

**Funktionelle Analysen
virulenzrelevanter und essentieller Gene
in *Candida albicans***



Dissertation
zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Bayerischen Julius-Maximilians Universität Würzburg

vorgelegt von
Teresa Anna Bader
aus Mindelaltheim

Würzburg, 2005

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission

Vorsitzender:

Gutachter: Prof. Dr. J. Morschhäuser

Gutachter: Prof. Dr. J. Reidl

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Vielen Dank!

Bei Prof. Dr. Dr. h. c. J. Hacker möchte ich mich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes am Zentrum für Infektionsforschung bzw. am Institut für Molekulare Infektionsbiologie bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Joachim Morschhäuser für die Überlassung der interessanten Themengebiete in der *Candida albicans*-Forschung, für die wissenschaftliche Anleitung und Unterstützung, sowie die stete Diskussionsbereitschaft, die zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen hat.

Bei Prof. Dr. Joachim Reidl bedanke ich mich für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens dieser Arbeit.

Die vorliegende Arbeit wurde durch die Firma Aventis (Sanofi, Paris) gefördert. Ich danke Herrn Klaus-Jörg Rieger für sein Interesse und die gute Zusammenarbeit.

Weiterhin gilt mein Dank Herrn PD Dr. Klaus Schröppel und Frau Barbara Bodendorfer (Institut für Klinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene; Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg) für die Durchführung der Tierexperimente. Bei Herrn Dr. Gerwald Köhler (University of California, San Francisco, USA) möchte ich mich für die Überlassung des *CdMPA^R*-Selektionsmarkers bedanken.

Einen herzlichen Dank richte ich an meine Laborkollegen Nim, Davina, Olli, Kajal, Peter, Ulsen, Manjistha, Sonja, Julia, Neelam und Karin S. für ihre freundliche Hilfsbereitschaft und für die Abwechslungen nicht nur im Laboralltag. Bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts bedanke ich mich für die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Für all die Unterstützung während des Studiums und der Promotion danke ich meinen Eltern und meiner Familie. Besonders bedanken möchte ich mich auch bei Bernhard für seine moralische Unterstützung und die praktischen Tips bei der Arbeit am PC.

INHALTSVERZEICHNIS

1	ZUSAMMENFASSUNG	1
1	SUMMARY.....	3
2	EINLEITUNG	5
2.1	ALLGEMEINE EINFÜHRUNG	5
2.2	VIRULENZFAKTOREN UND ANDERE ZELLBIOLOGISCHE EIGENSCHAFTEN VON <i>C. ALBICANS</i>	7
	<i>Adhärenz</i>	7
	<i>Dimorphismus und Signaltransduktion</i>	9
	<i>Sekretion hydrolytischer Enzyme</i>	10
	<i>Phänotypisches „Switching“ und Mating</i>	11
	<i>Calcineurin</i>	12
2.3	MOLEKULARGENETIK ZUR UNTERSUCHUNG NICHT-ESSENTIELLER GENE	13
2.4	MOLEKULARGENETIK ZUR UNTERSUCHUNG ESSENTIELLER GENE	15
2.5	CHROMATIN-MODIFIZIERENDE KOMPLEXE UND DIE RIBOSOMEN-BIOSYNTHESE	17
	<i>Chromatin-modifizierende Komplexe</i>	17
	<i>Ribosomen-Biosynthese</i>	19
2.6	ZIELSETZUNG DER ARBEIT	21
3	MATERIAL UND METHODEN	23
3.1	BAKTERIENSTÄMME UND PLASMIDE	23
3.1.1	<i>Escherichia coli K12</i>	23
3.1.2	<i>Plasmide</i>	23
3.2	<i>CANDIDA ALBICANS</i> -STÄMME	26
3.3	OLIGONUKLEOTIDE	28
3.4	LABORGERÄTE UND CHEMIKALIEN	31
3.5	MIKROBIOLOGISCHE METHODEN	32
3.5.1	<i>Anzucht von Escherichia coli</i>	32
3.5.2	<i>Anzucht von Candida albicans in Hefeform</i>	32
3.5.2.1	Vollmedium und SD-Medium	32
3.5.2.2	Induktion des <i>SAP2</i> -Promotors in YCB-BSA-Medium.....	32
3.5.3	<i>Hypheninduktionsmedien für Candida albicans</i>	33
3.6	MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	34
3.6.1	<i>Polymerasekettenreaktion (PCR) und Aufreinigung von PCR-Produkten</i>	34
3.6.2	<i>Spaltung von DNA mittels Restriktionsendonukleasen</i>	35
3.6.3	<i>Aufreinigung von DNA durch Agarose-Gelelektrophorese</i>	35

3.6.4	DNA-Sequenzierung	36
3.6.5	Plasmidisolierung aus <i>E. coli</i>	36
3.6.6	Ligation und Klonierung.....	37
3.6.7	Genetische Transformation von <i>C. albicans</i> durch Elektroporation	38
3.6.8	Isolierung chromosomaler DNA aus <i>C. albicans</i> -Zellen	39
3.6.9	Southern-Hybridisierung	40
3.6.10	Isolierung von Gesamt-RNA aus <i>C. albicans</i> -Zellen	41
3.6.11	Northern-Hybridisierung.....	42
3.6.12	Isolierung des Gesamt-Proteinextraktes aus <i>C. albicans</i> -Zellen	43
3.6.13	Westernblot.....	44
3.7	MIKROSKOPIE VON <i>C. ALBICANS</i>	44
3.7.1	Zellkern-Färbung.....	45
3.7.2	Indirekte Immunfluoreszenz in <i>C. albicans</i>	45
3.7.3	Lebend-/Totfärbung von <i>C. albicans</i> -Zellen	46
3.8	PHÄNOTYPISCHE TESTS	46
3.8.1	Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK-Test).....	46
3.8.2	Sensibilitätstest auf Agarplatten (Spot-Test).....	47
3.8.3	Test zur Serumsensitivität	47
3.9	IN VIVO-EXPERIMENTE: MURINES MODELL EINER SYSTEMISCHEN <i>C. ALBICANS</i> -INFEKTION.....	47
4	ERGEBNISSE	49
4.1	FUNKTIONELLE ANALYSE DES CALCINEURIN A-GENS <i>CMP1</i> IN <i>CANDIDA ALBICANS</i>	49
4.1.1	Identifizierung des <i>CMP1</i> -Gens durch Homologievergleich	49
4.1.2	Konstruktion einer Calcineurin-Mutante mit dem <i>ura3</i> -negativen Ausgangsstamm <i>CAI4</i>	50
4.1.2.1	Das <i>CMP1</i> -Gen in <i>C. albicans</i> ist nicht essentiell	50
4.1.2.2	Konstruktion eines komplementierten Stammes aus der Δ <i>cmp1</i> -Mutante.....	53
4.1.3	Deletion von <i>CMP1</i> verursacht Hypersensitivität gegenüber Ionen- und alkalischem Streß.....	54
4.1.4	<i>CMP1</i> ist nicht notwendig für das Wachstum bei erhöhten Temperaturen und für die Ausbildung von Hyphen.....	56
4.1.5	Erhöhte Sensitivität gegenüber Membranstreß und Fluconazol.....	60
4.1.6	Calcineurin ist essentiell für die Virulenz <i>in vivo</i>	61
4.1.7	Verhalten einer Calcineurin-Mutante mit dem Wildtyp-Stamm <i>SC5314</i> als Ausgangsstamm.....	63
4.1.7.1	Konstruktion der <i>CMP1</i> -Mutante im Wildtyp-Stamm <i>SC5314</i>	64
4.1.7.2	Konstruktion des komplementierten Stammes <i>SCCMP1K2</i>	66
4.1.7.3	Hypersensitivität gegenüber Kationen-, alkalischem und Membranstreß der Mutante <i>SCCMP1M4</i>	67
4.1.7.4	Kein Phänotyp der Calcineurin-Mutante <i>SCCMP1M4</i> bei erhöhter Temperatur und unter hypheninduzierenden Bedingungen.....	68
4.1.7.5	Attenuierte Virulenz der <i>SCCMP1M4</i> -Mutante <i>in vivo</i>	71
4.1.7.6	Verhalten der Δ <i>cmp1</i> -Mutante <i>SCCMP1M4</i> in Serum.....	72

4.2	CHARAKTERISIERUNG DER ESSENTIELLEN GENE <i>YML127</i> , <i>YPR143</i> UND <i>YML93</i> IN <i>CANDIDA ALBICANS</i> . 75	
4.2.1	<i>Die Gene YML127, YPR143 und YML93 sind essentiell für das Überleben von Candida albicans</i>	75
4.2.2	<i>Herstellung konditional letaler Mutanten</i>	77
4.2.2.1	Allgemeines Konstruktionsprinzip	77
4.2.2.2	Konstruktion der konditional letalen Mutante des Gens <i>YML127</i>	79
4.2.2.3	Konstruktion der konditional letalen Mutante des Gens <i>YPR143</i>	82
4.2.2.4	Konstruktion der konditional letalen Mutante des Gens <i>YML93</i>	85
4.2.3	<i>Induktionskinetik und Wachstum nach der Induktion</i>	88
4.2.3.1	Induktionskinetik der Mutanten YML127M6A und B	88
4.2.3.2	Wachstum der Mutanten YML127M6A und B	89
4.2.3.3	Induktionskinetik der Mutanten YPR143M6A und B	90
4.2.3.4	Wachstum der Mutanten YPR143M6A und B	91
4.2.3.5	Induktionskinetik der Mutanten YML93M6A und B	92
4.2.3.6	Wachstum der Mutanten YML93M6A und B	93
4.2.4	<i>Phänotypen und funktionelle Analysen</i>	95
4.2.4.1	<i>YML127</i> ist ein Homolog des <i>ScRSC9</i> -Gens, das für eine Komponente des RSC- „chromatin-remodeling complex“ kodiert	95
4.2.4.1.1	Induzierte M6-Stämme durchlaufen noch einige Zellzyklen bis zum Absterben der <i>rsc9</i> -defizienten Zellen	96
4.2.4.1.2	Es treten Zellzyklus-Anomalien der <i>rsc9</i> -defizienten Zellen auf	98
4.2.4.1.3	CaRsc9p ist im Nukleus lokalisiert	100
4.2.4.2	Ypr143p ist in die rRNA-Prozessierung involviert.....	103
4.2.4.2.1	Die <i>ypr143</i> -defizienten Zellen zeigen Defekte in der Zellmorphologie sowie einen gestörten Zellzyklus	104
4.2.4.2.2	In den <i>ypr143</i> -defizienten Zellen kommt es zu einer Akkumulierung von Vorstufen der ribosomalen RNA.....	108
4.2.4.2.3	Hypersensitivität der heterozygoten YPR143-Mutanten gegenüber Inhibitoren der Ribosomen- und Proteinbiosynthese.....	111
4.2.4.3	Yml93p ist ein Homolog von ScUtp14p, einer Komponente des U3 Ribonukleoprotein-Komplexes	113
4.2.4.3.1	Die <i>YML93</i> -Gendeletion beeinträchtigt sowohl die Zellmorphologie als auch den Zellzyklus	113
4.2.4.3.2	In den <i>yml93</i> -defizienten Zellen kommt es zu einer Akkumulierung von ribosomalen RNA-Vorstufen	117
4.2.4.3.3	Hypersensitivität der heterozygoten <i>YML93</i> -Mutanten gegenüber Inhibitoren der Ribosomen- und Proteinbiosynthese.....	119
5	DISKUSSION	121
5.1	CHARAKTERISIERUNG DES CALCINEURINS IN <i>CANDIDA ALBICANS</i>	121
	<i>Calcineurin ist in allen Eukaryonten von großer Bedeutung</i>	121
	<i>Calcineurin ist wichtig für das Überleben unter Streßbedingungen</i>	122
	<i>Calcineurin ist essentiell für die Pathogenität von C. albicans</i>	125
	<i>Problematik des URA3-Selektionsmarkers und Lösungen hinsichtlich der Calcineurin-Analyse</i>	129
	<i>Wertung und Ausblick zur Calcineurin-Analyse</i>	132

5.2	FUNKTIONELLE AUFKLÄRUNG DER ESSENTIELLEN GENE <i>RSC9/YML127</i> , <i>YPR143</i> UND <i>UTP14/YML93</i> MIT HILFE VON KONDITIONAL LETALEN MUTANTEN IN <i>CANDIDA ALBICANS</i>	133
	<i>Über die Nutzbarkeit konditional letaler Mutanten durch induzierbare, FLP-Rekombinase-vermittelte Gendeletion</i>	133
	<i>Ist C. albicans Rsc9p/Yml127p eine Komponente eines RSC „chromatin remodeling complex“?</i>	136
	<i>YPR143 ist in die Prozessierung der ribosomalen RNA involviert</i>	140
	<i>Yml93p stellt ein Homolog des ScUtp14 dar, einer Komponente des SSU-Prozessoms, und ist in die Prozessierung der ribosomalen RNA involviert</i>	143
	<i>Ausblick auf die Analyse essentieller Gene in C. albicans im allgemeinen und der hier untersuchten Gene im besonderen</i>	146

6 LITERATURVERZEICHNIS 149

A. ANHANG I

ERKLÄRUNGEN I

PUBLIKATIONEN UND PRÄSENTATIONEN II

LEBENS LAUF IIII

1 Zusammenfassung

Die Bedeutung von Mykosen hat wegen der wachsenden Zahl immunsupprimierter Patienten in den letzten Jahren immer mehr zugenommen. Diese erkranken häufig an oberflächlichen sowie lebensbedrohlichen systemischen Infektionen mit dem opportunistisch humanpathogenen Hefepilz *Candida albicans*, da der Keim, der oftmals als harmloser Kommensale auf den Schleimhäuten im Gastrointestinaltrakt gesunder Menschen vorkommt, vom geschwächten Immunsystem nicht mehr in Schach gehalten werden kann. Andererseits tragen Virulenzeigenschaften des Pilzes ebenso zu seiner Pathogenität bei, da er sich dadurch an unterschiedliche Wirtsnischen anpassen kann. Die Effizienz einer Therapie wird durch die Entstehung von Resistenzen bzw. toxische Nebenwirkungen der Medikamente eingeschränkt. Daher ist die Entwicklung neuer Antimykotika dringend erforderlich.

In dieser Arbeit sollten bestimmte Gene von *C. albicans*, die in anderen Organismen als essentiell für deren Lebensfähigkeit bzw. Virulenz beschrieben wurden, als potentielle Zielstrukturen für die Entwicklung neuer Antimykotika charakterisiert werden. Das *CMPI*-Gen kodiert für die katalytische Untereinheit der konservierten Calcium/Calmodulin-abhängigen Phosphatase Calcineurin, die in der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* und in anderen Organismen verschiedene physiologische Prozesse reguliert und essentiell für die Virulenz des pathogenen Hefepilzes *Cryptococcus neoformans* ist. Um die Bedeutung von Calcineurin für das Überleben und die Virulenz von *C. albicans* zu untersuchen, wurden homozygote *cmp1* knock-out-Mutanten sowohl in einem auxotrophen *C. albicans*-Laborstamm als auch, mit Hilfe eines neuen dominanten Selektionsmarkers, in einem prototrophen Wildstamm hergestellt. Die Mutanten erwiesen sich als hypersensitiv gegenüber Natrium, Calcium, Mangan und Lithium sowie gegenüber alkalischem pH-Wert. Darüber hinaus konnten die mutierten Zellen Membranstreß, der durch SDS- oder Fluconazol-Zugabe verursacht wurde, nicht tolerieren und waren unter diesen Bedingungen stark in ihrem Wachstum gehemmt. Andere wichtige Virulenzeigenschaften wie die Toleranz gegenüber Wirts-Körpertemperatur und die Fähigkeit zur Hyphenbildung zeigten sich durch die *CMPI*-Deletion *in vitro* nicht beeinträchtigt. Dennoch machte die Anwendung eines murinen Modells einer systemischen Candidose *in vivo* deutlich, daß die Mutanten sehr stark in ihrer Virulenz attenuiert waren. Der Virulenzdefekt war vermutlich zumindest zum Teil dadurch bedingt, daß die Calcineurin-defizienten Zellen im Gegensatz zum Wildtyp in humanem Serum nicht wachsen konnten und deshalb möglicherweise schlechter über die Blutbahn disseminieren konnten.

Außer Calcineurin wurden in Kooperation mit einem Industriepartner drei weitere Gene, *YML127*, *YPR143*, und *YML93*, die in *S. cerevisiae* als essentiell beschrieben wurden und die keine signifikanten Homologien zu Vertebraten-Genen aufwiesen, in der *C. albicans*-Genomsequenz identifiziert und auf ihre Eignung als potentielle Targets hin untersucht. Die Funktion dieser Gene war zu Beginn dieser Arbeit unbekannt; vor kurzem wurde jedoch gezeigt, daß sie in *S. cerevisiae* eine Rolle beim Chromatin-Remodeling bzw. bei der rRNA-Prozessierung haben. Nachdem sich alle Gene auch in *C. albicans* als essentiell herausgestellt hatten, wurden konditional letale Mutanten hergestellt, in denen die Gene durch induzierbare Deletion mit Hilfe der site-spezifischen Rekombinase FLP aus dem Genom entfernt wurden. Dadurch wurde eine Population von Nullmutanten erhalten, in denen der terminale Phänotyp der Gendeletion analysiert werden konnte. Die funktionelle Analyse des *YML127* (*RSC9*) Gens wies darauf hin, daß es in *C. albicans* eine ähnliche Funktion hat wie in der Bäckerhefe, in der das Rsc9-Protein ein Bestandteil des RSC-Protein-Komplexes ist, der die Struktur des Chromatins in Abhängigkeit von Zellzyklus und Umweltbedingungen umorganisiert und damit die Aktivität von Genen steuert. Mit Hilfe eines HA-Epitop markierten *YML127*-Gens konnte das Genprodukt im Zellkern von *C. albicans* lokalisiert werden. Die *C. albicans yml127*-Nullmutanten produzierten verlängerte, mehrfach knospende Zellen, was einen Verlust der Koordination zwischen Mitose und Zytokinese vermuten ließ. Die beiden Gene *YPR143* und *YML93* (*UTP14*) scheinen wie ihre homologen Vertreter in *S. cerevisiae* an der Prozessierung der ribosomalen RNA beteiligt zu sein. Heterozygote Mutanten wiesen eine Haploinsuffizienz auf, die sich in einer erhöhten Suszeptibilität gegenüber Hemmstoffen der rRNA-Synthese und der Ribosomenaktivität zeigte, und in den induzierten Nullmutanten akkumulierten Vorstufen der reifen rRNAs. In beiden Fällen führte die Gendeletion zu Anomalien im Zellzyklus; die *ypr143*-Mutanten wiesen eine vergrößerte unförmige Zellmorphologie auf, und die *yml93*-Mutanten bildeten große, rundliche Zellen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit erlauben nicht nur wichtige Einblicke in die Funktion der untersuchten Gene in essentiellen zellulären Prozessen, sondern zeigen auch deren Bedeutung für die Virulenz bzw. für das Überleben des humanpathogenen Hefepilzes *C. albicans*. Die entsprechenden Genprodukte sollten sich deshalb prinzipiell als Angriffspunkte für die Entwicklung neuer antimykotischer Medikamente eignen.

1 Summary

The importance of fungal infections has steadily increased during the past decades due to the growing number of immunocompromised patients. These patients often suffer from superficial as well as life-threatening systemic infections with the opportunistic human pathogenic yeast *Candida albicans*, which is a harmless commensal on mucosal surfaces in many healthy people but cannot be controlled any more by a weakened immune system. On the other hand, virulence traits of the fungus also contribute to its pathogenicity, because they enable adaptation to different host niches. The success of medical treatment is limited by the emergence of resistance and by toxic side effects of antifungal drugs. Therefore, there is an urgent need to develop novel antimycotic agents.

In this work selected *C. albicans* genes, which were known to be essential for viability or virulence in other organisms, were characterized as potential targets for the development of new antifungal drugs. The *CMPI* gene encodes the catalytic subunit of the conserved calcium/calmodulin-dependent phosphatase calcineurin, which regulates a variety of physiological processes in the model yeast *Saccharomyces cerevisiae* and other organisms and is essential for virulence of the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans*. To investigate the importance of calcineurin for survival and virulence of *C. albicans*, homozygous *cmp1* knock-out mutants were constructed in an auxotrophic *C. albicans* laboratory strain as well as, using a new dominant selection marker, in a prototrophic wild-type strain. The mutants showed hypersensitivity to increased concentrations of ions and to alkaline pH. In addition, the mutated cells could not tolerate membrane stress resulting from SDS or fluconazole treatment and their growth was strongly inhibited under these conditions. Other characteristics that are important for virulence, like tolerance to the host body temperature and the ability to switch to a hyphal growth form, were not affected by the *CMPI* deletion. Nevertheless, the mutants were avirulent in a murine model of systemic candidiasis. The virulence defect could be explained at least in part by the fact that, in contrast to the wild-type, the *cmp1* mutants were unable to grow in human serum and therefore might have a reduced capacity to disseminate via the bloodstream.

In addition to *CMPI*, three other genes, *YML127*, *YPR143*, and *YML93*, were selected in cooperation with an industrial partner from the available *C. albicans* genome sequence and evaluated as potential targets. These genes had been reported to be essential in *S. cerevisiae* and they did not exhibit significant homology to mammalian genes. At the beginning of the

present work the function of the three genes was unknown, but recently it was demonstrated that their counterparts in *S. cerevisiae* have roles in chromatin remodeling or rRNA processing. It was demonstrated that all three genes are also essential in *C. albicans*. Therefore, conditional lethal mutants were constructed in which the genes could be excised from the genome by inducible deletion using the site-specific FLP recombinase. In this way, populations of null mutants were obtained in which the terminal phenotype of the gene deletion could be analyzed. The functional analysis of the *YML127* (*RSC9*) gene showed that it has a similar function in *C. albicans* as in *S. cerevisiae*, where the Rsc9 protein is a component of the RSC complex that remodels the structure of chromatin in a cell cycle dependent manner and in response to environmental conditions and thereby controls gene activity. Using an HA-epitope-tagged *YML127* gene the Yml127 protein could be localized in the nucleus in *C. albicans*. The *C. albicans yml127* null mutants produced elongated, multi-budded cells, pointing to a loss of coordination of mitosis and cytokinesis. The genes *YPR143* and *YML93* (*UTP15*) seem to be involved in the processing of the ribosomal RNA, like their counterparts in *S. cerevisiae*. Heterozygous mutants exhibited a haploinsufficient phenotype, which was evident from their hypersusceptibility to inhibitors of rRNA synthesis and ribosome activity, and the induced null mutants accumulated precursors of the mature rRNAs. In both cases the gene deletion resulted in cell cycle defects; the *ypr143* null mutants produced enlarged, misshapen cells, and the *yml93* mutants formed large, round cells.

The results of this work not only provide valuable clues about the function of the investigated genes in essential cellular processes, but also demonstrate their importance for virulence and viability of the human pathogenic fungus *C. albicans*. In principle, the corresponding gene products should therefore be suitable targets for the development of novel antifungal drugs.

