell* **10**, 1004–1012
11. Lorenz, M. C., and Fink, G. R. (2001) The glyoxylate cycle is required for fungal virulence. *Nature* **412**, 83–86
12. Lorenz, M. C., and Fink, G. R. (2002) Life and death in a macrophage: role of the glyoxylate cycle in virulence. *Eukaryot. Cell* **1**, 657–662
13. Piekarska, K., Mol, E., van den Berg, M., Hardy, G., van den Burg, J., van Roermund, C., MacCallum, D., Odds, F., and Distel, B. (2006) Peroxisomal fatty acid β -oxidation is not essential for virulence of *Candida albicans*. *Eukaryot. Cell* **5**, 1847–1856
14. Otzen, C., Müller, S., Jacobsen, I. D., and Brock, M. (2013) Phylogenetic and phenotypic characterisation of the 3-ketoacyl-CoA thiolase gene family from the opportunistic human pathogenic fungus *Candida albicans*. *FEMS Yeast Res.* **13**, 553–564
15. Piekarska, K., Hardy, G., Mol, E., van den Burg, J., Strijbis, K., van Roermund, C., van den Berg, M., and Distel, B. (2008) The activity of the glyoxylate cycle in peroxisomes of *Candida albicans* depends on a functional β -oxidation pathway: evidence for reduced metabolite transport across the peroxisomal membrane. *Microbiology* **154**, 3061–3072
16. Schwab, M. A., Sauer, S. W., Okun, J. G., Nijtmans, L. G., Rodenburg, R. J., van den Heuvel, L. P., Dröse, S., Brandt, U., Hoffmann, G. F., Ter Laak, H., Kölker, S., and Smeitink, J. A. (2006) Secondary mitochondrial dysfunction in propionic aciduria: a pathogenic role for endogenous mitochondrial toxins. *Biochem. J.* **398**, 107–112
17. Morath, M. A., Okun, J. G., Müller, I. B., Sauer, S. W., Hörster, F., Hoffmann, G. F., and Kölker, S. (2008) Neurodegeneration and chronic renal failure in methylmalonic aciduria—a pathophysiological approach. *J. Inher. Metab. Dis.* **31**, 35–43
18. Brock, M., and Buckel, W. (2004) On the mechanism of action of the antifungal agent propionate. *Eur. J. Biochem.* **271**, 3227–3241
19. Brock, M., Fischer, R., Linder, D., and Buckel, W. (2000) Methylcitrate synthase from *Aspergillus nidulans*: implications for propionate as an antifungal agent. *Mol. Microbiol.* **35**, 961–973
20. Maerker, C., Rohde, M., Brakhage, A. A., and Brock, M. (2005) Methylcitrate synthase from *Aspergillus fumigatus*. Propionyl-CoA affects polyketide synthesis, growth and morphology of conidia. *FEBS J.* **272**, 3615–3630
21. Zhang, Y. Q., Brock, M., and Keller, N. P. (2004) Connection of propionyl-CoA metabolism to polyketide biosynthesis in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* **168**, 785–794
22. Ibrahim-Granet, O., Dubourdeau, M., Latgé, J. P., Ave, P., Huerre, M., Brakhage, A. A., and Brock, M. (2008) Methylcitrate synthase from *Aspergillus fumigatus* is essential for manifestation of invasive aspergillosis. *Cell. Microbiol.* **10**, 134–148
23. Chandler, R. J., and Venditti, C. P. (2005) Genetic and genomic systems to study methylmalonic acidemia. *Mol. Genet. Metab.* **86**, 34–43
24. Brock, M. (2010) in *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology* (Timmis, K. N., ed) pp. 3279–3291, Springer, Berlin
25. Müller, S., Fleck, C. B., Wilson, D., Hummert, C., Hube, B., and Brock, M. (2011) Gene acquisition, duplication and metabolic specification: the evolution of fungal methylisocitrate lyases. *Environ. Microbiol.* **13**, 1534–1548
26. Brock, M., Maerker, C., Schütz, A., Völker, U., and Buckel, W. (2002) Oxidation of propionate to pyruvate in *Escherichia coli*. Involvement of methylcitrate dehydratase and aconitase. *Eur. J. Biochem.* **269**, 6184–6194
27. Brock, M., Darley, D., Textor, S., and Buckel, W. (2001) 2-Methylisocitrate lyases from the bacterium *Escherichia coli* and the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*: characterization and comparison of both enzymes. *Eur. J. Biochem.* **268**, 3577–3586
28. Grimm, C., Evers, A., Brock, M., Maerker, C., Klebe, G., Buckel, W., and Reuter, K. (2003) Crystal structure of 2-methylisocitrate lyase (PrpB) from *Escherichia coli* and modelling of its ligand bound active centre. *J. Mol. Biol.* **328**, 609–621
29. Brock, M. (2005) Generation and phenotypic characterization of *Aspergillus nidulans* methylisocitrate lyase deletion mutants: methylisocitrate inhibits growth and conidiation. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 5465–5475
30. Luttk, M. A., Kötter, P., Salomons, F. A., van der Klei, I. J., van Dijken, J. P., and Pronk, J. T. (2000) The *Saccharomyces cerevisiae* ICL2 gene encodes a mitochondrial 2-methylisocitrate lyase involved in propionyl-coenzyme A metabolism. *J. Bacteriol.* **182**, 7007–7013
31. Lucas, K. A., Filley, J. R., Erb, J. M., Graybill, E. R., and Hawes, J. W. (2007) Peroxisomal metabolism of propionic acid and isobutyric acid in plants. *J. Biol. Chem.* **282**, 24980–24989
32. Halarnkar, P. P., and Blomquist, G. J. (1989) Comparative aspects of propionate metabolism. *Comp. Biochem. Physiol. B* **92**, 227–231
33. Lee, S. H., Park, S. J., Park, O. J., Cho, J., and Rhee, J. W. (2009) Production of 3-hydroxypropionic acid from acrylic acid by newly isolated *Rhodococcus erythropolis* LG12. *J. Microbiol. Biotechnol.* **19**, 474–481
34. Miyakoshi, S., Uchiyama, H., Someya, T., Satoh, T., and Tabuchi, T. (1987) Distribution of the methylcitric acid cycle and β -oxidation pathway for propionate catabolism in fungi. *Agric. Biol. Chem.* **51**, 2381–2387
35. Hasegawa, J., Ogura, M., Kanema, H., Kawaharada, H., and Watanabe, K. (1982) Production of 3-hydroxypropionic acid from propionic acid by a *Candida rugosa* mutant unable to assimilate propionic acid. *J. Ferment. Technol.* **60**, 591–594
36. Kniemeyer, O., Lessing, F., Scheibner, O., Hertweck, C., and Brakhage, A. A. (2006) Optimisation of a 2-D gel electrophoresis protocol for the human-pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus*. *Curr. Genet.* **49**, 178–189
37. Neuhoff, V., Arold, N., Taube, D., and Ehrhardt, W. (1988) Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis* **9**, 255–262
38. Vödisch, M., Albrecht, D., Lessing, F., Schmidt, A. D., Winkler, R., Guthke, R., Brakhage, A. A., and Kniemeyer, O. (2009) Two-dimensional proteome reference maps for the human pathogenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*. *Proteomics* **9**, 1407–1415
39. Reuss, O., Vik, A., Kolter, R., and Morschhäuser, J. (2004) The SAT1 flipper, an optimized tool for gene disruption in *Candida albicans*. *Gene* **341**, 119–127
40. Hortschansky, P., Eisendle, M., Al-Abdallah, Q., Schmidt, A. D., Bergmann, S., Thön, M., Kniemeyer, O., Abt, B., Seeber, B., Werner, E. R., Kato, M., Brakhage, A. A., and Haas, H. (2007) Interaction of HapX with the CCAAT-binding complex—a novel mechanism of gene regulation by iron. *EMBO J.* **26**, 3157–3168
41. Fazius, F., Shelest, E., Gebhardt, P., and Brock, M. (2012) The fungal α -aminoadipate pathway for lysine biosynthesis requires two enzymes of the aconitase family for the isomerization of homocitrate to homoisocitrate. *Mol. Microbiol.* **86**, 1508–1530
42. Chowdhury, E. K., Nagata, S., and Misono, H. (1996) 3-Hydroxyisobutyrate dehydrogenase from *Pseudomonas putida* E23: purification and characterization. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **60**, 2043–2047
43. Roessner, U., Wagner, C., Kopka, J., Trethewey, R. N., and Willmitzer, L. (2000) Technical advance: simultaneous analysis of metabolites in potato tuber by gas chromatography-mass spectrometry. *Plant J.* **23**, 131–142
44. Villas-Bôas, S. G., Noel, S., Lane, G. A., Attwood, G., and Cookson, A. (2006) Extracellular metabolomics: a metabolic footprinting approach to assess fiber degradation in complex media. *Anal. Biochem.* **349**, 297–305
45. Pronk, J. T., van der Linden-Beuman, A., Verduyn, C., Scheffers, W. A., and van Dijken, J. P. (1994) Propionate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*: implications for the metabolon hypothesis. *Microbiology* **140**, 717–722
46. Graybill, E. R., Rouhier, M. F., Kirby, C. E., and Hawes, J. W. (2007) Functional comparison of citrate synthase isoforms from *S. cerevisiae*. *Arch. Biochem. Biophys.* **465**, 26–37
47. Ansedé, J. H., Pellechia, P. J., and Yoch, D. C. (1999) Metabolism of acrylate to β -hydroxypropionate and its role in dimethylsulfoniopropionate lyase

- induction by a salt marsh sediment bacterium, *Alcaligenes faecalis* M3A. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 5075–5081
48. Shen, Y. Q., and Burger, G. (2009) Plasticity of a key metabolic pathway in fungi. *Funct. Integr. Genomics* **9**, 145–151
 49. Hawes, J. W., Jaskiewicz, J., Shimomura, Y., Huang, B., Bunting, J., Harper, E. T., and Harris, R. A. (1996) Primary structure and tissue-specific expression of human β -hydroxyisobutyryl-coenzyme A hydrolase. *J. Biol. Chem.* **271**, 26430–26434
 50. Ooiwa, T., Goto, H., Tsukamoto, Y., Hayakawa, T., Sugiyama, S., Fujitsuka, N., and Shimomura, Y. (1995) Regulation of valine catabolism in canine tissues: tissue distributions of branched-chain aminotransferase and 2-oxo acid dehydrogenase complex, methacrylyl-CoA hydratase and 3-hydroxyisobutyryl-CoA hydrolase. *Biochim. Biophys. Acta* **1243**, 216–220
 51. Steele, M. I., Lorenz, D., Hatter, K., Park, A., and Sokatch, J. R. (1992) Characterization of the *mmsAB* operon of *Pseudomonas aeruginosa* PAO encoding methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase and 3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* **267**, 13585–13592
 52. Yao, T., Xu, L., Ying, H., Huang, H., and Yan, M. (2010) The catalytic property of 3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase from *Bacillus cereus* on 3-hydroxypropionate. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **160**, 694–703
 53. Stines-Chaumeil, C., Talfournier, F., and Branlant, G. (2006) Mechanistic characterization of the MSDH (methylmalonate semialdehyde dehydrogenase) from *Bacillus subtilis*. *Biochem. J.* **395**, 107–115
 54. Talfournier, F., Stines-Chaumeil, C., and Branlant, G. (2011) Methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase from *Bacillus subtilis*: substrate specificity and coenzyme A binding. *J. Biol. Chem.* **286**, 21971–21981
 55. Goodwin, G. W., Rougraff, P. M., Davis, E. J., and Harris, R. A. (1989) Purification and characterization of methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase from rat liver. Identity to malonate-semialdehyde dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* **264**, 14965–14971
 56. Popov, K. M., Kedishvili, N. Y., and Harris, R. A. (1992) Coenzyme A- and NADH-dependent esterase activity of methylmalonate semialdehyde dehydrogenase. *Biochim. Biophys. Acta* **1119**, 69–73
 57. Domin, N., Wilson, D., and Brock, M. (2009) Methylcitrate cycle activation during adaptation of *Fusarium solani* and *Fusarium verticillioides* to propionyl-CoA-generating carbon sources. *Microbiology* **155**, 3903–3912
 58. Lee, S. H., Han, Y. K., Yun, S. H., and Lee, Y. W. (2009) Roles of the glyoxylate and methylcitrate cycles in sexual development and virulence in the cereal pathogen *Gibberella zeae*. *Eukaryot. Cell* **8**, 1155–1164
 59. Griffin, J. E., Pandey, A. K., Gilmore, S. A., Mizrahi, V., McKinney, J. D., Bertozzi, C. R., and Sasseti, C. M. (2012) Cholesterol catabolism by *Mycobacterium tuberculosis* requires transcriptional and metabolic adaptations. *Chem. Biol.* **19**, 218–227
 60. Hynes, M. J., Murray, S. L., Andrianopoulos, A., and Davis, M. A. (2011) Role of carnitine acetyltransferases in acetyl coenzyme A metabolism in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot. Cell* **10**, 547–555
 61. De Lucas, J. R., Domínguez, A. I., Valenciano, S., Turner, G., and Laborda, F. (1999) The *acuH* gene of *Aspergillus nidulans*, required for growth on acetate and long-chain fatty acids, encodes a putative homologue of the mammalian carnitine/acylcarnitine carrier. *Arch. Microbiol.* **171**, 386–396
 62. Ramón De Lucas, J., Martínez, O., Pérez, P., Isabel López, M., Valenciano, S., and Laborda, F. (2001) The *Aspergillus nidulans* carnitine carrier encoded by the *acuH* gene is exclusively located in the mitochondria. *FEMS Microbiol. Lett.* **201**, 193–198
 63. Strijbis, K., van Roermund, C. W., Visser, W. F., Mol, E. C., van den Burg, J., MacCallum, D. M., Odds, F. C., Paramonova, E., Krom, B. P., and Distel, B. (2008) Carnitine-dependent transport of acetyl coenzyme A in *Candida albicans* is essential for growth on nonfermentable carbon sources and contributes to biofilm formation. *Eukaryot. Cell* **7**, 610–618
 64. Zhou, H., and Lorenz, M. C. (2008) Carnitine acetyltransferases are required for growth on non-fermentable carbon sources but not for pathogenesis in *Candida albicans*. *Microbiology* **154**, 500–509
 65. Ishigure, K., Shimomura, Y., Murakami, T., Kaneko, T., Takeda, S., Inoue, S., Nomoto, S., Koshikawa, K., Nonami, T., and Nakao, A. (2001) Human liver disease decreases methacrylyl-CoA hydratase and β -hydroxyisobutyryl-CoA hydrolase activities in valine catabolism. *Clin. Chim. Acta* **312**, 115–121
 66. Shimomura, Y., Murakami, T., Fujitsuka, N., Nakai, N., Sato, Y., Sugiyama, S., Shimomura, N., Irwin, J., Hawes, J. W., and Harris, R. A. (1994) Purification and partial characterization of 3-hydroxyisobutyryl-coenzyme A hydrolase of rat liver. *J. Biol. Chem.* **269**, 14248–14253
 67. Hasegawa, J. (1981) Purification, crystallization and some properties of β -hydroxyisobutyrate dehydrogenase from *Candida rugosa* IFO 0750. *Agric. Biol. Chem.* **45**, 2805–2814
 68. Brzostek, A., Pawelczyk, J., Rumijowska-Galewicz, A., Dziadek, B., and Dziadek, J. (2009) *Mycobacterium tuberculosis* is able to accumulate and utilize cholesterol. *J. Bacteriol.* **191**, 6584–6591

Supplemental Table S1

Biological Process	Seq. pI	Seq. MW [kDa]	Total Seq. Cov. [%]	MS Mascot Score ^a	MS/MS Mascot Score ^a	Protein No.	Accession No.	Gene Name	orf	Growth Condition
Acetate Metabolism	6,4	57,9	47,3	249		1	gi 68482646	ACH1	orf19.3171	Glucose
β -Oxidation	5,7	73,8	27,9	148		2	gi 68484803	ACS2	orf19.1064	
Fermentation	5,4	54	37,1	148	42	3	gi 68481547	ALD5	orf19.5806	
Fermentation	9,1	46	6,5		38,9	4	gi 68468132	ADH1	orf19.3997	
Fermentation	5,3	62,4	14,5	73,3	56,1	5	gi 68480872	PDC11	orf19.2877	
Glycolysis	5,5	48	3,9		55,5	6	gi 6014673	ENO1	orf19.395	
Glycolysis	5,8	27,4	4		37,5	7	gi 68469783	GPM1	orf19.903	
Glycolysis	6,1	45,2	15,1		101,9	8	gi 68489602	PGK1	orf19.3651	
Glycolysis	5,7	26,6	8,9		77,2	10	gi 68472093	TPI1	orf19.6745	
PDC	6,4	52,8	38,7	195		11	gi 68487498	LPD1	orf19.6127	
TCA	5,9	84,2	18,3	87,6		12	gi 68479387	ACO1	orf19.6385	
TCA	6,3	44,2	40,3	161		13	gi 68481855	CIT1	orf19.4393	
TCA	5,7	34,7	62,7	179	180,7	14	gi 68466091	MDH1-1	orf19.4602	
TCA	6	70,1	32,9	177	39,8	15	gi 68480862	SDH12	orf19.2871	
PDC	5,3	41,3	18,5	67,3	62,7	25	gi 68477571	PDB1	orf19.5294	
PDC	8,8	44,1	30,4	64		26	gi 68481122	PDA1	orf19.3097	
AA Biosynthesis	9,2	48,9	26,5	109		34	gi 68482311	AAT1	orf19.3554	
AA Biosynthesis	6,9	47,9	46	184		36	gi 68464871	ADE12	orf19.4827	
AA Biosynthesis	6,1	64,9	2,9		104,1	37	gi 68476933	ADE17	orf19.492	
AA Biosynthesis	5,4	55,4	29,8	131	32,9	39	gi 68474508	ARG1	orf19.7469	
AA Biosynthesis	5,8	40,8	3		33,6	42	gi 68482781	BAT22	orf19.6994	
Removal of Superoxide Radicals	6,2	54,8	44,3	145		43	gi 68474218	CAT1	orf19.6229	
Cysteine and Homocysteine	6,2	42,9	6		43,5	44	gi 68479419	CYS3	orf19.6402	
Gluconeogenesis	5,7	39,2	39,8	91,6		45	gi 68466123	FBA1	orf19.4618	
Glutamate Biosynthesis from Ammonia	5,6	49,5	23	78		47	gi 68491798	GDH3	orf19.4716	
AA Biosynthesis	5,1	38,8	52,4	153	61,1	48	gi 68468783	HOM6	orf19.2951	
AA Biosynthesis	6,2	62,8	25,1	139		50	gi 68467901	ILV3	orf19.4040	
AA Biosynthesis	6,2	44,8	41,8	142		51	gi 68484035	ILV5	orf19.88	

^a MS Mascot score: Scores greater than 68 are significant (p<0.05). MS/MS Mascot score: Scores greater than 36 are significant

Supplemental Table S1

Biological Process	Seq. pl	Seq. MW [kDa]	Total Seq. Cov. [%]	MS Mascot Score ^a	MS/MS Mascot Score ^a	Protein No.	Accession No.	Gene Name	orf	Growth Condition
AA Biosynthesis	6	33,2	5,9		37,8	52	gj68466478	<i>ILV6</i>	orf19.4650	Glucose
AA Biosynthesis	6,7	36,4	45,9	126		53	gj68488633	<i>IMH3</i>	orf19.18	
Myo-Inositol Biosynthesis	5,2	57,7	7,5		37,4	54	gj68473083	<i>INO1</i>	orf19.7585	
UDP-Glucose Conversion	5	32,1	33	91,8	50,2	55	gj68483099	<i>IPP1</i>	orf19.3590	
AA Biosynthesis	5,5	86	26	165		56	gj68474564	<i>LEU1</i>	orf19.7498	
AA Biosynthesis	5	40,1	44,2	133		57	gj68471189	<i>Leu2</i>	orf19.7080	
AA Biosynthesis	5,1	40,2	38,9	113		58	gj2497260	<i>LEU3</i>	orf19.4225	
AA Biosynthesis	5,5	48	3,9		63,7	59	gj6014673	<i>MET15</i>	orf19.5645	
Sulfate Assimilation	5,9	58,8	54,1	237	38,5	60	gj68467361	<i>MET3</i>	orf19.5025	
AA Biosynthesis	5,3	85,6	6,1		88,9	61	gj68475194	<i>MET6</i>	orf19.2551	
Tetrahydrofolate biosynthesis	6,1	102,1	39,5	281	32,4	62	gj68486904	<i>MIS11</i>	orf19.2364	
Glycolysis	6,6	55,4	36,5	142		65	gj68482226	<i>PYK1</i>	orf19.3575	
S-Adenosylmethionine Cycle	5,6	42,2	53,2	181	40,8	66	gj68484437	<i>SAM2</i>	orf19.657	
AA Biosynthesis	6,8	52	22,6	115		67	gj68475759	<i>SHM2</i>	orf19.5750	
Removal of Superoxide Radicals	5,7	16,1	51,9	67,3		68	gj6094316	<i>SOD1</i>	orf19.2770. 1	
Pentose Phosphate Pathway	4,8	35,7	43	148		69	gj68481811	<i>TAL1</i>	orf19.4371	
Glycolysis	6,7	35,8	8,4		47	70	gj68472227	<i>TDH3</i>	orf19.6814	
AA Biosynthesis	5	57,7	44,9	190	50,7	71	gj68470332	<i>THR4</i>	orf19.4233	
AA Biosynthesis	6,2	16,9	53	98,2	30	72	gj68470482	<i>YNK1</i>	orf19.4311	
Acetate Metabolism	6,4	57,9	36,8	148		1	gj68482646	<i>ACH1</i>	orf19.3172	
Acetate utilisation	5,7	73,8	43,5	182		2	gj68484803	<i>ACS2</i>	orf19.1064	
Fermentation	5,4	54	37,3		36,2	3	gj68481547	<i>ALD5</i>	orf19.5806	
Fermentation	6	36,9	8		65,9	4	gj1168348	<i>ADH1</i>	orf19.3998	
Fermentation	5,3	62,4	43,9	208		5	gj68480872	<i>PDC11</i>	orf19.2877	
Glycolysis	5,4	47,2	20,7	53		6	gj68488457	<i>ENO1</i>	orf19.395	
Glycolysis	5,8	27,4	21,4	46,1	83,2	7	gj68469783	<i>GPM1</i>	orf19.903	

^a MS Mascot score: Scores greater than 68 are significant (p<0.05). MS/MS Mascot score: Scores greater than 36 are significant

Supplemental Table S1

Biological Process	Seq. pI	Seq. MW [kDa]	Total Seq. Cov. [%]	MS Mascot Score ^a	MS/MS Mascot Score ^a	Protein No.	Accession No.	Gene Name	orf	Growth Condition
Glycolysis	6,1	45,2	6,7		39,1	8	gi 68489602	<i>PGK1</i>	orf19.3651	Acetate
Glycolysis	6,4	35,7	4,2		60,3	9	gi 30580395	<i>TDH3</i>	orf19.6814	
Glycolysis	6,7	35,8	36,4	78,4		9	gi 68472227	<i>TDH3</i>	orf19.6814	
Glycolysis	5,7	26,6	43,1	80,7	81,4	10	gi 7270988	<i>TPI1</i>	orf19.6745	
PDC	6,4	52,8	35,6	122	39,4	11	gi 68487498	<i>LPD1</i>	orf19.6127	
TCA	5,9	84,2	16,6	72,2	31,3	12	gi 68479387	<i>ACO1</i>	orf19.6385	
TCA	6,3	44,2	36,8	58,2	60,2	13	gi 68481855	<i>CIT1</i>	orf19.4393	
TCA	5,7	34,7	53,3	139	148	14	gi 68466091	<i>MDH1-1</i>	orf19.4602	
TCA	6	70,1	36,7	184	75,9	15	gi 68480862	<i>SDH12</i>	orf19.2871	
Acetyl-CoA Metabolism	6,6	71,4	42,6	195	58,9	16	gi 68466067	<i>CAT2</i>	orf19.4591	
Fermentation	8,6	60,1	12,9		63,7	17	gi 68490378	<i>ALD6</i>	orf19.742	
Fermentation	6,3	36,8	47,1	144	44,9	18	gi 68476713	<i>ADH2</i>	orf19.5113	
Glyoxylate Cycle	6,9	61,4	40	205	45,4	19	gi 68487782	<i>ICL1</i>	orf19.6844	
Glyoxylate Cycle	9,4	62,5	5,6		30,1	20	gi 68464883	<i>MLS1</i>	orf19.4833	
Pentose Phosphate Pathway	6,1	56,9	8,9		53,1	21	gi 68467359	<i>GND1</i>	orf19.5024	
Pentose Phosphate Pathway	5,4	73,7	4,9		65,3	22	gi 68476711	<i>TKL1</i>	orf19.5112	
β _Oxidation	5,6	78,9	19,3	123		23	gi 68468339	<i>POX1-3</i>	orf19.1652	
AA Biosynthesis	6	39	10,2		81	24	gi 68473605	<i>orf19.5565</i>	orf19.5565	
Acetate utilisation	5,9	75,1	41,6	166	57,5	27	gi 68483295	<i>ACS1</i>	orf19.1743	
TCA	5,5	85,9	20,4	99,3		28	gi 68487910	<i>ACO2</i>	orf19.6632	
TCA	5,9	112	43,2	312	63,4	29	gi 68491108	<i>KGD1</i>	orf19.6165	
TCA	4,5	12,9	50,8	73		30	gi 68488751	<i>orf19.710</i>	orf19.710	
AA Biosynthesis	9,3	46	29,1	93,4		35	gi 68490046	<i>AAT21</i>	orf19.6287	
AA Biosynthesis	6,1	64,9	50,5	227	79,5	37	gi 68476933	<i>ADE17</i>	orf19.492	
Drug Response	5,2	41,8	49,5	122		38	gi 68473657	<i>ADO1</i>	orf19.5591	
AA Biosynthesis	6	38,6	32,5	62,6		40	gi 68473454	<i>ARG3</i>	orf19.5610	
AA Biosynthesis	5,8	40,8	49,9	112	47	42	gi 68482781	<i>BAT22</i>	orf19.6994	
Removal of Superoxide Radicals	6,2	54,8	54	211		43	gi 68474218	<i>CAT1</i>	orf19.6229	
Gluconeogenesis	5,7	39,2	42,9	130	55,4	45	gi 68466123	<i>FBA1</i>	orf19.4618	

^a MS Mascot score: Scores greater than 68 are significant (p<0.05). MS/MS Mascot score: Scores greater than 36 are significant

Supplemental Table S1

Biological Process	Seq. pI	Seq. MW [kDa]	Total Seq. Cov. [%]	MS Mascot Score ^a	MS/MS Mascot Score ^a	Protein No.	Accession No.	Gene Name	orf	Growth Condition
Formaldehyde oxidation	5,4	41,8	36,7	100		46	gj68488257	<i>FDH1</i>	orf19.638	Acetate
AA Biosynthesis	7,8	74,3	33,7	135	94,6	49	gj68468504	<i>ILV2</i>	orf19.1613	
AA Biosynthesis	6,2	44,8	27,5	93,8	46,9	51	gj68484035	<i>ILV5</i>	orf19.88	
Myo-Inositol Biosynthesis	5,2	57,7	35,4	91,1	46	54	gj68473083	<i>INO1</i>	orf19.7585	
AA Biosynthesis	5,3	85,6	23,6	109		61	gj68475194	<i>MET6</i>	orf19.2551	
Tetrahydrofolate biosynthesis	6,1	102,1	21,8	149		62	gj68486904	<i>MIS11</i>	orf19.2364	
Endocytosis/ Heat Response	4,7	34,6	30,8	72,7		63	gj68484973	<i>PIL1</i>	orf19.778	
Glycolysis	6,6	55,4	36,5	129		64	gj68482226	<i>PYK1</i>	orf19.3575	
AA Biosynthesis, formylTHF Biosynthesis	6,8	52	37,2	126		67	gj68475759	<i>SHM2</i>	orf19.5750	
Pentose Phosphate Pathway	4,8	35,7	40,9	125		69	gj68481811	<i>TAL1</i>	orf19.4371	
regulates Gsp1p GTPase activity	5,3	24,2	43,4	62	54,9	73	gj68474522	<i>YRB1</i>	orf19.7477	
Acetate Metabolism	6,4	57,9	32,8	151	57,5	1	gj68482646	<i>ACH1</i>	orf19.3171	
β -Oxidation	5,7	73,8	41,9	226		2	gj68484803	<i>ACS2</i>	orf19.1064	
Fermentation	5,4	54	46,5	190	58,3	3	gj68481547	<i>ALD5</i>	orf19.5806	
Fermentation	9,2	46,2	36,3	91,7	60,6	4	gj68467815	<i>ADH1</i>	orf19.3997	
Fermentation	5,3	62,4	54,9	226	78,3	5	gj68480872	<i>PDC11</i>	orf19.2877	
Glycolysis	5,4	47,2	46,1	173	68	6	gj68488457	<i>ENO1</i>	orf19.395	
Glycolysis	5,8	27,4	39,5	90,4		7	gj68469783	<i>GPM1</i>	orf19.903	
Glycolysis	6,1	45,2	12,5		69,6	8	gj68489602	<i>PGK1</i>	orf19.3651	
Glycolysis	6,7	35,8	46,6	144	56,2	9	gj68472227	<i>TDH3</i>	orf19.6814	
Glycolysis	5,7	26,6	48	110	52,2	10	gj7270988	<i>TPI1</i>	orf19.6745	
PDC	6,4	52,8	47,9	222		11	gj68487498	<i>LPD1</i>	orf19.6127	
TCA	5,9	84,2	21,5	145		12	gj68479387	<i>ACO1</i>	orf19.6385	
TCA	6,3	44,2	38,3	162		13	gj68481855	<i>CIT1</i>	orf19.4393	
TCA	6,2	44,8	24	64,7	36,8	14	gj68484035	<i>MDH1-1</i>	orf19.4602	
TCA	6	70,1	49,8	305		15	gj68480862	<i>SDH12</i>	orf19.2871	

^a MS Mascot score: Scores greater than 68 are significant ($p < 0.05$). MS/MS Mascot score: Scores greater than 36 are significant

Supplemental Table S1

Biological Process	Seq. pI	Seq. MW [kDa]	Total Seq. Cov. [%]	MS Mascot Score ^a	MS/MS Mascot Score ^a	Protein No.	Accession No.	Gene Name	orf	Growth Condition
Acetyl-CoA Metabolism	6,6	71,4	47,5	309		16	gj 68466067	CAT2	orf19.4591	Propionate
Fermentation	8,6	60,1	39,1	177	56,8	17	gj 68490378	ALD6	orf19.742	
Fermentation	6,3	36,8	35,6	99,7	42,4	18	gj 68476713	ADH2	orf19.5113	
Glyoxylate Cycle	6,9	61,4	37,6	157	61,4	19	gj 68487782	ICL1	orf19.6844	
Glyoxylate Cycle	9,2	62,4	4,7		39	20	gj 400225	MLS1	orf19.4833	
Pentose Phosphate Pathway	6,1	56,9	41,2	175		21	gj 3334110	GND1	orf19.5024	
Pentose Phosphate Pathway	5,4	73,7	27,6	150		22	gj 68476711	TKL1	orf19.5112	
β -Oxidation	5,6	78,9	44,7	266	51,8	23	gj 68468339	POX1-3	orf19.1652	
AA Biosynthesis	6	39	36,4	104		24	gj 68473605	HPD1	orf19.5565	
Anaerobic Respiration	8,5	70,4	13,3	81		31	gj 68467323	OSM2	orf19.5005	
β -Oxidation	5,1	99,3	33,8	264		32	gj 68492311	FOX2	orf19.1288	
β -Oxidation	5,8	42,9	34,8	76,3		33	gj 68474608	POT1	orf19.7520	
AA Biosynthesis	9,3	46	43,3	159		35	gj 68490046	AA721	orf19.6287	
AA Biosynthesis	6,1	64,9	28,4	169		37	gj 68476933	ADE17	orf19.492	
AA Biosynthesis	6,7	40,7	28,3	62		41	gj 461538	ARO3	orf19.1517	
Removal of Superoxide Radicals	6,2	54,8	27	144	37,7	43	gj 68474218	CAT1	orf19.6229	
Formaldehyde Oxidation	5,4	41,8	59,6	199		46	gj 68488257	FDH1	orf19.638	
Myo-Inositol Biosynthesis	5,2	57,7	56,2	195	84,3	54	gj 68473083	INO1	orf19.7585	
UDP-Glucose Conversion	5	32,1	28,8	63,8		55	gj 68483204	IPP1	orf19.3590	
AA Biosynthesis	5,5	48	33,4	78,5	64,5	59	gj 6014673	MET15	orf19.5645	
AA Biosynthesis	5,3	85,6	5,9		47,1	61	gj 68475194	MET6	orf19.2551	
AA Biosynthesis, formylTHF Biosynthesis	6,8	52	23	126		67	gj 68475759	SHM2	orf19.5750	

^a MS Mascot score: Scores greater than 68 are significant (p<0.05). MS/MS Mascot score: Scores greater than 36 are significant

8 Diskussion

8.1 Unterschiede des Propionatkatabolismus von *S. cerevisiae* und *C. albicans*

Der Abbau von Propionyl-CoA verläuft in *S. cerevisiae* und *C. albicans* über gänzlich verschiedene Stoffwechselwege. Diese unterscheiden sich bezüglich ihrer jeweiligen Kompartimentierung und, insbesondere, in den beteiligten Enzymen und Intermediaten.

S. cerevisiae benutzt den Methylcitratzyklus zum Abbau von Propionyl-CoA zu Pyruvat (Abb. 7). Dieser Stoffwechselweg ist in den Mitochondrien lokalisiert und katalysiert eine dem Citratzyklus und Glyoxylatzyklus analoge Reaktionsfolge (Graybill, Rouhier, Kirby, & Hawes, 2007; Luutik *et al.*, 2007; Jia, Becam, & Herbert, 1997). Im Gegensatz zu filamentösen Ascomyceten, welche über den Methylcitratzyklus verfügen, kann *S. cerevisiae* Propionat nur im Co-Metabolismus mit Glucose als Kohlenstoffquelle nutzen (Brock, & Buckel, 2004; Verduyn *et al.*, 1990). Die Aktivität des Methylcitratzyklus korreliert dabei positiv mit der Propionatkonzentration des Kulturmediums. Beträgt die Steigerung der Propionatkonzentration mehr als 10 mM, führt dies jedoch zum Absterben der Kultur. (Verduyn, Postma, Scheffers, & van Dijken, 1990). Diese Beobachtungen spiegeln wahrscheinlich den erhöhten Influx von Propionsäure und der damit verbundenen Störung von Protonengradienten, sowie die nachteilige Wirkung von Intermediaten des Methylcitratzyklus auf den Primärstoffwechsel wieder. Beispielsweise führt die mitochondriale Akkumulation von Propionyl-CoA nachweislich zur Hemmung des Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes und der Succinyl-CoA Synthetase (Brock & Buckel, 2004). Außerdem hemmt Methylcitrat die Citratsynthase, die Aconitase und die Isocitrat-Dehydrogenase (Cheema-Dhadli, Leznoff, & Halperin, 1975). *C. albicans* verwendet mit der modifizierten β -Oxidation einen alternativen Weg zum Abbau von Propionyl-CoA (Abb. 8). Dieser Weg beinhaltet einen peroxisomalen und einen mitochondrialen Ast. Der peroxisomale Ast beinhaltet mit Fox2p ein Schlüssel-Enzym der β -Oxidation und dient der Umwandlung von Propionyl-CoA zu 3-Hydroxypropionyl-CoA. Der mitochondriale Ast verfügt über Enzyme zur Oxidation des 3-Hydroxypropionyl-CoA zu Acetyl-CoA und CO₂. Er beginnt mit der Hydrolyse des CoA-Esters durch die putative Acyl-CoA-Hydrolase CaEhd3p.

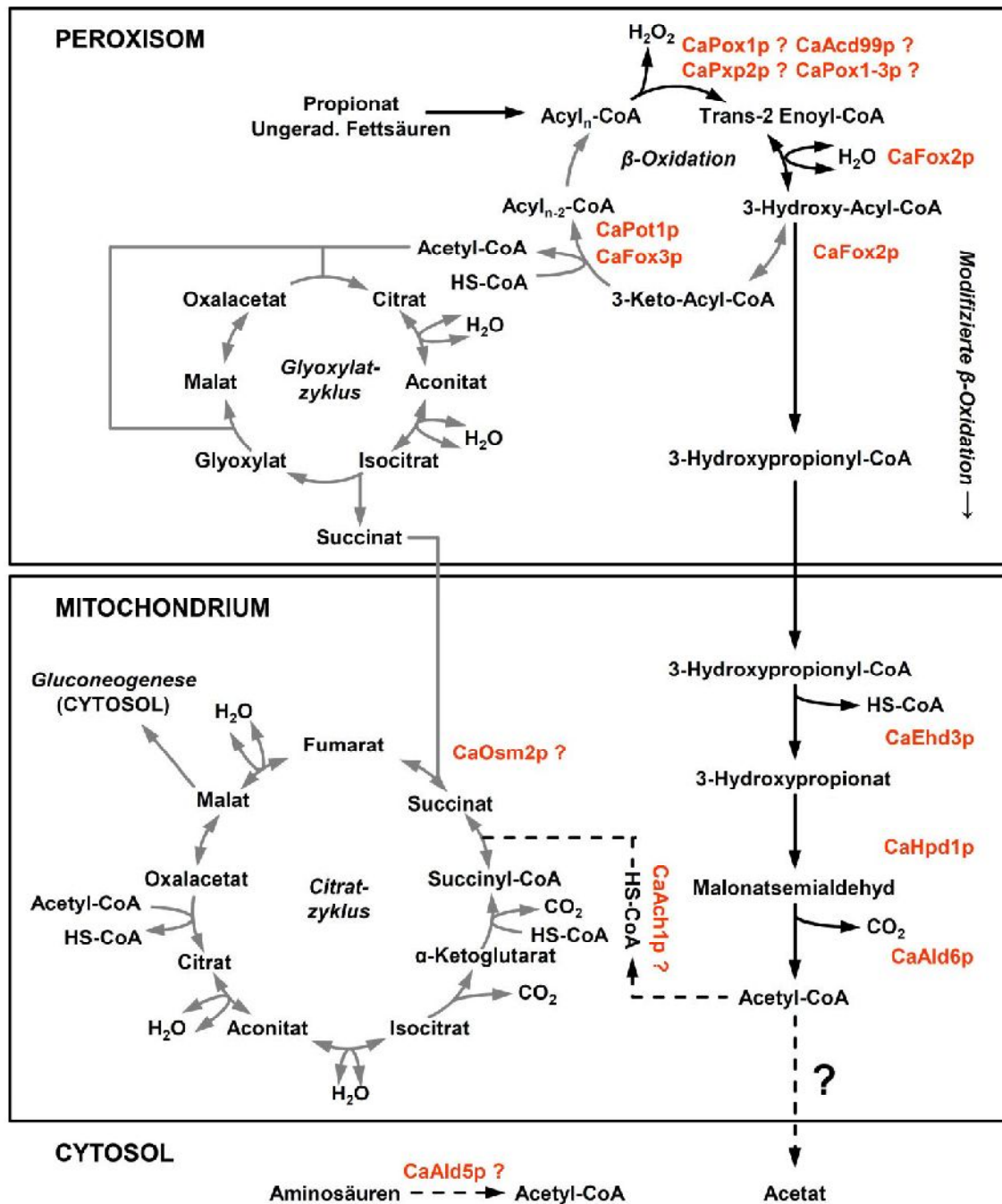


Abbildung 8: Schematische Übersicht der modifizierten β -Oxidation. Die modifizierte β -Oxidation verbindet peroxisomale Enzyme der β -Oxidation ($CaAcid99p, CaPox1p, CaPox1-3p, CaPxp2p, CaFox2p$) und mitochondriale Enzyme ($CaEhd3p, CaHpd1p, CaAld6p$) in einem Stoffwechselweg zum Abbau von Propionyl-CoA (schwarze Pfeile). Die peroxisomale β -Oxidation dient dem Abbau von Fettsäuren zu Acetyl-CoA. Acetyl-CoA geht anschließend in den Glyoxylatzyklus ein um zu Succinat aufgebaut zu werden. Succinat gelangt in die Mitochondrien und wird über den Citratzyklus in Malat umgewandelt, welches anschließend der Gluconeogenese im Cytosol zugeführt wird (grauen Pfeile). Die Fragezeichen kennzeichnen Enzyme mit experimentell unbestätigten Funktionen. Gestrichelte Pfeile markieren hypothetischen intrazellulären Metabolitfluss.

3-Hydroxypropionat wird anschließend durch die spezifische 3-Hydroxypropionat-Dehydrogenase CaHpd1p zu Malonatsemialdehyd oxidiert. Letzteres wird schließlich durch die Aldehyd-Dehydrogenase CaAld6p in Acetyl-CoA und CO₂ gespalten (Otzen *et al.*, 2014). Welche Konsequenzen sich aus den unterschiedlichen Wegen des Propionatabbaus ergeben, soll im Folgenden näher analysiert werden.

8.2 Effekte der Kohlenstoffquellen Propionat und Valerat auf das Wachstum von *C. albicans*

Wachstumsversuche ergaben, dass *C. albicans* Propionat in hohen Konzentrationen als einzige Kohlenstoffquelle nutzen kann und daher unabhängig von Glucose assimiliert. Allerdings unterscheidet sich *C. albicans* Wachstumsverhalten bezüglich der verfügbaren Propionyl-CoA-erzeugenden Kohlenstoffquellen.