2 Einleitung

2.1 Allgemeine Einführung

Im Vergleich zu bakteriellen Infektionserregern spielen Pilz-Infektionen epidemiologisch eher eine untergeordnete Rolle. Dennoch nahm in den letzten Jahrzehnten die Infektion durch Pilze bedingt durch den medizinischen Fortschritt und die Immunschwächekrankheit AIDS immer mehr zu, so daß die hierfür relevanten Erreger ein ernstzunehmendes Problem darstellen (Fridkin and Jarvis, 1996; Hacker, 2000). Gesunde, immunkompetente Menschen sind von Pilzinfektionen in der Regel nicht betroffen, da sie durch mechanische Barrieren wie Haut und Schleimhäute, eine intakte Mikroflora und ein funktionierendes Immunsystem geschützt sind. Jedoch erfordern medizinische Entwicklungen in der Intensivmedizin wie Organtransplantationen und die Nutzung von intravaskulären Kathetern oder anderen implantierten medizinischen Geräten eine medikamentöse Immunsuppression. Dazu kommt der Einsatz von Chemotherapeutika und Breitspektrum-Antibiotika oder Langzeit-Applikationen von Antibiotika, was zu einer wachsenden Zahl abwehrgeschwächter Patienten führt. Eine erhöhte Prädisposition besitzen insbesondere auch neutropenische Patienten sowie Patienten mit schwerwiegenden Grundkrankheiten wie AIDS und Diabetes mellitus (Tufano, 2002).

Die klinisch relevanten Pilzarten beschränken sich auf etwa 150 Spezies, die sich nach ihrem morphologischen Erscheinungsbild in Sproßpilze wie *Candida albicans* und *Cryptococcus neoformans*, Fadenpilze wie *Aspergillus fumigatus*, und endemisch vorkommende, klassisch dimorphe Pilze wie *Histoplasma capsulatum* und *Blastomyces dermatidis* untergliedern (Staib *et al.*, 2000a). Die Mehrheit der fakultativ humanpathogenen Pilzarten gehört der Gattung *Candida* an, die als gemeinsames Merkmal kein bekanntes sexuelles Vermehrungsstadium besitzt und demnach den Fungi imperfecti oder anamorphen Hefen zugeordnet wird. Medizinisch von Bedeutung sind nur wenige der insgesamt etwa 200 *Candida*-Arten. Dabei treten neben dem am häufigsten vorkommenden opportunistischen Erreger *Candida albicans*, der für über 60% aller *Candida*-Mykosen (Candidose) verantwortlich ist, zunehmend auch Infektionen durch *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei* und *C. dubliniensis* auf. Im Gegensatz zu freilebenden *Candida*-Arten stellt der Mensch selbst das Haupthabitat von *C. albicans* dar, zumal er bei etwa der Hälfte der Bevölkerung als harmloser Kommensale den Gastrointestinaltrakt, aber auch die Schleimhäute im Mund und Urogenitalbereich besiedelt. Demnach sind die meisten *C. albicans*-Infektionen endogenen Ursprungs, die

aufgrund einer Schwächung des Immunsystems oder einer Gleichgewichtsstörung in der Mikroflora des Wirtes zum Ausbruch kommen (Nucci and Anaissie, 2001). Daneben wurden vereinzelt auch exogene Schmierinfektionen beschrieben. Eine Candidose kann oberflächliche Körperbereiche betreffen, aber auch zum Befall tieferer Gewebeschichten, bis hin zu inneren Organen führen (Engelmann, 1999). Das lokal an Schleimhäuten in der Mundhöhle, Ösophagus und Vagina auftretende Krankheitsbild mit sichtbaren *Candida*-Belägen wird dabei als Soor bezeichnet. Bei HIV-Infektionen im fortgeschrittenen Stadium gilt *C. albicans* als Leiterreger für Infektionen im Mund- und Rachenraum, weshalb diese Infektionen daher regelmäßig oder dauerhaft therapiert werden müssen. Im Gegensatz dazu sind die invasiven *C. albicans*-Infektionen mit systemischem Verlauf oft lebensbedrohlich. Bei diesen Candidosen handelt es sich meist um nosokomiale Infektionen, die hauptsächlich mit der Immunsuppression von Patienten durch operative Eingriffe oder Chemotherapie in Verbindung gebracht werden (Velasco *et al.*, 2000). Der Erreger kann dabei über die Blutbahn disseminieren und sämtliche innere Organe befallen, so daß eine Mortalitätsrate von über 30% zu verzeichnen ist (Kullberg and Oude Lashof, 2002; Martin *et al.*, 2003).

Pilze sind eukaryontische Organismen und haben deshalb wie ihr menschlicher Wirt ähnliche zellbiologische Strukturen. Anders als bei Bakterien, bei denen man gezielt die andersartige Zellorganisation durch Antibiotika bekämpfen kann, sieht man sich bei der Therapie von Mykosen mit der Schwierigkeit konfrontiert, daß es nur eine begrenzte Auswahl an selektiven Angriffspunkten in der Pilzzelle gibt. Zudem muß aufgrund der z. T. starken Nebenwirkungen der heute eingesetzten Antimykotika oft eine Abwägung zwischen Nutzen und Schaden für den Patienten gemacht werden. Der wachsende Bedarf und Einsatz der zur Verfügung stehenden Wirkstoffe fördert auch die unerwünschte Entstehung von Resistenzen innerhalb der Pilze. Deshalb wird ein Schwerpunkt auf die Erforschung möglicher neuer zellulärer Angriffsmöglichkeiten auf Seiten des Pilzes zur Entwicklung neuartiger Antimykotika gelegt. Zudem ist auch die Optimierung der bekannten Wirkstoffe Gegenstand der derzeitigen Forschung. Klinische Verwendung finden zur Zeit antimykotische Medikamente aus fünf Stoffklassen, die auf unterschiedlichen Wirkmechanismen beruhen (Georgopapadaku, 1998). Die Polyene, z. B. Amphotericin B, stören die Membranfunktion durch Anlagerung an das dort vorhandene Ergosterol. Azole, z. B. Fluconazol, und Allylamine, z. B. Terbinafin, inhibieren die Ergosterol-Biosynthese an unterschiedlichen Stellen. Die weniger häufig eingesetzten Fluoropyrimidine, z. B. 5-Flucytosin, greifen in den RNA-Metabolismus und in die DNA-Synthese ein. Gute Wirksamkeit und Verträglichkeit verspricht die neue Stoffklasse der Echinocandine, z. B. Caspofungin, welche die β -(1,3)-Glukan-Synthese und somit den

Aufbau der Pilz-Zellwand inhibieren (Maschmeyer and Ruhnke, 2004).

Trotz der entscheidenden Rolle der Umweltfaktoren, die durch den Wirt vorgegeben werden, ist auch der Pilz selbst verantwortlich für die Aufrechterhaltung und Fortgang einer Infektion. Pathogene Pilze unterscheiden sich von den apathogenen Vertretern insofern, als sie über bestimmte pathogenitätsrelevante Eigenschaften, sogenannte Virulenzfaktoren, verfügen. Um mögliche Virulenzfaktoren speziell in *C. albicans* zu untersuchen, wurden im letzten Jahrzehnt Methoden zur genetischen Manipulation dieser Hefe entwickelt. Außerdem sind inzwischen Tiermodelle von oberflächlichen und systemischen *Candida*-Infektionen etabliert, welche der Evaluierung möglicher Pathogenitätsmerkmale und dem besseren Verständnis der Beziehung zwischen Erreger und Wirt dienen (de Repentigny, 2004).

2.2 Virulenzfaktoren und andere zellbiologische Eigenschaften von *C. albicans*

Anders als bei pathogenen Bakterien, wo oft nur wenige Determinanten ihre Virulenz bestimmen, verfügt *C. albicans* über ein vielseitiges Repertoire an einzigartigen Merkmalen und Mechanismen, die als putative Virulenzfaktoren gehandelt werden (Navarro-García *et al.*, 2001). Dadurch gelingt es dem opportunistisch pathogenen Erreger, sich bei entsprechender Disposition des Wirtes an unterschiedlichste Wirtsnischen anzupassen und dort zu vermehren. Dies impliziert aber zugleich, daß ein komplexes Zusammenspiel der einzelnen Faktoren nötig ist, um flexibel in Abhängigkeit vom umgebenden Milieu erfolgreich die Besiedlung zu gewährleisten. Dies erschwert allerdings zudem die Identifizierung der Faktoren und die Beurteilung ihrer Bedeutung während einer Infektion. Im folgenden werden nun die für *C. albicans* charakteristischen Pathogenitätsmerkmale und, soweit bekannt, die zugrunde liegenden genetischen Strukturen vorgestellt.

Adhärenz

Ein wichtiges Kriterium der Virulenz von *C. albicans* stellt die Besiedlung des Wirtes dar. Die Adhärenz an Epithelzellen der Schleimhaut ist dabei der initiale Schritt, der für eine Invasion in tiefere Gewebeschichten nötig ist. Die Bindung des Pilzes an Epithel-, aber auch Endothelzellen über Zuckermoleküle oder Wirtsproteine (Extrazelluläre Matix) verhindert oder mindert zumindest die Fähigkeit des Wirtes, den Keim zu eliminieren (Calderone and Fonzi, 2001). Verantwortlich für diese Prozesse ist die Zellwand, die aus β -Glukanen, Chitin

und Mannoproteinen besteht. Sie sorgt als dynamische Struktur außerdem für den Erhalt der Zellmorphologie und für die Bereitstellung antigener und immunmodulatorischer Eigenschaften (Navarro-García *et al.*, 2001). Die frühe Entdeckung nicht-adhäsiver, avirulenter Spontanmutanten gab Anlaß zur Identifikation von Proteinen des Pilzes, die an den Adhäsion-Rezeptor-Interaktionen beteiligt sind (Calderone and Braun, 1991). Eine ganze Genfamilie, bestehend aus bisher acht bekannten Vertretern, kodiert für glykosylierte Zelloberflächenproteine mit Homologie zum *S. cerevisiae* α -Agglutinin Protein, das für die Zell-Zell-Erkennung während des „matings“ nötig ist. Diese *ALS*-Gene („agglutinin like sequence“), von denen zumindest für Als1p, Als3p und Als5p (Ala1p) eine adhäsive Funktion nachgewiesen werden konnte, werden während der Infektion differentiell exprimiert und dienen deshalb wahrscheinlich der Anpassung an unterschiedliche Wirtsnischen durch Erzeugung variabler Zelloberflächenprofile (Hoyer, 2001; Zhao *et al.*, 2004). Genauso wie diese, ist das Mannoprotein Hwp1p an Zellwandglukane gekoppelt und gilt als wichtiges Adhäsion. Die Synthese dieses Proteins ist eng verbunden mit der Ausbildung von Keimschläuchen und echten Hyphen. Außerdem besitzen es eine Domäne, die Ähnlichkeit mit Substraten für Transglutaminasen aufweist (Staab *et al.*, 1999). Diese Enzyme des Wirtes, die durch die Quervernetzung von Oberflächenproteinen für die Stabilität von Epithelzellschichten sorgen, könnten somit auch bei einer Infektion mit *C. albicans* durch molekulare Mimikry hilfreich für die Besiedlung und Penetration von Zellschichten sein. Eine enge Verknüpfung zwischen der Fähigkeit zur Adhärenz, Hyphenbildung und Virulenz wurde bei Untersuchungen an einer Mutante des *INT1*-Gens deutlich, das für ein Transmembranprotein mit geringfügiger Homologie zu Säuger-Integrinen kodiert, da eine defekte Adhärenz an humane Epithelzellen und defektes Hyphenwachstum *in vitro* mit einer abgeschwächten Virulenz *in vivo* einherging (Gale *et al.*, 1998). Daneben wurde für einige Mannosyltransferasen wie Mnt1p, Pmt1p und Pmt6p eine Funktion in der Adhärenz von *C. albicans* nachgewiesen (Buurman *et al.*, 1998; Timpel *et al.*, 1998; Timpel *et al.*, 2000). Ein weitgehend unerforschtes Gebiet ist die Fähigkeit von *C. albicans*, an implantierte medizinische Geräte zu adhäreren und widerstandsfähige Biofilme zu bilden, was vielfältige adhäsive Prozesse sowohl an künstlichen Oberflächen, als auch an intra- und interspezifischen Zelloberflächen einschließt (Douglas, 2003).

Dimorphismus und Signaltransduktion

Als Dimorphismus bezeichnet man die Fähigkeit von *C. albicans*, zwischen der einzelligen Hefeform und dem mehrzelligen filamentösen Wachstum je nach Umwelteinflüssen zu wechseln. Während sich die rund-ovalen, ca. 3-5 µm im Durchmesser großen Blastosporen nach der Knospung abtrennen, bildet der Pilz auch verzweigte Ketten länglicher Zellen, die man Pseudohyphen nennt, und echte Hyphen, in denen Septen die einzelnen Zellen voneinander trennen. Letztere Eigenschaft ist beschränkt auf die Spezies *C. albicans* und *C. dubliniensis* und kann auch *in vitro* durch neutralen pH, erhöhte Temperatur, Mangel an Nährstoffen oder Anwesenheit von Serum induziert werden (Ernst, 2000). Viele Versuche wurden unternommen, um Beweise einer eindeutigen Assoziation zwischen filamentösem Wachstum und der Virulenz zu erbringen, zumal Keimschläuche stärker adhären als Hefezellen und mit Zerstörung von Wirtszellen nach einer Phagozytose in Verbindung gebracht wurden (Cutler, 1991; Kimura and Pearsall, 1980). Tatsächlich kann diese Frage bis heute nicht eindeutig beantwortet werden, da eine Virulenzattenuation für definierte regulatorische Mutanten beobachtet wurde, die entweder nur in Hefeform oder nur in Hyphenform wachsen konnten (Braun *et al.*, 2000; Braun and Johnson, 1997; Lo *et al.*, 1997). Inzwischen ist die Annahme verbreitet, daß beide Formen in koordinierter Weise zur Pathogenität beitragen. Unterstützt wird diese Annahme dadurch, daß in infizierten Geweben *in vivo* beide morphologischen Formen detektiert werden konnten. Erschwert wird das Verständnis zudem durch die Beobachtung, daß bestimmte Hyphen-spezifische Gene durch dieselben regulatorischen Moleküle angeschaltet werden, die auch die morphologische Transition kontrollieren. Dazu gehören Adhäsionsfaktoren wie *HWPI* aber auch sekretorische Proteinasen (Brown, 2002a). Deswegen ist es unmöglich, eine Virulenzattenuation dem morphologischen Defekt zuzuschreiben, da sich auch die Expression möglicher wichtiger pathogenitätsrelevanter Gene ändern kann.

In den letzten Jahren wurde das Verständnis um die regulatorischen Netzwerke des Dimorphismus immer besser, so daß einige Signaltransduktionswege identifiziert werden konnten, die bei ihrer Aktivierung die Ausbildung von Keimschläuchen einleiten. Die wichtigsten sind die Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK-) Kaskade und der cAMP-abhängige Signalweg (Brown, 2002b; Ernst, 2000). Dabei handelt es sich um konservierte Signalwege, die durch vergleichende Studien mit der besser charakterisierten Bäckerhefe identifiziert wurden. Die MAPK-Kaskade endet in der Aktivierung des Transkriptionsfaktors Cph1p. Eine Deletion des *CPHI*-Gens in *C. albicans* führt lediglich auf bestimmten Agar-

Medien *in vitro* zu einer verminderten Filamentbildung, und übereinstimmend dazu hatte sie keinen Einfluß auf die Virulenz dieser Mutante im Tiermodell (Lo *et al.*, 1997). Ein weiterer Transkriptionsfaktor *EFG1*, der cAMP und Proteinkinase A unterstellt ist und ein DNA-bindendes basisches Helix-Loop-Helix-Motiv aufweist, scheint dagegen eine wichtigere Rolle für die Ausbildung der Hyphenform zu haben, da diese bei einer *efg1*-Mutante in Serumhaltigem Medium *in vitro* unterbunden war, und die *efg1*-Mutante im Tiermodell weniger virulent war (Lo *et al.*, 1997; Stoldt *et al.*, 1997). Am stärksten avirulent erwies sich dahingegen die *cph1-efg1*-Doppelmutante, was auf die Beteiligung beider Signalwege an der Virulenz hindeutet (Lo *et al.*, 1997; Stoldt *et al.*, 1997). Neben diesen beiden Transkriptionsfaktoren gibt es noch weitere Regulatoren, die zum einen aktivierend auf das filamentöse Wachstum einwirken, wie z. B. *CZF1* und *TECI* (Brown *et al.*, 1999; Schweizer *et al.*, 2000), und zum anderen reprimierende Funktion erfüllen, wie z. B. *TUP1* und *NRG1* (Braun *et al.*, 2000; Braun and Johnson, 1997; Braun *et al.*, 2001), um den morphologischen Status der Hefezellform aufrechtzuerhalten.

Die hier aufgeführten Faktoren stellen nur eine Auswahl dar, welche die Morphologie von *C. albicans* beeinflussen. Obwohl viele Regulatoren und Wachstumsphasen-spezifische Proteine charakterisiert worden sind, sind die Zusammenhänge jedoch bislang nur lückenhaft erschlossen. Daher ist die Einschätzung ihrer Bedeutung für die Infektion und verschiedene Infektionsstadien sehr schwierig.

Sekretion hydrolytischer Enzyme

Die sekretierten Aspartylproteinasen (SAPs) und Phospholipasen sind zwei große Familien von hydrolytischen Enzymen in *C. albicans*, bei denen vorwiegend die SAPs an der Virulenz beteiligt sind. Von den vier bekannten Phospholipasen wurde bisher nur Plb1p näher untersucht. Plb1p konnte an den Hyphenenden während der Gewebeinvasion nachgewiesen werden und war nötig für die Pathogenität im Tiermodell, da sich eine Deletionsmutante als avirulent erwies (Ghannoum, 2000). Der SAP-Familie, die zehn Mitglieder in *C. albicans* umfaßt, wird durch ihre Fähigkeit, Wirtsproteine abzubauen, eine direkte Beteiligung an der Pathogenität des Pilzes zugeschrieben. Während SAP1-8 über Sekretionsvesikel in den Extrazellularraum entlassen werden (Schaller *et al.*, 1999), bleiben SAP9 und SAP10 über einen Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol-Anker an die Zellmembran angeheftet (Albrecht *et al.*, 2004). In einigen Studien der letzten Jahre wurde gezeigt, daß die *SAP*-Gene während des Infektionsprozesses differentiell reguliert und exprimiert werden. So werden die

verschiedenen *SAP*-Gene unterschiedlich je nach Typ und Stadium der Infektion angeschaltet (Naglik *et al.*, 2004; Staib *et al.*, 2000c). Die Gene *SAP1-3* sind außerdem Hefeform-spezifisch, *SAP4-6* jedoch werden spezifisch in der Hyphenform exprimiert. Die einzelnen Mitglieder der *SAP*-Familie erfüllen mannigfache Funktionen (Naglik *et al.*, 2004). Expressionsdaten belegen eine Rolle bei der Ausbildung von Biofilmen, phänotypischem „Switching“ und Dimorphismus. Aus Funktionsanalysen mit *SAP*-Proteinen konnte man ihre Beteiligung an Adhäsion, Invasion und Zerstörung von Haut und Gewebe sowie Nährstoffversorgung und Interaktion mit dem Wirtsimmunsystem zeigen. Aber auch die Aspekte, daß sie über voneinander unabhängigen Transkriptionsfaktoren kontrolliert werden, und daß eine koordinierte Expression zusammen mit anderen Virulenzeigenschaften, wie Hyphenausbildung und phänotypischem „Switching“, stattfindet, weisen darauf hin, daß sie zur enormen Flexibilität des Pilzes beitragen, um verschiedene Wirtsnischen zu besiedeln und den Fortschritt der Infektion zu gewährleisten.

Phänotypisches „Switching“ und Mating

Ein reversibles Wechseln des sichtbaren Phänotyps der Zell- und Koloniemorphologie in *C. albicans* bezeichnet man als phänotypisches „Switching“. Dies kann spontan erfolgen und geht mit Veränderungen bezüglich der Eigenschaften der Adhärenz, Antigen-Expression und Gewebeaffinität einher. Dieses Phänomen trägt zu einer noch größeren Plastizität des Organismus bei und wurde vor allem bei dem sogenannten „white-opaque-Switching“ des WO1-Stammes untersucht (Slutsky *et al.*, 1987), wurde aber auch in anderen klinischen Isolaten beobachtet (Calderone and Fonzi, 2001). Die Transition zwischen der „white“ und „opaque“ Phase schließt die koordinierte Aktivierung und Deaktivierung vieler phasenspezifischer Gene ein, die nicht nur für die morphologische Transition verantwortlich sind, sondern auch metabolische Spezifizierungen widerspiegeln, die dem Erreger bei der Anpassung an verschiedene Wirtsnischen helfen könnten (Lan *et al.*, 2002).

Als Meilenstein der *C. albicans*-Forschung gilt eine Entdeckung der letzten Jahre, die im unmittelbaren Zusammenhang mit dem „white-opaque Switching“ steht. In *C. albicans*, von dem bis dahin kein sexueller Zyklus bekannt war, wurde „Mating“ beobachtet (Hull *et al.*, 2000; Magee and Magee, 2000). Allerdings ist dieser Prozeß von dem klassischen sexuellen Zyklus zu unterscheiden, in dem durch eine meiotische Teilung ein haploider Chromosomensatz beteiligt ist, sondern hier verschmelzen diploide Kerne zweier Zellen zu einem tetraploiden, der daraufhin wiederum durch Chromosomenverlust zu einem diploiden

Kern revertiert. Die Mating-Kompetenz ist an das „opaque“-Stadium gebunden und generell können nur die Stämme „maten“, die homo- oder hemizygot bezüglich ihres „mating type like“ Locus (*MTL*) sind (Lockhart *et al.*, 2002; Miller and Johnson, 2002). Die meisten *C. albicans*-Stämme sind jedoch heterozygot, sie besitzen sowohl *MTLa* als auch *MTL α* und zeigen deswegen keine Mating-Aktivität. Von vielen Genen, die in *S. cerevisiae* für das Mating benötigt werden, wurden nun auch homologe Vertreter in dem pathogenen Pilz *C. albicans* identifiziert, und diese übernehmen vergleichbare Funktionen (Magee *et al.*, 2002; Panwar *et al.*, 2003). Erst kürzlich wurde über klinische Isolate berichtet, die eine Mating-Aktivität besitzen und die Autoren postulieren, daß es sich hierbei um eine signifikante Bedeutung im Lebenszyklus von *C. albicans* handeln könnte, mit der molekulare Eigenschaften und Marker weitergegeben werden können (Legrand *et al.*, 2004).

Calcineurin

Calcineurin ist eine weit verbreitete Ca^{2+} /Calmodulin-aktivierte Proteinphosphatase und gehört zur Familie der 2B-Serin/Threonin-spezifischen Proteinphosphatasen. Entdeckt wurde es vor etwa 25 Jahren und den Namen „Calcineurin“ erhielt es aufgrund seiner Calcium-bindenden Eigenschaft und der ersten Lokalisierung in neuronalem Gewebe (Klee *et al.*, 1979; Klee and Krinks, 1978). Die Konserviertheit von Pilzen bis hin zum Menschen stellt seine enorme physiologische Bedeutung heraus, die für vielfältige Prozesse in der Signaltransduktion eine Rolle spielt, wie beispielsweise in der T-Zellaktivierung in der menschlichen Immunantwort (Rusnak and Mertz, 2000). Calcineurin umfaßt eine katalytische Untereinheit (Calcineurin A) von 57-71 kDa Größe und eine regulatorische (Calcineurin B) Untereinheit mit 19-20 kDa, die beide für seine enzymatische Funktion erforderlich sind. Während Calcineurin A neben der katalytischen Domäne noch über weitere funktionelle Domänen verfügt, welche die Calcineurin B-Bindung, die Calmodulin-Bindung und eine autoinhibitorische Funktion vermitteln, besitzt die kleinere B-Untereinheit lediglich einige Calcium-bindende Motive (Rusnak and Mertz, 2000). Die autoinhibitorische Domäne der A-Untereinheit bindet bei Abwesenheit von Ca^{2+} /Calmodulin im katalytischen Zentrum und inhibiert so das Enzym. Bei Anwesenheit von Ca^{2+} /Calmodulin wird das aktive Zentrum freigegeben und die Interaktion mit der Untereinheit B erhöht gleichsam die Affinität des Enzyms für sein Substrat (Perrino *et al.*, 1995). Calcineurin kann spezifisch durch die Immunsuppressiva Cyclosporin A (CsA) und FK506 inhibiert werden, die in die Zellen diffundieren und sich an ihre entsprechenden Immunophilinen Cyclophilin bzw. FKBP12

binden. Die entstehenden Komplexe CsA-Cyclophilin oder FK506-FKBP12 sind für die spezifische Hemmung verantwortlich (Liu *et al.*, 1991a).

In Pilzen wurde Calcineurin erstmals im Jahr 1991 in *S. cerevisiae* und *Neurospora crassa* isoliert, wobei die Bäckerhefe zwei redundante Isoformen für Calcineurin A besitzt (Cyert *et al.*, 1991; Higuchi *et al.*, 1991; Liu *et al.*, 1991b). Analysen von Mutanten in diesem Organismus zeigten, daß Calcineurin nicht essentiell für das Überleben ist, aber dennoch wichtige Funktionen für die Aufhebung des Pheromon-induzierten Wachstumsarrestes, für die Zellwandbiosynthese und für die Anpassung an hohe Salzkonzentrationen oder an alkalische Bedingungen erfüllt (Mazur *et al.*, 1995; Mendoza *et al.*, 1994; Moser *et al.*, 1996; Nakamura *et al.*, 1993). Diese Reaktionen werden hauptsächlich über die Calcineurin-abhängige Dephosphorylierung und Kernlokalisierung des Transkriptionsfaktors Crz1p/Tcn1p vermittelt, der die Expression von Genen reguliert, die für die Zellwandbiosynthese und die Kationen-Homöostase benötigt werden (Matheos *et al.*, 1997; Stathopoulos and Cyert, 1997; Stathopoulos-Gerontides *et al.*, 1999). In dem pathogenen Pilz *N. crassa* ist Calcineurin essentiell für die Morphologie und für das filamentöse Wachstum (Prokisch *et al.*, 1997), ähnlich wie bei der pathogenen Hefe *Cryptococcus neoformans*, in der Calcineurin für die Hyphenelongation während des Matings und haploiden Fruchtens benötigt wird (Cruz *et al.*, 2001). Darüber hinaus ist es in *C. neoformans* essentiell für das Wachstum bei 37°C, wie sich anhand von Deletionsmutanten der Untereinheit A oder B herausstellte, und somit zeigten diese Mutanten auch *in vivo* im Tiermodell einen avirulenten Phänotyp (Fox *et al.*, 2001; Odom *et al.*, 1997). Vor allem die Beteiligung an virulenzrelevanten Eigenschaften in dieser Hefe, aber auch die Funktionen im filamentösen Wachstum und Streßadaptation in anderen Pilzen macht Calcineurin ebenso in *C. albicans* zu einem interessanten Forschungsobjekt.

2.3 Molekulargenetik zur Untersuchung nicht-essentieller Gene

Im Gegensatz zu der nahe verwandten, apathogenen Bäckerhefe *S. cerevisiae* wird die genetische Manipulation von *C. albicans* durch einige Hindernisse erschwert. Die Charakterisierung eines nicht-essentiellen Gens stützt sich primär auf Phänotypen, die durch die Geninaktivierung in dem untersuchten Organismus verursacht werden. Da *C. albicans* jedoch ein diploider Organismus ohne einen klassischen sexuellen Zyklus ist, müssen zu diesem Zweck beide Allele deletiert werden. Einen Durchbruch in der molekularen *C. albicans*-Forschung gelang Fonzi und Irwin durch die Generierung des *ura3*-auxotrophen Laborstammes CAI4 und der Etablierung der „URA-blaster“-Technik, bei der über homologe

Rekombination eine Mutagenesekassette mit flankierenden „direct repeats“ und dem *URA3*-Gen als Selektionsmarker nacheinander beide Kopien eines Gens ersetzte (Fonzi and Irwin, 1993). Um nach der ersten Transformationsrunde *ura3*-negative Klone zu erhalten, in denen spontan die Deletion des genetischen Markers durch intrachromosomale Rekombination erfolgt war, war eine negative Selektion auf speziellem Nährmedium erforderlich, bevor die zweite Transformation zur Herstellung homozygoter Mutanten durchgeführt werden konnte. Eine Weiterentwicklung des Verfahrens stellt die „*URA3*-Flipper“-Methode dar (Morschhäuser *et al.*, 1999). Dabei wird die „site-spezifische“ FLP- („Flip“-) Rekombinase aus dem *S. cerevisiae* 2 μ Plasmid induzierbar in die Mutagenesekassette integriert, welche die effiziente Deletion der Kassette nach der ersten bzw. zweiten Transformation mit Hilfe ihrer flankierenden Erkennungssequenzen übernimmt. Somit konnten *ura3*-negative Derivate spezifisch mit hoher Frequenz erhalten werden und eine aufwendige negative Selektion wurde umgangen. Daneben wurden auch andere Methoden zur Generierung homozygoter Mutanten beschrieben. Nur einer einmaligen Insertion einer speziellen Mutagenesekassette bedarf es bei der von Enloe *et al.* vorgestellten Methode, bei der eine mitotische Rekombination mit dem zweiten Allel die Selektion homozygoter Mutanten erlaubt (Enloe *et al.*, 2000). Eine weitere benutzt ein PCR-basiertes Protokoll, das eine Klonierung des Zielgens vor der Inaktivierung umgeht (Wilson *et al.*, 2000). Eine Einschränkung der bisher genannten Techniken stellt jedoch die Verwendung von Laborstämmen dar, die bezüglich eines oder mehrerer metabolischer Biosynthesewege auxotroph sind, um bei der Mutagenese eine Selektion durch die genetischen Marker, am häufigsten *URA3*, aber auch *ARG4* und *HIS1*, zu ermöglichen (Fonzi and Irwin, 1993; Wilson *et al.*, 1999). Zum einen können klinisch isolierte Wildtypstämme, die prototroph sind, auf diese Weise nicht manipuliert und analysiert werden. Zum anderen liefert die Nutzung des *URA3*-Selektionsmarkers in den letzten Jahren immer mehr Anlaß zu kritischer Diskussion, da die ektopische Lokalisation des Gens eine variable, meist zu schwache Expressionsstärke nach sich zieht, was mit pleiotropen Effekten unabhängig von der Inaktivierung des Zielgens verbunden sein kann und daher die Interpretation von Ergebnisse erschwert (Brand *et al.*, 2004; Lay *et al.*, 1998; Sundstrom *et al.*, 2002). Deshalb war die Entwicklung dominanter Selektionsmarker, die solche Probleme umgehen, von besonderem Interesse. In jüngster Zeit konnte man den erfolgreichen Einsatz zweier neuartiger Markergene unter Abwandlung der bekannten „*URA3*-Flipper“-Strategie durch Austausch des *URA3*-Gens gegen das *MPA^R*- bzw. das *SAT1*-Gen konstatieren (Reuß *et al.*, 2004; Wirsching *et al.*, 2000). Ersteres verleiht Resistenz gegenüber Mycophenolsäure (MPA) und stellt ein mutiertes Allel der Inosin-Monophosphat-Dehydrogenase aus

C. albicans selbst dar, einem Schlüsselenzym in der Guanin-Biosynthese. Das *SATI*-Gen dagegen stammt aus *Escherichia coli* und verleiht Resistenz gegenüber dem Antibiotikum Nourseothricin. Dafür mußte dieses Gen erst an den unüblichen Codon-Gebrauch in *C. albicans* durch Punktmutagenese angepaßt werden, bei dem das CUG-Codon aufgrund einer speziellen tRNA anstelle von Leucin in Serin übersetzt wird (Santos and Tuite, 1995), eine Schwierigkeit, die generell bei heterologer Expression von Genen in diesem Organismus auftritt. So mußte dies beispielsweise auch bei der Etablierung eines *GFP*-Reportersystems („green fluorescence protein“) berücksichtigt werden (Morschhäuser *et al.*, 1998). Daneben werden auch regulierbare Promotoren zur gezielten Repression von Genen eingesetzt; allerdings findet diese Strategie häufigere Anwendung bei der Untersuchung essentieller Gene (siehe Kapitel 2.4). Groß angelegte Studien, die auf bestimmte Fragestellungen abzielen, eröffneten in den letzten Jahren weitere Möglichkeiten zur Erforschung von Genfunktionen. So nutzten De Backer *et al.* die Promotor-induzierte Expression einer antisense cDNA-Bank in *C. albicans*, um nach wachstumsdefizienten Phänotypen einzelner Klone zu suchen, und konnten so wachstumsrelevante Gene identifizieren (De Backer *et al.*, 2001). Eine interessante Perspektive lieferte auch der Ansatz, durch Transposon-Mutagenese heterozygote Mutanten zu erzeugen und auf Haploinsuffizienz-bedingte Defekte in der Hyphenausbildung zu überprüfen (Uhl *et al.*, 2003).

2.4 Molekulargenetik zur Untersuchung essentieller Gene

Neben Genen, die sich deletieren lassen, ohne daß solche Mutanten ihre Lebensfähigkeit verlieren, gibt es die essentiellen Gene, die unerlässlich für das Überleben des Pilzes sind und deren Mutanten sich auch unter optimalen Wachstumsbedingungen nicht vermehren können. Wie bei allen Eukaryonten schließen sie Gene ein, die für essentielle Komponenten und Enzyme wichtiger Haushaltsfunktionen kodieren wie dem Energiestoffwechsel, der Biosynthese aller zellulären Bestandteile (Nukleinsäuren, Aminosäuren, Zucker und Fettsäuren), sowie der Replikation, Transkription und Translation, aber auch Gene, die an der adäquaten Steuerung des Zellzyklus beteiligt sind, wie Cycline oder Proteinkinasen. Diese Gene sind meist hoch konserviert und finden ihre entsprechenden homologen Vertreter in vielen Organismen von der Hefe bis zum Säugetier. Daneben gibt es Gene, die ausschließlich bei Pilzen vorkommen und dort essentielle Eigenschaft besitzen, wie beispielsweise *VRG4*, ein GDP-Mannose-Transporter des Golgi-Apparates für die Mannosylierung von Proteinen und Lipiden (Nishikawa *et al.*, 2002), oder einige Vertreter der Ergosterol-Biosynthese *ERG9*

und *ERG20* (beide putativ essentiell) und *ERG26* (Aaron *et al.*, 2001; Davis *et al.*, 2002). Nach neueren Erkenntnissen stellte man allerdings fest, daß essentielle Gene der Modellhefe *S. cerevisiae*, deren Mutanten fast immer Basis vergleichender funktioneller Studien darstellten, nicht unbedingt ein essentielles Homolog in *C. albicans* haben müssen. Beispiele dafür lieferten Roemer *et al.* in einer groß angelegten Studie, worin insgesamt 1152 Gene in *C. albicans* untersucht wurden, von denen 823 homologe essentielle Vertreter in *S. cerevisiae* besitzen (Roemer *et al.*, 2003). Davon stellten sich allerdings nur 61% als essentiell in *C. albicans* heraus. Auch andere Publikationen untermauern diesen Standpunkt (Biswas *et al.*, 2003; Nagahashi *et al.*, 1998). Hinzu kommt, daß annähernd 40% der *C. albicans*-Gene nach der BLAST-Analyse ($P < 1 \times 10^{-20}$) kein identifizierbares Bäckerhefe-Homolog besitzen (Roemer *et al.*, 2003). Dies weist darauf hin, daß beide Pilze sich in ihrer Fähigkeit unterscheiden, Nullmutationen „abzupuffern“, was sich in einem unterschiedlichen Satz an essentiellen Genen widerspiegelt (Hartman *et al.*, 2001). Neben den Pilz-spezifischen essentiellen Genen ist dieser Satz an *Candida*-spezifischen essentiellen Genen von besonderem Interesse für die Nutzung als mögliche Angriffsziele für Antimykotika, da diese hochspezifisch und ohne toxische Nebenwirkungen agieren könnten.

Um die Auswirkungen des Verlustes eines essentiellen Gens zu studieren, bedarf es der Konstruktion konditional letaler Mutanten, da konventionelle Nullmutanten nicht überlebensfähig sind. Eine ganze Reihe von Strategien wurde hierfür in den letzten Jahren entwickelt, wobei sich die Mehrheit bei *C. albicans* den Einsatz regulierbarer Promotoren zunutze macht, unter deren Kontrolle das zu untersuchende Gen gestellt wird. Dabei sind die *GAL1*-, *MAL2*-, *MET3*- und *PCK1*-Promotoren zu nennen, die in Abhängigkeit von der Verfügbarkeit bestimmter Substrate im Medium aktiviert oder reprimiert werden (Brown *et al.*, 1996; Care *et al.*, 1999; Gorman *et al.*, 1991; Leuker *et al.*, 1997). Das Tetracyclin-regulierbare Promotor-System, das aus *E. coli* entnommen wurde, ist an die Nutzung in vielen eukaryontischen Organismen, unter anderem *C. albicans*, angepaßt worden, so daß eine konstitutive Expression eines Gens bei Abwesenheit und eine Repression bei Anwesenheit von Tetracyclin erfolgen kann (Nakayama *et al.*, 2000). Dieses System findet vielfach Verwendung bei der Untersuchung nicht nur essentieller Gene und erlaubt sogar einen Einsatz im Tiermodell (Roemer *et al.*, 2003). Eine weitere Möglichkeit bietet die experimentelle Suche nach temperatursensitiven Mutanten des Gens von Interesse, bei denen ein Funktionsverlust des Genprodukts meist aufgrund von Punktmutationen unter nicht-permissiven Bedingungen auftritt. Obwohl diese Strategie häufig in *S. cerevisiae* angewendet wird, stellte sich eine Übertragung dieser Technik auf *C. albicans* bisher als schwierig heraus.

Nicht den gewünschten Erfolg erzielte beispielsweise eine Integration einer äquivalenten temperatursensitiven Mutation aus der Bäckerhefe in ein essentielles Homolog in *C. albicans*, da sie zwar einen Funktionsverlust des Gens hervorrufen konnte, dieser aber nicht temperaturabhängig war (Weinberg *et al.*, 1995). Ein positives Beispiel dagegen lieferte eine Analyse von temperatursensitiven Mutanten des *ESS1* Prolyl-Isomerase-Gens auf Basis der beschriebenen Mutationen in *S. cerevisiae*, die zur funktionellen Aufklärung dieses Gens beitragen konnte (Devasahayam *et al.*, 2002). In der hier vorliegenden Arbeit wurde eine erst kürzlich vorgestellte Methode zur Herstellung konditionaler Mutanten in *C. albicans* eingesetzt, die eine Generierung echter Nullmutanten durch induzierbare FLP-Rekombinase-vermittelte Gendeletion ermöglicht (Michel *et al.*, 2002).

2.5 Chromatin-modifizierende Komplexe und die Ribosomen-Biosynthese

Chromatin-modifizierende Komplexe

Die Chromatinstruktur spielt eine wichtige und dynamische Rolle in der Genregulation (Kadonaga, 1998). Die Strukturen des Chromatins, d. h. die unterschiedliche Packungsdichte der DNA durch die Anlagerung von Histon-Oktameren (Nukleosomen), müssen den Anforderungen der notwendigen Aktivierung oder Reprimierung von Genen in Abhängigkeit des Zellzyklus oder infolge von Umweltsignalen genügen. So ist es notwendig, daß entsprechende DNA-Sequenzen für die Transkriptionsmaschinerie zugänglich oder versperrt werden. In den letzten Jahren wurden Faktoren und Mechanismen für die Modifikation von Chromatin durch genetische und biochemische Experimente in der Bäckerhefe, in *Drosophila* und im Menschen aufgedeckt (Narlikar *et al.*, 2002). Neben der Aufgabe der Transkriptionskontrolle sind diese Mechanismen aber auch fundamental für andere bekannte nukleäre Prozesse wie der Replikation, Rekombination und DNA-Reparatur. Die modifizierenden Faktoren können in zwei grundlegende Klassen unterteilt werden. Die erste Gruppe umfaßt Enzym-Komplexe, die in kovalenter Weise die N-terminalen Bereiche der Histone modifizieren, wie Acetylierungen und Deacetylierungen, Methylierungen und Phosphorylierungen (Strahl and Allis, 2000). Aber nur ein Zusammenspiel mit der zweiten Klasse der nicht-kovalent modifizierenden Faktoren erlaubt eine effektive Transkriptionskontrolle, da sie die Positionierung der Nukleosomen, welche die DNA maskieren, verändern können. Diese ATP-abhängigen „Chromatin-remodelierenden“

Faktoren sind Proteinkomplexe aus vier bis 15 Untereinheiten, die je nach Identität ihrer katalytischen ATPase-Untereinheit in drei Klassen unterteilt werden (Narlikar *et al.*, 2002). Die wichtigste Klasse stellt die Familie der SWI/SNF remodelierenden Komplexe dar, deren Prototyp in *S. cerevisiae*-Zellen aber nur in kleiner Anzahl vorkommt und für die Transkriptionskontrolle von nur etwa 6% aller Hefegene benötigt wird (Sundarsanam *et al.*, 2000). Dementsprechend ist er auch nicht essentiell für das Überleben des Pilzes. Im Gegensatz dazu steht der zum SWI/SNF homologe RSC-Komplex („remodels the structure of chromatin“), der in vielen Kopien pro Zelle vorhanden ist und essentielle Bedeutung besitzt (Cairns *et al.*, 1996). Seine Zusammensetzung kann geringfügig variieren, jedoch bleiben die ATPase-Einheit und ein Großteil der insgesamt 15 Proteine stabil im Komplex integriert (Angus-Hill *et al.*, 2001; Cairns *et al.*, 1999). Für die Mechanismen der experimentell beobachteten Umpositionierung der Nukleosomen werden zwei Modelle diskutiert (Narlikar *et al.*, 2002). Zum einen wird vermutet, daß die remodelierenden Komplexe die DNA aktiv an den Nukleosomen entlanggleiten lassen („sliding mechanism“). Allerdings ist diese Vorstellung unzureichend, da dies lediglich die Lage der Nukleosomen verändert, ohne letztlich längere DNA-Abschnitte freizusetzen. Dies ist aber vor allem von Bedeutung, wenn eine hohe Dichte an Nukleosomen vorliegt. Deshalb schlagen Narlikar und Kollegen eine durch die ATP-Hydrolyse induzierte transiente Konformationsänderung des Histon-Oktamers vor, in der die DNA an der Nukleosomen-Oberfläche zugänglich gemacht wird (Narlikar *et al.*, 2002). Dabei können beim Zurückfallen in die energetisch niedrigere Normal-Konformation zufällige Translokationen der Nukleosomen auftreten. Eine Substratspezifität wird durch die übrigen Untereinheiten des Komplexes vermittelt, die eine Reihe funktioneller Domänen besitzen und so den Komplex entweder direkt oder indirekt über eine Interaktion mit Transkriptionsfaktoren spezifisch an DNA-Abschnitte dirigieren. Daneben können sie auch Einfluß auf die Regulation des Komplexes nehmen, die beispielsweise seine Effizienz oder den Endzustand der Chromatin-Modellierung betreffen. Für zusätzliche Regulation sorgt die bereits erwähnte Kooperation der Komplexe mit den kovalenten Modifikationen. Hyperacetylierungen an den N-Termini der Histone werden schon seit 40 Jahren mit der Transkriptionsaktivierung von Genen in Verbindung gebracht (Allfrey *et al.*, 1964). Physikalisch erklären läßt sich das durch eine mögliche Verringerung der Stabilität der Interaktion zwischen Histonen und der DNA durch eine Verringerung der positiven Ladung der Proteine (Narlikar *et al.*, 2002). Außerdem können Acetylierungen die internukleosomalen Interaktionen, die über die N-Termini vermittelt werden, erschweren und so die Packungsdichte der Nukleosomen in einem DNA-Abschnitt verringern (Tse *et al.*,

1998). Eine mögliche Rekrutierung zusätzlicher Faktoren durch kovalente Modifikationen ist ebenfalls denkbar. Eine Kombination aus nicht-kovalenten und kovalenten Modifikationen bestimmt somit die Aktivität von Genen. Dabei können sie sowohl in einer aktivierenden als auch in einer reprimierenden Weise bezüglich der Expression von Genen agieren und stellen wichtige Mechanismen für vielfältige zelluläre Prozesse dar, wie Zellzyklus-Progression oder Anpassung an stressvolle Bedingungen (Angus-Hill *et al.*, 2001; Damelin *et al.*, 2002; Koyama *et al.*, 2004).