Stehen *C. albicans* sowohl Glucose als auch Propionat als Kohlenstoffquellen zur Verfügung, so zeigt sich ein diauxisches Wachstumsverhalten, wobei zuerst Glucose und anschließend Propionat assimiliert wird. Allerdings durchläuft die Kultur nach dem Verbrauch von Glucose eine ca. 15 Stunden währende Adaptionsphase bevor das exponentielle Wachstum erneut beginnt. Interessant ist die Beobachtung, dass *C. albicans* während der Adaptionsphase bereits Propionat aus dem Kulturmedium aufnimmt aber nicht sofort zum Wachstum nutzen kann (Otzen *et al.*, 2014). Eine der möglichen Erklärungen für dieses Phänomen wäre die toxische Wirkung schwacher Säuren auf den Metabolismus. Diese Wirkung beruht auf dem Einstrom von Protonen die mit der Aufnahme von schwachen Säuren einhergeht. Da der pH-Wert des verwendeten Kulturmediums 6,5 betrug, wird Propionat aufgrund seines pK_s-Wertes von 4,87 in dissoziierter Form vorgelegen haben. Wahrscheinlich wird es daher über einen membranständigen Protonen-Symporter von der Zelle aufgenommen (Casal *et al.*, 1996; Cassio, Leao, & van Uden, 1987). Undissoziiertes Propionat kann zudem frei über die Zell- und Organellenmembranen diffundieren und im Cytoplasma dissoziieren. Dieser Einstrom von Protonen führt zum Absinken des cytosolischen pH-Wertes, welcher mit der Beeinträchtigung der enzymatischen Funktionen dort lokalisierter Enzyme einhergeht. Die Zelle ist daher gezwungen Energie zur Aufrechterhaltung der pH-Homöostase aufzuwenden, was zu einer Entkopplung anaboler und kataboler Prozesse führt (Abbott *et al.*, 2007; Verduyn *et al.*, 1990; Warth, 1988). Die lange Anpassungsphase könnte daher der Gewährleistung der pH-

Homöostase dienen, bevor *C. albicans* das aktive Wachstum einleiten kann.

Ein weiterer wichtiger Aspekt ist die Tatsache, dass die modifizierte β -Oxidation von Propionat lediglich mitochondriales Acetyl-CoA erzeugt. Da die Mitochondrien-Membran für CoA-Ester undurchlässig ist, steht dort lokalisiertes Acetyl-CoA weder dem Glyoxylatzyklus noch der Gluconeogenese oder der Fettsäuresynthese zur Verfügung (Königshoff & Brandenburger, 2012). Dagegen liefert die β -Oxidation ungeradzahligter Fettsäuren neben Propionyl-CoA auch peroxisomales Acetyl-CoA. Dies kann entweder den anaplerotischen Zwecken des Glyoxylatzyklus dienen oder über das Carnitin-Acetyl-Transport-System der Fettsäuresynthese im Cytosol zugeführt werden (Kornberg & Krebs, 1957; Strijbis & Distel, 2010; Zhou & Lorenz, 2008). Dieser Umstand erklärt möglicherweise das unterschiedliche Wachstumsverhalten auf Propionat im Vergleich zu der Propionyl-CoA-erzeugenden Fettsäure Valerat. Auf den Wechsel einer *C. albicans*-Kultur von Glucose zu Valerat als Kohlenstoffquelle folgt eine kürzere, 10-stündige, Adaptionsphase. Der wesentliche Unterschied zur Propionat-Kultur betrifft jedoch die finale Zelldichte. Während Propionat höchstens eine Verdreifachung der Zelldichte bewirkte, erhöhte sich diese durch Valerat ca. 30-fach (Otzen *et al.*, 2014).

Die Fähigkeit von *C. albicans* Propionat dennoch als Kohlenstoffquelle zu nutzen lässt allerdings auf einen alternativen Weg zum Transport von mitochondrialem Acetyl-CoA ins Cytosol schließen, der später diskutiert wird.

Ein weiteres Problem ergibt sich aus der Translokation von Propionyl-CoA aus dem Cytosol in die Mitochondrien. Der Transport über einen Carnitin-Shuttle ist unidirektional und es fehlen Enzyme zum Abbau von Propionyl-CoA innerhalb der Mitochondrien (Königshoff & Brandenburger, 2012). Deshalb würde Propionyl-CoA in der mitochondrialen Matrix akkumulieren und die respirativen und anabolen Funktionen des Citratzyklus behindern. Dieser Fall könnte durch unspezifische Transportprozesse des Acetyl/ Carnitin-Transport-Systems herbeigeführt werden. Bisher ist jedoch nicht bekannt, ob dieser Fall unter entsprechenden Wachstumsbedingungen tatsächlich eintritt oder ob cytosolisches Propionyl-CoA nach seiner Bildung über einen spezifischen Acyl/ Carnitin-Transporter in die Peroxisomen befördert und der modifizierten β -Oxidation zugeführt wird.

8.3 Potentielle Auswirkungen einer peroxisomalen Akkumulation von Propionyl-CoA auf den Metabolismus und die Virulenz von *C. albicans*

Propionyl-CoA wirkt in hohen Konzentrationen hemmend auf verschiedene Enzyme des Primärmetabolismus und führt zur Senkung der Virulenz des humanpathogenen Ascomyceten *Aspergillus fumigatus* (Ibrahim-Granet *et al.*, 2008). In dazu durchgeführten Untersuchungen wurde eine intrazelluläre Anreicherung von Propionyl-CoA durch die Deletion des Gens für die Methylcitratsynthase beobachtet. Die Methylcitratsynthase ist das Schlüsselenzym des mitochondrialen Methylcitratzyklus, welcher der Umwandlung von toxischem Propionyl-CoA zu Pyruvat dient (Brock & Buckel, 2004; Brock *et al.*, 2000; Ibrahim-Granet *et al.*, 2008; Maerker *et al.*, 2005; Piper *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2004) In *C. albicans* wird durch die Kompartimentierung der modifizierten β -Oxidation die Bildung von mitochondrialem Propionyl-CoA reduziert. Dadurch werden mitochondriale Enzyme vor der hemmenden Wirkung von Propionyl-CoA geschützt. Propionyl-CoA entsteht stattdessen im Cytosol oder in den Peroxisomen. Ersteres geschieht durch die Aktivierung von Propionat zum CoA-Ester und Letzteres durch den Abbau ungeradzahligter Fettsäuren über die β -Oxidation (Berg *et al.*, 2007; van den Berg *et al.*, 1996). Cytosolisches Propionyl-CoA würde nach seiner Bildung wahrscheinlich über einen Acyl/ Carnitin-Transporter in die Peroxisomen befördert und der modifizierten β -Oxidation zugeführt werden (Strijbis *et al.*, 2009). Um eine Akkumulation von Propionyl-CoA zu erreichen müsste hier wahrscheinlich eine der Propionyl-CoA-Oxidasen deletiert werden, die Propionyl-CoA in Acrylyl-CoA umsetzen. *C. albicans* besitzt insgesamt vier putative Enzyme mit Acyl-CoA-Oxidase-Funktion: CaPox1p, CaPox1-3p, CaPxp2p und CaAcd99p. Eine phänotypische Charakterisierung homologer Einzelmutanten der entsprechenden Gene zeigte keinen Nachteil dieser Mutanten beim Wachstum auf Propionat-haltigen Nährmedien, dem hingegen ist die Herstellung einer homozygoten CaPOX1-3-Mutante bisher nicht gelungen (Otzen *et al.*, nicht dargestellte Daten). Dies mag zwar für eine besondere Funktion von CaPox1-3p sprechen, kann aber ohne biochemische Beweise nicht direkt gefolgert werden. Im Hinblick auf die Erforschung entsprechender Genfamilien in anderen Hefen (*Candida tropicalis*, *Candida maltosa*) ist es hingegen

wahrscheinlich, dass die einzelnen Isoenzyme die spezifische Oxidation von Fettsäuren verschiedener Länge katalysieren. Allerdings wären auch redundante Substratspezifitäten möglich (Hill, Boulay, & Rogers, 1988; Masuda, Park, Ohta, & Takagi, 1995; Murray & Rachubinski, 1987; Okazaki *et al.*, 1986; Okazaki, Tan, Fukui, Kubota, & Kamiryo, 1987; Wang *et al.*, 1999).

Würde die Deletion einer oder mehrerer der Acyl-CoA-Oxidasen in *C. albicans* zur Akkumulation von Propionyl-CoA führen, könnte hierdurch ein Teil der verfügbaren CoA-SH-Moleküle gebunden und so anderen Stoffwechsel- und Transport-Prozessen verloren gehen. Die Verfügbarkeit von CoA-Resten ist jedoch für zahlreiche Zellprozesse von Bedeutung. Unter anderem für die Bereitstellung von Acetyl-CoA durch die β -Oxidation, welches für die anaplerotische Funktion des Glyoxylatzyklus benötigt wird. Dabei dienen CoA-Reste zur Aktivierung von Fettsäuren, bevor diese in die β -Oxidation eintreten. Während der β -Oxidation selbst bedarf es pro Zyklus eines weiteren CoA-Rests zur Abspaltung einer Acetyl-CoA-Einheit. Peroxisomales Acetyl-CoA dient dem peroxisomalen Glyoxylatzyklus zum Aufbau des C4-Körpers Succinat. Succinat gelangt über einen spezifischen Transporter in die Mitochondrien. Dort wird es von Enzymen des Citratzyklus in Malat umgewandelt und anschließend ins Cytosol transportiert. Dort wird es in Oxalacetat umgewandelt und der Gluconeogenese zugeführt. (Kornberg & Krebs, 1957; Lorenz & Fink, 2001, 2002; Pallotta, Fratianni, & Passarella, 1999). Ein Mangel an verfügbaren peroxisomalen CoA-Molekülen würde demnach den Metabolitfluss zwischen den Zellkompartimenten verringern und dadurch die anabolen Zellfunktionen der Gluconeogenese und des Citratzyklus beeinträchtigen.

Die Deletion von Genen der β -Oxidation könnte außerdem zu strukturellen Veränderungen der Peroxisomen führen, wie es bei einer Deletionsmutante der Trans-2-Enoyl-CoA-Hydratase/ Epimerase *CaFOX2* beobachtet wurde. Die vergrößerten Peroxisomen dieser Mutante beschränken vermutlich den Transport von Metaboliten des Glyoxylatzyklus über die Peroxisomen-Membran (Piekarska *et al.*, 2008). Diese Veränderung resultiert in einer generellen Störung der Assimilierung alternativer Kohlenstoffquellen. Folglich ist eine *Cafox2 Δ* -Mutante nicht in der Lage Acetat, Ethanol, Citrat, Glycerin oder Lactat zu verwerten. Diese Ergebnisse heben die besondere Bedeutung des peroxisomalen Metabolismus hervor (Lorenz & Fink,

2001; Piekarska *et al.*, 2006; Ramirez & Lorenz, 2007). Dies spiegelt sich auch in der Bedeutung des Glyoxylatzyklus und einer funktionalen β -Oxidation für die Etablierung systemischer Candidiasis im murinen Infektionsmodell wieder (Barelle *et al.*, 2006; Chabrier-Rosello, Foster, Mitra, & Haidaris, 2008; Lorenz & Fink, 2001; Piekarska *et al.*, 2008; Ramirez & Lorenz, 2007). Daher könnte eine Beeinträchtigung des Propionatstoffwechsels durch einen Eingriff in den peroxisomalen Stoffwechsel nicht nur direkt, sondern auch indirekt die Virulenz von *C. albicans* abschwächen.

8.4 CaOsm2p verbindet den Propionatmetabolismus mit Prozessen der anaeroben Respiration

Mit Hilfe von 2D-Proteomanalysen konnten wir feststellen, dass die im Kulturmedium verfügbare Kohlenstoffquelle die Ausprägung des Proteoms in *C. albicans* beeinflusst. Dabei verlieh die Expression spezifischer Enzyme zur Assimilierung der jeweiligen Kohlenstoffquelle dem Proteom ein charakteristisches Muster. Der Einsatz von Glucose als einziger Kohlenstoffquelle führte zur verstärkten Expression von Enzymen des Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes. Der Einsatz von Acetat führte dagegen zur verstärkten Expression von Enzymen des Acetatstoffwechsels und des Citratzyklus. Zur Assimilierung von Propionat als einziger Kohlenstoffquelle werden neben Enzymen der modifizierten β -Oxidation offenbar auch Enzyme der anaeroben Atmung mit einbezogen, welche *C. albicans* möglicherweise in die Lage versetzen Fumarat anstelle von Sauerstoff als Elektronenendakzeptor der Respiration zu verwenden. Als konkreter Hinweis darauf könnte das spezifische Auftreten der putativen Fumaratreduktase CaOsm2p verstanden werden (Abb. 8) (Otzen *et al.*, 2014). Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen zur intrazellulären Lokalisierung der Enzyme CaHpd1p und CaEhd3p zeigten außerdem, dass der *C. albicans* Wildtyp SC5314 während der Assimilierung von Propionat, bei einer Exitation von 395 nm, ein schwaches aber deutliches Fluoreszenzsignal im Emissions-Bereich von ungefähr 500-550 nm erzeugt (Otzen *et al.*, 2014; Otzen *et al.*, nicht dargestellte Daten). In diesen Bereich fällt auch das Emissions-Maximum des oxidierten FAD, dem putativen CaOsm2p-Co-Faktor (Lu, Xun, & Xie, 1998). Daher könnte diese Beobachtung als Indiz für eine CaOsm2p-Reduktase-Aktivität interpretiert werden. Die genauen Funktionen von CaOsm2p sind bisher unerforscht, es existieren jedoch indirekte Hinweise auf eine Funktion im Energiestoffwechsel. Bei vergleichenden

Proteomanalysen stellten Kusch *et al.* (2008) ein stark erhöhtes Vorkommen des Enzyms während der stationären Wachstumsphase einer aeroben *C. albicans*-Kultur fest. Damit einhergehend findet offenbar ein Wechsel im Energiemetabolismus statt, welcher durch die verstärkte Expression der NADP-abhängigen cytosolischen Isocitrat-Dehydrogenase Cald2p anstelle der NAD-abhängigen mitochondrialen Isoenzyme Cald1p und Cald2p gekennzeichnet ist (Kusch *et al.*, 2008).

Die CaOsm2p-Annotierung beruht lediglich auf Sequenzvergleichen mit *S. cerevisiae* und blieb bisher experimentell unbestätigt (Braun *et al.*, 2005; d'Enfert *et al.*, 2005). Die Fumaratreduktase-Aktivität der entsprechenden *S. cerevisiae*-Homologe ScFrds1p (Yel047cp) und ScFrds2p (Yjr051wp) wurde jedoch nachgewiesen. Demnach geht der größere Anteil der Gesamtaktivität auf das cytosolische Enzym ScFrds1p zurück. Das promitochondriale Isoenzym ScFrds2p trägt hingegen einen essentiellen Teil zum anaeroben Wachstum auf Glucose bei (Arikawa, Enomoto, Muratsubaki, & Okazaki, 1998; Muratsubaki & Enomoto, 1998). *S. cerevisiae* bildet Promitochondrien unter anaeroben Bedingungen im Zuge der Repression des oxidativen Katabolismus. Reduktionsäquivalente in Form von NADH sowie ATP könnten unter diesen Bedingungen durch den glykolytischen Abbau von Glucose generiert werden. Promitochondrien verfügen über keine funktionale Elektronentransportkette zur Reduktion von NADH und zur ATP-Synthese. Die Reoxidation von NADH geschieht stattdessen durch die Kopplung der NADH-Oxidation mit der Reduktion der ScFrds2-Cofaktoren FAD oder FMN und der anschließenden Reduktion des alternativen Elektronenakzeptors Fumarat. Dabei wird Fumarat zu Succinat reduziert. Das in *S. cerevisiae* für die FAD oder FMN-Reduktion verantwortliche Enzym wurde bisher nicht identifiziert. Außerdem tragen wahrscheinlich weitere NADH-abhängige Enzyme und Prozesse dazu bei das Redox-Gleichgewicht zu stabilisieren (Ansell, Granath, Hohmann, Thevelein, & Adler, 1997; Arikawa *et al.*, 1998; Criddle & Schatz, 1969; Enomoto, Arikawa, & Muratsubaki, 2002). Frühere Publikationen legten einen Zusammenhang zwischen einem fehlenden ScFrds2p und verstärkter Sensitivität gegenüber hyperosmotischen Bedingungen nahe. Jedoch handelte es sich bei dem untersuchten *S. cerevisiae*-Stamm um eine Doppelmutante, welcher zusätzlich das Gen des Iso-1-Cytochrom c

fehlte. In neueren Experimenten ließ sich ein entsprechender Zusammenhang nicht belegen (Arikawa *et al.*, 1998; Singh & Sherman, 1978).

Diesen Daten zufolge beschränkt sich die CaOsm2-Funktion wahrscheinlich nicht auf Prozesse der anaeroben Respiration. Stattdessen verhilft dieses Enzym *C. albicans* möglicherweise zur Anpassung an aerobe Wachstumsbedingungen, wie sie während der stationären Wachstumsphase oder dem Wachstum auf Propionat als einziger Kohlenstoffquelle gegeben sind.

8.5 Der ungeklärte Mechanismus der Acetyl-CoA-Translokation aus den Mitochondrien

Ein wichtiger Aspekt des Propionatmetabolismus ist sowohl für *S. cerevisiae* als auch für *C. albicans* nicht abschließend geklärt. Die Endprodukte des Methylcitratzyklus und der modifizierten β -Oxidation müssen dem Anabolismus zugeführt werden. Dazu müssten das Pyruvat aus dem Methylcitratzyklus und das Acetyl-CoA aus der modifizierten β -Oxidation über die Mitochondrienmembran ins Cytosol gelangen. Da die Pyruvat- und die Acetyl-CoA-Translokation jedoch unidirektionale Transportprozesse darstellen, sind beide Intermediate in den Mitochondrien eingeschlossen, sofern sie nicht in andere Substanzen umgewandelt und auf alternativen Wegen ins Cytosol gelangen (Königshoff & Brandenburger, 2012). In *S. cerevisiae* könnte Pyruvat aus dem Methylcitratzyklus durch den mitochondrialen Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex in Acetyl-CoA umgewandelt und anschließend dem Citratzyklus zugeführt werden. Cytosolisches Acetyl-CoA entstünde dagegen durch die Fermentation von Glucose. Dies wäre eine Erklärung für die Notwendigkeit des Co-Metabolismus von Propionat und Glucose in dieser Hefe und entspräche deren bevorzugt fermentativen Metabolismus (De Deken, 1966; Luttik *et al.*, 2000; Postma, Verduyn, Scheffers, & Van Dijken, 1989; Verduyn *et al.*, 1990). Die Tatsache, dass *C. albicans* jedoch Propionat als einzige Kohlenstoffquelle zum Wachstum nutzen kann, weist auf einen alternativen Mechanismus zum Transport von Acetyl-CoA ins Cytosol hin. Es ist naheliegend anzunehmen, dass mitochondriales Acetyl-CoA in den Citratzyklus eingeht und folglich in Citrat umgewandelt wird. Citrat könnte anschließend über einen Citrat-Malat-Antiporter ins Cytosol gelangen. Dort müsste Citrat durch eine ATP-Citrat-Lyase in Oxalacetat und Acetyl-CoA gespalten werden um cytosolisches Acetyl-CoA zu gewinnen (Hynes &

Murray, 2010). Jedoch verfügen weder *C. albicans* noch *S. cerevisiae* über ein solches Enzym.