Ribosomen-Biosynthese

Eine Vielzahl essentieller Gene ist an den Prozessen der Transkription und Translation beteiligt. Selbstverständlich gehören Genprodukte wie RNA-Polymerasen, sowie die Untereinheiten der Ribosomen, die sowohl ribosomale Proteine und als auch ribosomale RNA (rRNA) umfassen, und die Faktoren für den Fortschritt der Translation zu essentiellen Bestandteilen, die der Aufrechterhaltung der Lebensfunktionen dienen. Jedoch wird den Prozessen vor der Translation meist wenig Beachtung geschenkt, obwohl die Ribosomenbiosynthese eines der komplexesten und zugleich hoch konservierten Systeme darstellt. Sie findet vorwiegend im Nukleolus statt, einem speziellen Kompartiment im Zellkern. Der Großteil des Wissens um diese Abläufe stammt aus Studien mit der Bäckerhefe als Modellorganismus eukaryontischer Systeme. Angesichts der Zahl von ca. 200000 Ribosomen in einer exponentiell wachsenden *S. cerevisiae*-Zelle (Warner, 1999) wird verständlich, daß die Produktion dieses RNA-Protein-Komplexes hocheffizient ablaufen muß. Um so interessanter ist es, daß innerhalb kürzester Zeit über 100 nicht-ribosomale Proteine in kooperativem Zusammenspiel dabei mitwirken (Fatica and Tollervey, 2002). Dazu wurden für manche keine enzymatischen Aktivitäten vorausgesagt, andere gehören zu Endo- und Exonukleasen, modifizierenden Enzymen, AAA-Typ ATPasen (mit vielfältigen zellulären Aktivitäten assoziierte ATPasen), GTPasen und ATP-abhängige RNA-Helikasen, welche die größte Klasse repräsentieren (Kressler *et al.*, 1999). Diese sind selbst stadienabhängig in verschiedenen Komplexen aus multiplen Komponenten (Prä-Ribonukleoprotein-Partikel, Prä-RNPs) zusammen mit ribosomalen Proteinen und rRNAs sowie kleinen nukleolären RNAs (snoRNAs) organisiert. Mutanten eines Großteils dieser Faktoren sind nicht überlebensfähig (Kressler *et al.*, 1999; Venema and Tollervey, 1999).

Die Synthese beginnt mit der Transkription des rRNA-Genclusters, das in 100-200 genomischen Wiederholungen (Warner, 1999) organisiert ist, durch die RNA-Polymerase I,

wodurch das Primärtranskript der 35S prä-rRNA entsteht. Nicht enthalten ist darin die 5S prä-rRNA, die durch die RNA-Polymerase III synthetisiert und daraufhin lediglich an ihrem 3'Ende prozessiert wird, bevor sie erst später in einen prä-60S-Partikel gelangt. Das 35S-Primärtranskript setzt sich zusammen aus 5'ETS („external transcribed spacer“), 18S rRNA, ITS1 („internal transcribed spacer“), 5.8S rRNA, ITS2, 25S rRNA und dem 3'ETS-Bereich (siehe Abb. 37A). Kotranskriptional lagern sich die prozessierenden Proteine und snoRNAs an dieses Transkript an und bilden so das 90S prä-Ribosom, das eine adäquate Faltung und eine präzise Positionierung der einzelnen prozessierenden Faktoren ermöglicht, um wichtige Modifikationen wie Ribose-Methylierungen und Pseudouridineinbau und die ersten endonukleolytischen Spaltungen der 5'ETS vorzunehmen. Als wichtigster Vertreter der snoRNAs ist hier die U3 snoRNA zu nennen, die durch Basenpaarung mit der 5'ETS essentiell für die ersten Prozessierungsschritte und die Generierung der 18S rRNA ist. Neueren Erkenntnissen zufolge nennt man diesen U3 snoRNA-assoziierten Proteinkomplex nach seinem Substrat und seiner Funktion das „small subunit“ (SSU-) Prozessom (Dragon *et al.*, 2002). Nach einer weiteren endonukleolytischen Spaltung innerhalb der ITS1-Region entstehen der prä-40S- und prä-60S-Partikel, in denen sich im ersteren die 20S rRNA-Vorstufe für die reife 18S rRNA und im letzteren die 27SA₂ rRNA-Vorstufe für die reifen 5.8S und 25S rRNAs befinden. Der 40S prä-RNP enthält viele Komponenten des ursprünglichen 90S prä-RNPs und wird aus dem Kern ins Cytoplasma entlassen, wo die endgültige Reifung der 18S rRNA und der kleinen Ribosomenuntereinheit stattfindet. Im Unterschied dazu ist die Reifung der 60S Untereinheit wesentlich komplexer. Der entstandene 60S prä-RNP hat kaum Komponenten mit dem 90S-Partikel gemeinsam (Grandi *et al.*, 2002) und wandelt sich im Lauf der rRNA-Prozessierung in dynamischer Weise, so daß zwischen frühen, mittleren und späten 60S prä-RNPs unterschieden wird (Nissan *et al.*, 2002). Mit voranschreitender Reifung wandert der Komplex vom Nukleolus in den Nukleus und schließlich ins Cytoplasma, begleitet von einer Abnahme seiner Komplexität und der Zahl der assoziierten Faktoren (Fatica and Tollervey, 2002; Nissan *et al.*, 2002). Bevor er aber den Zellkern verläßt, wird die 27SA₂ prä-rRNA zu den reifen 5.8S und 25S rRNAs prozessiert, was auf zwei alternativen Wegen erfolgen kann. Zum einen kann das 5'Ende über eine 27SA₃-Zwischenstufe exonukleolytisch abgebaut werden, die dann hin zum reifen 5'Ende der 5.8S rRNA prozessiert wird, wobei die 27SB_S-Spezies entsteht. Die weniger benutzte Alternative stellt die sofortige Prozessierung bis hin zu einem reifen 5'Ende der 5.8S rRNA dar, wobei aber ein leicht verlängertes Produkt, die 27SB_L prä-rRNA, entsteht. Aus der anschließenden Spaltung beider 27SB-Spezies im ITS2-Bereich gehen die 7S und die 25.5S

prä-rRNAs hervor, die exonukleolytisch zu den reifen 5.8S und 25S rRNAs prozessiert werden (siehe Abb. 37A). Im Cytoplasma erfolgen schließlich die wenigen letzten Reifungsschritte des 60S prä-Ribosoms, bevor die große und die kleine Untereinheit zu einem funktionsfähigen Ribosom zusammengefügt werden.

In *C. albicans* sind diese Abläufe noch gänzlich unerforscht, jedoch kann man angesichts des hohen Verwandtschaftsgrades der beiden Ascomyceten und angesichts der hohen Konserviertheit in allen Eukaryonten von einer weitgehenden Übereinstimmung der Prozesse ausgehen. Betrachtet man die aus den Datenbanken entnommenen genomischen Daten für die jeweiligen rRNA-Gene, so unterscheiden sie sich in ihrer Länge nur um wenige Basen (*S. cerevisiae*: 1800 b, 158 b und 3396 b für jeweils 18S, 5.8S und 25S rRNA; *C. albicans*: 1788 b, 157 b und 3360 b für entsprechende rRNAs). Allerdings sind beide ITS-Bereiche zusammen in *C. albicans* um etwa 300 Basen kürzer als bei der Bäckerhefe (*S. cerevisiae*: 232 b, 361 b für ITS1, ITS2; *C. albicans*: 139 b, 151 b für ITS1, ITS2).

2.6 Zielsetzung der Arbeit

Als Ziel dieser Arbeit sollten bislang uncharakterisierte Gene hinsichtlich ihrer Funktion in dem opportunistisch humanpathogenen Pilz *C. albicans* analysiert werden. Die Eigenschaften der vier ausgewählten Gene gliedern diese Arbeit in zwei grundlegende Abschnitte. Zum einen wurde ein Gen für die katalytische Untereinheit des Calcineurins *CMPI* untersucht, das sich als nicht-essentiell herausstellte und somit eine konventionelle „knock-out“-Analyse erlaubte. Darüber hinaus waren Phänotypen von Mutanten entsprechender homologer Gene in anderen verwandten Organismen bekannt, die eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion für die Adaptation an Umweltstressoren belegten. Da sich Calcineurin zudem als essentiell für die pathogene Lebensweise der Hefe *C. neoformans* erwies, war ein großes Interesse an diesem Enzym als mögliches antifungales Angriffsziel auch in *C. albicans* geweckt. In dieser Arbeit sollte daher die Bedeutung des *CMPI*-Gens für *C. albicans* unter verschiedenen Bedingungen *in vitro* aufgedeckt werden, wobei ein Schwerpunkt auf die Analyse möglicher pathogenitätsrelevanter Eigenschaften wie Toleranz gegenüber Umwelteinflüssen und die Fähigkeit zum Dimorphismus gesetzt wurde. Ferner sollte *in vivo* überprüft werden, ob der Genverlust eine Beeinträchtigung der Virulenz *per se* im Tiermodell nach sich zieht.

Ein zweiter Themenkomplex umfaßte die Analyse dreier Gene (*YML127*, *YPR143* und *YML93*), die im Rahmen einer Firmenkooperation zur Identifizierung potentieller Antimykotika-Targets ausgewählt wurden. Ihre Genprodukte wiesen keine signifikanten

Homologien zu Säuger-Proteinen auf, und deren Funktionen waren zu Beginn dieser Arbeit gänzlich unbekannt (siehe 2.4). Zunächst sollte nun geklärt werden, ob es sich, wie bei ihren Homologen in der Bäckerhefe, um Gene handelt, die essentiell für das Überleben des Pilzes sind. In Abhängigkeit davon bestand die Aufgabe darin, konditional letale Mutanten herzustellen, um die Auswirkungen des Genverlustes mittels verschiedener mikrobiologischer, molekularbiologischer und zytologischer Methoden zu studieren und dadurch Erkenntnisse über die Funktionen der Gene in *C. albicans* zu gewinnen. Weiterführende Experimente, die im zeitlichen Rahmen dieser Arbeit möglich waren, wie die Lokalisationsstudie eines markierten Genprodukts oder die Suszeptibilitätsuntersuchungen mit heterozygoten Stämmen sollten darüber hinaus der besseren Charakterisierung der Gene dienen.

Diese Arbeit sollte sowohl einen Beitrag zur Grundlagenforschung über den Hefepilz *C. albicans* leisten, als auch eine mögliche Eignung Calcineurins und der unbekanntes Genprodukte für eine gezielte Bekämpfung von *Candida*-Infektionen überprüfen.

3 Material und Methoden

3.1 Bakterienstämme und Plasmide

3.1.1 *Escherichia coli* K12

Als Wirtsbakterium für alle Klonierungsarbeiten diente der Laborstamm *E. coli* DH5 α (F⁻, *endA1*, *hsdR17* [r_k⁻, m_k⁻], *supE44*, *thi-1*, *recA1*, *gyrA96*, *relA1*, Δ [*argF-lac*]U169, λ , ϕ 80*dlacZ* Δ M15) (Bethesda Research Laboratories, 1986).

3.1.2 Plasmide

Als Grundgerüst für die Konstruktion der in dieser Arbeit verwendeten Vektoren diente das Plasmid pBluescript II KS (pKS II, Stratagene Heidelberg, Germany).

Im Folgenden (Tab. 1) sind die in dieser Arbeit benutzten und neu konstruierten Plasmide und deren relevante Eigenschaften aufgelistet.

Für das Verständnis wichtige Abkürzungen werden nun vorab erklärt: *ADHIP* bezeichnet den konstitutiv aktiven Promotor des *ADHI* (Alkohol-Dehydrogenase1)-Gens; *CBF1* steht für das Gen des „centromere binding factor 1“. Die *caFLP* bezeichnet die *Candida albicans* adaptierte *FLP*-Rekombinase und *ecaFLP* die „enhanced“, d.h. durch vier Aminosäureaustausche (P2S, L33S, Y108N, S294P) in ihrer Aktivität verbesserte, an *Candida albicans* adaptierte *FLP*-Rekombinase. Desweiteren steht *caGFP1* für das an *Candida albicans* adaptierte „green fluorescent protein“ mit S65T Chromophormutation; *caGFP2* ist bis auf die Aminosäureaustausche S65A, V68L und S72A im Chromophor identisch mit *caGFP1*; *MPA^R* steht für den Mycophenolsäure („mycophenolic acid“)-Resistenzmarker und *CdMPA^R* für den aus *Candida dubliniensis* abgeleiteten *MPA^R*-Resistenzmarker. Bei *SAP2* handelt es sich um das Gen für die sekretierte Aspartylprotease 2; bei *SAP2P* um den entsprechenden Promotor; analog dazu entspricht *SAP2-1* dem Allel 1 des *SAP2*-Gens aus CAI4 und *SAP2-1P* dem *SAP2*-Promotor des Allels *SAP2-1*. *URA3* bezeichnet den *URA3*-Selektionsmarker; *TEF3P* ist der konstitutiv aktive Promotor des *TEF3* („translation elongation factor 3“)-Gens.

Tab. 1 In dieser Arbeit verwendete Plasmide und deren integrierte Elemente

Bezeichnung	Inserts der Plasmide	Referenz
pADH1P1	[<i>ADH1P</i>]-Fragment	Labor Morschhäuser
pAFI3	[<i>ACT1P-FRT-MPA^R-FRT-3`ACT1</i>]-Fragment	(Staub <i>et al.</i> , 1999)
pCBF1M4	[5` <i>CBF1-ACT1T-URA3-3`CBF1</i>]-Fragment	(Biswas <i>et al.</i> , 2003)
pCDC8	[5` <i>CDC42-FRT-URA3-ACT1T-caFLP-SAP2P-FRT-3`CDC42</i>]- Fragment	(Michel <i>et al.</i> , 2002)
pCdMPA ^R	enthält das <i>MPA^R</i> -Leseraster aus <i>C. dubliniensis</i> mit einer eingeführten Mutation	Labor Morschhäuser
pCMP1K1	[<i>CMP1-ACT1T-URA3-3`CMP1</i>]-Fragment	diese Arbeit
pCMP1K3	[<i>CMP1-ACT1T-FRT-SAP2-1P-caFLP-ACT1T-CdMPA^R-FRT-3`CMP1</i>]- Fragment	diese Arbeit
pCMP1M1	[5` <i>CMP1-FRT-SAP2P-caFLP-ACT1T-URA3-FRT-5`CDC42</i>]- Fragment	diese Arbeit
pCMP1M2	[5` <i>CMP1-FRT-SAP2P-caFLP-ACT1T-URA3-FRT-3`CMP1</i>]- Fragment	diese Arbeit
pCMP1M3	[<i>ACT1P-caGFP1-ACT1T-URA3-3`CMP1</i>]-Fragment	diese Arbeit
pCMP1M4	[5` <i>CMP1-ACT1T-URA3-3`CMP1</i>]-Fragment	diese Arbeit
pCMP1M5	[<i>FRT-SAP2-1P-caFLP-ACT1T-CdMPA^R-FRT-3`CMP1</i>]-Fragment	diese Arbeit
pCMP1M6	[5` <i>CMP1-FRT-SAP2-1P-caFLP-ACT1T-CdMPA^R-FRT-3`CMP1</i>]- Fragment	diese Arbeit
pGFP26	[<i>ACT1P-caGFP1-ACT1T-URA3-3`ACT1</i>]-Fragment	(Morschhäuser <i>et al.</i> , 1998)
pLACZ5	[<i>ACT1P-LACZ-ACT1T</i>]-Fragment	Labor Morschhäuser
pSFI2	[<i>FRT-SAP2P-caFLP-ACT1T-CdMPA^R-FRT</i>]-Fragment	diese Arbeit
pSFI3	[<i>FRT-SAP2-1P-caFLP-ACT1T-CdMPA^R-FRT</i>]-Fragment	diese Arbeit
pSFL211	[<i>SAP2-1P-caFLP-ACT1T-URA3-3`SAP2</i>]-Fragment	(Staub, 2001)
pSFL213	[<i>SAP2-1P-ecaFLP-ACT1T-URA3-3`SAP2</i>]-Fragment	(Staub <i>et al.</i> , 2000c)
pSFL28	[<i>SAP2P-URA3-3`SAP2</i>]-Fragment	(Staub <i>et al.</i> , 2000c)
pSFU1	Quelle für den <i>URA3</i> -Flipper: [<i>FRT-SAP2P-caFLP-ACT1T-URA3-FRT</i>]	(Morschhäuser <i>et al.</i> , 1999)

Bezeichnung	Inserts der Plasmide	Referenz
pSFUC2	Quelle für den URA3-Flipper: [<i>FRT-SAP2P-caFLP-ACT1T-URA3-FRT</i>]	(Morschhäuser <i>et al.</i> , 1999)
pTEF3G2	[<i>TEF3P-caGFP2-ACT1T-URA3-3`TEF3</i>]-Fragment	Labor Morschhäuser
pYML127	enthält das <i>YML127</i> -Gen mit up- und downstream-Sequenzen	diese Arbeit
pYML127D1	[<i>MPA^R-YML127</i>]-Fragment	diese Arbeit
pYML127D2	[<i>5`ACT1-FRT-MPA^R-YML127-FRT-3`ACT1</i>]-Fragment	diese Arbeit
pYML127G1	[<i>caGFP2-ACT1T-URA3-FRT-3`YML127</i>]-Fragment	diese Arbeit
pYML127G2	[<i>YML127-caGFP2-ACT1T-URA3-FRT-3`YML127</i>]-Fragment; enthält die funktionelle <i>YML127-caGFP2</i> -Fusion	diese Arbeit
pYML127G3	[<i>YML127-caGFP2-ACT1T-URA3-FRT-3`YML127</i>]-Fragment; entspricht pYML127G2, nur ist hier das <i>GFP</i> ohne das Start-Methionin über zwei zusätzliche Aminosäuren an das <i>YML127p</i> gekoppelt	diese Arbeit
pYML127G5	[<i>TEF3P-YML127-caGFP2-ACT1T-URA3-3`TEF3</i>]; die <i>YML127-GFP</i> -Fusion steht unter der Kontrolle des <i>TEF3</i> -Promotors-	diese Arbeit
pYML127G6	[<i>TEF3P-YML127-caGFP2-ACT1T-URA3-3`ADHI</i>]-Fragment	diese Arbeit
pYML127G7	[<i>ADHIP-YML127-caGFP2-ACT1T-URA3-3`ADHI</i>]; die <i>YML127-GFP</i> -Fusion steht unter der Kontrolle des <i>ADHI</i> -Promotors	diese Arbeit
pYML127HAT1	[<i>YML127-3xHAT-ACT1T-URA3-FRT-3`YML127</i>]-Fragment; enthält die funktionelle <i>YML127-3xHA</i> -Epitop-Fusion	diese Arbeit
pYML127HAT2	[<i>ADHIP-YML127-3xHAT-ACT1T-URA3-3`ADHI</i>]; das mit dem Epitop aus dem Hämagglutinin des humanen Influenzavirus markierte <i>YML127</i> -Gen steht unter Kontrolle des <i>ADHI</i> -Promotors	diese Arbeit
pYML127M1	[<i>5`YML127-FRT-SAP2P-caFLP-ACT1T-URA3-FRT</i>]-Fragment	diese Arbeit
pYML127M2	[<i>5`YML127-FRT-SAP2P-caFLP-ACT1T-URA3-FRT-3`YML127</i>]-Fragment	diese Arbeit
pYML93	enthält das <i>YML93</i> -Gen mit up- und downstream-Sequenzen	diese Arbeit
pYML93D1	[<i>MPA^R-YML93</i>]-Fragment	diese Arbeit
pYML93D2	[<i>5`ACT1-FRT-MPA^R-YML93-FRT-3`ACT1</i>]-Fragment	diese Arbeit
pYML93M1	[<i>5`YML127-FRT-SAP2P-caFLP-ACT1T-URA3-FRT-3`YML93</i>]-Fragment	diese Arbeit
pYML93M2	[<i>5`YML93-FRT-SAP2P-caFLP-ACT1T-URA3-FRT-3`YML93</i>]-Fragment	diese Arbeit
pYPR143D1	[<i>ACT1P-YPR143-3`CMPI</i>]-Fragment; enthält das <i>YPR143</i> -Gen mit up- und downstream-Sequenzen	diese Arbeit
pYPR143D2	[<i>MPA^R-YPR143</i>]-Fragment	diese Arbeit

Bezeichnung	Inserts der Plasmide	Referenz
pYPR143D3	[5` <i>ACT1-FRT-MPA^R-YPR143-FRT-3`ACT1</i>]-Fragment	diese Arbeit
pYPR143M1	[5` <i>YML127-FRT-SAP2P-caFLP-ACT1T-URA3-FRT-3`YPR143</i>]-Fragment	diese Arbeit
pYPR143M2	[5` <i>YPR143-FRT-SAP2P-caFLP-ACT1T-URA3-FRT-3`YPR143</i>]-Fragment	diese Arbeit

3.2 *Candida albicans*-Stämme

In Tab. 2 sind alle in dieser Arbeit verwendeten Hefestämme, deren Ausgangsstämme, Genotypen, sowie deren Referenzen angegeben.

Tab. 2 In dieser Arbeit verwendete *C. albicans*-Stämme und deren Charakteristika

Bezeichnung	Ausgangsstamm	Genotyp	Referenz
CAI4	SC5314	<i>Δura3::imm434/Δura3::imm434</i>	(Fonzi and Irwin, 1993)
CAG55S2HAT22A	CAI4	<i>sap2-1::SAP2P-GFP-ACT1T-URA3/sap2-2::SAP2-3xHAT-FRT</i>	Labor Morschhäuser
CMP1K1A/B	CMP1M4A/B	<i>cmp1::FRT/cmp1::CMP1-URA3</i>	diese Arbeit
CMP1M1A/B	CAI4	<i>CMP1/cmp1::FRT-SAP2P-caFLP-ACT1T-URA3-FRT</i>	diese Arbeit
CMP1M2A/B	CMP1M1A/B	<i>CMP1/cmp1::FRT</i>	diese Arbeit
CMP1M3A/B	CMP1M2A/B	<i>cmp1::FRT-SAP2P-caFLP-ACT1T-URA3-FRT/cmp1::FRT</i>	diese Arbeit
CMP1M4A/B	CMP1M3A/B	<i>cmp1::FRT/cmp1::FRT</i>	diese Arbeit
CMP1M5A/B	CMP1M4A/B	<i>cmp1::FRT/cmp1::URA3</i>	diese Arbeit
CYML127HAT2A/B	CAI4	<i>ADH1/adh1::ADH1P-YML127-3xHAT-ACT1T-URA3</i>	diese Arbeit
S2UI1A	CAI4	<i>ACT1/act1::ACT1P-FRT-MPA^R-FRT sap2-1::URA3/SAP2-2</i>	(Staib <i>et al.</i> , 1999)
SC5314	-	Wildtyp-Stamm	(Gillum <i>et al.</i> , 1984)
SCCMP1K1	SCCMP1M4	<i>cmp1::FRT/cmp1::CMP1-FRT-SAP2-1P-caFLP-ACT1T-CdMPA^R-FRT</i>	diese Arbeit
SCCMP1K2	SCCMP1K1	<i>cmp1::FRT/cmp1::CMP1-FRT</i>	diese Arbeit

Bezeichnung	Ausgangsstamm	Genotyp	Referenz
SCCMP1M1	SC5314	<i>CMP1/cmp1::FRT-SAP2-1P-caFLP-ACTIT-CdMPA^R-FRT</i>	diese Arbeit
SCCMP1M2	SCCMP1M1	<i>CMP1/cmp1::FRT</i>	diese Arbeit
SCCMP1M3	SCCMP1M2	<i>cmp1::FRT-SAP2-1P-caFLP-ACTIT-CdMPA^R-FRT/cmp1::FRT</i>	diese Arbeit
SCCMP1M4	SCCMP1M3	<i>cmp1::FRT/cmp1::FRT</i>	diese Arbeit
YML127HAT1A/B	YML127M2A	<i>yml127/yml127::YML127-3xHAT-ACTIT-URA3</i>	diese Arbeit
YML127M1A/B	CAI4	<i>YML127/yml127::FRT-SAP2P-caFLP-ACTIT-URA3-FRT</i>	diese Arbeit
YML127M2A/B	YML127M1A/B	<i>YML127/yml127::FRT</i>	diese Arbeit
YML127M3A	YML127M2A	<i>YML127/yml127::FRT ACT1/act1::FRT-MPA^R-YML127-FRT</i>	diese Arbeit
YML127M4A	YML127M3A	<i>yml127::FRT-SAP2P-caFLP-ACTIT-URA3-FRT/ yml127::FRT ACT1/act1::FRT-MPA^R-YML127-FRT</i>	diese Arbeit
YML127M5A	YML127M3A	<i>yml127::FRT/yml127::FRT ACT1/act1::FRT-MPA^R-YML127-FRT</i>	diese Arbeit
YML127M6A/B	YML127M5A	<i>yml127::FRT/yml127::FRT ACT1/act1::FRT-MPA^R-YML127-FRT sap2-1::SAP2-1P-ecaFLP-ACTIT-URA3/SAP2-2</i>	diese Arbeit
YML127M7A/B	YML127M3A	<i>YML127/yml127::FRT ACT1/act1::FRT-MPA^R-YML127-FRT sap2-1::SAP2-1P-ecaFLP-ACTIT-URA3/SAP2-2</i>	diese Arbeit
YML127M8A/B	YML127M5A	<i>yml127::FRT/yml127::FRT ACT1/act1::FRT-MPA^R-YML127-FRT sap2-1::URA3/SAP2-2</i>	diese Arbeit
YML93M1A/B	CAI4	<i>YML93/yml93::FRT-SAP2P-caFLP-ACTIT-URA3-FRT</i>	diese Arbeit
YML93M2A/B	YML93M1A/B	<i>YML93/yml93::FRT</i>	diese Arbeit
YML93M3A/B	YML93M2A/B	<i>YML93/yml93::FRT ACT1/act1::FRT-MPA^R-YML93-FRT</i>	diese Arbeit
YML93M4A/B	YML93M3A/B	<i>yml93::FRT-SAP2P-caFLP-ACTIT-URA3-FRT/ yml93::FRT ACT1/act1::FRT-MPA^R-YML93-FRT</i>	diese Arbeit
YML93M5A/B	YML93M3A/B	<i>yml93::FRT/yml93::FRT ACT1/act1::FRT-MPA^R-YML93-FRT</i>	diese Arbeit
YML93M6A/B	YML93M5A/B	<i>yml93::FRT/yml93::FRT ACT1/act1::FRT-MPA^R-YML93-FRT sap2-1::SAP2-1P-ecaFLP-ACTIT-URA3/SAP2-2</i>	diese Arbeit

Bezeichnung	Ausgangsstamm	Genotyp	Referenz
YML93M7A/B	YML93M3A/B	<i>YML93/yml93::FRT</i> <i>ACT1/act1::FRT-MPA^R-YML93-FRT</i> <i>sap2-1::SAP2-1P-ecaFLP-ACTIT-URA3/SAP2-2</i>	diese Arbeit
YML93M8A/B	YML93M5A/B	<i>yml93::FRT/yml93::FRT</i> <i>ACT1/act1::FRT-MPA^R-YML93-FRT</i> <i>sap2-1::URA3/SAP2-2</i>	diese Arbeit
YPR143M1A/B	CAI4	<i>YPR143/ypr143::FRT-SAP2P-caFLP-ACTIT-URA3-FRT</i>	diese Arbeit
YPR143M2A/B	YPR143M1A/B	<i>YPR143/ypr143::FRT</i>	diese Arbeit
YPR143M3A/B	YPR143M2A/B	<i>YPR143/ypr143::FRT</i> <i>ACT1/act1::FRT-MPA^R-YPR143-FRT</i>	diese Arbeit
YPR143M4A/B	YPR143M3A/B	<i>ypr143::FRT-SAP2P-caFLP-ACTIT-URA3-FRT/</i> <i>ypr143:FRT</i> <i>ACT1/act1::FRT-MPA^R-YPR143-FRT</i>	diese Arbeit
YPR143M5A/B	YPR143M3A/B	<i>ypr143::FRT/ypr143::FRT</i> <i>ACT1/act1::FRT-MPA^R-YPR143-FRT</i>	diese Arbeit
YPR143M6A/B	YPR143M5A/B	<i>ypr143::FRT/ypr143::FRT</i> <i>ACT1/act1::FRT-MPA^R-YPR143-FRT</i> <i>sap2-1::SAP2-1P-ecaFLP-ACTIT-URA3/SAP2-2</i>	diese Arbeit
YPR143M7A/B	YPR143M3A/B	<i>YPR143/ypr143::FRT</i> <i>ACT1/act1::FRT-MPA^R-YPR143-FRT</i> <i>sap2-1::SAP2-1P-ecaFLP-ACTIT-URA3/SAP2-2</i>	diese Arbeit
YPR143M8A/B	YPR143M5A/B	<i>YPR143/ypr143::FRT</i> <i>ACT1/act1::FRT-MPA^R-YPR143-FRT</i> <i>sap2-1::URA3/SAP2-2</i>	diese Arbeit

3.3 Oligonukleotide

Die benutzten Oligonukleotide (Tab. 3) wurden von den Firmen MWG und Sigma ARK bezogen. Die Erkennungssequenzen von Restriktionsendonukleasen sind mit fettgedruckter Schrift hervorgehoben. Nukleotidsubstitutionen oder Ergänzungen, die für den Einbau von Restriktionsschnittstellen oder für die Fusion von Elementen erforderlich waren, sind durch Unterstreichung gekennzeichnet. T_A bezeichnet die Annealing-Temperatur während der PCR- bzw. Sequenzierreaktion. Die Primer für die Sequenzierungen wurden mit einem fluoreszierenden Molekül am 5'-Ende (IRD 800) von MWG bestellt.

Tab. 3 In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide

Bezeichnung	Länge (nt)	T _A (°C)	Sequenz (5'→3')
ACT16	28	52	TTCTAAGATCTAAATTCTGGAAATCTGG
ACT21	36	52	ATATACTCGAGGACATTTTATGATGGAATGAATGGG
ACT18seq	22	55	IRD 800-GAATACAAAACCAGATTTCCAG
ADH11	27	50	CGGTTGAGATGGTACCGTCAAATATCC
ADH12	33	50	TTTGTTGAGATCTAATTGTTTTTGTATTTGTTG
CMP1	26	50	GCTAGACGTGAGGTACCAACGGGTGG
CMP2	30	50	CAGTTCATTACCTCGAGTGGTTCGTCTATG
CMP3	31	48	AATTA CCGCGGG GATCATTACCCAAAGGTTCC
CMP4	33	48	TTCATGAGCTCATTAAATATATTGAATCAATAAG
CMP5	25	50	GAAGATTATCTGCAGTTAAACTTTC
CMP6	36	50	TGGTTCCGCGGCTCATTAAATATATTGAATCAATAAG
CMP7	27	50	CGTTGAACAGTGGATCCCTGACATGATG
CMP8	30	50	CAGGGGCAAAAAGGATCCCTTAACTTTGAGAT
CMP9seq	21	57	IRD 800-CCCCATTATCATCATGTCAGG
CMP10seq	21	55	IRD 800-CATCCATGAAATGAGGTAACC
CMP12	31	48	CCATCGGGCCCGTTATATATTAATGATGGTG
CMP13seq	23	55	IRD 800-CCTGTGGTGGTTCGTCTATGTTG
CMP14seq	23	55	IRD 800-CAAAGCGGCGGTTTTAAAATATG
GFP4	19	50	TCTGGTAAAAGGACAGGGC
GFP16	35	50	GATGGGATCCAGTAAAGGAGAAGAAGACTTTTCACTG
GFPseq1	21	55	IRD 800-GTGCCCATTAACATCACCATC
HAT6	110	50	TGCTAGGATCCACCCATACGATGTTCCGGATTACGCTTACCCA TACGATGTTCCGGATTACGCTTACCCATACGATGTTCCGGATTAC GCTTAAGAGTGAAATTCTGGA
ITS1	22	-	CACATGTGGTGCAATTAAGCAAATC
ITS2	26	-	CAACACCAAACCCAGCGGTTTGAGGG
URA16	31	50	TGTTTCCGCGGATACCATCCAAATCAATTCC
YML1	34	47,5	GGGTTGTAAACTGGGCCCAGGTTTGTGATCG
YML2	31	47,5	GAGTCGTTCTGGAGCTCGAGCTAACTGGTAC
YML3	34	50	CCTTCTTTGTTAGATCTAGGTATTATAGAAACC
YML4	29	50	TCTTACTTGTACCGCGGATCATGTGGCTG
YML5	31	59	AATTTGGCAATTTCTGCAGGTGATAATTGAG
YML6	33	59	ATTAGGAAGAGGATCCCTACCTGATGAGATTGCC
YML7seq	22	56,7	IRD 800-CCGGCTCACCTTCATTAAGTAG
YML8seq	21	55	IRD 800-GCAAATATTTCAACCAAGTGG
YML9seq	19	55	IRD 800-CTTGCCAAATCAACAATGG
YML10seq	20	55	IRD 800-CCCCTGAGTATTGGGATCTC
YML11	32	50	GCTAAAGTTGTAGCGGTACCTCAAGCTCCAGG

Bezeichnung	Länge (nt)	T _A (°C)	Sequenz (5' → 3')
YML12	33	54	GATT <u>GGATCC</u> ATGCAAATATTTCAACCAAGTGG
YML15	37	54	<u>ATATGGATCCAAA</u> ATGCCTTCATTAGTACCAGTTAGC
YML93-1	34	50	GAATATTTGTAATC <u>GGGCCC</u> GATCTGAATTAAG
YML93-2	31	50	CATAT <u>CTCGAG</u> AGTTCATTTCTTCATCGTC
YML93-3	30	50	GACTATGCCA <u>AGATCT</u> TATTGTCAAACAAGG
YML93-4	33	50	CTACCATGTATCGT <u>CCGCGG</u> GGAACATAATGTTG
YML93-5	34	52	CCACTC <u>CTGCAG</u> GTTTTTCTTCATTTCTTCTCC
YML93-6	34	52	GAGTAAAGCT <u>GGATCC</u> AAACCTCATTGGGCTAAG
YML93-7seq	22	55	IRD 800-GCTGGTTTTATTGCCATTATT
YML93-8seq	25	55	IRD 800-CTCATTGATCTTTCATATTGTTCTC
YML93-9seq	21	55	IRD 800-GATGATGATTATGATGTTTTG
YML93-10seq	23	55	IRD 800-GGTATTGTCATTTATTTGGGATG
YML93-11seq	20	55	IRD 800-GATGGCTAATATTAATGAAG
YML93-12seq	21	55	IRD 800-GAATTTTATGATACTGTTTGG
YPR2	33	52	CTAGTCAGTTTCTTG <u>CTCGAG</u> TTACAGATAACC
YPR3	30	50	CGTGGTGTGTC <u>AGATCT</u> TTTAATGCAGTG
YPR4	31	50	GAAAGTGAAAC <u>CGCGG</u> CTATCTCTAGTGCTC
YPR5	32	50	GACTCTGAAAT <u>GGGCC</u> CTGTGGGTACAGTATC
YPR7	33	52	CGAC <u>CTGCAG</u> TCATTAATTCTTGTTTATGTTGG
YPR8	34	52	CACTAATAAATT <u>AGATCT</u> TGAAACCATTGCTATC
YPR9seq	21	53	IRD 800-GTCTAAACCTGTTTACTCTG
YPR10seq	20	56	IRD 800-CCTTTTTGGTTTGTCCCAAC
YPR11seq	20	55	IRD 800-GGCATTGAAAAAAGTTGCAC
YPR12seq	21	55	IRD 800-GGAGATTTACTGTTATGACAC

Als Herkunft der DNA-Sequenzen sind im folgenden die „accession“-Nummern, Referenz der publizierten Sequenzen oder die „open reading frame“- (orf-) Nummern aus dem „assembly“ 6 bzw. 19 in der *Candida albicans*-Datenbank (<http://www-sequence.stanford.edu/group/candida>) der nicht publizierten Sequenzen angegeben: *ACT1* (X16377); *ADH1* (X81694); *CMP1* (orf 6.3161, 19.10237); *GFP* (M62653); HA-Epitop (Wilson *et al.*, 1984); *ITS1* und *ITS2* (AF455428); *MPA^R* (Staib *et al.*, 1999); *TEF3* (orf19.5119); *URA3* (X14198); *YML* entspricht *YML127* (orf 6.4962, 19.2473); *YML93* (orf 19.7552); *YPR* entspricht *YPR143* (orf 19.563).

3.4 Laborgeräte und Chemikalien

Die für diese Arbeit benötigten Laborgeräte und deren Hersteller sind in Tab. 4 aufgelistet. Die Hersteller bzw. Anbieter der benutzten Chemikalien sind an geeigneter Stelle im Methodenteil unter 3.5 bis 3.9 angeben. Das Antimykotikum Fluconazol wurde uns freundlicherweise von der Firma Pfizer zur Verfügung gestellt. Alle nicht erwähnten Chemikalien, Geräte und sonstigen Hilfsmittel wurden von den Firmen Amersham, Applichem, Biometra, Boehringer, Difco, Eppendorf, Gibco, Gilson, Greiner, Merck, MWG, Oxoid, Pequlab, Pharmacia, Roth, Serva und Sigma bezogen.

Tab. 4 In dieser Arbeit benötigte Laborgeräte

Gerät	Firma
Binokular Nikon SMZ800	Nikon
Brutschrank 30°C	Memmert
Brutschrank 37°C kelvitron	Heraeus
Digitalkamera Coolpix 4500	Nikon
Elektrophosesezammern horizontal, vertikal	Bio-Rad
Elektroporationsgerät	Equibio
Farbvideokamera für mikroskopische Aufnahmen	Intas
Fluoreszenzmikroskop (Zeiss MC80, Axiolab Fluoreszenz, ausgestattet Quecksilber-Kurzbogenlampe HB050 und Zeiss Fluorescein-spezifischem Filter-Set 09)	Zeiss
Geldokumentationsanlage	Bio-Rad
Hybridisierungsöfen Shake 'n' Stack	Hybaid
Photometer Ultrospec 3100	Amersham
Schüttelinkubator 30°C Certomat [®] BS1	B.Braun Biotech International
Schüttelinkubator 37°C, innova 4300	New Brunswick Scientific
Semidry-Blotgerät	OWL
Thermocycler Cyclone 25	Pequlab
UV-Crosslinker Stratalinker 1800	Stratagene
Tischzentrifugen Biofuge Pico, Kühlzentrifuge fresco	Heraeus

3.5 Mikrobiologische Methoden

3.5.1 Anzucht von *Escherichia coli*

Die Anzucht von einer *E. coli*-Flüssigkultur erfolgte unter Schütteln (180 rpm) bei 37°C in LB-Medium (1% Pepton aus Casein, 0.5% Hefeextrakt, 0.5% NaCl) über Nacht. Auf LB-Agarplatten (1,5% Agar) beimpfte *E. coli*-Zellen wurden über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Plasmid-tragende *E. coli*-Stämme wurden unter Selektionsdruck (100 µg/ml Ampicillin) kultiviert.

3.5.2 Anzucht von *Candida albicans* in Hefeform

Zur Kultivierung von *C. albicans*-Zellen wurden je nach Intention verschiedene Medien verwendet. Zur Herstellung entsprechender Festmedien wurden jeweils 1,5% Agar (Difco) zugesetzt. Flüssigkulturen wurden bei 30°C unter Schütteln (250 rpm), beimpfte Agarplatten bei 30°C in einem Brutschrank inkubiert.

3.5.2.1 Vollmedium und SD-Medium

Als Vollmedium zur schnellen Anzucht diente YPD-Medium (2% Pepton aus Casein, 1% Hefe-Extrakt, 2% Glucose). Zur Selektion und Propagation von *URA3*-prototrophen *C. albicans*-Transformanten wurde SD-Medium eingesetzt (0.67% YNB [Yeast Nitrogen Base; BIO 101 Vista, Calif.], 2% Glucose) mit 100 ml URA-drop out 10x (BIO101). Für die Anzucht von *ura3*-auxotrophen Stämmen wurde das SD-Medium mit 100 µg/ml Uridin supplementiert. Zur Selektion von Mycophenolsäure-resistenten- (MPA^R) Stämmen wurde mit 10 µg/ml MPA ergänztes SD-Medium verwendet.

3.5.2.2 Induktion des *SAP2*-Promotors in YCB-BSA-Medium

Die Induktion des *C. albicans*-*SAP2*-Promotors erfolgte in YCB-BSA-Medium (2.34% YCB [Yeast Carbon Base, Difco], 0.4% BSA [Bovine Serum Albumin, Fraktion V, Sigma], pH 4.0, mit Zusatz von 2% Hefeextrakt), was das Ausschneiden der „Flipper-Kassette“ zusammen mit dem entsprechenden *URA3*- bzw. MPA^R -Marker aus dem *C. albicans*-Genom bewirkte. Zur Unterscheidung von *ura3*-negativen bzw. MPA -sensitiven Derivaten wurden entsprechende Verdünnungen von YCB-BSA-Kulturen auf Minimalagarplatten ausplattiert, die 10 µg/ml Uridin bzw. 1,8 µg/ml MPA enthielten. Dort wuchsen die gewünschten *ura3*-negativen bzw.

MPA-sensitiven-Klone als kleinere Kolonien als die *URA3*-positiven bzw. MPA-resistenten Ausgangsstämme. Zur Kontrolle wurden diese Derivate in der Regel nochmals auf Agarplatten ohne Uridin bzw. 10 µg/ml MPA-haltigen Agarplatten überprüft.

3.5.3 Hypheninduktionsmedien für *Candida albicans*

Im folgenden sind verschiedene Hypheninduktionsmedien beschrieben, die sowohl als Flüssig- als auch als Festmedien durch den Zusatz von Agar verwendet wurden. Flüssigkulturen wurden bei 37°C entweder im Heizblock oder unter Schütteln (180 rpm), Agarplatten bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

Als gängigstes flüssiges Hypheninduktionsmedium wurde RPMI 1640 (PAA Laboratories GmbH) mit einem Anteil von 10% FCS (foetal calf serum „gold“, PAA Laboratories GmbH) verwendet. Alternativ wurde FCS allein als Agar in einer Konzentration von 10% oder 100%iges FCS oder humanes Serum (aus Blut gewonnen) als Flüssigmedium benutzt.

Desweiteren wurde SLAD (Synthetic Low Ammonium Dextrose)-Medium (0.17% YNB [Yeast Nitrogen Base; BIO 101 Vista, Calif.], 2% Glucose, 50 µM (NH₄)₂SO₄) (Gimeno *et al.*, 1992) eingesetzt. Für das entsprechende Festmedium wurde der Agar viermal in doppelt destilliertem Wasser gewaschen, die Endkonzentration betrug 2%.

Das sogenannte Spider-Medium (Liu *et al.*, 1994) enthält 1% Nutrient Broth (Gibco), 1% Mannitol, 0.2% K₂HPO₄ und eventuell 2% Agar und hat einen pH-Wert zwischen 7.1 bis 7.2. Außerdem wurde für *C. albicans* modifiziertes Lee's Medium (Lee *et al.*, 1975) verwendet. Es besteht aus 1.25% Glucose, 0.5% NaCl, 0.5% (NH₄)₂SO₄, 0.25% K₂HPO₄, 1x Aminosäure-Mix (0.13% L-Leucin, 0.1% L-Lysin, 0.05% L-Alanin, 0.05% L-Phenylalanin, 0.05% L-Prolin, 0.05% L-Threonin, 0.01% L-Methionin, 0.007% L-Ornithin, 0.007% L-Arginine und 0.0001% d-Biotin), 0.1 µM ZnSO₄ sowie 0.81 mM MgSO₄ und eventuell 2% Agar. Der pH-Wert wird auf 6.8 eingestellt.

3.6 Molekularbiologische Methoden

Sofern nicht genauer beschrieben, wurden molekularbiologische Methoden nach Standardprotokollen durchgeführt (Sambrook *et al.*, 1989). Dazu gehörten Phenolisieren von Plasmid-DNA, Fällung mit Ethanol, Spaltung mit Restriktionsendonukleasen, Polymerasekettenreaktion sowie Ligation und Klonierung von DNA-Fragmenten.

3.6.1 Polymerasekettenreaktion (PCR) und Aufreinigung von PCR-Produkten

Die Amplifizierung von bestimmten DNA-Sequenzen erfolgte nach der Polymerasekettenreaktion nach Saiki *et al.* (Saiki *et al.*, 1988). Als Polymerasen wurden entweder der Elongase-Enzym-Mix (Gibco bzw. Invitrogen), die Pfu- bzw. Pfx-DNA-Polymerase (Invitrogen) oder die Triple-Master-DNA-Polymerase (Eppendorf) eingesetzt und nach Herstellerangaben verwendet.

Die PCR-Reaktionen wurden generell in 30 Amplifikations-Zyklen durchgeführt. Jeder Zyklus enthielt einen Denaturierungsschritt von 30 oder 60 Sekunden bei 95°C, eine Primer-Annealing-Phase von 30 oder 60 Sekunden bei einer je nach Primern geeigneten Annealing-Temperatur (siehe Tab. 3) und 1 Minute (bzw. 2 Minuten bei Pfu und Pfx) Extensionszeit pro kb des zu amplifizierenden DNA-Fragmentes bei 68°C (bzw. 72°C bei Pfu und Pfx). Auf die Amplifikations-Zyklen folgte ein zusätzlicher Extensionsschritt von zehn Minuten. Als Template in einem 50 µl-PCR-Ansatz diente im Normalfall 0.1-1.0 µg chromosomale DNA des *C. albicans* CAI4 Stammes. Bei einem Einsatz von Plasmid-DNA (1-2 ng) bzw. genomischer DNA eines anderen Stammes als Template wird dies entsprechend vermerkt. Weitere Bestandteile des PCR-Ansatzes waren jeweils 0.2 mM der Desoxyribonukleotide ATP, CTP, GTP und TTP, je 2 µM Primer sowie die einfache Konzentration des vom Hersteller mitgelieferten Puffersystems. Der Erfolg jeder PCR-Reaktion wurde überprüft, indem ein Aliquot von 5 µl auf einem Agarose-Gel mittels Gelelektrophorese aufgetrennt, und anschließend die DNA mit Ethidiumbromid angefärbt wurde.

Die Aufreinigung von PCR-Produkten erfolgte durch Phenolisieren und Fällen der DNA in Ethanol mit 3 M Natriumacetat (pH 4.8) oder mittels Säulchen des Quiagen PCR-Purification-Kits laut dessen Vorschrift. Im Anschluß wurde die DNA in 20-40 µl bidest. H₂O aufgenommen.