Möglicherweise ist die putative CoA-Transferase CaAch1p an der Translokation von Acetyl-CoA aus den Mitochondrien ins Cytosol beteiligt (Abb. 8). Carman *et al.* (2008) vermuteten, dass CaAch1p die Hydrolyse des Acetyl-CoA-Esters mit der Bildung von Acetyl-Carnitin verbinden könnte, lieferten dazu jedoch keine experimentellen Beweise (Carman, Vylkova, & Lorenz, 2008). Wie bereits erwähnt gibt es zudem keine Hinweise auf einen Carnitin-abhängigen Transport-Prozess aus der mitochondrialen Matrix ins Cytosol (Königshoff & Brandenburger, 2012). In Wachstumsversuchen zur Charakterisierung einer *Caach1*-Deletionsmutante wurde zwar eine Beeinträchtigung der Verwertung von Acetat und Ethanol festgestellt, jedoch erzeugen diese Kohlenstoffquellen kein mitochondriales Acetyl-CoA, wie es bei der Verwertung von Propionat oder ungeradzahligen Fettsäuren der Fall ist (Carman *et al.*, 2008; Otzen *et al.*, 2014). Daher ist die tatsächliche Funktion von CaAch1p und dessen Rolle für den Acetatstoffwechsel in *C. albicans* bisher ungeklärt. Durch Studien an homologen Enzymen in *Aspergillus nidulans* und *S. cerevisiae* ist es jedoch unwahrscheinlich, dass Caach1p als Hydrolase von CoA-Estern fungiert. Vielmehr ist eine Funktion als CoA-Transferase wahrscheinlich (Fleck & Brock, 2009). Das entsprechende *S. cerevisiae*-Homolog dieses Enzyms bildet Succinyl-CoA aus Succinat, wobei ein CoA-Rest von Acetyl-CoA übertragen wird. Dadurch wird die zur Esterbildung aufgewendete Energie konserviert (Fleck & Brock, 2009). In diesem Prozess könnte ein etwaiger Mehrbedarf an Succinat zur Aufnahme von CoA-Molekülen aus der Reduktion von Fumarat gedeckt werden. Mit der putativen Fumaratreduktase CaOsm2p stünde ein Enzym zur Katalyse dieses Prozesses zur Verfügung (Abb. 8) (Otzen *et al.*, 2014). Im Gegensatz zu Acetyl-CoA könnte Acetat die Mitochondrien-Membran überwinden. Zum einen könnte dies durch passive Diffusion geschehen, zum anderen durch aktiven Transport. Ob in *C. albicans* ein entsprechender Acetat-Transporter zur Verfügung steht, ist allerdings unbekannt. Schließlich müsste eine der Acetyl-CoA-Synthasen CaAcs1p oder CaAcs2p einen CoA-Rest auf Acetat übertragen, um cytosolisches Acetyl-CoA herzustellen (Carman *et al.*, 2008). In unseren 2D-Proteomanalysen wurde CaAcs2 unter allen getesteten Bedingungen, unabhängig von der Kohlenstoffquelle,

detektiert. Dagegen konnte CaAcs1p lediglich dann im Proteom von *C. albicans* nachgewiesen werden, wenn Acetat als Kohlenstoffquelle diente (Otzen *et al.*, 2014). Die vergleichende 2D-Proteomanalyse war jedoch auf besonders prägnante Protein-Spots beschränkt, von denen einige durch MALDI-MS-Analyse nicht identifiziert werden konnten. Es ist daher nicht auszuschließen, dass CaAcs1p auch im Proteom von Zellen vorhanden war, die über Propionat als Kohlenstoffquelle verfügten.

8.6 *C. albicans* vermeidet die Bildung von Propionyl-CoA während des Aminosäurekatabolismus

In Wachstumsversuchen auf Festmedien wurde der *C. albicans* Wildtypstamm SC5314 und Deletionsmutanten der modifizierten β -Oxidation (*Cafox2 Δ* , *Caehd3 Δ* , *cahpd1 Δ* , *Caald6 Δ* , *Caald5 Δ /ald6 Δ*), sowie der peroxisomalen β -Oxidation (*Cafox2 Δ* , *Capot1 Δ /Cafox3/Capot13 Δ*), auf ihre Fähigkeit zur Assimilierung von Aminosäuren als alternativer Kohlenstoffquelle getestet. Deletionsmutanten der peroxisomalen β -Oxidation zeigten dabei Einschränkungen in der Assimilierung von Aminosäuren als alternativer Kohlenstoffquelle (Abb. 9). Dies bestätigt und ergänzt die Beobachtung, dass Störungen der β -Oxidation die Assimilierung von alternativen Kohlenstoffquellen behindern (Piekarska *et al.*, 2008; Ramirez & Lorenz, 2007). Die Deletion von spezifischen Genen der modifizierten β -Oxidation hat nach den Ergebnissen der Wachstumsversuche keinen Einfluss auf die Assimilierung der Aminosäuren Methionin, Valin, Leucin und Isoleucin (Abb. 9) (Otzen *et al.*, 2014). Dies entspricht der Annahme, dass *C. albicans* Methionin, Valin und Isoleucin nicht in Propionyl-CoA umwandelt, wie es bei Säugetieren der Fall ist (Abb. 3). *S. cerevisiae* wandelt diese Aminosäuren in Fuselalkohole um (Abb. 4). Da diese Fuselalkohole anschließend sekretiert werden, kann *S. cerevisiae* die genannten Aminosäuren zwar als Stickstoff- aber nicht als Kohlenstoffquelle nutzen (Berg *et al.*, 2007; Dickinson, 2000; Dickinson *et al.*, 1997; Hazelwood *et al.*, 2008; Perpète *et al.*, 2006). Allerdings geben die vorliegenden Ergebnisse keine Anhaltspunkte für die Produktion von Fuselalkoholen durch *C. albicans*. Interessanterweise scheint es, als könnte *C. albicans* die getesteten Aminosäuren sogar als Kohlenstoffquelle nutzen (Abb. 9). In diesem Fall würden sich die entsprechenden Stoffwechselwege nicht nur von denen in *S. cerevisiae*, sondern auch von denen in Säugetieren unterscheiden.

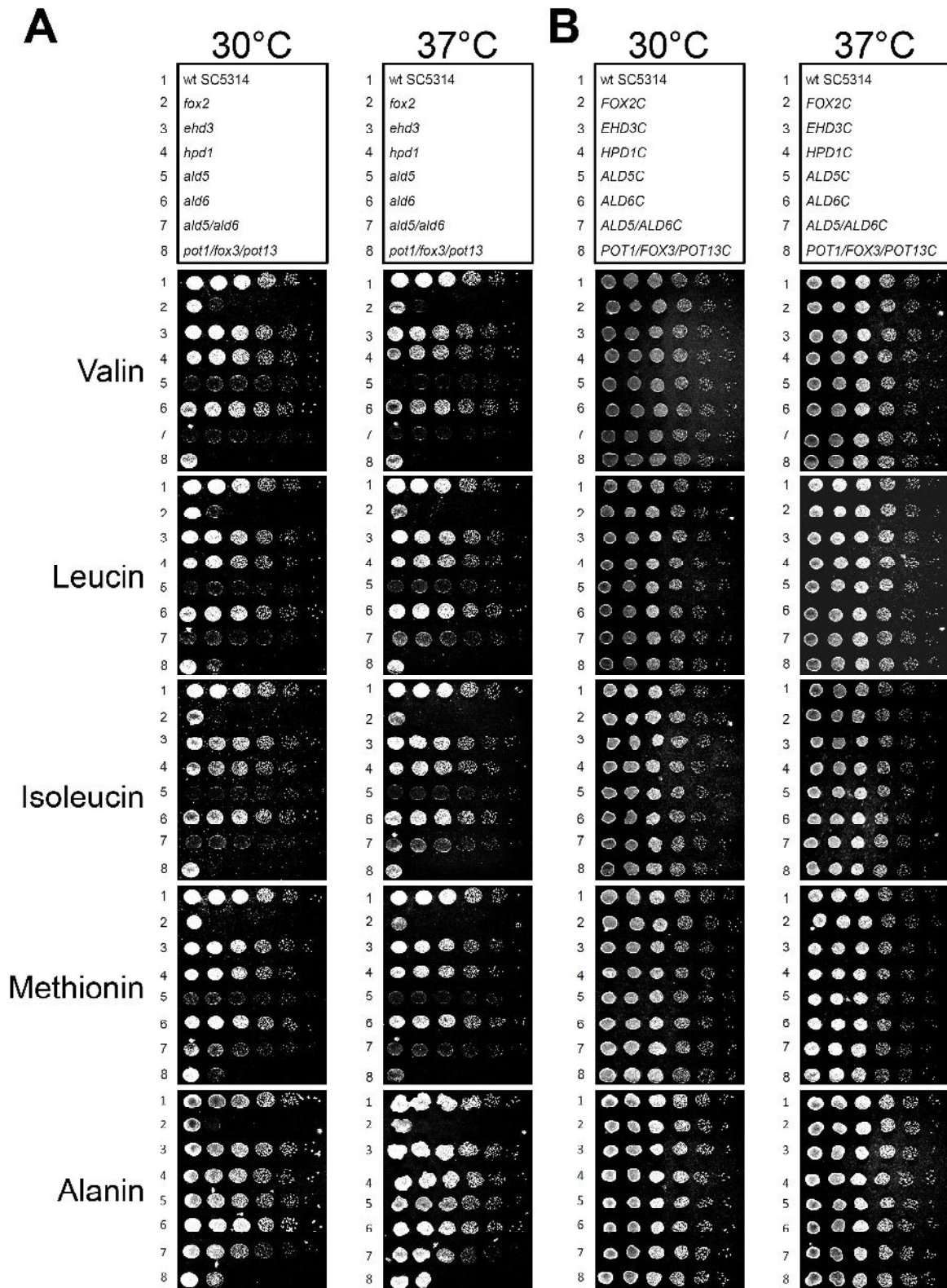


Abbildung 9: Wachstumstest zur Aminosäureassimilierung durch *C. albicans*. A) Deletionsmutanten der peroxisomalen und der modifizierten β -Oxidation und einer *Caald5 Δ* -Mutante. B) Die rekonstituierten Deletionsmutanten entsprechen in ihrem Wachstumsverhalten dem *C. albicans* WT

Diesbezüglich lieferten Untersuchungen des anaeroben Bakteriums *Clostridium sporogenes* und der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* Hinweise auf die Interkonversion von Valin und Leucin. Demnach ließe sich Valin prinzipiell in Leucin umwandeln und anschließend zu Acetyl-CoA abbauen (Lucas, Filley, Erb, Graybill, & Hawes, 2007; Monticello & Costilow, 1982). Allerdings sind nach unserer derzeitigen Kenntnis keine alternativen Stoffwechselwege zur Umwandlung von Methionin und Isoleucin in Acetyl-CoA beschrieben. Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang der Einfluss der putativen Aldehyd-Dehydrogenase CaAld5p. Die *Caald5Δ*- und *Caald5Δ/ Caald6Δ*-Deletionsmutanten zeigen ein vermindertes Wachstum, sofern diese über Methionin, Valin, Leucin oder Isoleucin als einziger Kohlenstoffquelle verfügen (Abb. 9). Das Restwachstum der *Caald5Δ*-Mutante beruht möglicherweise auf anderen alternativen Kohlenstoffquellen, welche *C. albicans* aus dem Testagar aufzunehmen vermag oder auf der Existenz von CaAld5p-Isoenzymen mit ähnlicher Funktion. Daher könnte CaAld5p möglicherweise an einem Knotenpunkt des Katabolismus der genannten Aminosäuren fungieren. Verwendet man hingegen Alanin als Kohlenstoffquelle, zeigt lediglich die Doppelmutante einen geringen Wachstumsdefekt, welcher offenbar auf die *CaALD6*-Deletion zurückzuführen ist (Abb. 9). Dieser Phänotyp beruht wahrscheinlich auf einer Beteiligung von CaAld6p an der Fermentation von Pyruvat, welches bei der Deaminierung von Alanin entsteht, und wird in Abschnitt 9.8 näher betrachtet. Eine Funktion von CaAld5p im Aminosäurekatabolismus wäre auch mit dem Wachstumsdefekt der *Caald5Δ*-Mutante auf Propionat-haltigem Testagar vereinbar (Otzen *et al.*, 2014). Möglicherweise muss *C. albicans* zur Anpassung des Metabolismus an diese Kohlenstoffquelle zusätzliche Energie und Acetyl-CoA aus dem Abbau von Aminosäuren generieren. Die Deletion von *CaALD5* würde diesen Mechanismus unterbrechen und so den Wachstumsdefekt herbeiführen. Derartige Überlegungen bleiben in höchstem Maße hypothetisch, da sie in den vorliegenden Ergebnissen keine ausreichende Unterstützung finden und weitere Experimente zur Überprüfung der spezifischen CaAld5p-Funktionen notwendig wären. Dies gilt auch für die Untersuchung des Einflusses der modifizierten β -Oxidation auf den Abbau von Threonin, einer Aminosäure deren Abbau sowohl in *S. cerevisiae* als auch in Säugetieren Propionyl-CoA erzeugt (Luttik *et al.*, 2000, Sinclair *et al.*, 1993).

8.7 Propionat aktiviert möglicherweise Regulatoren des Kohlenstoff- und Aminosäuremetabolismus

Die Beteiligung von Enzymen der β -Oxidation am Abbau von Propionyl-CoA deutet auf eine integrierte Regulation dieser beiden Stoffwechselprozesse in *C. albicans* hin (Otzen *et al.*, 2014). Möglicherweise ist der Transkriptionsfaktor Ctf1p, welcher in *C. albicans* die Biogenese der Peroxisomen und die Expression von Genen der β -Oxidation reguliert, in diese Prozesse involviert (Ramirez & Lorenz, 2009). Ctf1 gehört zu einer hochkonservierten Familie von Zn_2 -Cys₆-Transkriptionsfaktoren und bindet an ein CCTCGG-Motiv welches in den Promotern von Genen der β -Oxidation und des Glyoxylatzyklus vieler Pilze zu finden ist. *S. cerevisiae* bildet hier eine Ausnahme, da hier Gene der β -Oxidation durch das Heterodimer Pip2p/Oaf1p reguliert werden (Hedges, Proft, & Entian, 1995; Hynes, Murray, Duncan, Khew, & Davis, 2006; Strijbis & Distel, 2010). Darüber hinaus scheint Propionat in *C. albicans* noch weitere Regulationsprozesse zu aktivieren. Die Expression der putativen Fumaratreduktase CaOSM2 wird laut Turnou *et al.* (2005) durch die Proteinkinase CaGcn2p und den Transkriptionsregulator CaGcn4p reguliert. Gemeinsam regulieren sie Zellprozesse zum Ausgleich von Aminosäuremangel und aktivieren Gene der Aminosäurebiosynthese (Tournu *et al.*, 2005; Tripathi *et al.*, 2002). In diesen Zusammenhang fügt sich auch die verstärkte Transkription von Genen der Leucinbiosynthese ein, welche in Microarray-Analysen festgestellt wurde (Abb. 10). Daran schließt sich wahrscheinlich ein in *C. albicans* bisher nicht charakterisierter Quorum Sensing-Mechanismus an. Neben CaLEU1, einem Gen der Leucinbiosynthese, gehörte nämlich auch das Gen einer putativen Methyltransferase (CaTMT1) zu den am stärksten transkribierten Genen in Gegenwart von Propionat (Abb10). Die putative 2-Isopropylmalat-Dehydratase CaLeu1p erzeugt während der Leucinbiosynthese 3-Isopropylmalat, welches möglicherweise als Substrat für CaTmt1p dient. Das entsprechende *S. cerevisiae*-Homolog ScTmt1p katalysiert in ScGcn4p-abhängiger Weise die spezifische Methylierung der Leucin-Vorstufe 3-Isopropylmalat, welche anschließend von der Zelle sekretiert wird. Der 3-Isopropylmalat-mono-Methylester ist Teil eines Regulations-Mechanismus, der bei Stickstoff- oder Aminosäuremangel die Bildung von Pseudohyphen aktiviert und invasives Wachstum einleitet (Cai *et al.*, 2001; Katz *et al.*, 2004). Die Funktion von

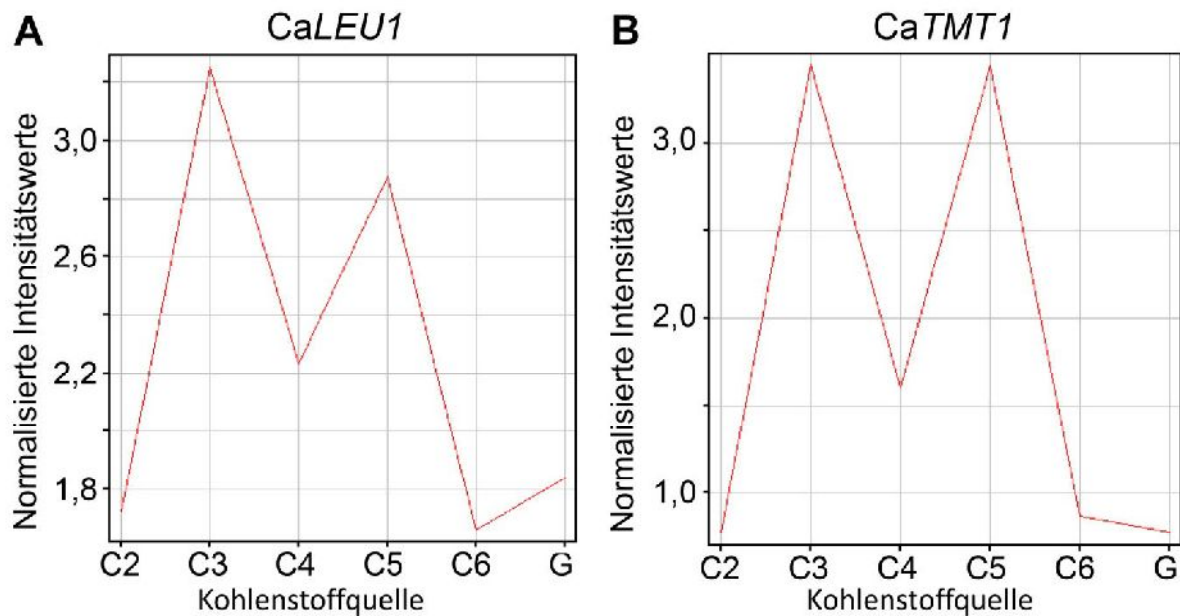


Abbildung 10: Microarray-Analyse der differentiellen Regulation der Gene *CaLEU1* und *CaTMT1* in Abhängigkeit von unterschiedlichen Kohlenstoffquellen. **A)** Die normalisierten Intensitätswerte deuten auf eine gesteigerte Transkriptionsaktivität der putativen 2-Isopropylmalat-Dehydratase *CaLEU1* unter dem Einfluss der Propionyl-CoA-erzeugenden Kohlenstoffquellen Propionat und Valerat. **B)** Die Transkriptionsaktivität des Gens der putativen Methyltransferase *CaTMT1* ist unter denselben Bedingungen ebenfalls erhöht. Beide Gene und deren Genprodukte sind möglicherweise Teil eines Regulationsmechanismus zur Hyphenbildung in *C. albicans*. Abkürzungen: Acetat (C2), Propionat (C3), Butyrat (C4), Valerat (C5), Hexanoat (C6) und Glucose (G).

CaTmt1p in *C. albicans* ist nach vorläufigen Ergebnissen ebenfalls mit der Morphogenese verknüpft. Eine *Catmt1Δ*-Mutante zeigt einen deutlichen Hyphenbildungs-Defekt in Glucose-Flüssigkultur. Durch Zugabe eines synthetischen 3-Isopropylmalat-mono-Methylesters ließ sich der WT-Phänotyp in Glucose-Flüssigkultur rekonstituieren und dadurch die Signalfunktion dieses Moleküls darstellen (Otzen *et al.*, nicht dargestellte Ergebnisse). Propionat und Glucose würden demnach eine *CaGcn4p* vermittelte Aminosäureantwort in *C. albicans* induzieren. Die katalytische Funktion von *CaTmt1p* bildet dabei möglicherweise eine Verbindung zwischen Metabolismus und Morphogenese die bisher für *C. albicans* nicht beschrieben wurde.

8.8 Die Aldehyd-Dehydrogenasen *CaAld5p* und *CaAld6p* haben neue und zusätzliche metabolische Funktionen

Die ALD-Genfamilie in *S. cerevisiae* umfasst 5 Gene von Aldehyd-Dehydrogenasen (*ScALD2*, *ScALD3*, *ScALD4*, *ScALD5*, *ScALD6*). Drei der entsprechenden Enzyme dienen der Acetatbildung über den Pyruvat-Dehydrogenase-Beipass der Pyruvat-

Decarboxylase. Diese Oxidieren während der Fermentation von Glucose anfallendes Acetaldehyd zu Acetat. Im Cytosol wird diese Funktion von ScAld6p durchgeführt. In den Mitochondrien finden sich dazu mit ScAld4p und ScAld5p zwei weitere Isoenzyme. Alle drei dieser Enzyme generieren NADPH₂ und führen dem Anabolismus über diesen Co-Faktor Reduktions-Äquivalente zu. ScAld5p ist außerdem über eine Funktion in der Häm-Synthese mit der aeroben Respiration verbunden. ScAld2p und ScAld3p katalysieren im Rahmen der Biosynthese von Co-Enzym A die Konversion von 3-Amino-Propanal zu β -Leucin (Saint-Prix, Bonquist, & Dequin, 2004).