3.6.2 Spaltung von DNA mittels Restriktionsendonukleasen

Generell wurden für DNA-Spaltungen 10 bis 20 Units einer oder mehrerer Restriktionsendonukleasen (Amersham Pharmacia, New England Biolabs) eingesetzt. Pro Ansatz durfte das zugesetzte Volumen an Enzym 1/10 des Gesamtvolumens nicht übersteigen. Als Reaktionspuffer diente ein 10x Spaltpuffer (330 mM Tris-Acetat pH 7.9, 660 mM Kaliumacetat, 100 mM Magnesiumacetat, 5 mM DTT, 0.1% BSA), der in den Reaktionsansätzen in einfacher Konzentration eingesetzt wurde.

Bei dem Verdau von Plasmid-DNA wurde zwischen qualitativen und präparativen Spaltungen für Klonierungen und Gewinnung von linearen DNA-Fragmenten für die Hefetransformation unterschieden, wobei bei der qualitativen Kontrollspaltung 2 µl (100-200 ng/µl) Plasmid-DNA in einem 20 µl-Reaktionsansatz und bei der präparativen Spaltung 15 bis 30 µl DNA in einem 50 µl-Ansatz verwendet wurden. Für eine Kontrollspaltung waren 1-2 h Inkubation bei 37°C ausreichend, bei präparativen Spaltungen war eine längere Inkubation für 4-5 h erforderlich. Die Spaltung von PCR-Produkten erfolgte analog zu den präparativen Plasmid-DNA-Spaltungen. Für die Southern-Hybridisierungen mußte chromosomale DNA von *C. albicans* gespalten werden. In der Regel wurden etwa 10 µg DNA benutzt, die in einem 30 µl-Restriktionsansatz über Nacht bei 37°C inkubiert wurde.

Zur Analyse bzw. Weiterverarbeitung der Proben folgte auf jede Restriktion eine Agarose-Gelelektrophorese.

3.6.3 Aufreinigung von DNA durch Agarose-Gelelektrophorese

Präparative Spaltansätze von Plasmid- oder PCR-DNA wurden für die Agarose-Gelelektrophorese mit 1x Auftragspuffer (6x Puffer: 0.25% Bromphenolblau, 0.25% Xylencyanol, 25% Ficoll Typ 400) versetzt, bevor die Größenauftrennung in einem 1%igen Agarosegel in 1x TAE-Puffer (242 g Tris, 57.1 ml Eisessig, 100 ml 0.5 M EDTA ad 1 l H₂O) zusammen mit einem DNA-Größenstandard (1 kb DNA-Leiter [Invitrogen]) erfolgte.

Zur Elution von DNA-Fragmenten aus dem Agarose-Gel kam der „Gene Clean Kit“ von Dianova zum Einsatz. Dabei wurden die mit Ethidiumbromid angefärbten gewünschten DNA-Banden ausgeschnitten und die Gelstücke in 400 µl Natriumjodid bei 50°C gelöst, mit 7 µl Glasmilch versetzt, kurz mit Vortexer gemischt und für 5 min auf Eis inkubiert. Dabei bindet die DNA an die Glasmilch, welche dann je dreimal zentrifugiert (1 min 13000 rpm) und mit eiskalter 200 µl „New Wash“-Lösung gewaschen wurde. Anschließend wurde das Pellet in geeignetem Volumen bidest. H₂O (15 µl bei Fragmenten zur Klonierung bzw. 6 µl

bei Fragmenten zur Hefe-Transformation) aufgenommen und zur Elution 5 min bei 50°C inkubiert. Zuletzt wurde nach dem Zentrifugieren (2 min 13000 rpm) der DNA-haltige wässrige Überstand abgenommen und zur weiteren Verwendung bei -20°C aufbewahrt.

3.6.4 DNA-Sequenzierung

DNA-Sequenzierungen waren dann nötig, wenn Nukleotidsequenzen aus chromosomaler DNA von *C. albicans*-Stämmen oder aus Plasmid-DNA mittels PCR amplifiziert worden waren, bevor sie in Plasmid-Vektoren kloniert wurden. Nach der Isolierung wurde die für die Sequenzierung bestimmte Plasmid-DNA zusätzlich aufgereinigt, indem sie in 200 µl H₂O gelöst je einmal mit einem Volumenteil (VT) Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) und 200 µl Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) extrahiert, in zwei VT Ethanol und 1/10 VT 3 M Natriumacetat pH 4.8 gefällt, mit 70% Ethanol gewaschen und nach Lufttrocknen in 26 µl bidest. H₂O suspendiert wurde.

Das verwendete Protokoll basierte auf der Kettenabbruch-Methode verursacht durch Didesoxynukleotide (Sanger *et al.*, 1977). Unter Verwendung des „Thermo-Sequense fluorescent labeled primer cycle sequencing kit with 7-deaza-dGTP“ (RPN 2438, Amersham) wurden für jede Probe vier Sequenzieransätze mit den jeweiligen Nukleotidgemischen A, C, G und T, 1 pmol des fluoreszenzmarkierten (IRD 800) Sequenzier-Primers (MWG) und 6 µl der gereinigten Plasmid-DNA (entspricht ca. 500 ng) eingesetzt. Die Sequenzierreaktionen erfolgten im Thermocycler, wobei 30 Zyklen der Schritte Denaturierung (30 s, 95°C), Primer-Annealing (30 s, Primer-abhängige Temperatur) und DNA-Synthese (30 s, 70°C) durchgeführt wurden. Die anschließende Auftrennung der fluoreszenzmarkierten DNA-Produkte in einem Polyacrylamidgel, deren Detektion sowie die Analyse der erhaltenen Daten nach automatischer Sequenzierung erfolgte mit dem Sequenziergerät „LI-COR model 4000 automated sequencer“ (MWG) und der dazugehörigen Software.

3.6.5 Plasmidisolierung aus *E. coli*

Die Plasmidisolierung aus *E. coli*-Zellen wurde nach einem modifizierten Protokoll der alkalischen Lyse (Birnboim and Doly, 1979) durchgeführt. Dabei wurden 1.5 ml einer *E. coli*-über-Nacht-Kultur in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß abzentrifugiert (2 min, 13000 rpm) und das Zell-Pellet für 5 min bei Raumtemperatur in 100 µl Lösung 1 (50 mM Tris/HCl, 10 mM EDTA pH 8.0, 25 mM Tris/HCl pH 7.5) inkubiert. Nach Abkühlen der Suspension auf Eis wurde zunächst 200 µl Lösung 2 (200 mM NaOH, 1% SDS) zugegeben, kurz

gemischt und mit 150 μ l 3 M Natriumacetat versetzt, erneut gemischt, und für die Lyse der Ansatz für 5 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation (5 min, 13000 rpm) wurde der wässrige Überstand vom Pellet abgenommen, um die DNA in 200 μ l Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) zu extrahieren und in 1 ml 100% Ethanol zu fällen. Nach Zentrifugation (5 min, 13000 rpm) wurde das DNA-Pellet mit 70% Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in 50 μ l bidest H₂O gelöst (100-200 ng/ μ l DNA). Für den Abbau der RNA wurden die gelöste Plasmid-DNA für 30 min bei 37°C mit 1 μ l RNaseA (50 mg/ml) behandelt.

3.6.6 Ligation und Klonierung

Die Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen erfolgte nach der CaCl₂-Methode. Dazu wurden 50 ml LB-Medium 1:100 aus einer 10 ml über-Nacht-Kultur inokuliert und bis zu einer OD von etwa 0.7 unter Schütteln bei 37°C inkubiert. Alle weiteren Schritte wurden nun auf Eis bzw. bei 4°C durchgeführt. Zunächst wurde die Kultur in einem 50 ml Greiner-Röhrchen 10 min bei 3000 rpm abzentrifugiert, das Zellpellet daraufhin vorsichtig in sterilen, eiskalten 20 ml 100 mM CaCl₂ resuspendiert und 30 min auf Eis inkubiert. Nach erneutem Abzentrifugieren (10 min 3000 rpm) wurde das Pellet in 2.5 ml 100 mM CaCl₂ aufgenommen und mit sterilem Glycerin (86%) versetzt, so daß die Endkonzentration an Glycerin 15% betrug. Diese Suspension wurde in Eppendorf-Caps zu je 200 μ l aliquotiert und bis zur Verwendung bei -80°C aufbewahrt.

Zur Ligation wurden die gespaltenen und gelaufgereinigten DNA-Fragmente verwendet. Ein 15 μ l Ligationsansatz bestand aus 1 μ l Vektor-DNA, einer oder mehrerer Insert-DNAs (je 3 bis 7 μ l), sowie 1x T4-DNA-Ligationspuffer (5x, Gibco) und 1 μ l T4-DNA-Ligase (1 U/ μ l, Gibco). Die Reaktion erfolgte innerhalb von 2-3 h bei Raumtemperatur.

Die anschließende *E. coli*-Transformation wurde durch Hitzeschock induziert. Dafür wurden 8 μ l des Ligationsansatzes mit 200 μ l kompetenten *E. coli*-Zellen (auf Eis aufgetaut) vermischt und 30 min auf Eis inkubiert. Nach dem Hitzeschock für 90 s bei 42°C und kurzem Abkühlen auf Eis (10 s) wurde 1 ml LB-Medium zugegeben und zur Expression des transformierten Ampicillin-Resistenzmarkters für 1 h bei 37°C inkubiert, bevor die Zellen auf Ampicillin-haltigen Selektions-Agarplatten ausplattiert wurden.

3.6.7 Genetische Transformation von *C. albicans* durch Elektroporation

Generell wurden für die Transformation entweder auxotrophe, *ura3*-negative *C. albicans*-Stämme oder Mycophenolsäure-sensitive Stämme oder Stämme mit beiden Wachstumsdefiziten eingesetzt. Wird nun bei der Transformation ein DNA-Fragment in die Hefezelle aufgenommen und ins Genom integriert, die als Selektionsmarker ein intaktes *URA3*- bzw. *MPA^R*-Gen enthält, so lassen sich prototrophe bzw. MPA-resistente Transformanten auf SD-Agarplatten bzw. MPA-haltigen Agarplatten gegenüber dem Ausgangsstamm selektionieren. Bei der zu transformierenden DNA handelte es sich ausschließlich um aus Plasmiden durch Restriktion herausgespaltene lineare DNA-Fragmente, die vorab durch Agarose-Gelelektion aufgereinigt wurden und in einer Konzentration von etwa 0.5 µg/µl gelöst in 5 µl H₂O vorlagen. Für die Integration an der gewünschten Stelle im Hefegenom durch homologe Rekombination war es außerdem erforderlich, daß die DNA an den 5`- und 3`-flankierenden Bereichen homologe Sequenzen mit der Zielsequenz aufwies.

Die Transformation von *C. albicans*-Zellen erfolgte durch Elektroporation (Köhler *et al.*, 1997), nachdem die Zellen zuvor nach der Lithiumacetat-Methode kompetent gemacht wurden. Zu diesem Zweck wurden als Vorkultur 10 ml YPD-Medium (evtl. mit 100 µg/ml Uridin) mit einer Kolonie des zu transformierenden *C. albicans*-Stammes inokuliert und über Nacht bei 30°C unter Schütteln inkubiert. Mit dieser Vorkultur wurde am nächsten Tag die 50 ml-YPD-Hauptkultur (evtl. mit 100 µg/ml Uridin) 1:10000 angeimpft und etwa 15 h (über Nacht) bei 30°C unter Schütteln weiterkultiviert, bis sie eine OD₆₀₀ von 1.5-2.0 erreicht hatte. Die Kultur wurde in ein 50 ml Greiner-Röhrchen überführt und abzentrifugiert (5 min, 4000 rpm). Das Zellpellet wurde in 8 ml sterilem bidest. H₂O suspendiert, mit je 1 ml 10x TE-Puffer (100 mM Tris-Cl pH 7.5, 10 mM EDTA pH 7.5) und 1 M Lithiumacetat pH 7.5 (mit Essigsäure eingestellt) versetzt und 60 min unter Schütteln bei 30°C inkubiert. Nach der Zugabe von 250 µl 1 M DTT erfolgten weitere 30 min Schüttelinkubation bei 30°C. Beginnend mit der anschließenden Zugabe von 40 ml eiskaltem sterilem H₂O wurde darauf geachtet, daß bei den folgenden Schritten die Zellen immer auf Eis bzw. bei 4°C gehalten wurden. Nach dem Abzentrifugieren (5 min, 4000 rpm, 4°C) wurden die Zellen einmal in 25 ml sterilem kaltem H₂O und einmal in 5 ml sterilem kaltem 1 M Sorbitol gewaschen und schließlich in 50 bis 100 µl 1 M Sorbitol aufgenommen.

Für die Transformation der kompetenten *C. albicans*-Zellen durch Elektroporation wurden 40 µl der Zellsuspension mit 5 µl der aufgereinigten DNA vermischt und in eine auf Eis vorgekühlte Elektroporationsküvette (0.2 cm Durchmesser, Equibio) überführt. Die Elektroporation erfolgte mit dem Elektroporationsgerät (Equibio) bei 1.8 kV. Zur Kontrolle

wurde eine Elektroporation der Zellen mit bidest H₂O ohne DNA durchgeführt. Auf die Zellen wurde 1 ml 1 M Sorbitol gegeben; diese Suspension in ein Eppendorf-Cap überführt und 100 µl schließlich auf den entsprechenden Selektionsagarplatten ausplattiert. Der Rest der Suspension wurde konzentriert und ebenfalls ausplattiert. Nach 2-3 Tagen Inkubation bei 30°C bei der Selektion *URA3*-positiver Klone bzw. 6 Tage bei der Selektion MPA-resistenter Klone konnten Transformanten gepickt und auf Selektionsagarplatten überstrichen werden.

3.6.8 Isolierung chromosomaler DNA aus *C. albicans*-Zellen

Zur Isolierung chromosomaler DNA aus *C. albicans*-Zellen wurde alternativ nach zwei Protokollen gearbeitet. Die mechanische Aufschlußmethode lieferte gegenüber der enzymatischen Methode schneller die DNA, wobei aber die Ausbeute geringer und die Qualität schlechter war, aber sich dennoch gut zum schnellen Southernblot-Screening von vielen Transformanten eignete. Zur qualitativ guten Darstellung beispielsweise von Stammserien im Southernblot wurde die etwas aufwendigere enzymatische Isolierung gewählt.

Zunächst mußten in jedem Fall die *C. albicans*-Zellen in 10 ml YPD-Medium bei 30°C über Nacht unter Schütteln angezüchtet werden. Die Kultur wurde in ein Greiner-Röhrchen überführt und abzentrifugiert (5 min, 4000 rpm). Bei der mechanischen Aufschlußmethode wurde das Pellet in 1 ml bidest. H₂O suspendiert, in ein 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und nochmals zum Waschen abzentrifugiert (1 min, 13000 rpm). Nun wurde das Pellet mit 200 µl TSSTE-Puffer (2% Triton X-100, 1% SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris/HCL pH 8.0, 1 mM EDTA), etwa 0.3 g Glassperlen (0.25-0.50 mm Durchmesser, Roth) sowie 200 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) versetzt und 3-4 min gevortext. Nach Zugabe von 200 µl TE-Puffer (100 mM Tris/HCL pH 8.0, 1 mM EDTA) wurde nochmals 30 sec gevortext, bevor die DNA durch Zentrifugieren (5 min, 13000 rpm) in die wässrige Phase extrahiert und in ein neues Cap überführt wurde. Auf die Fällung der DNA durch Zugabe von 1 ml Isopropanol und Abzentrifugieren des Pellets folgte ein Waschschrift in 70% Ethanol. Das luftgetrocknete DNA-Pellet wurde in 20 bis 50 µl H₂O gelöst und schließlich noch mit 1 µl RNaseA (50 mg/ml) für 15 min bei 37°C behandelt.

Für die enzymatische Methode der chromosomalen DNA-Isolierung wurde das Zell-Pellet aus der über-Nacht-Kultur nach dem Abzentrifugieren in 1 ml Sorbitol gewaschen, in ein 2 ml Eppendorf-Cap überführt und erneut zentrifugiert (1 min, 13000 rpm). Die Zellen wurden in 1 ml Lyse-Puffer (1 M Sorbitol, 100 mM Natriumcitrat pH 5.8, 50 mM EDTA pH 8.0, 2%

β -Mercaptoethanol, 500 U/ml Lyticase) resuspendiert und für 45 min bei 37°C inkubiert. Daraufhin folgte ein Zentrifugationsschritt (5 min, 13000 rpm) zum Abtrennen der Lösung von den entstandenen Sphäroblasten, und ein Wechsel in 800 μ l Proteinase-Puffer (10 mM Tris-Cl pH 7.5, 50 mM EDTA pH 7.5, 0.5% SDS, 1 mg/ml Proteinase K) und die Inkubation für 30 min bei 60°C wurde durchgeführt. Die Extraktion der DNA erfolgte nun durch Zugabe des gleichen Volumens an Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) und Trennung der Phasen durch Zentrifugation (5 min 13000 rpm). Die DNA-haltige wässrige Phase wurde in ein neues Cap überführt und mit 700 μ l Isopropanol ausgefällt. Nach der Zentrifugation (5 min, 13000 rpm) wurde das Pellet in 70% Ethanol gewaschen und kurz luftgetrocknet. Anschließend erfolgte eine RNase-Behandlung der DNA für 30 min bei 37°C, die dafür in 200 μ l TE-Puffer (10 mM Tris-Cl pH 7.5, 1 mM EDTA) gelöst und mit 2 μ l RNaseA (50 mg/ml) versetzt wurde. Anschließend wurde die DNA nochmals durch einen Phenolisierungsschritt extrahiert und durch einen Reinigungsschritt mit Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) von restlichem Phenol abgetrennt und in 200 μ l Isopropanol gefällt. Nach Waschen des Pellets mit 70% Ethanol und Lufttrocknen wurde die chromosomale DNA in 100 μ l bidest. H₂O gelöst und die Konzentration photometrisch bestimmt unter Annahme, daß eine OD₂₆₀ von 1.0 50 μ g/ml DNA entspricht.

3.6.9 Southern-Hybridisierung

Bei der Southern-Hybridisierung (Southernblot) wird auf einem Gel aufgetrennte DNA auf eine Membran transferiert, um darauf mit einer markierten Sonden-DNA die entsprechende komplementäre DNA zu detektieren (Southern, 1975). Zu diesem Zweck wurde zunächst in einem 30 μ l Restriktionsansatz ca. 10 μ g chromosomale *C. albicans*-DNA über Nacht bei 37°C mit einer geeigneten Restriktionsendonuklease verdaut und zusammen mit einem DNA-Größenstandard mittels Agarose-Gelelektrophorese über Nacht (1% Agarose, 1x TAE, 38 V) aufgetrennt. Nach dem Färben des Gels mit Ethidiumbromid und Kontrolle der DNA-Spaltung und Auftrennung unter UV-Ansicht, wurde die DNA mit Hilfe eines Vakuum-Blot-Geräts (Pharmacia) vom Gel auf eine zuvor mit dest. H₂O angefeuchtete und dann in 20x SSC (0.3 M Na-Citrat, 3 M NaCl) äquilibrierte Nylon-Membran (Schleicher und Schuell) transferiert. Hierfür wurde das Gel mit der DNA zunächst durch Anlegen eines Unterdrucks mit 3 verschiedenen Lösungen jeweils 15 min behandelt: Lösung A (250 mM HCl) zur Depurinierung, Lösung B (1.5 M NaCl, 0.5 M NaOH) zur Denaturierung und Lösung C (1.5 M NaCl, 0.5 M Tris-Cl pH 7.5) zur Neutralisierung. Anschließend erfolgte der

eigentliche Transfer durch Beschichten des Gels mit 20x SSC innerhalb von 90 min. Die Nylon-Membran wurde dann für je 30 sec in 0.4 N NaOH und 0.2 M Tris/HCL pH 7.5 inkubiert, bevor die DNA durch UV-Crosslinking auf der Membran fixiert wurde. Der Blot konnte so bis zur Hybridisierung aufbewahrt werden.

Die Hybridisierung wurde nach den Herstellerangaben des „ECL-labeling and detection-Kit“ (Amersham) durchgeführt. Die Membran wurde mit der Hybridisierungslösung in einem Rotationsofen bei 42°C für 1-2 h vorhybridisiert. Währenddessen wurde die DNA-Sonde (gelgereinigtes Fragment von 0.3-1 kb Länge, ca. 100 ng) für die Detektion mit Peroxidase gekoppelt und in das Hybridisierungsröhrchen gegeben. Nach der Hybridisierung über Nacht wurde die Membran 3x bei 42°C im Röhrchen für 1x 20 min und 2x 10 min mit Waschpuffer 1 (6 M Harnstoff, 0.4% SDS, 0.5x SSC), sowie 2x bei Raumtemperatur in einer Schale mit Waschpuffer 2 (2x SSC) gewaschen. Für die Signaldetektion wurden gleiche Volumenteile an Detektionslösung 1 und 2 gemischt und 1 min auf der Membran inkubiert, bevor sie in Frischhaltefolie eingepackt und ein ECL-Film (Amersham Hyperfilm ECL) aufgelegt wurde. Je nach Signalstärke wurde zwischen 2 und 90 min lang exponiert.

Für eine eventuelle Rehybridisierung mit einer anderen Sonde mußte das Signal einen Tag lang abklingen, wofür die Membran mit gebrauchter Detektionslösung in Folie eingeschweißt wurde. Vor Gebrauch wurde die Membran für 1 min mit 5x SSC gewaschen.

3.6.10 Isolierung von Gesamt-RNA aus *C. albicans*-Zellen

Die für die RNA-Isolierung (Ausubel *et al.*, 1989) benutzten Lösungen wurden ausschließlich mit RNase-freiem DEPC-H₂O (2 ml DEPC/ 1 l dest. H₂O, über Nacht bei 37°C, dann autoklaviert) angesetzt.

Eine *C. albicans* YPD-Kultur wurde aus einer Vorkultur in geeigneter Verdünnung (1:100-1:1000) inokuliert und bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 1 bzw. geringer (bei induzierten konditionalen Mutanten) bei 30°C unter Schütteln inkubiert. Die Zellen wurden in ein Greiner-Röhrchen überführt und abzentrifugiert (5 min, 4000 rpm, 4°C). Das Pellet wurde in 1 ml DEPC-H₂O gewaschen dabei in ein 2 ml Eppendorf-Cap überführt, abzentrifugiert und in 600 µl TES-Puffer (10 mM TRIS/HCl pH 7.5, 10 mM EDTA, 0.5% SDS) resuspendiert. Nach der Zugabe von 600 µl saurem Phenol wurde die Suspension sofort durch Vortexen gemischt und für 60 min bei 65°C inkubiert, wobei alle 10 min erneut gemischt wurde. Nach Abkühlen für 5 min auf Eis wurde der Ansatz abzentrifugiert (5 min 13000 rpm), 600 µl der wässrigen Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt, und nochmals mit 600 µl saurem

Phenol durch Vortexen vermischt. Auf einen erneuten Inkubationsschritt bei 65°C für 10 min folgte analog wie zuvor Abkühlen, Abzentrifugieren und Abziehen der wässrigen Phase. Nun wurde die RNA einmal mit Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) extrahiert und in 1 ml Ethanol und 40 µl 3 M Natriumacetat pH 5.2 auf Eis für 10 min präzipitiert, mit 70% Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in 20-100 µl DEPC-H₂O gelöst. Die RNA-Konzentrationsbestimmung erfolgte photometrisch unter Annahme, daß eine OD₂₆₀ von 1.0 40 µg/ml RNA entspricht.

3.6.11 Northern-Hybridisierung

Zur Bestimmung der Expression eines Gens wurde die semiquantitative Analyse nach dem Northern-Hybridisierungsverfahren (Ausubel *et al.*, 1989; Sambrook *et al.*, 1989) benutzt. Die RNA wurde hierfür in einem 1.2%igen Agarose-Gel mit 1.11% Formaldehyd für 3 h bei 150 V in 1x MOPS-Laufpuffer (41.8 g MOPS in 800 ml DEPC-H₂O gelöst, pH 7.0, 50 mM Natriumacetat pH 5.2, 10 mM EDTA pH 8.0, ad 1 l) mittels Gelelektrophorese aufgetrennt. In der Regel wurden 20-40 µg RNA in 40 µl DEPC-H₂O eingesetzt, diese mit 10 µl 5x RNA-Ladepuffer (4 mM EDTA pH 8.0, 0.25% Bromphenolblau, 0.25% Xylencyanol, 2.7% Formaldehyd, 17.2% Glycerin, 30.8% deionisiertes Formamid, 4x MOPS) versetzt und 5 min bei 65°C inkubiert und zusammen mit einem RNA-Größenmarker (Invitrogen) aufgetragen. Nach dem Gellauf wurde das Gel 2x je 30 min bei Raumtemperatur mit DEPC-H₂O gewaschen, um das Formaldehyd zu entfernen, und anschließend in 10x SSC für 45 min äquilibriert. Anschließend erfolgte der Transfer der RNA mit 20x SSC mittels Kapillarblot innerhalb von ca. 18 h auf eine Nylon-Membran. Die RNA wurde danach über UV-Crosslinking auf der Membran fixiert.

Für die Northern-Hybridisierungen wurden zwei verschiedene Verfahren der Sondenmarkierung eingesetzt. Zum einen wurde die T4-Kinase-Reaktion zum Anhängen eines ³²P-markierten Phosphates am 5'-Ende eines zur Zielsequenz komplementären Oligonukleotids benutzt, zum anderen wurden in einer Klenow-Polymerase-Reaktion radioaktiv markierte α-³²P-dATPs in neu synthetisierte DNA-Stränge eingebaut, wobei die Zielsequenz als Template diente. In jedem Fall mußte die mit 6x SSC befeuchtete Membran für 4 h im Hybridisierungspuffer (50% deionisiertes Formamid, 5x SSC, 0.1% SDS, 1 mM EDTA pH 8.0, 5x Denhardt's [100x Denhardt's: 2 g Polyvinyl-Pyrrolidon, 2 g Ficoll Typ 400, 2 g BSA, ad 100 ml dest. H₂O], 50 mM Tris/HCl pH 7.5, 100 µg/ml denaturierte Heringssperma-DNA) im Rotationsofen bei 42°C prähybridisiert werden.

Im T4-Polynukleotid-Kinase-Labeling wurden 30 pmol des Oligonukleotids in 34 μ l DEPC-H₂O zunächst 5 min bei 70°C denaturiert, auf Eis abgekühlt, und mit 5 μ l 10x T4 PNK-Puffer (New England Biolabs), 9 μ l (30 pmol) γ -³²P-dATP sowie 2 μ l T4-Kinase (20 Units, New England Biolabs) versetzt. Nach 40 min Inkubation bei 37°C wurde die Reaktion durch Kochen für 10 min bei 100°C abgestoppt und vor dem Zugeben ins Hybridisierungsröhrchen auf Eis abgekühlt. Bei der Sondenherstellung mit der Klenow-Polymerase wurde der „Random primed DNA labeling kit“ (Invitrogen) nach Vorschrift verwendet. Als Sonde dienten 200 ng eines gelgereinigten DNA-Fragments in 23 μ l DEPC-H₂O, die vorab für 10 min bei 100°C denaturiert, dann mit je 2 μ l dCTP, dGTP, dTTP, 15 μ l Random Primers Buffer Mixture, 5 μ l (ca. 50 μ Ci) α -³²P-dATP und 1 μ l Klenow-Polymerase versetzt. Die Polymerisation erfolgte bei 27°C für 1 h. Nach Zugabe des Stop-Puffers wurde die DNA 10 min bei 100°C denaturiert und zur Membran gegeben.

Die Hybridisierung der Nylonmembran erfolgte über Nacht im Rotationsofen bei 42°C, ebenso 1x Waschen mit Waschlösung 1 (2x SSC, 0.1% SDS) für 25 min (bei T4-Kinase-Labeling) bzw. für 15 min (bei Klenow-Labeling), sowie 1x Waschen mit Waschlösung 2 (0.1x SSC, 0.1% SDS) für 20 bzw. 15 min. Zuletzt wurde bei 56°C im Rotationsofen mit Waschlösung 2 für 20 bzw. 15 min gewaschen. Ein Röntgenfilm wurde aufgelegt und für zwei Tage bei -80°C exponiert.

3.6.12 Isolierung des Gesamt-Proteinextraktes aus *C. albicans*-Zellen

Die Isolierung des Gesamt-Proteinextraktes aus *C. albicans* erfolgte durch Aufschluß der Zellen mittels Glasperlen-Präparation (Horvath and Riezman, 1994). Dafür wurde eine 50 ml Kultur aus einer über-Nacht-Vorkultur angeimpft und bis zur log-Phase (ca. OD₆₀₀ 1.0) bei 30°C unter Schütteln bebrütet. Die Kultur wurde in einem 50 ml Greiner-Röhrchen abzentrifugiert (5 min, 4000 rpm, 4°C), zweimal in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß mit 1 ml H₂O gewaschen und erneut abzentrifugiert (1 min, 13000 rpm). Das Zellpellet wurde in 0.5 ml eiskaltem Probenpuffer (0.06 M Tris/HCl pH 6.8, 10% Glycerin, 2% SDS, 5% 2-Mercaptoethanol, 0.0025% Bromphenolblau, je frisch zugesetzt: 0.5 mM PMSF [0.1 M in EtOH] und 0.5 mM Benzamidin [0.5 M in H₂O]) resuspendiert, ca. 0.5 ml Glasperlen zugegeben und 4x für 45 sec auf höchster Stufe gevortext mit je 30 sec Abkühlen der Probe auf Eis zwischen den einzelnen Mixschritten. Die Proben wurden anschließend für 5 min bei 13000 rpm und 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Cap überführt und bis zur Verwendung bei -20°C aufbewahrt.

3.6.13 Westernblot

Zum Nachweis der Expression des Yml127-Proteins, das in C-terminaler Fusion mit drei Tandem-Repeats des HA-Epitops (Epitop aus dem Hämagglutinin des humanen Influenzavirus) (Wilson *et al.*, 1984) in den Stämmen YML127HAT1A/B und CYML127HAT2A/B vorlag, sowie der Stabilität dieser Proteine wurden Proteinextrakte dieser Stämme mittels Westernblot analysiert. Dazu wurden 20-40 µg Proteinextrakt (20-25 µl einer Präparation) auf einem 10%igen Polyacryamid-Gel (Maniatis *et al.*, 1982) zusammen mit einem Protein-Größenmarker (BioRad) aufgetrennt. Die Gelzusammensetzung war wie folgt. Trenngel: 2.5 ml Lösung B (1.5 M Tris-Cl pH 8.8, 0.4% SDS), 3.4 ml Gelstock (30%, 49:1 [Applichem]), 50 µl 10% APS, 5 µl Temed, ad 10 ml dest. H₂O; Sammelgel: 1.25 ml Lösung C (0.5 M Tris-Cl pH 6.8, 0.4% SDS), 0.65 ml Gelstock, 25 µl 10% APS, 5 µl Temed, ad 5 ml dest H₂O. Nach der Auftrennung der Proteine bei 40 mA für ca. 45 min in 1x SDS-Laufpuffer (für 10x: 30.2 g Tris, 188 g Glycin, 1%SDS, ad 1 l dest. H₂O) wurde das Gel in Towbin-Transferpuffer (25 mM Tris/HCl pH 8.0, 192 mM Glycin, 20% Methanol, pH 8.1-8.5) 5 min äquilibriert, ebenso die passend zugeschnittene Nitrozellulose-Membran, und ein Semi-Dry-Blot für 1.5 h bei 0.8 mA/cm² Membran durchgeführt. Für die Hybridisierung mit dem Antikörper mußte die Membran mit 5% Magermilchpulver (BioRad) in TBS (8 g NaCl, 0.2 g KCl, 3 g Tris, pH 7.4, ad 1 l) zunächst für 1 h abgeblockt werden, bevor 20 µl Peroxidase-konjugierter anti-HA-Antikörper (monoklonal aus Ratte, 25 U/ml, High Affinity [3F10], Roche) 1:500 in 5% Milchpulver in TBS zugegeben und für 1 h bei RT unter leichtem Schütteln inkubiert wurde. Nach dreimal Waschen der Membran für 5 min in TBS, erfolgte die Detektion mit ECL (siehe 3.6.9 Southern-Hybridisierung).

3.7 Mikroskopie von *C. albicans*

Generell wurde für die Mikroskopie ein Aliquot einer *C. albicans*-Zellsuspension auf einen Objektträger aufgetropft, mit einem Deckglas bedeckt und unter 400-facher Vergrößerung im Mikroskop mit Ölimmersion betrachtet. Mit einer Videokamera wurden zur morphologischen Betrachtung Phasenkontrastaufnahmen von Zellen gemacht, in denen Hyphenwachstum induziert bzw. zuvor ein essentielles Gen deletiert worden war. Durch UV-Anregung und entsprechende Filterung am Fluoreszenzmikroskop erfolgte die Aufnahme von Zellen, die durch Zellkern-Färbung, indirekte Immunfluoreszenz bzw. durch Lebend-/Totfärbung Leuchtsignale erkennen ließen.

3.7.1 Zellkern-Färbung

Die DNA und somit die Zellkerne in *C. albicans*-Zellen wurden durch den blau fluoreszierenden Höchst-Farbstoff 33258 angefärbt. Dafür wurde ein Aliquot (1 ml) einer gut bewachsenen Kultur entnommen, mit PBS gewaschen und zur Fixierung der Zellen mit 3.7% Paraformaldehyd versetzt. Nach 1 h Inkubation bei Raumtemperatur wurde das Zellpellet einmal für 30 min mit 70% Ethanol und einmal für 5 min mit 100% Ethanol behandelt, bevor es erneut in PBS gewaschen und in 20-50 µl PBS resuspendiert wurde. Gleiches Volumen an 1:1000 verdünntem Höchst-Farbstoff wurde zugegeben, und das Gemisch für 30 min im Dunkeln inkubiert. Nach einem Waschschrift in PBS wurde die Fluoreszenz der Nuklei am Fluoreszenzmikroskop unter Verwendung eines Blaufilters betrachtet.

3.7.2 Indirekte Immunfluoreszenz in *C. albicans*

Die indirekte Immunfluoreszenz zur Lokalisierung des HA-fusionierten Yml127-Proteins wurde in modifizierter Weise nach Poveda *et al.* durchgeführt (Poveda *et al.*, 2004). Dafür wurden über-Nacht-Kulturen der Stämme YML127HAT1A/B und CYML127HAT2A/B 1:100 in frisches YPD-Medium verdünnt und bei 30°C unter Schütteln bis zu einer OD₆₀₀ zwischen 1 und 2 bebrütet, ein 1 ml-Aliquot in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß in 1 ml PBS (8 g NaCl, 1.25 g Na₂HPO₄ x 2H₂O, 0.2 g KCl, 0.2g KH₂PO₄, pH 7.4-7.6, ad 1 l) gewaschen, abzentrifugiert (3 min, 3000 rpm) und für 1 h in 4% Paraformaldehyd in PBS bei RT unter leichtem Schütteln fixiert. Anschließend wurde das Zellpellet in Lysepuffer (1 M Sorbitol, 100 mM Natriumcitrat pH 5.8, 50 mM EDTA pH 8.0, 2% β-Mercaptoethanol, 500 U/ml Lyticase) gewaschen, abzentrifugiert (3 min, 3000 rpm) und erneut in 500 µl Lysepuffer resuspendiert, worin die Lyse der Zellwand bei 37°C für 15 min erfolgte. Nach dem vollständigen Abtrennen des Lysepuffers durch 3x Waschen mit PBS und Abzentrifugieren (3 min, 3000 rpm) wurde das Pellet in 20 µl PBS/0.1% BSA resuspendiert, das den anti-HA-Antikörper (monoklonal aus Ratte, High Affinity [3F10], Roche) in einer Konzentration von 2 µg/ml enthielt. Als Negativkontrolle wurde eine Probe in PBS/0.1% BSA ohne Antikörper resuspendiert. Nach Inkubation über Nacht bei 4°C unter leichtem Schütteln wurden die Zellen mit PBS, PBS plus 0.1% Nonidet P40 und nochmals mit PBS gewaschen und anschließend für 5-7 h im Dunkeln bei RT mit dem 2. Antikörper anti-Ratte Texas-red (2mg/ml 1:150 in PBS, Invitrogen), der ein rot-emittierendes Fluorophor enthält (Titus *et al.*, 1982), unter leichtem Schütteln behandelt. Zuletzt wurden die Zellen nach 2x Waschen in PBS in 20-50 µl PBS aufgenommen und mit gleichem Volumen 1:1000 verdünntem Höchst-

Farbstoff 33258 versetzt und für 30 min bei RT im Dunkeln inkubiert, um die Zellkerne anzufärben. Die Analyse der Zellen erfolgte am Fluoreszenzmikroskop unter Verwendung der entsprechenden Filter.

3.7.3 Lebend-/Totfärbung von *C. albicans*-Zellen

Die Lebend-/Totfärbung von *C. albicans*-Zellen erfolgte nach Vorschrift der MoBiTee GmbH mit den Farbstoffen CFDA (5,(6)-Carboxyfluoresceindiacetat) für die Lebendfärbung und DiBAe (bis-(1,3-dibutylbarbituricacid)trimethineoxonol) für die Totfärbung. Für die CFDA-Färbung wurden die Zellen 2x in 0.1 M MOPS-Puffer pH 7.0 gewaschen, in 0.1 M MOPS/50 mM Citronensäure pH 3.0 resuspendiert und CFDA in einer Konzentration von 50 µg/ml (Stock: 5 mg/ml) zugegeben. Nach Inkubation im Dunkeln für 45 min bei 37°C unter leichtem Schütteln wurde die Probe bis zur Analyse auf Eis aufbewahrt. Für die Totfärbung wurden die Zellen in 0.1 M MOPS pH 7.0 aufgenommen, DiBAe in einer Konzentration von 2 µg/ml (Stock: 1 mg/ml) zugegeben und im Dunkeln bei RT unter leichtem Schütteln für 1 h inkubiert. Nach 2x Waschen in 0.1 M MOPS pH 7.0 konnten die Zellen bis zur Analyse auf Eis aufbewahrt werden. Der jeweilige Farbstoffe erzeugte in lebenden bzw. toten Zellen ein grün fluoreszierendes Licht, das am Fluoreszenzmikroskop detektiert und analysiert wurde.

3.8 Phänotypische Tests

3.8.1 Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK-Test)

Zur Bestimmung der Sensitivität der heterozygoten *C. albicans* *YML93*- und *YPRI43*-Mutanten gegenüber dem Inhibitor der Fettsäuresynthese Cerulenin (Sigma), dem Translationshemmer Cycloheximid (Applichem) und dem Antimykotikum und Hemmstoff des rRNA-Processings 5-Fluorocytosin (Sigma) wurden MHK-Tests in „high resolution“ Medium (14.67 g HR-Medium [Oxoid], 1 g NaHCO₃, 0.2 M Phosphatpuffer, pH 7.2, ad 1 l) nach Ruhnke *et al.* durchgeführt (Ruhnke *et al.*, 1994). Dazu wurden 2 Tage alte Kolonien in 2 ml 0.9% NaCl suspendiert und davon 4 µl in 2 ml HR-Medium verdünnt und je 100 µl davon in eine Reihe einer 96-well-Platte vorgelegt. Von den Testsubstanzen wurden ebenfalls in HR-Medium Verdünnungsreihen im Verhältnis 1:2 hergestellt, von denen je 100 µl zu den Zellen hinzupipettiert wurde, so daß in jedem Napf Zellsuspension und Testsubstanz in abnehmenden Konzentrationen zu gleichen Teilen gemischt wurden. Nach Inkubation der

Platten über Nacht bei 37°C wurden die einzelnen Näpfe auf Wachstum der Zellen überprüft und Unterschiede in bezug auf die verschiedenen Konzentrationen der Testsubstanzen festgehalten. Als minimale Hemmkonzentration bezeichnet man die geringste Konzentration einer Substanz, bei der das Wachstum eines Stammes gerade noch inhibiert wird.

3.8.2 Sensibilitätstest auf Agarplatten (Spot-Test)

Der Spot-Test wurde zur Bestimmung der Ionensensitivität und Sensitivität gegenüber SDS, Fluconazol und alkalischem pH-Wert der Calcineurin-Mutanten herangezogen. Dabei wurden über-Nacht-Kulturen dieser Stämme von 10^{-1} bis 10^{-5} in sterilem H₂O verdünnt, wobei darauf geachtet wurde, daß bei jedem Stamm etwa die gleiche Zellzahl pro Verdünnung vorlag. Von jeder Verdünnung wurden 8 µl auf YPD-Agarplatten aufgetropft, die jeweils bestimmte Konzentrationen der zu untersuchenden Salze bzw. SDS oder 155 mM Tris/HCL zur pH-Wert-Einstellung enthielten.

3.8.3 Test zur Serumsensitivität

Dieser Test diente zur Aufdeckung, in wie weit die Calcineurin-Mutanten bei Inkubation in Serum in ihrem Wachstum geschwächt sind. Hierbei wurden die Zellen einer YPD über-Nacht-Kultur in PBS gewaschen und 1:100 in 1 ml humanes Serum (aus Blut gewonnen) oder FCS (PAA Laboratories GmbH) überführt und bei 37°C auf dem Heizblock inkubiert. Das Inokulum betrug ca. 2×10^6 Zellen pro ml. Die genauen Zellzahlen wurden durch Ausplattieren eines geeignet verdünnten Aliquots auf YPD-Agar zu Beginn, nach 4 h, 8 h und 24 h ermittelt.

3.9 *In vivo*-Experimente: Murines Modell einer systemischen *C. albicans*-Infektion

Die Virulenz-Tests im Tiermodell wurden in Zusammenarbeit mit Herrn PD Dr. med. Klaus Schröppel (Institut für Klinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene, Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg) von Frau Barbara Bodendorfer durchgeführt. In diesen Tests wurde die Virulenz der Calcineurin-Mutanten im Vergleich zu den entsprechend komplementierten Stämmen bzw. zum Wildtyp-Stamm überprüft.

Im murinen Mausmodell einer systemischen *C. albicans* Infektion wurden 8-10 Wochen alte weibliche BALB/c Mäuse (Charles River Breeding Laboratories, Sulzfeld, Germany) mit 5×10^5 *C. albicans*-Zellen über intravenöse Injektion infiziert (Schweizer *et al.*, 2000). Pro Stamm und Versuch wurden 5-8 Mäuse eingesetzt. Überlebenskurven wurden nach der Kaplan-Meier-Methode unter Verwendung des PRISM Programmes (GraphPad Software, San Diego, Californien) berechnet. Ein P-Wert <0.05 (Mantel-Haenzel-Test) wurde dabei als signifikant angesehen (Mantel and Haenzel, 1958). Für die mikroskopische Analyse wurden *C. albicans*-Zellen aus KOH-solubilisierten Nieren extrahiert und mit Calcofluor white (Sigma) angefärbt. Für die Bestimmung der Lebendzellzahl pro mg Niere (Feuchtgewicht) wurden die Organe in PBS homogenisiert und Replika serieller Verdünnungen auf YPD ausplattiert und nach 2 Tagen ausgezählt.

4 Ergebnisse

4.1 Funktionelle Analyse des Calcineurin A-Gens *CMP1* in *Candida albicans*

4.1.1 Identifizierung des *CMP1*-Gens durch Homologievergleich

Die Verfügbarkeit von umfassenden Genomdatenbanken sowohl der bestens untersuchten Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* (<http://www.yeastgenome.org>) als auch der von *Candida albicans* (<http://www-sequence.stanford.edu/group/candida/>) ermöglichte die leichte Identifizierung des Gens für die katalytische Untereinheit A des Calcineurins in *C. albicans* durch den BLAST-Homologievergleich der beiden bereits charakterisierten redundanten Gene in der Bäckerhefe *ScCNA1* und *ScCNA2* mit dem *C. albicans*-Genom. Der darin identifizierte offene Leserahmen (6.3161) kodiert für ein Protein mit einer hohen Homologie zu ScCna1p (69% Ähnlichkeit; 61% Identität) und ScCna2p (69% Ähnlichkeit, 59% Identität), welches seine hohe Konserviertheit in verwandten Organismen, wie auch in anderen Eukaryonten (Rusnak and Mertz, 2000), unterstreicht. Das *CaCMP1*-Gen ist auf dem Contig 6-2213 (nach „alignment 6“) bzw. 19-10237 (nach „alignment 19“) lokalisiert und wurde durch das „Stanford Genome Technologie Center“ unter dem Namen *CMP1* annotiert. Es weist eine Länge von 1830 bp auf und kodiert für ein Protein mit 609 Aminosäuren und einer theoretischen molekularen Masse von 69.9 kDa. Ein Homologievergleich auf Proteinebene der beiden redundanten Proteine ScCna1p und ScCna2p mit dem CaCmp1p ist in Abb. 1 dargestellt. Die Tatsache, daß die Bindedomänen für die Calcineurin B-Untereinheit und Calmodulin hoch konserviert sind, deutet auf eine ebenfalls konservierte Regulation des Calcineurins über diese beiden Proteine hin. Außer dem *CaCMP1*-Leseraster konnte kein anderes Gen mit vergleichbarer Homologie identifiziert werden. Dies wies darauf hin, daß anders als bei *S. cerevisiae* nur ein einziges Gen in *C. albicans* für die katalytische Untereinheit A des Calcineurins existiert wie auch bei *Cryptococcus neoformans* (Odom *et al.*, 1997).