C. albicans verfügt über mindestens 6 ALD-Gene. Bis auf CaALD4, dessen Genprodukt als drittes Enzym der Carnitin-Biosynthese charakterisiert wurde, sind den entsprechenden Enzymen bisher keine spezifischen Funktionen zugewiesen worden (Maglott, Ostell, Pruitt, & Tatusova, 2007; Strijbis *et al.*, 2009). Unsere Untersuchungen legen nahe, dass zwei der ALD-Gene in *C. albicans* in den Propionat- und Aminosäurekatabolismus involviert sind und sich in ihren spezifischen Funktionen von ihren *S. cerevisiae*-Homologen unterscheiden (Otzen *et al.*, 2014). Das ScAld4-Homolog CaAld6p katalysiert demnach in den Mitochondrien die oxidative Decarboxylierung von Malonylsemialdehyd zu Acetyl-CoA und CO₂. (Otzen *et al.*, 2014). Unveröffentlichte Ergebnisse deuten jedoch darauf hin, dass Ald6p neben der Beteiligung am Abbau von Propionyl-CoA an weiteren Stoffwechselprozessen beteiligt ist. In Glucose-Flüssigmedium erreichen Kulturen der Caald6 Δ -Mutante im Vergleich zum WT nicht dieselbe Wachstumsrate und finale Zelldichte (Abb. 11). Daher ist anzunehmen, dass Ald6p auch an der Fermentation von Glucose beteiligt ist und möglicherweise für die Beseitigung toxischer Intermediate benötigt wird. Als mögliches Substrat käme dabei Acetaldehyd in Frage, welches durch die Decarboxylierung von Pyruvat oder der Oxidation von Ethanol entsteht (Berg *et al.*, 2007, Püschel *et al.*, 2001). CaAld6p könnte Acetaldehyd in einer Dehydrogenasereaktion entweder in Acetyl-CoA oder Acetat umwandeln. Unseren unveröffentlichten Ergebnissen zufolge unterscheiden sich ScAld5p und dessen Homolog CaAld5p in ihrer jeweiligen Lokalisation, Funktion und Regulation. In *S. cerevisiae* dient ScAld5p der Oxidation von mitochondrialem Acetaldehyd. Im

Einklang damit wird die *ScALD5*-Transkription durch die Anwesenheit von Glucose verstärkt (Rodaki *et al.*, 2009; Saint-Prix *et al.*, 2004).

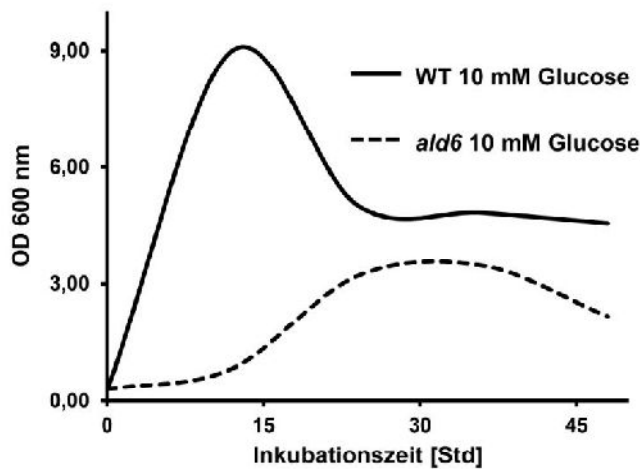


Abbildung 11: Wachstumsversuch zur Charakterisierung einer *Caald6*-Deletionsmutante.

Die Deletion der putativen Aldehyd-Dehydrogenase *CaALD6* resultiert in eingeschränktem Wachstum auf Glucose. Dies deutet möglicherweise auf zusätzliche Funktionen von *CaAld6p* im glykolytischen Stoffwechsel, neben dessen Funktion im Propionatstoffwechsel. Dargestellt sind die Mittelwerte von 3 unabhängigen Bestimmungen der Zelldichte (OD_{600}).

Nach Vorhersage der Proteinlokalisierung durch das Vorhersageprogramm PSORT II (<http://psort.hgc.jp/form2.html>) ist *CaAld5p* hingegen mit einer Wahrscheinlichkeit von 65% im Cytosol lokalisiert. Außerdem wird die Transkription von *CaALD5* durch Glucose reprimiert (Rodaki *et al.*, 2009). Die Tatsache, dass *Ald5p* trotzdem auf 2D-Gelen von *C. albicans* Glucose-Kulturen nachgewiesen wurde, kann möglicherweise durch die unterschiedlichen Kulturbedingungen in beiden Experimenten erklärt werden. Für ihre Transkriptomanalyse verwendeten Rodaki *et al.* (2009) zur Vorkultur der Hefezellen ein Vollmedium mit Lactat als Kohlenstoffquelle (YPLactat). Nach Erreichen der mittleren exponentiellen Wachstumsphase wechselten sie zu einem Vollmedium mit Glucose und Aminosäuren als Kohlenstoffquelle und Stickstoffquelle (YPD). In unseren Experimenten verwendeten wir dagegen ein Minimal-Medium mit Glucose und $(NH_4)_2SO_4$ zur Vorkultur. Nach Erreichen der stationären Wachstumsphase wechselten wir zu einem Minimal-Medium mit Glucose, Acetat, Propionat oder Aminosäuren als Kohlenstoffquellen, wobei entweder $(NH_4)_2SO_4$ oder keine weitere Stickstoffquelle zugesetzt wurde. Diese Kulturen wurden jeweils in der mittleren Wachstumsphase geerntet und für die Proteomanalyse vorbereitet. Es ist wahrscheinlich, dass die verschiedenen Inhaltsstoffe der Kulturmedien die Analyseergebnisse der jeweiligen Experimente beeinflusst haben. In Wachstumsversuchen zeigte eine *Caald5*-Mutante vermindertes Wachstum wenn eine der Aminosäuren Methionin, Valin, Leucin und Isoleucin als einzige

Kohlenstoffquelle verfügbar war (Abb. 9). Es bedarf jedoch weiterer Experimente um eine etwaige Beteiligung von CaAld5p am Aminosäuremetabolismus zu untersuchen. Diese vorläufigen Ergebnisse geben Hinweise auf die Regulation, sowie neue und zusätzliche Funktionen der Aldehyd-Dehydrogenasen CaAlp5p und CaAld6p. Die nähere Charakterisierung der enzymatischen Eigenschaften dieser Enzyme würde möglicherweise neue Aspekte des Glucose- und Aminosäurekatabolismus und deren Verbindung zum Anabolismus in *C. albicans* sichtbar machen.

8.9 Die Relevanz der modifizierten β -Oxidation für die kommensale und für die pathogene Lebensweise von *C. albicans*

Die modifizierte β -Oxidation verbindet Enzyme der peroxisomalen β -Oxidation (CaPox1p, CaPox1-3p, CaPxp2p, CaFox2p) mit mitochondrialen Enzymen (CaEhd3p, CaHpd1p, CaAld6p) in einem Stoffwechselweg zum spezifischen Abbau von Propionyl-CoA (Abb. 8). Eine Unterbrechung der modifizierten β -Oxidation durch die Deletion der 3-Hydroxypropionat-Dehydrogenase *CaHPD1* verursacht eine signifikante Verminderung der Virulenz des humanpathogenen Pilzes *C. albicans* im murinen Infektionsmodell disseminierter Candidiasis (Otzen *et al.*, 2014). Man kann daher vermuten, dass Propionyl-CoA-erzeugende Kohlenstoffquellen eine wichtige Nahrungsquelle während des Infektionsprozesses darstellen. Unterstützung findet diese Vermutung durch die Ergebnisse einer Untersuchung der Interaktion von *C. albicans* mit Makrophagen. Lorenz *et al.* (2004) zeigten, dass der Phagozytose von *C. albicans* durch Makrophagen eine drastische Änderung der transkriptionellen Aktivität des Pilzes folgt. Die frühe Phase nach der Phagozytose ist von einer Abnahme der Transkription von Genen der Glykolyse und des Translationsapparates sowie durch eine verstärkte Transkription von Genen der Gluconeogenese, des Glyoxylatzyklus und der β -Oxidation gekennzeichnet. In der späten Phase kehrt sich diese Transkriptionsaktivität um. Die phagozytierten Zellen nehmen das glykolytische Wachstum wieder auf und leiten die Hyphenbildung ein, um schließlich aus dem Makrophagen auszuwachsen. Diese Ergebnisse begründen die Hypothese, dass *C. albicans* durch die Phagozytose in eine Glucose-arme Umgebung gelangt und dadurch zur Assimilierung von Fettsäuren gezwungen wäre, bevor die Hyphenbildung und damit einhergehend der glykolytische Stoffwechsel wieder einsetzen könnte. Ein Bezug zur modifizierten β -Oxidation wird in der Arbeit von

Lorenz *et al.* (2004) nicht hergestellt. Zur Zeit der besagten Studie war dieser Stoffwechselweg in *C. albicans* jedoch auch noch nicht bekannt.

Eine Betrachtung des Datensatzes aus dem Anhang der Publikation von Lorenz *et al.* (2004) im Hinblick auf die Gene der modifizierten β -Oxidation ergab jedoch, dass deren Aktivität in analoger Weise zu den Genen der β -Oxidation verläuft. Außerdem gehören die Gene *CaHPD1* (orf19.5565) und *CaALD6* (orf19.742) neben *CaPXP2* (orf19.1655) und *CaFOX2* (orf19.1809) zu den am stärksten transkribierten Genen der frühen Phase. Ebenso verzeichnet die Transkription von *CaEHD3* (orf19.3029) während der frühen Phase einen Anstieg. Dessen im Vergleich zu *CaHPD1* und *CaALD6* geringe Transkriptionsaktivität deckt sich zudem mit unseren eigenen Beobachtungen, da die Promotoraktivität von *CaEHD3* nicht ausreichte, um GFP-Fluoreszenz unter induzierenden Bedingungen sichtbar zu machen (Lorenz *et al.*, 2004; Otzen *et al.*, 2014).

Überraschend sind dagegen die geringen Transkriptionsaktivitäten der Gene der 3-Ketoacyl-CoA-Thiolasen *CaPOT1* (orf19.7520) und *CaFOX3* (orf19.1704). Deren Genprodukte katalysieren im letzten Schritt der β -Oxidation die Verkürzung von Fettsäuren um ein Acetyl-CoA-Molekül (Otzen *et al.*, 2013). Nach der Hypothese von Lorenz *et al.* (2004) wird das so gewonnene Acetyl-CoA über den Glyoxylatzyklus der Gluconeogenese zugeführt (Abb. 8). Eine geringe Expression der Acyl-CoA-Thiolasen könnte notwendig sein, um unspezifische Stoffwechselreaktionen und daraus resultierende toxische Effekte auf den peroxisomalen Stoffwechsel zu vermeiden. Die geringe Genaktivität der Acyl-CoA-Thiolasen könnte jedoch auch als Hinweis auf deren nachrangige Bedeutung für Infektionsprozesse gewertet werden. Zumindest zeigten Thiolase-Deletionsstämme im Hühnereimodell für Pilzinfektionen keine verminderte Virulenz gegenüber dem *C. albicans* Wildtyp (Otzen *et al.*, 2013). Dies lässt vermuten, dass *C. albicans* im Phagosom von Makrophagen Propionyl-CoA-erzeugenden Fettsäuren über die modifizierte β -Oxidation verwerten könnte. Propionyl-CoA könnte außerdem aus dem Abbau von Cholesterol stammen, wie es für das intraphagosomale Pathogen *Mycobacterium tuberculosis* beschrieben wurde (Griffin *et al.*, 2012). Jedoch ist ungeklärt ob *C. albicans* in ähnlicher Weise Cholesterol aus den Zellen seines Wirts gewinnen und verwerten kann. Die Ergänzung der Ergebnisse zur Reaktion von *C. albicans* auf die Phagozytose durch

Makrophagen mit den Erkenntnissen zur modifizierten β -Oxidation liefert eine mögliche Erklärung für die verminderte Virulenz einer *Ca_{hpd1} Δ* -Mutante (Otzen *et al.*, 2014). Der vorrangigen Darstellung zufolge würde *C. albicans* durch eine Unterbrechung der modifizierten β -Oxidation die Möglichkeit zur effizienten Kohlenstoffassimilierung nach der Phagozytose durch Makrophagen verlieren. Dies würde einen Fitnessverlust bei der Etablierung systemischer Infektionen bedeuten. Neuere Forschungsergebnisse deuten außerdem auf eine Bedeutung der modifizierten β -Oxidation für die kommensale Lebensweise von *C. albicans* hin. Man vermutet, dass spezifische Wirtsfaktoren *C. albicans* in seinem kommensalen Stadium zur Ausprägung eines intermediären Phänotyps von Weißen und Opaque-Zellen veranlassen. Neben diesen bisher unbekanntem Wirtsfaktoren wird dieser Phänotyp offenbar durch den morphogenetischen Regulator CaWor1p induziert, welcher der Kontrolle des Weiß-Opaque-Phänotyps und des parasexuellen Zyklus dient (Bennett & Johnson, 2003; Hernday, Noble, Mitrovich, & Johnson, 2010; Xie *et al.*, 2013). Die konstitutive CaWor1-Expression in α/α -Stämmen und die Passage dieser Zellen durch den gastrointestinalen Trakt von Mäusen führt zur Ausprägung und Fixierung des Intermediären Phänotyps, den sogenannten GUT-Zellen. Diese verfügen über einen nicht näher charakterisierten kompetitiven Vorteil bei der Besiedelung des gastrointestinalen Trakts von Mäusen. Umfassende Transkriptionsanalysen von Weißen, Opaque- und GUT-Zellen ergaben, dass sich GUT-Zellen durch eine verstärkte Transkription von Genen der peroxisomalen β -Oxidation auszeichnen (Pande *et al.*, 2013). Die Analyse des veröffentlichten Datensatzes der Transkriptomanalysen mit Hilfe des „GeneXplorer“ der Candida Genome Database (<http://www.candidagenome.org>) offenbarte, dass dies auch für sämtliche Gene der modifizierten β -Oxidation gilt. Diesen Daten zufolge wird die Transkriptionsaktivität dieser Gene von echten Opaque-Zellen noch übertroffen. Diese Ergebnisse legen eine besondere Bedeutung der modifizierten β -Oxidation zur Nahrungsverwertung als Kommensale im gastrointestinalen Trakt und im Stoffwechsel von Opaque-Zellen nahe.

9 Zusammenfassung und Ausblick

Die in dieser Dissertationsschrift zusammengefassten Publikationen schließen Wissenslücken auf dem Gebiet der Physiologie des Hefepilzes *C. albicans* und bieten Ausgangspunkte für eine weiterführende Analyse des Metabolismus, der Virulenz und des Kommensalismus dieses humanpathogenen Pilzes.

Die erste Publikation aus dieser Arbeit befasst sich mit dem Einfluss der Gene der putativen Ketoacyl-CoA-Thiolasen *CaPOT1*, *CaFOX3* und *CaPot13* auf die Verwertung von Fettsäuren durch *C. albicans*. Ketoacyl-CoA-Thiolasen katalysieren die Verkürzung von Fettsäuren um ein Acetyl-CoA-Molekül im letzten Reaktionsschritt der peroxisomalen β -Oxidation (Otzen *et al.*, 2013). Insbesondere der peroxisomale Glyoxylatzyklus, aber auch die β -Oxidation von Fettsäuren, spielen für *C. albicans* eine wichtige Rolle für die Virulenz und bei der Verwertung verschiedener alternativer Kohlenstoffquellen (Lorenz *et al.*, 2004; Lorenz & Fink, 2001; Piekarska *et al.*, 2008; Piekarska *et al.*, 2006; Ramirez & Lorenz, 2007). Es wäre daher interessant, die Verbindung dieser Gene zu Wirts-Interaktion zu vertiefen. Dies ließe sich mit Interaktionsstudien mit Makrophagen erreichen und würde ein genaueres Verständnis der Funktion von Ketoacyl-CoA-Thiolasen im Infektionsprozess ermöglichen. Zudem könnte die phänotypische Charakterisierung der Thiolase-Deletionsmutanten im Hinblick auf eine mögliche Beeinträchtigung der Morphogenese unter hypheninduzierenden Bedingungen erweitert werden. Ein möglicher Bezug zur Morphogenese ließe sich mittels gezielter mikroskopischer Untersuchungen und über Transkriptionsstudien untersuchen.

In der zweiten Publikation wird die Existenz der modifizierten β -Oxidation zum spezifischen Abbau von toxischem Propionyl-CoA in *C. albicans* erstmals experimentell dargestellt (Otzen *et al.*, 2014). Zum Abbau von Propionyl-CoA verfügen die meisten filamentösen Pilze über den Methylcitratzyklus und Säugetiere über den Cobalamin-abhängigen Methylmalonyl-CoA-Weg (Ibrahim-Granet *et al.*, 2008; Otzen *et al.*, 2014; Verduyn *et al.*, 1990). Die modifizierte β -Oxidation ist daher eine physiologische Besonderheit und stellt möglicherweise eine spezifische Anpassung von *C. albicans* an dessen Lebensweise als Kommensale und als opportunistisches Pathogen von Säugetieren dar. Dafür spricht die signifikante Verminderung der Virulenz einer Deletionsmutante der modifizierten β -Oxidation im

murinen Infektionsmodell disseminierter Candidiasis im Zusammenhang mit den Ergebnissen von Transkriptomanalysen. Diese zeigen, dass der Phagozytose von *C. albicans* durch Makrophagen eine verstärkte Aktivität von Genen der modifizierten β -Oxidation folgt (Lorenz *et al.*, 2004; Otzen *et al.*, 2014). Dasselbe geschieht durch bisher undefinierte Pilz-Wirts-Interaktionen in einem murinen Kommensalismus-Modell und in Opaque-Zellen, wie aus den Datensätzen weiterer Transkriptomanalysen ersichtlich wird (Pande *et al.*, 2013). Diese Ergebnisse eröffnen eine neue Perspektive zur weiteren Erforschung der Virulenz und des Kommensalismus von *C. albicans*. Entsprechende Luciferase-Reporter-Stämme böten beispielsweise die Möglichkeit zur spezifischen Untersuchung von Pilz-Wirts-Interaktionen unter Verwendung von Methoden zur *in vivo* Biolumineszenzdetektion (Brock, 2012). Auf diese Weise könnten neue Einsichten über die spezifische Verfügbarkeit von Kohlenstoffquellen in unterschiedlichen anatomischen Nischen des Wirts gewonnen werden. Diesbezüglich wären auch hier Interaktionsstudien mit Makrophagen von großem Interesse.

Die gemeinsame Induktion der modifizierten β -Oxidation und der putativen Fumaratreduktase CaOsm2p deutet eine weitere Besonderheit des Stoffwechsels in *C. albicans* an. CaOsm2p wurde bisher mit Mechanismen des anaeroben Wachstums assoziiert, scheint bei *C. albicans* jedoch der Anpassung des Stoffwechsels an spezifische, aerobe Umgebungsbedingungen zu dienen (Arikawa *et al.*, 1998; Kusch *et al.*, 2008; Otzen *et al.*, 2014). Die Charakterisierung dieses Enzyms und einer entsprechenden Deletionsmutante bietet vielleicht die Möglichkeit ein weiteres spezifisches Merkmal der Physiologie von *C. albicans* zu beschreiben.

Desweiteren folgt aus unseren veröffentlichten und unveröffentlichten Ergebnissen, dass die Funktionen der Mitglieder der ALD-Genfamilie und die Stoffwechselwege des Aminosäurekatabolismus von den bekannten Funktionen aus *S. cerevisiae* abweichen könnten (Otzen *et al.*, 2014). Diese Gene und Stoffwechselwege gehören dem zentralen Kohlenstoffmetabolismus an, der Basis für das Wachstum und die Vermehrung eines Organismus. Zum besseren Verständnis von den in *C. albicans* ablaufenden Stoffwechselfunktionen wäre es lohnenswert die Erforschung dieser Stoffwechselwege voranzutreiben. Die phylogenetische und phänotypische Charakterisierung der Acyl-CoA-Thiolasen von *C. albicans* hat gezeigt, dass *in silico*

und *in vitro*-Methoden sich erfolgreich ergänzen und neue Einsichten in die individuelle Funktion einzelner Mitglieder von Genfamilien erlauben (Otzen *et al.*, 2013). Eine solche Kombination von Methoden bietet sich daher auch zur Erforschung der Regulation und den Funktionen der ALD-Genfamilien an.

Die am Rande unserer Forschung entdeckte putative Methyltransferase *CaTMT1* ist wahrscheinlich essentieller Bestandteil eines für *C. albicans* bisher unbeschriebenen Regulationsmechanismus der Hyphenbildung bei Aminosäuremangel (Cai *et al.*, 2001; Katz *et al.*, 2004). Daher wäre es interessant etwaige Verbindungen zur Zellantwort auf Aminosäuremangel zu untersuchen. Methoden zur Untersuchung dieses Aspektes finden sich in der Literatur (Tripathi *et al.*, 2002; Wimalasena *et al.*, 2008). Würde man diese Methoden durch einen *CaTMT1*-Fluoreszenz-Reporterstamm ergänzen, ließen sich die Induktionsbedingungen des *CaTMT1*-Gens *in vitro* studieren und die Rolle dieses Gens für zelluläre Prozesse in *C. albicans* genauer charakterisieren.

Bibliographie

- Abbott, D. A., Knijnenburg, T. A., de Poorter, L. M., Reinders, M. J., Pronk, J. T., & van Maris, A. J. (2007). Generic and specific transcriptional responses to different weak organic acids in anaerobic chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res*, 7(6), 819-833.
- Agvald-Ohman, C., Klingspor, L., Hjelmqvist, H., & Edlund, C. (2008). Invasive candidiasis in long-term patients at a multidisciplinary intensive care unit: Candida colonization index, risk factors, treatment and outcome. *Scand J Infect Dis*, 40(2), 145-153.
- Alby, K., Schaefer, D., & Bennett, R. J. (2009). Homothallic and heterothallic mating in the opportunistic pathogen *Candida albicans*. *Nature*, 460(7257), 890-893.
- Alexander, B. D., Johnson, M. D., Pfeiffer, C. D., Jimenez-Ortigosa, C., Catania, J., Booker, R., Pfaller, M. A. (2013). Increasing echinocandin resistance in *Candida glabrata*: clinical failure correlates with presence of FKS mutations and elevated minimum inhibitory concentrations. *Clin Infect Dis*, 56(12), 1724-1732.
- Aliaga, S., Clark, R. H., Laughon, M., Walsh, T. J., Hope, W. W., Benjamin, D. K., Smith, P. B. (2014). Changes in the incidence of candidiasis in neonatal intensive care units. *Pediatrics*, 133(2), 236-242.
- Ampel, N. M. (1996). Emerging disease issues and fungal pathogens associated with HIV infection. *Emerg Infect Dis*, 2(2), 109-116.
- Ansell, R., Granath, K., Hohmann, S., Thevelein, J. M., & Adler, L. (1997). The two isoenzymes for yeast NAD⁺-dependent glycerol 3-phosphate dehydrogenase encoded by GPD1 and GPD2 have distinct roles in osmoadaptation and redox regulation. *EMBO J*, 16(9), 2179-2187.
- Arikawa, Y., Enomoto, K., Muratsubaki, H., & Okazaki, M. (1998). Soluble fumarate reductase isoenzymes from *Saccharomyces cerevisiae* are required for anaerobic growth. *FEMS Microbiol Lett*, 165(1), 111-116.
- Askew, C., Sellam, A., Epp, E., Hogues, H., Mullick, A., Nantel, A., & Whiteway, M. (2009). Transcriptional regulation of carbohydrate metabolism in the human pathogen *Candida albicans*. *PLoS Pathog*, 5(10), e1000612.

- Baillie, G. S., & Douglas, L. J. (1999). Role of dimorphism in the development of *Candida albicans* biofilms. *J Med Microbiol*, 48(7), 671-679.
- Barelle, C. J., Priest, C. L., Maccallum, D. M., Gow, N. A., Odds, F. C., & Brown, A. J. (2006). Niche-specific regulation of central metabolic pathways in a fungal pathogen. *Cell Microbiol*, 8(6), 961-971.
- Bendel, C. M., Hess, D. J., Garni, R. M., Henry-Stanley, M., & Wells, C. L. (2003). Comparative virulence of *Candida albicans* yeast and filamentous forms in orally and intravenously inoculated mice. *Crit Care Med*, 31(2), 501-507.
- Bennett, R. J., & Johnson, A. D. (2003). Completion of a parasexual cycle in *Candida albicans* by induced chromosome loss in tetraploid strains. *EMBO J*, 22(10), 2505-2515.
- Berg, J. M., Tymoczko, J. L., Stryer, L., Häcker, B., & Held, A. (2007). *Biochemie*: Spektrum Akademischer Verlag.
- Berman, J., & Sudbery, P. E. (2002). *Candida albicans*: a molecular revolution built on lessons from budding yeast. *Nat Rev Genet*, 3(12), 918-930.
- Bille, J., Marchetti, O., & Calandra, T. (2005). Changing face of health-care associated fungal infections. *Curr Opin Infect Dis*, 18(4), 314-319.
- Bockmuhl, D. P., & Ernst, J. F. (2001). A potential phosphorylation site for an A-type kinase in the Efg1 regulator protein contributes to hyphal morphogenesis of *Candida albicans*. *Genetics*, 157(4), 1523-1530.
- Braun, B. R., & Johnson, A. D. (2000). TUP1, CPH1 and EFG1 make independent contributions to filamentation in *Candida albicans*. *Genetics*, 155(1), 57-67.
- Braun, B. R., van Het Hoog, M., d'Enfert, C., Martchenko, M., Dungan, J., Kuo, A., . . . Nantel, A. (2005). A human-curated annotation of the *Candida albicans* genome. *PLoS Genet*, 1(1), 36-57.
- Brock, M. (2009). Fungal metabolism in host niches. *Curr Opin Microbiol*, 12(4), 371-376.
- Brock, M. (2012). Application of bioluminescence imaging for in vivo monitoring of fungal infections. *Int J Microbiol*, 2012, 956794.
- Brock, M., & Buckel, W. (2004). On the mechanism of action of the antifungal agent propionate. *Eur J Biochem*, 271(15), 3227-3241.

- Brock, M., Darley, D., Textor, S., & Buckel, W. (2001). 2-Methylisocitrate lyases from the bacterium *Escherichia coli* and the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*: characterization and comparison of both enzymes. *Eur J Biochem*, 268(12), 3577-3586.
- Brock, M., Fischer, R., Linder, D., & Buckel, W. (2000). Methylcitrate synthase from *Aspergillus nidulans*: implications for propionate as an antifungal agent. *Mol Microbiol*, 35(5), 961-973.
- Brown, A. J. P. (2006). Integration of Metabolism with Virulence in *Candida albicans*. *The Mycota*, 13, 185-203.
- Brown, V., Sabina, J., & Johnston, M. (2009). Specialized sugar sensing in diverse fungi. *Curr Biol*, 19(5), 436-441.
- Brown, V., Sexton, J. A., & Johnston, M. (2006). A glucose sensor in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell*, 5(10), 1726-1737.
- Butler, G., Rasmussen, M. D., Lin, M. F., Santos, M. A., Sakthikumar, S., Munro, C. A., Cuomo, C. A. (2009). Evolution of pathogenicity and sexual reproduction in eight *Candida* genomes. *Nature*, 459(7247), 657-662.
- Cai, H., Dumlao, D., Katz, J. E., & Clarke, S. (2001). Identification of the gene and characterization of the activity of the trans-aconitate methyltransferase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry*, 40(45), 13699-13709.
- Carlson, M. (1999). Glucose repression in yeast. *Curr Opin Microbiol*, 2(2), 202-207.
- Carman, A. J., Vylkova, S., & Lorenz, M. C. (2008). Role of acetyl coenzyme A synthesis and breakdown in alternative carbon source utilization in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell*, 7(10), 1733-1741.
- Casal, M., Cardoso, H., & Leao, C. (1996). Mechanisms regulating the transport of acetic acid in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology*, 142 (Pt 6), 1385-1390.
- Cassio, F., Leao, C., & van Uden, N. (1987). Transport of lactate and other short-chain monocarboxylates in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol*, 53(3), 509-513.
- Chabrier-Rosello, Y., Foster, T. H., Mitra, S., & Haidaris, C. G. (2008). Respiratory deficiency enhances the sensitivity of the pathogenic fungus *Candida* to photodynamic treatment. *Photochem Photobiol*, 84(5), 1141-1148.

- Chamilos, G., Lionakis, M. S., Lewis, R. E., Lopez-Ribot, J. L., Saville, S. P., Albert, N. D., Kontoyiannis, D. P. (2006). *Drosophila melanogaster* as a facile model for large-scale studies of virulence mechanisms and antifungal drug efficacy in *Candida* species. *J Infect Dis*, *193*(7), 1014-1022.
- Chandra, J., Kuhn, D. M., Mukherjee, P. K., Hoyer, L. L., McCormick, T., & Ghannoum, M. A. (2001). Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. *J Bacteriol*, *183*(18), 5385-5394.
- Cheema-Dhadli, S., Leznoff, C. C., & Halperin, M. L. (1975). Effect of 2-methylcitrate on citrate metabolism: implications for the management of patients with propionic acidemia and methylmalonic aciduria. *Pediatr Res*, *9*(12), 905-908.
- Chen, H., & Fink, G. R. (2006). Feedback control of morphogenesis in fungi by aromatic alcohols. *Genes Dev*, *20*(9), 1150-1161.
- Chen, H., Fujita, M., Feng, Q., Clardy, J., & Fink, G. R. (2004). Tyrosol is a quorum-sensing molecule in *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *101*(14), 5048-5052.
- Cheng, G.; Yeater, K.M., Hoyer, L.L., (2006) Cellular and molecular biology of *Candida albicans* estrogen response. *Eukaryotic Cell* *5*, 180-191
- Chibana, H., Oka, N., Nakayama, H., Aoyama, T., Magee, B. B., Magee, P. T., & Mikami, Y. (2005). Sequence finishing and gene mapping for *Candida albicans* chromosome 7 and syntenic analysis against the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Genetics*, *170*(4), 1525-1537.
- Classen, H. G. E., P. S.; Hammes, W. P.; Winter, M. (2001). Toxikologisch-hygienische Beurteilung von Lebensmittelinhaltsstoffen und Zusatzstoffen. *Behr's Verlag*.
- Crabtree, H. G. (1929). Observations on the carbohydrate metabolism of tumours. *Biochem J*, *23*(3), 536-545.
- Criddle, R. S., & Schatz, G. (1969). Promitochondria of anaerobically grown yeast. I. Isolation and biochemical properties. *Biochemistry*, *8*(1), 322-334.
- Cypionka, H. (2010). *Allgemeine Mikrobiologie* (4 ed.): Springer.

- d'Enfert, C., Goyard, S., Rodriguez-Arnaveille, S., Frangeul, L., Jones, L., Tekaia, F., Brown, A. J. (2005). CandidaDB: a genome database for *Candida albicans* pathogenomics. *Nucleic Acids Res*, 33(Database issue), D353-357.
- De Deken, R. H. (1966). The Crabtree effect: a regulatory system in yeast. *J Gen Microbiol*, 44(2), 149-156.
- Delaloye, J., & Calandra, T. (2014). Invasive candidiasis as a cause of sepsis in the critically ill patient. *Virulence*, 5(1), 161-169.
- DeVit, M. J., & Johnston, M. (1999). The nuclear exportin Msn5 is required for nuclear export of the Mig1 glucose repressor of *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Biol*, 9(21), 1231-1241.
- Dickinson, J. R. (2000). Pathways of leucine and valine catabolism in yeast. *Methods Enzymol*, 324, 80-92.
- Dickinson, J. R., Lanterman, M. M., Danner, D. J., Pearson, B. M., Sanz, P., Harrison, S. J., & Hewlins, M. J. (1997). A ¹³C nuclear magnetic resonance investigation of the metabolism of leucine to isoamyl alcohol in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, 272(43), 26871-26878.
- Doedt, T., Krishnamurthy, S., Bockmuhl, D. P., Tebarth, B., Stempel, C., Russell, C. L., Ernst, J. F. (2004). APSES proteins regulate morphogenesis and metabolism in *Candida albicans*. *Mol Biol Cell*, 15(7), 3167-3180.
- Dumitru, R., Hornby, J. M., & Nickerson, K. W. (2004). Defined anaerobic growth medium for studying *Candida albicans* basic biology and resistance to eight antifungal drugs. *Antimicrob Agents Chemother*, 48(7), 2350-2354.
- Enomoto, K., Arikawa, Y., & Muratsubaki, H. (2002). Physiological role of soluble fumarate reductase in redox balancing during anaerobiosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Lett*, 215(1), 103-108.
- Ensign, SA. (2006): *Revisiting the glyoxylate cycle: alternate pathways for microbial acetate assimilation*. In: *Mol Microbiol*. 61(2); 274–276
- Fleck, C. B., & Brock, M. (2009). Re-characterisation of *Saccharomyces cerevisiae* Ach1p: fungal CoA-transferases are involved in acetic acid detoxification. *Fungal Genet Biol*, 46(6-7), 473-485.

- Fleck, C. B., Schobel, F., & Brock, M. (2011). Nutrient acquisition by pathogenic fungi: nutrient availability, pathway regulation, and differences in substrate utilization. *Int J Med Microbiol*, 301(5), 400-407.
- Forst, T. G., & Prillinger, H. (1988) Vergleichende karyologische Untersuchungen an dimorphen Zygomyceten. *Zeitschrift Für Mykologie* 54(2), 139-152
- Fradin, C., De Groot, P., MacCallum, D., Schaller, M., Klis, F., Odds, F. C., & Hube, B. (2005). Granulocytes govern the transcriptional response, morphology and proliferation of *Candida albicans* in human blood. *Mol Microbiol*, 56(2), 397-415.
- Fradin, C., Kretschmar, M., Nichterlein, T., Gaillardin, C., d'Enfert, C., & Hube, B. (2003). Stage-specific gene expression of *Candida albicans* in human blood. *Mol Microbiol*, 47(6), 1523-1543.
- Georg Fuchs, H.-G. S. (2006). *Allgemeine Mikrobiologie* (8 ed.).
- Gerd P. Püschel, H. K., Thomas Kietzmann, Wolfgang Höhne. (2011). *Taschenlehrbuch Biochemie*: Georg Thieme Verlag.
- Gerike, U., Hough, D. W., Russell, N. J., Dyall-Smith, M. L., & Danson, M. J. (1998). Citrate synthase and 2-methylcitrate synthase: structural, functional and evolutionary relationships. *Microbiology*, 144 (Pt 4), 929-935.
- Goffeau, A., Barrell, B. G., Bussey, H., Davis, R. W., Dujon, B., Feldmann, H., Oliver, S. G. (1996). Life with 6000 genes. *Science*, 274(5287), 546, 563-547.
- Griffin, J. E., Pandey, A. K., Gilmore, S. A., Mizrahi, V., McKinney, J. D., Bertozzi, C. R., & Sasseti, C. M. (2012). Cholesterol catabolism by *Mycobacterium tuberculosis* requires transcriptional and metabolic adaptations. *Chem Biol*, 19(2), 218-227.
- Grimm, C., Evers, A., Brock, M., Maerker, C., Klebe, G., Buckel, W., & Reuter, K. (2003). Crystal structure of 2-methylisocitrate lyase (PrpB) from *Escherichia coli* and modelling of its ligand bound active centre. *J Mol Biol*, 328(3), 609-621.
- Gujjar, P. R., Finucane, M., & Larsen, B. (1997). The effect of estradiol on *Candida albicans* growth. *Ann Clin Lab Sci*, 27(2), 151-156.
- Haber, J. E. (2012). Mating-type genes and MAT switching in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 191(1), 33-64.

- Han, T. L., Cannon, R. D., & Villas-Boas, S. G. (2011). The metabolic basis of *Candida albicans* morphogenesis and quorum sensing. *Fungal Genet Biol*, 48(8), 747-763.
- Halarnkar, PP, and Blomquist, GJ. (1989) Comparative aspects of propionate metabolism. *Comp. Biochem. Physiol. B* 92, 227–231
- Harris, R. A., Joshi, M., Jeoung, N. H., & Obayashi, M. (2005). Overview of the molecular and biochemical basis of branched-chain amino acid catabolism. *J Nutr*, 135(6 Suppl), 1527S-1530S.
- Hasegawa, J, Ogura, M, Kanema, H, Kawaharada, H, & Watanabe, K.(1982) Production of 3-hydroxypropionic acid from propionic acid by a *Candida rugosa* mutant unable to assimilate propionic acid. *J. Ferment. Technol.* 60, 591–594
- Hazelwood, L. A., Daran, J. M., van Maris, A. J., Pronk, J. T., & Dickinson, J. R. (2008). The Ehrlich pathway for fusel alcohol production: a century of research on *Saccharomyces cerevisiae* metabolism. *Appl Environ Microbiol*, 74(8), 2259-2266.
- Hazen, K. C., & Cutler, J. E. (1979). Autoregulation of germ tube formation by *Candida albicans*. *Infect Immun*, 24(3), 661-666.
- Hedges, D., Proft, M., & Entian, K. D. (1995). CAT8, a new zinc cluster-encoding gene necessary for derepression of gluconeogenic enzymes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, 15(4), 1915-1922.
- Hernday, A. D., Noble, S. M., Mitrovich, Q. M., & Johnson, A. D. (2010). Genetics and molecular biology in *Candida albicans*. *Methods Enzymol*, 470, 737-758.
- Hill, D. E., Boulay, R., & Rogers, D. (1988). Complete nucleotide sequence of the peroxisomal acyl CoA oxidase from the alkane-utilizing yeast *Candida maltosa*. *Nucleic Acids Res*, 16(1), 365-366.
- Hiltunen, JK, Mursula, AM, Rottensteiner, H, Wierenga, RK, Kastaniotis, AJ, Gurvitz, A (2003) The biochemistry of peroxisomal beta-oxidation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev.* 27(1):35-64
- Hogan, D. A. (2006a). Quorum sensing: alcohols in a social situation. *Curr Biol*, 16(12), R457-458.
- Hogan, D. A. (2006b). Talking to themselves: autoregulation and quorum sensing in fungi. *Eukaryot Cell*, 5(4), 613-619.

- Horn, F. (2012). *Biochemie des Menschen: Das Lehrbuch für das Medizinstudium*: Georg Thieme Verlag.
- Hornby, J. M., Jensen, E. C., Lisec, A. D., Tasto, J. J., Jahnke, B., Shoemaker, R., Nickerson, K. W. (2001). Quorum sensing in the dimorphic fungus *Candida albicans* is mediated by farnesol. *Appl Environ Microbiol*, 67(7), 2982-2992.
- Hsia, Y. E., Scully, K. J., & Rosenberg, L. E. (1971). Inherited propionyl-Coa carboxylase deficiency in "ketotic hyperglycinemia". *J Clin Invest*, 50(1), 127-130.
- Hull, C. M., & Johnson, A. D. (1999). Identification of a mating type-like locus in the asexual pathogenic yeast *Candida albicans*. *Science*, 285(5431), 1271-1275.
- Hynes, M. J., & Murray, S. L. (2010). ATP-citrate lyase is required for production of cytosolic acetyl coenzyme A and development in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot Cell*, 9(7), 1039-1048.
- Hynes, M. J., Murray, S. L., Duncan, A., Khew, G. S., & Davis, M. A. (2006). Regulatory genes controlling fatty acid catabolism and peroxisomal functions in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot Cell*, 5(5), 794-805.
- Ibrahim-Granet, O., Dubourdeau, M., Latge, J. P., Ave, P., Huerre, M., Brakhage, A. A., & Brock, M. (2008). Methylcitrate synthase from *Aspergillus fumigatus* is essential for manifestation of invasive aspergillosis. *Cell Microbiol*, 10(1), 134-148.
- Jia, Y. K., Becam, A. M., & Herbert, C. J. (1997). The CIT3 gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a second mitochondrial isoform of citrate synthase. *Mol Microbiol*, 24(1), 53-59.
- Jones, T., Federspiel, N. A., Chibana, H., Dungan, J., Kalman, S., Magee, B. B., Scherer, S. (2004). The diploid genome sequence of *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(19), 7329-7334.
- Katz, J. E., Dumlao, D. S., Wasserman, J. I., Lansdown, M. G., Jung, M. E., Faull, K. F., & Clarke, S. (2004). 3-Isopropylmalate is the major endogenous substrate of the *Saccharomyces cerevisiae* trans-aconitate methyltransferase. *Biochemistry*, 43(20), 5976-5986.
- Königshoff, M., Brandenburger, T. (2012) Kurzlehrbuch Biochemie. *Georg Thieme Verlag* S. 60 ff

- Kornberg, H. L., & Krebs, H. A. (1957). Synthesis of cell constituents from C2-units by a modified tricarboxylic acid cycle. *Nature*, 179(4568), 988-991.
- Korting, H. C., Hube, B., Oberbauer, S., Januschke, E., Hamm, G., Albrecht, A., Schaller, M. (2003). Reduced expression of the hyphal-independent *Candida albicans* proteinase genes SAP1 and SAP3 in the *efg1Δ* mutant is associated with attenuated virulence during infection of oral epithelium. *J Med Microbiol*, 52(Pt 8), 623-632.
- Kullberg, B. J., & Oude Lashof, A. M. (2002). Epidemiology of opportunistic invasive mycoses. *Eur J Med Res*, 7(5), 183-191.
- Kusch, H., Engelmann, S., Bode, R., Albrecht, D., Morschhauser, J., & Hecker, M. (2008). A proteomic view of *Candida albicans* yeast cell metabolism in exponential and stationary growth phases. *Int J Med Microbiol*, 298(3-4), 291-318.
- Kutzman, C. P. (2011) The Yeasts: a taxonomic study. 5. Auflage. Elsevier, Amsterdam
- Kvaal, C., Lachke, S. A., Srikantha, T., Daniels, K., McCoy, J., & Soll, D. R. (1999). Misexpression of the opaque-phase-specific gene PEP1 (SAP1) in the white phase of *Candida albicans* confers increased virulence in a mouse model of cutaneous infection. *Infect Immun*, 67(12), 6652-6662.
- Kvaal, C. A., Srikantha, T., & Soll, D. R. (1997). Misexpression of the white-phase-specific gene WH11 in the opaque phase of *Candida albicans* affects switching and virulence. *Infect Immun*, 65(11), 4468-4475.
- Lachke, S. A., Lockhart, S. R., Daniels, K. J., & Soll, D. R. (2003). Skin facilitates *Candida albicans* mating. *Infect Immun*, 71(9), 4970-4976.
- Lan, C. Y., Newport, G., Murillo, L. A., Jones, T., Scherer, S., Davis, R. W., & Agabian, N. (2002). Metabolic specialization associated with phenotypic switching in *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(23), 14907-14912.
- Ledley, F. D., Crane, A. M., Klish, K. T., & May, G. S. (1991). Is there methylmalonyl CoA mutase in *Aspergillus nidulans*? *Biochem Biophys Res Commun*, 177(3), 1076-1081.
- Lee, SH, Park, SJ, Park, OJ, Cho, J, & Rhee, JW (2009) Production of 3-hydroxy-

- propionic acid from acrylic acid by newly isolated *Rhodococcus erythropolis* LG12. *J. Microbiol. Biotechnol.* 19, 474–481
- Leng, P., Lee, P. R., Wu, H., & Brown, A. J. (2001). Efg1, a morphogenetic regulator in *Candida albicans*, is a sequence-specific DNA binding protein. *J Bacteriol*, 183(13), 4090-4093.
- Lin, C. H., Kabrawala, S., Fox, E. P., Nobile, C. J., Johnson, A. D., & Bennett, R. J. (2013). Genetic control of conventional and pheromone-stimulated biofilm formation in *Candida albicans*. *PLoS Pathog*, 9(4), e1003305.
- Liu, H., Kohler, J., & Fink, G. R. (1994). Suppression of hyphal formation in *Candida albicans* by mutation of a STE12 homolog. *Science*, 266(5191), 1723-1726.
- Lo, H. J., Kohler, J. R., DiDomenico, B., Loebenberg, D., Cacciapuoti, A., & Fink, G. R. (1997). Nonfilamentous *C. albicans* mutants are avirulent. *Cell*, 90(5), 939-949.
- Lohse, M. B., & Johnson, A. D. (2009). White-opaque switching in *Candida albicans*. *Curr Opin Microbiol*, 12(6), 650-654.
- Lorenz, M. C., Bender, J. A., & Fink, G. R. (2004). Transcriptional response of *Candida albicans* upon internalization by macrophages. *Eukaryot Cell*, 3(5), 1076-1087.
- Lorenz, M. C., & Fink, G. R. (2001). The glyoxylate cycle is required for fungal virulence. *Nature*, 412(6842), 83-86.
- Lorenz, M. C., & Fink, G. R. (2002). Life and death in a macrophage: role of the glyoxylate cycle in virulence. *Eukaryot Cell*, 1(5), 657-662.
- Lu, H. P., Xun, L., & Xie, X. S. (1998). Single-molecule enzymatic dynamics. *Science*, 282(5395), 1877-1882.
- Lucas, K. A., Filley, J. R., Erb, J. M., Graybill, E. R., & Hawes, J. W. (2007). Peroxisomal metabolism of propionic acid and isobutyric acid in plants. *J Biol Chem*, 282(34), 24980-24989.
- Luttik, M. A., Kotter, P., Salomons, F. A., van der Klei, I. J., van Dijken, J. P., & Pronk, J. T. (2000). The *Saccharomyces cerevisiae* ICL2 gene encodes a mitochondrial 2-methylisocitrate lyase involved in propionyl-coenzyme A metabolism. *J Bacteriol*, 182(24), 7007-7013.

- Maerker, C., Rohde, M., Brakhage, A. A., & Brock, M. (2005). Methylcitrate synthase from *Aspergillus fumigatus*. Propionyl-CoA affects polyketide synthesis, growth and morphology of conidia. *FEBS J*, 272(14), 3615-3630.
- Maglott, D., Ostell, J., Pruitt, K. D., & Tatusova, T. (2007). Entrez Gene: gene-centered information at NCBI. *Nucleic Acids Res*, 35(Database issue), D26-31.
- Manning, M., & Mitchell, T. G. (1980). Strain variation and morphogenesis of yeast- and mycelial-phase *Candida albicans* in low-sulfate, synthetic medium. *J Bacteriol*, 142(2), 714-719.
- Martchenko, M., Levitin, A., Hogues, H., Nantel, A., & Whiteway, M. (2007). Transcriptional rewiring of fungal galactose-metabolism circuitry. *Curr Biol*, 17(12), 1007-1013.
- Masuda, Y., Park, S. M., Ohta, A., & Takagi, M. (1995). Cloning and characterization of the POX2 gene in *Candida maltosa*. *Gene*, 167(1-2), 157-161.
- Mathe, L., & Van Dijck, P. (2013). Recent insights into *Candida albicans* biofilm resistance mechanisms. *Curr Genet*, 59(4), 251-264.
- Mayer, F. L., Wilson, D., & Hube, B. (2013). *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence*, 4(2), 119-128.
- Merson-Davies, L. A., & Odds, F. C. (1989). A morphology index for characterization of cell shape in *Candida albicans*. *J Gen Microbiol*, 135(11), 3143-3152.
- Mira, N. P., Teixeira, M. C., & Sa-Correia, I. (2010). Adaptive response and tolerance to weak acids in *Saccharomyces cerevisiae*: a genome-wide view. *OMICS*, 14(5), 525-540.
- Mitchell, A. P. (1998). Dimorphism and virulence in *Candida albicans*. *Curr Opin Microbiol*, 1(6), 687-692.
- Monticello DJ, & Costilow RN (1982) Interconversion of valine and leucine by *Clostridium sporogenes*. *J Bacteriol*. 152(2), 946-9
- Morath, M. A., Okun, J. G., Muller, I. B., Sauer, S. W., Horster, F., Hoffmann, G. F., & Kolker, S. (2008). Neurodegeneration and chronic renal failure in methylmalonic aciduria--a pathophysiological approach. *J Inherit Metab Dis*, 31(1), 35-43.

- Morschhauser, J. (2010). Regulation of white-opaque switching in *Candida albicans*. *Med Microbiol Immunol*, 199(3), 165-172.
- Murad, A. M., d'Enfert, C., Gaillardin, C., Tournu, H., Tekaia, F., Talibi, D., Brown, A. J. (2001). Transcript profiling in *Candida albicans* reveals new cellular functions for the transcriptional repressors CaTup1, CaMig1 and CaNrg1. *Mol Microbiol*, 42(4), 981-993.
- Murad, A. M., Leng, P., Straffon, M., Wishart, J., Macaskill, S., MacCallum, D., Brown, A. J. (2001). NRG1 represses yeast-hypha morphogenesis and hypha-specific gene expression in *Candida albicans*. *EMBO J*, 20(17), 4742-4752.
- Muratsubaki, H., & Enomoto, K. (1998). One of the fumarate reductase isoenzymes from *Saccharomyces cerevisiae* is encoded by the OSM1 gene. *Arch Biochem Biophys*, 352(2), 175-181.
- Murray, W. W., & Rachubinski, R. A. (1987). The primary structure of a peroxisomal fatty acyl-CoA oxidase from the yeast *Candida tropicalis* pK233. *Gene*, 51(2-3), 119-128.
- Muskett, H., Shahin, J., Eyres, G., Harvey, S., Rowan, K., & Harrison, D. (2011). Risk factors for invasive fungal disease in critically ill adult patients: a systematic review. *Crit Care*, 15(6), R287.
- Miyakoshi, S, Uchiyama, H, Someya, T, Satoh, T, & Tabuchi, T (1987) Distribution of the methylcitric acid cycle and α -oxidation pathway for propionate catabolism in fungi. *Agric. Biol. Chem.* 51, 2381–2387
- Naglik, J., Albrecht, A., Bader, O., & Hube, B. (2004). *Candida albicans* proteinases and host/pathogen interactions. *Cell Microbiol*, 6(10), 915-926.
- Naglik, J. R., Challacombe, S. J., & Hube, B. (2003). *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. *Microbiol Mol Biol Rev*, 67(3), 400-428, table of contents.
- Nickerson, K. W., Atkin, A. L., & Hornby, J. M. (2006). Quorum sensing in dimorphic fungi: farnesol and beyond. *Appl Environ Microbiol*, 72(6), 3805-3813.
- Niimi, M., Kamiyama, A., & Tokunaga, M. (1988). Respiration of medically important *Candida* species and *Saccharomyces cerevisiae* in relation to glucose effect. *J Med Vet Mycol*, 26(3), 195-198.

- Niimi, M., Niimi, K., Tokunaga, J., & Nakayama, H. (1980). Changes in cyclic nucleotide levels and dimorphic transition in *Candida albicans*. *J Bacteriol*, *142*(3), 1010-1014.
- Odds, F. C. (1985). Morphogenesis in *Candida albicans*. *Crit Rev Microbiol*, *12*(1), 45-93.
- Odds, F. C. (1994). *Candida albicans*, the life and times of a pathogenic yeast. *J Med Vet Mycol*, *32 Suppl 1*, 1-8.
- Okazaki, K., Takechi, T., Kambara, N., Fukui, S., Kubota, I., & Kamiryo, T. (1986). Two acyl-coenzyme A oxidases in peroxisomes of the yeast *Candida tropicalis*: primary structures deduced from genomic DNA sequence. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *83*(5), 1232-1236.
- Okazaki, K., Tan, H., Fukui, S., Kubota, I., & Kamiryo, T. (1987). Peroxisomal acyl-coenzyme A oxidase multigene family of the yeast *Candida tropicalis*; nucleotide sequence of a third gene and its protein product. *Gene*, *58*(1), 37-44.
- Ostergaard, S., Olsson, L., & Nielsen, J. (2000). Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev*, *64*(1), 34-50.
- Otzen, C., Bardl, B., Jacobsen, I. D., Nett, M., & Brock, M. (2014). *Candida albicans* utilises a modified beta-oxidation pathway for the degradation of toxic propionyl-CoA. *J Biol Chem*.
- Otzen, C., Muller, S., Jacobsen, I. D., & Brock, M. (2013). Phylogenetic and phenotypic characterisation of the 3-ketoacyl-CoA thiolase gene family from the opportunistic human pathogenic fungus *Candida albicans*. *FEMS Yeast Res*, *13*(6), 553-564.
- Paiva, S., Devaux, F., Barbosa, S., Jacq, C., & Casal, M. (2004). Ady2p is essential for the acetate permease activity in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, *21*(3), 201-210.
- Palige, K., Linde, J., Martin, R., Bottcher, B., Citiulo, F., Sullivan, D. J., Staib, P. (2013). Global transcriptome sequencing identifies chlamyospore specific markers in *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*. *PLoS One*, *8*(4), e61940.

- Pallotta, M. L., Fratianni, A., & Passarella, S. (1999). Metabolite transport in isolated yeast mitochondria: fumarate/malate and succinate/malate antiports. *FEBS Lett*, 462(3), 313-316.
- Pande, K., Chen, C., & Noble, S. M. (2013). Passage through the mammalian gut triggers a phenotypic switch that promotes *Candida albicans* commensalism. *Nat Genet*, 45(9), 1088-1091.
- Petter, R., Chang, Y. C., & Kwon-Chung, K. J. (1997). A gene homologous to *Saccharomyces cerevisiae* SNF1 appears to be essential for the viability of *Candida albicans*. *Infect Immun*, 65(12), 4909-4917.
- Perpète, P., Duthoit, O, De Maeyer, S, Imray, L, Lawton, AI, Stavropoulos, KE, Gitonga, VW, Hewlins, MJE, & Dickinson, JR (2006) Methionine catabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res*, 6(1), 48-56
- Pfaller, M. A., & Diekema, D. J. (2004). Rare and emerging opportunistic fungal pathogens: concern for resistance beyond *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. *J Clin Microbiol*, 42(10), 4419-4431.
- Piekarska, K., Hardy, G., Mol, E., van den Burg, J., Strijbis, K., van Roermund, C., Distel, B. (2008). The activity of the glyoxylate cycle in peroxisomes of *Candida albicans* depends on a functional beta-oxidation pathway: evidence for reduced metabolite transport across the peroxisomal membrane. *Microbiology*, 154(Pt 10), 3061-3072.
- Piekarska, K., Mol, E., van den Berg, M., Hardy, G., van den Burg, J., van Roermund, C., Distel, B. (2006). Peroxisomal fatty acid beta-oxidation is not essential for virulence of *Candida albicans*. *Eukaryot Cell*, 5(11), 1847-1856.
- Pierce, J. V., Dignard, D., Whiteway, M., & Kumamoto, C. A. (2013). Normal adaptation of *Candida albicans* to the murine gastrointestinal tract requires Efg1p-dependent regulation of metabolic and host defense genes. *Eukaryot Cell*, 12(1), 37-49.
- Piper, P., Calderon, C. O., Hatzixanthis, K., & Mollapour, M. (2001). Weak acid adaptation: the stress response that confers yeasts with resistance to organic acid food preservatives. *Microbiology*, 147(Pt 10), 2635-2642.

- Postma, E., Verduyn, C., Scheffers, W. A., & Van Dijken, J. P. (1989). Enzymic analysis of the crabtree effect in glucose-limited chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol*, 55(2), 468-477.
- Pronk, J. T., Yde Steensma, H., & Van Dijken, J. P. (1996). Pyruvate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 12(16), 1607-1633.
- Ramage, G., Vandewalle, K., Wickes, B. L., & Lopez-Ribot, J. L. (2001). Characteristics of biofilm formation by *Candida albicans*. *Rev Iberoam Micol*, 18(4), 163-170.
- Ramirez, M. A., & Lorenz, M. C. (2007). Mutations in alternative carbon utilization pathways in *Candida albicans* attenuate virulence and confer pleiotropic phenotypes. *Eukaryot Cell*, 6(2), 280-290.
- Ramirez, M. A., & Lorenz, M. C. (2009). The transcription factor homolog CTF1 regulates {beta}-oxidation in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell*, 8(10), 1604-1614.
- Remm, M, Storm, CE, Sonnhammer, EL (2001) Automatic clustering of orthologs and in-paralogs from pairwise species comparisons. *J Mol Biol*. 314(5), 1041-52
- Rodaki, A., Bohovych, I. M., Enjalbert, B., Young, T., Odds, F. C., Gow, N. A., & Brown, A. J. (2009). Glucose promotes stress resistance in the fungal pathogen *Candida albicans*. *Mol Biol Cell*, 20(22), 4845-4855.
- Rodriguez, J. M., Ruiz-Sala, P., Ugarte, M., & Penalva, M. A. (2004). Fungal metabolic model for 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency. *J Biol Chem*, 279(6), 4578-4587.
- Rooney, P. J., & Klein, B. S. (2002). Linking fungal morphogenesis with virulence. *Cell Microbiol*, 4(3), 127-137.
- Rozpedowska, E., Galafassi, S., Johansson, L., Hagman, A., Piskur, J., & Compagno, C. (2011). *Candida albicans*--a pre-whole genome duplication yeast--is predominantly aerobic and a poor ethanol producer. *FEMS Yeast Res*, 11(3), 285-291.
- Ruijter, G. J., & Visser, J. (1997). Carbon repression in Aspergilli. *FEMS Microbiol Lett*, 151(2), 103-114.
- Sabina, J., & Brown, V. (2009). Glucose sensing network in *Candida albicans*: a sweet spot for fungal morphogenesis. *Eukaryot Cell*, 8(9), 1314-1320.

- Saint-Prix, F., Bonquist, L., & Dequin, S. (2004). Functional analysis of the ALD gene family of *Saccharomyces cerevisiae* during anaerobic growth on glucose: the NADP⁺-dependent Ald6p and Ald5p isoforms play a major role in acetate formation. *Microbiology*, 150(Pt 7), 2209-2220.
- Sandai, D., Yin, Z., Selway, L., Stead, D., Walker, J., Leach, M. D., Brown, A. J. (2012). The evolutionary rewiring of ubiquitination targets has reprogrammed the regulation of carbon assimilation in the pathogenic yeast *Candida albicans*. *MBio*, 3(6).
- Sardi, J. C., Scorzoni, L., Bernardi, T., Fusco-Almeida, A. M., & Mendes Giannini, M. J. (2013). *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. *J Med Microbiol*, 62(Pt 1), 10-24.
- Schaller, M., Borelli, C., Korting, H. C., & Hube, B. (2005). Hydrolytic enzymes as virulence factors of *Candida albicans*. *Mycoses*, 48(6), 365-377.
- Schuller, H. J. (2003). Transcriptional control of nonfermentative metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet*, 43(3), 139-160.
- Schwab, M. A., Sauer, S. W., Okun, J. G., Nijtmans, L. G., Rodenburg, R. J., van den Heuvel, L. P., Smeitink, J. A. (2006). Secondary mitochondrial dysfunction in propionic aciduria: a pathogenic role for endogenous mitochondrial toxins. *Biochem J*, 398(1), 107-112.
- Seetharam, B., & Alpers, D. H. (1982). Absorption and transport of cobalamin (vitamin B12). *Annu Rev Nutr*, 2, 343-369.
- Si, H., Hernday, A. D., Hirakawa, M. P., Johnson, A. D., & Bennett, R. J. (2013). *Candida albicans* white and opaque cells undergo distinct programs of filamentous growth. *PLoS Pathog*, 9(3), e1003210.
- Sinclair, D. A., Dawes, I. W., & Dickinson, J. R. (1993). Purification and characterization of the branched chain alpha-ketoacid dehydrogenase complex from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Mol Biol Int*, 31(5), 911-922.
- Singh, A., & Sherman, F. (1978). Deletions of the iso-1-cytochrome c and adjacent genes of yeast: discovery of the OSM1 gene controlling osmotic sensitivity. *Genetics*, 89(4), 653-665.

- Slutsky, B., Staebell, M., Anderson, J., Risen, L., Pfaller, M., & Soll, D. R. (1987). "White-opaque transition": a second high-frequency switching system in *Candida albicans*. *J Bacteriol*, *169*(1), 189-197.
- Sohn, K., Urban, C., Brunner, H., & Rupp, S. (2003). EFG1 is a major regulator of cell wall dynamics in *Candida albicans* as revealed by DNA microarrays. *Mol Microbiol*, *47*(1), 89-102.
- Staib, P., & Morschhauser, J. (2007). Chlamyospore formation in *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*--an enigmatic developmental programme. *Mycoses*, *50*(1), 1-12.
- Strijbis, K., & Distel, B. (2010). Intracellular acetyl unit transport in fungal carbon metabolism. *Eukaryot Cell*, *9*(12), 1809-1815.
- Strijbis, K., van Roermund, C. W., Hardy, G. P., van den Burg, J., Bloem, K., de Haan, J., Distel, B. (2009). Identification and characterization of a complete carnitine biosynthesis pathway in *Candida albicans*. *FASEB J*, *23*(8), 2349-2359.
- Sudbery, P. E. (2001). The germ tubes of *Candida albicans* hyphae and pseudohyphae show different patterns of septin ring localization. *Mol Microbiol*, *41*(1), 19-31.
- Sudbery, P. E. (2011). Growth of *Candida albicans* hyphae. *Nat Rev Microbiol*, *9*(10), 737-748.
- Suh, S. O., Blackwell, M., Kurtzman, C. P., & Lachance, M. A. (2006). Phylogenetics of Saccharomycetales, the ascomycete yeasts. *Mycologia*, *98*(6), 1006-1017.
- Suhr, K. I., & Nielsen, P. V. (2004). Effect of weak acid preservatives on growth of bakery product spoilage fungi at different water activities and pH values. *Int J Food Microbiol*, *95*(1), 67-78.
- Tabuchi, T., Serizawa, N., Uchiyama, H. . (1974). A novel pathway for the partial oxidation of propionyl-CoA to pyruvate via seven-carbon tricarboxylic acids in yeast. *Agric Biol Chem*, *38*(12), 2571-2572.
- Taff, H. T., Mitchell, K. F., Edward, J. A., & Andes, D. R. (2013). Mechanisms of *Candida* biofilm drug resistance. *Future Microbiol*, *8*(10), 1325-1337.

- Textor, S., Wendisch, V. F., De Graaf, A. A., Muller, U., Linder, M. I., Linder, D., & Buckel, W. (1997). Propionate oxidation in *Escherichia coli*: evidence for operation of a methylcitrate cycle in bacteria. *Arch Microbiol*, *168*(5), 428-436.
- Tournu, H., Tripathi, G., Bertram, G., Macaskill, S., Mavor, A., Walker, L., Brown, A. J. (2005). Global role of the protein kinase Gcn2 in the human pathogen *Candida albicans*. *Eukaryot Cell*, *4*(10), 1687-1696.
- Tripathi, G., Wiltshire, C., Macaskill, S., Tournu, H., Budge, S., & Brown, A. J. (2002). Gcn4 co-ordinates morphogenetic and metabolic responses to amino acid starvation in *Candida albicans*. *EMBO J*, *21*(20), 5448-5456.
- Turcotte, B., Liang, X. B., Robert, F., & Soontorngun, N. (2010). Transcriptional regulation of nonfermentable carbon utilization in budding yeast. *FEMS Yeast Res*, *10*(1), 2-13.
- van den Berg, M. A., de Jong-Gubbels, P., Kortland, C. J., van Dijken, J. P., Pronk, J. T., & Steensma, H. Y. (1996). The two acetyl-coenzyme A synthetases of *Saccharomyces cerevisiae* differ with respect to kinetic properties and transcriptional regulation. *J Biol Chem*, *271*(46), 28953-28959.
- Veiga, A., Arrabaca, J. D., & Loureiro-Dias, M. C. (2003). Cyanide-resistant respiration, a very frequent metabolic pathway in yeasts. *FEMS Yeast Res*, *3*(3), 239-245.
- Verduyn, C., Postma, E., Scheffers, W. A., & van Dijken, J. P. (1990). Physiology of *Saccharomyces cerevisiae* in anaerobic glucose-limited chemostat cultures. *J Gen Microbiol*, *136*(3), 395-403.
- Wang, H. J., Le Dall, M. T., Wach, Y., Laroche, C., Belin, J. M., Gaillardin, C., & Nicaud, J. M. (1999). Evaluation of acyl coenzyme A oxidase (Aox) isozyme function in the n-alkane-assimilating yeast *Yarrowia lipolytica*. *J Bacteriol*, *181*(17), 5140-5148.
- Warth, A. D. (1988). Effect of benzoic Acid on growth yield of yeasts differing in their resistance to preservatives. *Appl Environ Microbiol*, *54*(8), 2091-2095.
- Weber, H. (1993) Allgemeine Mykologie. Gustav-Fischer-Verlag, Jena
- White, S., & Larsen, B. (1997). *Candida albicans* morphogenesis is influenced by estrogen. *Cell Mol Life Sci*, *53*(9), 744-749.

- Wimalasena, T. T., Enjalbert, B., Guillemette, T., Plumridge, A., Budge, S., Yin, Z., Archer, D. B. (2008). Impact of the unfolded protein response upon genome-wide expression patterns, and the role of Hac1 in the polarized growth, of *Candida albicans*. *Fungal Genet Biol*, 45(9), 1235-1247.
- Wisplinghoff, H., Bischoff, T., Tallent, S. M., Seifert, H., Wenzel, R. P., & Edmond, M. B. (2004). Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin Infect Dis*, 39(3), 309-317.
- Wisplinghoff, H., Ebbers, J., Geurtz, L., Stefanik, D., Major, Y., Edmond, M. B., Seifert, H. (2014). Nosocomial bloodstream infections due to *Candida* spp. in the USA: species distribution, clinical features and antifungal susceptibilities. *Int J Antimicrob Agents*, 43(1), 78-81.
- Xie, J., Tao, L., Nobile, C. J., Tong, Y., Guan, G., Sun, Y., Huang, G. (2013). White-opaque switching in natural MTL α /alpha isolates of *Candida albicans*: evolutionary implications for roles in host adaptation, pathogenesis, and sex. *PLoS Biol*, 11(3), e1001525.
- Zaragoza, O., Rodriguez, C., & Gancedo, C. (2000). Isolation of the MIG1 gene from *Candida albicans* and effects of its disruption on catabolite repression. *J Bacteriol*, 182(2), 320-326.
- Zhang, Y. Q., Brock, M., & Keller, N. P. (2004). Connection of propionyl-CoA metabolism to polyketide biosynthesis in *Aspergillus nidulans*. *Genetics*, 168(2), 785-794.
- Zhou, H., & Lorenz, M. C. (2008). Carnitine acetyltransferases are required for growth on non-fermentable carbon sources but not for pathogenesis in *Candida albicans*. *Microbiology*, 154(Pt 2), 500-509.

Wissenschaftliche Leistungen

Publikationen

Otzen, C., Mueller, S., Jacobsen, I. D., & Brock, M. (2013) Phylogenetic and phenotypic characterisation of the 3-ketoacyl-CoA thiolase family from the opportunistic human pathogenic fungus *Candida albicans*. FEMS Yeast Res., 13(6), 553-564.

Otzen, C., Bardl, B., Jacobsen, I D., Nett, M., & Brock, M. (2014). *Candida albicans* Utilises a Modified β -Oxidation Pathway for the Degradation of Toxic Propionyl-CoA. J Biol Chem., 289(12):8151-69.

Beiträge auf Fachtagungen

Otzen, C., Brock, M. „Propionate metabolism in *Candida albicans*“, Summer School “Pathogen-Host Interactions at Cellular Barriers”, University of Muenster (06/ 2008, Poster)

Otzen, C., Brock, M. “Propionate metabolism in *Candida albicans*“, VAAM Jahrestagung 2009, Bochum, Deutschland, March 8-11, 2009 (Vortrag)

Otzen, C., Brock, M. “An unexpected discovery: *Candida albicans* uses a modified β -oxidation for the detoxification of propionyl-CoA”, Conference on Candida and Candidiasis, Miami, Florida, (03/ 2010, Poster)

Otzen, C., Brock, M. ”Propionate metabolism in *C. albicans*: Implications for a modified β -Oxidation”, 1st International Student Conference on Microbial Communication (Vortrag, 09/ 2010)

Otzen, C., Brock, M. "Detoxification of propionyl-CoA in *Candida albicans*: Implications for a modified beta-oxidation pathway", VAAM Jahrestagung 2011, Karlsruhe, Deutschland (04/2011, Poster)

Otzen, C., Brock, M. "Propionate metabolism in *C. albicans*: Implications for a modified β -Oxidation", 2nd International Student Conference on Microbial Communication (Vortrag, 09/ 2011)

Otzen, C., Brock, M. "A modified β -Oxidation for propionyl-CoA degradation in *Candida albicans*", 18th Congress of the International Society for Human and Animal Mycology, Berlin, Germany (06/ 2012, Poster)

Otzen, C., Brock, M. "Propionate metabolism in *C. albicans*: Implications for a modified β -Oxidation", 3rd International Student Conference on Microbial Communication (Poster, 11/ 2012)

Curriculum vitae

Anschrift

Christian Otzen
Paraschkenmühle 8
07743 Jena

Zur Person

geb. am 21. November 1978
Geburtsort: Kiel
Familienstand: ledig

03/ 2008 - heute

Promotion - Friedrich-Schiller-Universität, Jena

Doktorarbeit im Rahmen der Exzellenzgraduiertenschule „Jena School for Microbial Communication“ (JSMC) am Leibniz Institut für Naturstoffforschung und Infektionsbiologie-Hans-Knöll-Institut (HKI, Jena)
Nachwuchsgruppe: Mikrobielle Biochemie und Physiologie

1. Betreuer: Dr. habil. Matthias Brock
2. Betreuer: Prof. Bernhard Hube

Titel der Dissertation: Untersuchungen zum Fettsäure- und Propionatkatabolismus in *Candida albicans*

10/ 2002 – 04/ 2008

Diplom-Studiengang Biologie

Christian-Albrechts-Universität (CAU), Kiel
Diplomarbeit: Überexpression des Whirly2-Gens in *Arabidopsis thaliana*

1. Betreuer: Dr. Ying Miao
 2. Betreuer: Prof. Karin Krupinska
- Hauptfach: Zellbiologie
1. Nebenfach: Zoologie
2. Nebenfach: Biochemie

10/ 2000 – 09/2002

Diplom-Studiengang Chemie

Christian-Albrechts-Universität (CAU), Kiel

06/ 1999

Erwerb der allgemeinen Hochschulreife

Hoffmann von Fallersleben Schulzentrum, Lütjenburg

Auszeichnungen

03/ 2008 – 03/ 2011

Promotions-Stipendium der Exzellenz Graduierten-Schule “Jena School for Microbial Communication“ (JSMC)

Danksagung

Zunächst gilt mein Dank meinem Doktorvater Dr. habil. Matthias Brock, für die Betreuung und Beratung bei der Durchführung der Experimente und der schriftlichen Arbeiten. Auch neben der rein wissenschaftlichen Arbeit empfand ich die Zeit in seiner Arbeitsgruppe als äußerst lehrreich.

Meinem zweiten Betreuer Prof. Dr. Bernhard Hube möchte ich ebenfalls für die Begleitung meiner Dissertation und seine stete Hilfsbereitschaft danken. In seiner Institutsabteilung fühlte ich mich immer willkommen.

Prof. Dr. Brakhage gewährte mir großzügig Zugang zu den Laboren der Abteilung für molekulare und angewandte Mikrobiologie, wo ich einen wichtigen Teil der Experimente durchführen konnte. Hierfür meinen herzlichsten Dank.

Für ihre stete Diskussionsbereitschaft und Beratung möchte ich mich ausdrücklich bei den folgenden Personen bedanken: Prof. Ilse Jacobsen, Dr. habil. Peter Staib, Dr. habil Markus Nett, Dr. Bettina Bardl, Dr. Sascha Brunke, Dr. Sebastian Müller und Dipl. Biologe Florian Hennicke.

Meinen herzlichsten Dank auch meinen Freunden und Kollegen der Nachwuchsgruppe Mikrobielle Biochemie und Physiologie: Daniela Hildebrandt, Gudrun Steinmetzer, Christian Fleck, Felicitas Fazius, Markus Greßler, Shruti Ramachandra, Silvia Slesiona, Amelie Savers, Shih-Hung Hsieh und Nicole Domin. Der gute Zusammenhalt und die vertrauensvolle Atmosphäre innerhalb der Gruppe haben trotz der manchmal schwierigen Arbeit und den Notwendigkeiten des Forscherdaseins Freude und Zuversicht ermöglicht.

Neben dem beruflichen Umfeld hat auch mein privates Umfeld Anteil an dieser Arbeit, insbesondere meine Jenaer Freunde aus dem schönen Leutra-Tal. Meiner Freundin, meinen Geschwistern und schließlich meinen Eltern danke ich für ihre wohlwollende Begleitung während meiner Zeit in Jena.

Eigenständigkeitserklärung

Die vorliegende Dissertation wurde mit Kenntnis der geänderten Promotionsordnung der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena vom 04. Dezember 2012 angefertigt. Die Dissertation wurde von mir selbst verfasst. Bei der Durchführung und Auswertung der Ergebnisse und der Erstellung des Manuskripts haben mir die in der Danksagung erwähnten Personen geholfen. Es wurden neben den von mir angegebenen Hilfsmitteln und Quellen keine Textabschnitte von Dritten ohne entsprechende Kennzeichnung übernommen. Die an den Publikationen und Manuskripten beteiligten Personen und deren Anteil an Inhalt und Umfang bei deren Anfertigung sind in der Publikationsliste angegeben.

Diese oder eine in großen Teilen ähnliche Dissertation wurde von mir bisher nicht als Prüfungsarbeit an dieser oder einer anderen Hochschule für eine staatliche oder eine andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht.

Jena, den.....

(Christian Otzen)

Anhang

Beschreibung zusätzlich angewandter Materialien und Methoden

Herstellung zusätzlicher *C. albicans*-Deletionsstämme

Die Herstellung der in der Diskussion erwähnten *C. albicans* Deletionsstämme der Gene *CaLeu1*, *CaPOX1*, *CaPXP2*, *CaPOX1-3*, *CaACD99* und *CaTMT1*, sowie der entsprechenden Revertanten erfolgte entsprechend der von Otzen *et al.* (2014) beschriebenen Methode. Eine Liste der dazu verwendeten Primer findet sich in Tabelle 1.

Zusätzliche Wachstumsversuche auf Fest- und in Flüssigmedien.

Die in der Diskussion dargestellten Versuche zur phänotypischen Charakterisierung des Wachstums von Mutanten der β -Oxidation, der modifizierten β -Oxidation sowie der putativen Aldehyddehydrogenase *CaALD5* wurden entsprechend der Angaben bei Otzen *et al.* (2014) durchgeführt (Abschnitt 8.6, Abb. 9). Das Flüssigmedium zum vergleichenden Wachstumsversuch der *Caald6 Δ* -Deletionsmutante und des *C. albicans* Wildtyps SC5314 enthielt entgegen der Angaben von Otzen *et al.* (2014) Glucose in einer Konzentration von lediglich 10 mM anstelle von 50 mM.

Die Glucosekonzentration im Flüssigmedium zur Verwendung in Vorversuchen zur phänotypischen Charakterisierung der *Catmt1 Δ* -Deletionsmutante betrug 20 mM anstelle von 50 mM. Die Vorversuche wurden bei 37°C und 200 rpm auf einem Rotationsschüttler durchgeführt. Die Rekonstituierung des *Catmt1 Δ* -Phänotyps geschah durch Zugabe des 3-Isopropylmalat-1-mono-Methylesters mit einer Endkonzentration von 5 mM vor Beginn der Inkubation bei 37°C und 200 rpm.

Transkriptom-Analyse zur Untersuchung der differentiellen Genregulation in *C. albicans* in Abhängigkeit verschiedener Kohlenstoffquellen

Zur Vorbereitung der Transkriptom-Analyse wurde der *C. albicans* SC5314 Wildtyp über Nacht bei 30°C und 200 rpm in YPD kultiviert. Am nächsten Tag wurde diese Kultur drei Mal mit kalten PBS gewaschen und anschließend zur Beimpfung von 5 Folgekulturen verwendet. Als Nährmedium dieser Kulturen dienten jeweils 50 ml Candida Minimal Medium (Dumitru, Hornby, & Nickerson, 2004), welches mit je einer der Kohlenstoffquellen Glucose, Acetate, Propionat, Valerat oder Hexanoat

supplementiert war. Die OD_{600} der Kulturen wurde auf 0,4 eingestellt und die Kulturen anschließend bei 30°C und 200 rpm inkubiert. Nach 30 Minuten, 2 Stunden und 8 Stunden Inkubationszeit wurde jeder der Kulturen jeweils 2 ml Zellsuspension entnommen. Die Zellen dieser Proben wurden ein Mal mit eiskaltem PBS gewaschen. Die Zellsedimente wurden danach in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Aufbereitung bei -80°C gelagert. Die RNA der Zellen wurde mit dem „RNeasy Mini Kit“ (Quiagen, Hilden, Deutschland) gemäß der Herstellerangaben isoliert und anschließend mit Hilfe eines „Bioanalyzer“ (Agilent, Böblingen, Deutschland) einer Qualitätskontrolle unterzogen. Die RNA diente als Matrize für die Herstellung von Cy5-markierter cDNA unter Verwendung des „Low RNA Input Linear Amplification Kit“ (Agilent). Die cDNA wurde mit dem „RNeasy Mini Kit“ aufgereinigt und anschließend zur Hybridisierung von Microarrays benutzt. Dazu wurden jeweils 1 µg Cy5-markierter Proben-cDNA und 1 µg Cy3-markierter cDNA einer YPD-Referenzprobe verwendet (Fradin *et al.*, 2005). Die hybridisierten Microarrays wurden unter Verwendung der Software „GenePix“ (Axon, Orleans Drive, USA) ausgelesen und die Ergebnisse mit Hilfe der Software „GeneSpring GX10“ (Agilent) ausgewertet (Fradin *et al.*, 2005). Es wurden jeweils 3 biologische Replikate und mindestens 3 technische Replikate zu jeder der Kohlenstoffquellen hergestellt.

Synthese des 3-Isopropylmalat-mono-Methylesters

Einer 0,5 mM Lösung von (2R, 3S)-2-hydroxy-3-Isopropylsuccinat in Methanol/Toluen (1:1, v/v) wurde unter Rühren bei -78°C 0,25 ml einer 2 M Trimethyl-silyldiazomethan/ Hexan-Lösung hinzugefügt. Nachdem diese Lösung langsam auf Raumtemperatur erwärmt wurde sie durch Evaporation eingeengt. Der verbliebene Rest wurde mittels Semi-präparativer HPLC in drei Fraktionen geteilt. Diese Fraktionen entsprachen 23 mg 3-Isopropylmalat-1-mono-Methylester, 19 mg 3-Isopropylmalat-4-mono-Methylester und 6 mg 3-Isopropylmalat-1-4-di-Methylester. Alle drei Fraktionen wurden bezüglich ihrer Fähigkeit zur Rekonstitution des *tmt1Δ*-Phänotyps getestet.

Liste zusätzlich verwendeter Primer

Tabelle 1: Liste zusätzlich verwendeter Primer

Name	Sequenz	Organismus
<i>C. albicans</i> POX1		
POX1_5'Apal_for	GGG CCC ATT TAG TAC TAG GCC GAT TCT CG	<i>C. albicans</i>
POX1_5'XhoI_rev	CTC GAG TAA TGT AAT TAT AGA TAA AGA AAT GAA TGG	<i>C. albicans</i>
POX1_3'SacII_for	CCG CGG ATC TAG TTA GAC AAA AAG AAA GGG G	<i>C. albicans</i>
POX1_3'SacI_rev	GAG CTC GTA TAC AGC TTC TGT CAA AGC AC	<i>C. albicans</i>
POX1_DC_rev	GGA GTA TTA ATG ACA AAT TCG TCA G	<i>C. albicans</i>
POX1_Comploligo_BamH1_rev	GGA TCC AAT TTC AGC AGC TTC TTC AGA TCT T	<i>C. albicans</i>
<i>C. albicans</i> PXP2		
PXP2_5'Apal_for	GGG CCC AAA AAA ATT GTG GGG CGA GGA G	<i>C. albicans</i>
PXP2_5'XhoI_rev	CTC GAG AAA GAG GTT GTT TGG TTT GAA AG	<i>C. albicans</i>
PXP2_3'SacII_for	CCG CGG TAT CAA GAT AAT TTG ATA TAG GTG ACC	<i>C. albicans</i>
PXP2_3'SacI_rev	GAG CTC TTG ATT CAT TTA TTT TTA TTT TCT TAA ACA TAG	<i>C. albicans</i>
PXP2_DC_rev	TTA GTA GCA CCA ATG TGA GGA G	<i>C. albicans</i>
PXP2_Comploligo_BglII_rev	AGA TCT TTA TCT TGA TAA TTT AGC AGC TGC TT	<i>C. albicans</i>
<i>C. albicans</i> POX1-3		
POX1-3_5'Apal_for	GGG CCC GTC ATA TTG TCT TTG ATG TAA TCT CC	<i>C. albicans</i>
POX1-3_5'XhoI_rev	CTC GAG AAA GAC CAA ACA AGA ATT GGC TCG AG	<i>C. albicans</i>
POX1-3_3'SacI_for	CCGCG G GGC ATA TTA ATT GTA CTC TTT TGA C	<i>C. albicans</i>
POX1-3_3'SacII_rev	GAG CTC GTA ATT GTA ATA CCC ATC GTT GTA CGA GCT C	<i>C. albicans</i>
POX1-3_DC_rev	CAA TTC AGT CAT ACC GAA ACA ACC	<i>C. albicans</i>
POX1-3_ComplOligo_BamHI_rev	GGA TCC TTA TTT GGA TAA AAT TTC AGC GGT TTC	<i>C. albicans</i>
<i>C. albicans</i> ACD99		
ACD99_5'Apal_for	GGG CCC TTA ATG ATA CTA ATA CTT GAA TGG	<i>C. albicans</i>
ACD99_5'XhoI_rev	CTC GAG GAA GCA CCG AGA CAT TTG C	<i>C. albicans</i>
ACD99_3'SacII_for	CCG CGG AAG TAA GAG AAC TGC TAT TCC AAG	<i>C. albicans</i>
ACD99_3'SacI_rev	GAG CTC TGT ATA TCA ACG ATA ATG AGC G	<i>C. albicans</i>
ACD99_DC_rev	CAA AGC CTT TTT GGC ATC GAT G	<i>C. albicans</i>
ACD99_Comploligo_BglII_rev	AGA TCT TTA TAA TTT GCT ACG TTG AGT TTC C	<i>C. albicans</i>
<i>C. albicans</i> TMT1		
TMT1_5'Apal_for (1. Allel)	GGG CCC GAA ATG ACG TTC AAC AGT CAG C	<i>C. albicans</i>
TMT1_5'XhoI_rev (1. Allel)	CTC GAG GAG TTT TCT TTA ATT GAC ACT GG	<i>C. albicans</i>
TMT1_3'SacII_for (1. Allel)	CCG CGG GAT TAT GTC AAA AGT TGG AGC GC	<i>C. albicans</i>
TMT1_3'SacI_rev (1. Allel)	GAG CTC AAA CGT GTA AAC TGT GTC CCA G	<i>C. albicans</i>
TMT1_5'Apal_for (2. Allel)	GGG CCC TCT ATT TGC CTC ACA ACA CAA CC	<i>C. albicans</i>
TMT1_5'XhoI_rev (2. Allel)	CTC GAG CTC GAG TAA ATT TGT AAA TTG ATA TTG CTG AGG	<i>C. albicans</i>
TMT1_3'SacII_for (2. Allel)	CCG CGG CCG CGG TTA GTA ATA ACT TTG TGA GAG CCG	<i>C. albicans</i>
TMT1_3'SacI_rev (2. Allel)	GAG CTC TAA TTT AAG CGA TCA CGC AGA GC	<i>C. albicans</i>
TMT1_DC_rev	CAA TTC CGC AAC AAA CTT TTC AGC	<i>C. albicans</i>
TMT1_Comploligo_BglII_rev	AGA TCT ACT AAT CAT TAT TGA TCT AAC TCT ATT	<i>C. albicans</i>