ScCna1p	MS-KDLN-----SSRIKIHK-----PND SYIKVDRKK-----DLTKVBLENGKVI STKDRP IA	47
ScCna2p	MS-SDAIRNTEQINAAIKI IENK-TERPQSSTTPIDSKASTVAAANST ATE T SRDLTQYTLDDGRVWSTN RRI MN	73
CaCmp1p	MSGNTVQRNTEQINNALNAIQHRRRTTTGNESENTNTNQRQ-----I LQNP T GRDVTI YVTDGGEKY STVERAVK	68
ScCna1p	SVP AITGKIP SDEE VFD SKTGLPNH SFLREHFFHEGRLSKEQA I K I L N M S T V A L S K E P N L L K L K A P I T I C G D I H G	122
ScCna2p	KVPAITSHVPTDEE L R Q P N - G I P R H E F L R D H F K R E G K L S A A Q A A R I V T L A T E L S K E P N L S V P A P I T I C G D I H G	147
CaCmp1p	SWDPPATFRKPKDEQV E V P N - G K P N H Q F L K Q H F I H E G R L H E H Q A I Q I L K Q A T H L S K E P N L L S V P A P I T I C G D V H G	142
ScCna1p	QYD L L K L F E V G G D P A E I D V L F L G D Y V D R G A F S F E C L I Y L Y S L K L N N L G R F W M L R G N H E C K H L T S Y F T F K N E M L H	197
ScCna2p	QYD L L K L F E V G G D P A T S Y L F L G D Y V D R G S F S F E C L I Y L Y S L K L N F N D H F W L R G N H E C K H L T S Y F T F K N E M L H	222
CaCmp1p	QYD L M K L F E V G G D P A S T K Y L F L G D Y V D R G S F S I E C L L Y L Y S L K I N Y P D T F W M L R G N H E C R H L T E Y F T F K N E C L H	217
ScCna1p	KYDMEVYDA CCRS F N V L P L A A L M N G Q Y F C V H G G I S P E L K S V E D V N K I N R F R E I P S R G L M C D L L W A D P W E N Y D D A R	272
ScCna2p	KYNLDIYKCCESFN N L P L A A L M N G Q V L C V H G G I S P E L N S L Q D I N N L N R F R E I P S H G L M C D L L W A D P I E E Y D E V L	297
CaCmp1p	KVSEELVBECLV S F N A L P L A A I M N E Q F F C V H G G I S E Q L T S L D S L R K L H R F R E P E T K G L M C D L L W A D P I E E Y D D - -	290
ScCna1p	DG-----SEFDQSEDE F V P N S L R G C S F A F T E K A S C K F L K A N G L L S I I R A H E A Q D A G Y R M Y K N N	330
ScCna2p	DKDLTEEDIVNSKT M V P H H G K M A P S R D M F V P N S V R G C S Y A F T Y R A A C H F L Q E T G L L S I I R A H E A Q D A G Y R M Y K N T	372
CaCmp1p	-----DNLDQEEV T N V V R G C S F A F T Y K A A C K F L D R T K L L S V I R A H E A Q N A G Y R M Y K R T	343
Calcineurin B binding		
ScCna1p	KV T G F P S L I T M F S A P N Y L D T Y H N K A A V L K Y E N V M N I R Q F H M S P H P Y W L P D F M D V F T W S L P F V G E K V T S M L V S I L	405
ScCna2p	KT L G F P S L L T L F S A P N Y L D T Y N N K A A I L K Y E N N V M N I R Q F N M T P H P Y W L P D F M D V F T W S L P F V G E K V T E M L V A I L	447
CaCmp1p	K T M G F P S L L T M F S A P N Y L D S Y N N K A A V L K Y E N N V M N I R Q F N A S P H P Y W L P H F M D V F T W S L P F V G E K V T D M L V S I L	418
ScCna1p	N I C S E Q E L D P E S - E P K A A E E T V K A R A N A T K E T G T P -----S D E K A S S -----A I L E D	451
ScCna2p	N I C T E D E L E N D T P V I E E L V G T D K K L P Q A G K S E A T P -----O P A T S A S P K H A S I L D D	498
CaCmp1p	N V C T E E E L D E D L P F S E A E I G V T P T T T T T A T P V S P K A Y P P S S R I T S P H K S T K L V E S R A N E E K A N D G D D D S E M T L	493
Calmodulin binding		
ScCna1p	E T R R K A L R N K I L A I A K V S R M F S V L R E E S E K V E Y L K I M N A G V L P R G A L A R G T E G L N E T L S T F E K A R K E D L I N E K L P	526
ScCna2p	E H R R K A L R N K I L A V A K V S R M Y S V L R E E T N K V Q F L K D H N S G V L P R G A L S N G V K G L D E A L S T F E R A R K H D L I N E K L P	573
CaCmp1p	E E K K Q A L R N K I I A T G K M S R M F Q V L R E E Q E N V A H L K E L N R G S L P K G S L L H G A D G L K N T I N S F E A K A A D R V N E A L P	568
Autoinhibitory		
ScCna1p	P S L S E V E Q E K I K Y Y E K I L K G A E K K P Q L -----	553
ScCna2p	P S L D E L K N E N K K Y Y E K W W Q K V H E H D A K N D S K -----	604
CaCmp1p	P S F E D L Q R L K Q E K N T R I R Q Q I E N Q E M S G P V F Q R L I R R L S Q S	609

Abb. 1 Homologievergleich der katalytischen Untereinheiten von Calcineurin Cna1p und Cna2p von *S. cerevisiae* (Sc) und Cmp1p von *C. albicans* (Ca). Die Aminosäuresequenzen der Proteine sind im Standard-Einzelbuchstaben-Code angegeben. Identische Reste sind schwarz unterlegt, ähnliche in grau. Die Positionen der Aminosäuren sind auf der rechten Seite gezeigt. Die Lage der hochkonservierten regulatorischen Calcineurin B- und Calmodulin-Bindestelle sowie der autoinhibitorischen Domäne sind durch Balken über den Sequenzen gekennzeichnet (nach Odom *et al.*, 1997).

4.1.2 Konstruktion einer Calcineurin-Mutante mit dem *ura3*-negativen Ausgangsstamm CAI4

4.1.2.1 Das *CMPI*-Gen in *C. albicans* ist nicht essentiell

Aufgrund der Tatsache, daß Calcineurin in *Aspergillus nidulans* ein essentielles Protein darstellt, und es für das Wachstum bei 37°C des pathogenen Pilzes *Cryptococcus neoformans* und damit für eine Infektion notwendig ist, sollte nun zunächst überprüft werden, ob Calcineurin auch in *C. albicans* für das Überleben *per se* oder für das Wachstum bei Körpertemperatur eine essentielle Rolle spielt. Um dieser Frage nachzugehen, wurde eine Mutagenese des *CaCMPI*-Gens in dem Laborstamm CAI4 durchgeführt mit dem Ziel, eine homozygote Mutante zu erhalten, in der sich die Funktionen des Calcineurins in *C. albicans* studieren lassen. Bei dem Stamm CAI4 handelt sich um einen auxotrophen Stamm, in dem das *URA3*-Gen deletiert ist, das für die Orotidylat-Decarboxylase kodiert, ein Enzym in der

Uridin-Biosynthese, weshalb das Medium für sein Wachstum stets mit Uridin supplementiert werden muß. Das Prinzip der Mutagenese dieses Stammes beruht auf der Verwendung eines *URA3*-Selektionsmarkers, der durch die sog. „Flipper“-Strategie recycelt und zur sequentiellen Inaktivierung beider Allele eines Gens verwendet werden kann. Das Schema der „*URA3*-Flipper“- (*URA3*-FLIP) Methode in Abb. 2A zeigt, wie der *URA3*-Selektionsmarker in einem linearen DNA-Fragment zunächst ins Genom mittels homologer Rekombination integriert und anschließend durch die Induktion der „site-spezifischen“ Rekombinase FLP aus *S. cerevisiae* wieder aus dem Genom herausgeschnitten wird (Morschhäuser *et al.*, 1999). Die homologe Rekombination wird vermittelt durch flankierende Bereiche der Genkassette, die homolog zur Zielsequenz im Genom sind. Die Aktivität der FLP-Rekombinase wird über den induzierbaren *SAP2*- (Sekretierte Aspartylprotease-) Promotor (*SAP2P*) kontrolliert, der nur in einem Medium mit ausschließlich Proteinen als Stickstoffquelle angeschaltet ist und nicht in normalem Vollmedium, das niedermolekulare Stickstoffquellen enthält. Bei einer Expression der FLP-Rekombinase erkennt diese ihre Erkennungssequenzen *FRTs* („FLP recognition targets“) und deletiert den dazwischen liegenden DNA-Bereich. Auf diese Weise erhält man nacheinander eine heterozygote *URA3*⁺, eine heterozygote *ura3*⁻, sowie nach der zweiten Transformation eine homozygote *URA3*⁺ und nach erneuter Exzision eine homozygote *ura3*⁻ Mutante.

Die genaue Struktur der verwendeten Mutagenesekassette ist in Abb. 2B dargestellt. Sie entstammte dem *KpnI*-*SacI*-Fragment aus dem Plasmid pCMP1M2, das wie folgt konstruiert wurde. Ein *KpnI*-*XhoI*-Fragment, das upstream-*CMP1*-Sequenzen von -1058 bis +77 bezogen auf das Start-Codon enthielt, wurde aus chromosomaler DNA des Stammes CAI4 mit dem Primerpaar CMP1 und CMP2 amplifiziert, in welche die beiden Schnittstellen eingefügt worden waren. Ein *SacII*-*SacI*-downstream-Fragment mit Sequenzen von +1594 bis +2316 wurde mit den Primern CMP3 und CMP4 amplifiziert, die entsprechende Schnittstellen enthielten. Beide Fragmente wurden an je ein Ende der *URA3*-Flipper-Kassette aus dem Plasmid pSFU1 kloniert, woraus pCMP1M2 resultierte, in dem die *CMP1*-kodierende Region von den Positionen +78 bis +1593 durch den *URA3*-Flipper ersetzt worden war.

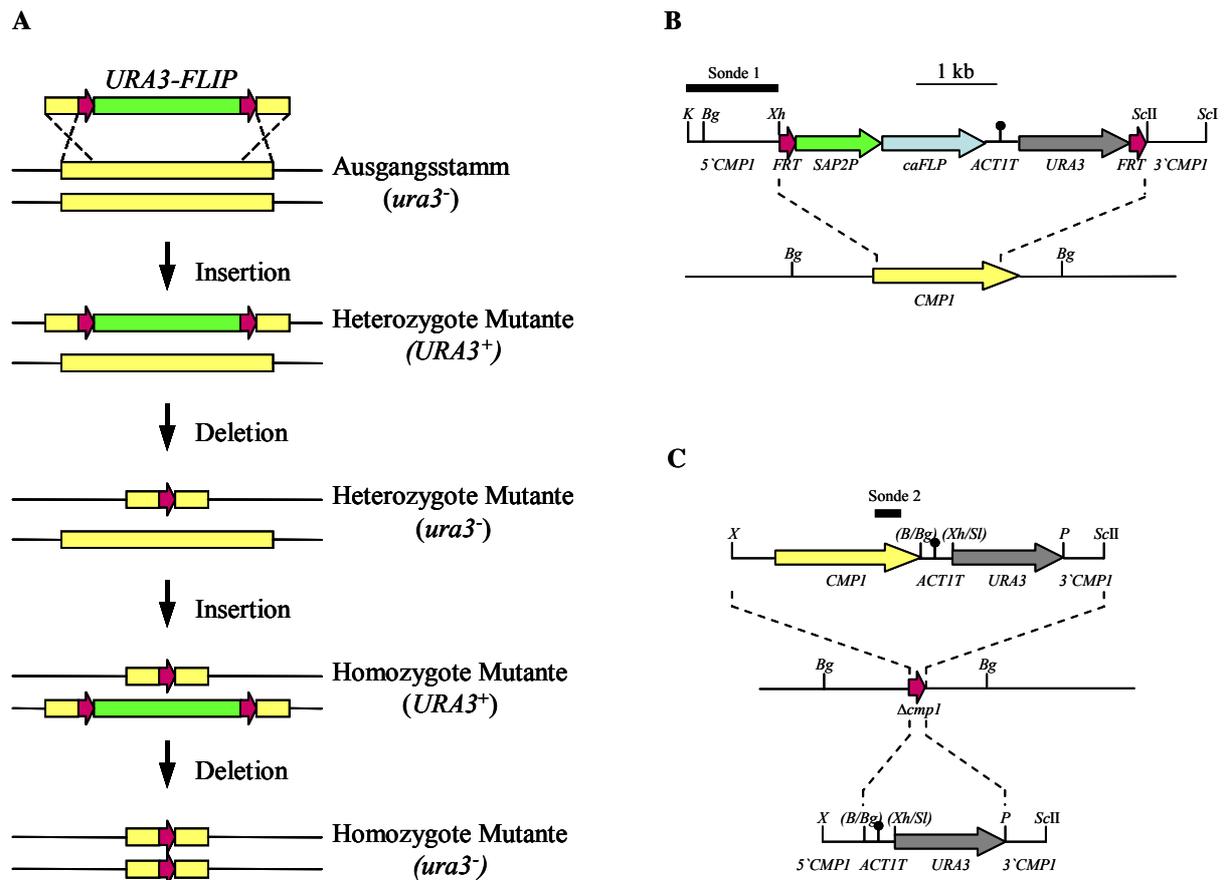


Abb. 2 Prinzip der *URA3*-Flipper-Kassette und der Mutagenese des *CaCMP1*-Lokus. **A.** Schematische Darstellung der sequentiellen Inaktivierung beider Allele eines Locus mit anschließender Exzision des Markers. **B.** genaue Struktur der *CMP1*-Mutagenese-Kassette aus pCMP1M2. **C.** Strukturen der Fragmente für die Reintegration des *CMP1*-Gens (oben, pCMP1K1) und für die Integration des *URA3*-Markers (unten, pCMP1M4) in die Mutantenstämme. Relevante Schnittstellen sowie die Lage der für die Southern-Hybridisierungen verwendeten Sonden 1 und 2 sind angegeben. *B*: *Bam*HI; *Bg*: *Bg*III; *K*: *Kpn*I; *P*: *Pst*I; *ScI*: *Sac*I; *ScII*: *Sac*II; *Sl*: *Sal*I; *X*: *Xba*I; *Xh*: *Xho*I. Schnittstellen, die durch Ligation zerstört wurden, sind mit Klammern gekennzeichnet. Für weitere Erklärungen siehe Text. Mit Ausnahme der *FRT*-sites sind alle Größen maßstabsgetreu wiedergegeben.

Es muß erwähnt werden, daß jeweils zwei isogene Stämme und somit zwei Stammserien A und B hergestellt wurden, deren korrekter Genotyp nach jedem Schritt mittels Southernblot-Hybridisierung überprüft wurde. Aus zwei unabhängigen Stämmen, in denen nach der ersten Transformation von CAI4 fast das gesamte *CMP1*-Leseraster eines Allels deletiert worden war (CMP1M1A und B, Abb. 3A Spuren 2 und 3), wurde der *URA3*-Flipper durch FLP-vermittelte Rekombination herausgeschnitten, so daß die Uridin-auxotrophen Stämme CMP1M2A und B erhalten wurden (Abb. 3A Spuren 4 und 5). Nachdem die Inaktivierung des zweiten *CMP1*-Allels in *C. albicans* in der zweiten Transformationsrunde möglich war, wie die Southernblot-Analyse zeigte (CMP1M3A und B, Abb. 3A Spuren 6 und 7), war eine für das Überleben essentielle Funktion des Calcineurins in diesem Organismus

auszuschließen. Aus den homozygoten $\Delta cmp1$ -Mutanten CMP1M3A und B gingen nach der *URA3*-Flipper-Deletion die Uridin-auxotrophen Derivate CMP1M4A und B (Abb. 3A Spuren 8 und 9) hervor.

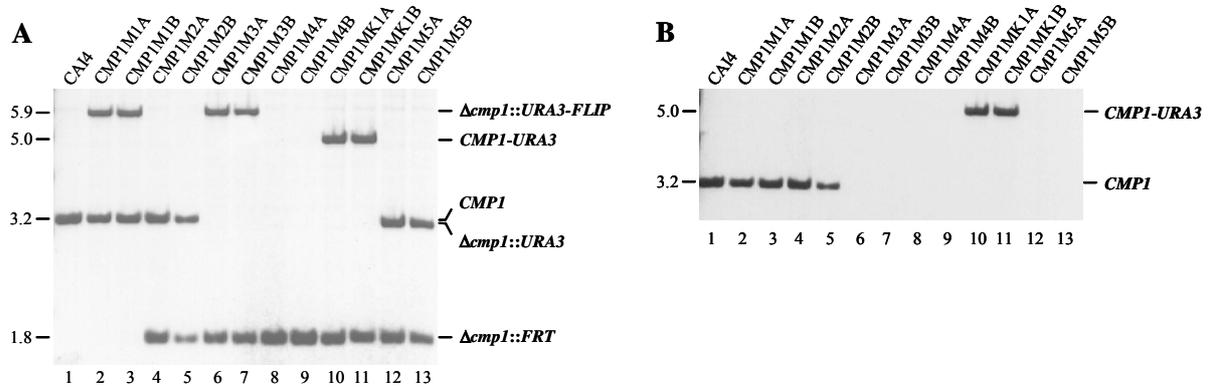


Abb. 3 Southern-Hybridisierungen *Bgl*III-gespaltener genomischer DNA des Ausgangsstammes CAI4 und seiner mutagenisierten Derivate. **A.** mit dem 5' *CMP1*-Fragment (Sonde 1). **B.** Rehybridisierung mit einem *CMP1* internen Fragment (Sonde 2). Die Größen der hybridisierenden Fragmente in Kilobasen sind auf der linken Seite, die Identität der Fragmente auf der rechten Seite angegeben. Für die Lage der Sonden siehe Abb. 2B und C.

4.1.2.2 Konstruktion eines komplementierten Stammes aus der $\Delta cmp1$ -Mutante

Um eventuelle Phänotypen dieser homozygoten Mutanten zu verifizieren, war es nötig, einen Stamm herzustellen, in dem die Mutation durch Einfügen eines intakten, funktionellen *CMP1*-Gens in eines der beiden inaktivierten Allele komplementiert wurde. Da dafür wieder der *URA3*-Selektionsmarker in die Mutante eingebracht wurde, mußte, um Mutanten mit Uridin-prototrophen Komplementantenstämmen zu vergleichen, der *URA3*-Marker allein ebenfalls in denselben Locus der Mutante integriert werden. Ein weiterer Vorteil der Reintegration des *URA3*-Markers in die *ura3⁻* Mutante bestand darin, daß daraus prototrophe Stämme hervorgingen, die später für *in vivo*-Experimente im Tiermodell eingesetzt werden konnten. Die für die entsprechenden Transformationen verwendeten *Xba*I-*Sac*II-Fragmente wurden aus den Plasmiden pCMP1K1 und pCMP1M4 gewonnen (Abb. 2C). Dafür wurden zunächst *CMP1*-downstream-Sequenzen von Position +1825 bis +2316 aus pCMP1M2-Plasmid-DNA mit dem Primerpaar CMP5 und CMP6 amplifiziert, an den eingeführten Schnittstellen *Pst*I und *Sac*II gespalten und mit dem gleichermaßen gespaltenen pGFP26A zum Plasmid pCMP1M3 kloniert. Anschließend wurde der *CMP1*-upstream-Bereich zusammen mit dem offenen Leseraster aus chromosomaler DNA mit den Primern CMP1 und CMP8 amplifiziert und an der Position -528 mit *Xba*I sowie an der hinter dem Stop-Codon eingeführten *Bam*HI-Schnittstelle gespalten. Gleichzeitig erfolgte die Amplifikation des etwa

370 bp großen *ACT1T*- (*ACT1*-Terminator) Fragments mit den Primern ACT16 und ACT21 und pLACZ5-DNA als Template, das an den eingeführten Restriktionsschnittstellen *Bgl*II und *Xho*I gespalten wurde. Das Plasmid pCMP1M3 wurde *Xba*I-*Sal*I verdaut und mit den beiden PCR-Produkten zum Plasmid pCMP1K1 kloniert (Abb. 2C, oben). Das Kontroll-Konstrukt pCMP1M4 entstand aus der Ligation eines *Xba*I-*Bam*HI-gespaltenen PCR-Produkts unter Verwendung der Primer CMP1 und CMP7, das 5' *CMP1*-Sequenzen von Position -528 bis +7 enthielt, mit dem *Bgl*II-*Xho*I-gespaltenen *ACT1T*-Amplifikat und dem *Xba*I-*Sal*I-gespaltenen pCMP1M3 als Vektor (Abb. 2C, unten). CMP1M4A und B-Stämme, die mit pCMP1K1 transformiert wurden, erhielten die Bezeichnung CMP1K1A und B und stellten die *CMP1*-komplementierten Stämme dar (Abb. 3A, Spuren 10 und 11). Derivate von CMP1M4A und B, die aus der Integration der pCMP1M4-Kassette hervorgingen, wurden CMP1M5A und B genannt und wiesen einen *URA3*⁺ Δ *cmp1*-homozygoten Genotyp auf (Abb. 3A, Spuren 12 und 13).

Bei einer Rehybridisierung des Southernblots aus Abb. 3A mit einer Sonde aus der *CMP1*-kodierenden Region konnte beim Ausgangsstamm CAI4 ebenso nur eine hybridisierende Bande von ca. 3.2 kb detektiert werden (Abb. 3B, Spur 1), die nach den beiden Allelaustauschen in den homozygoten Δ *cmp1*-Mutanten verschwand (Abb. 3B, Spuren 6-9, 12, 13). Dies lieferte einen zusätzlichen Hinweis darauf, daß *C. albicans* lediglich ein einziges Gen für die katalytische Untereinheit des Calcineurins besitzt.

4.1.3 Deletion von *CMP1* verursacht Hypersensitivität gegenüber Ionen- und alkalischem Streß

Zunächst sollte das Verhalten der Δ *cmp1*-Mutanten unter Bedingungen getestet werden, unter denen auch bei *cna1/cna2*-Mutanten der verwandten Bäckerhefe *S. cerevisiae* Phänotypen beschrieben worden waren. Hierzu wurde das Wachstum sowohl der homozygoten Uridin-prototrophen als auch der Uridin-auxotrophen Mutanten auf YPD-Platten untersucht, die erhöhte Konzentrationen an bestimmten Ionen aufwiesen. Verglichen wurde das Wachstum mit dem Wildtyp-Stamm SC5314 (*URA3*⁺) und dem Laborstamm CAI4 (*ura3*⁻), sowie mit den komplementierten Stämmen. Wie in Abb. 4 gezeigt, wiesen die Δ *cmp1*-Mutanten eine erhöhte Sensitivität gegenüber Ionenstreß auf, weil sie in Gegenwart von 1.8 M bzw. 1.0 M Natrium, 0.3 M Lithium, 10 mM Mangan und 0.3 M Calcium ein gehemmtes Wachstum im Gegensatz zu den entsprechenden Wildtyp-Stämmen zeigten. Dieser Effekt konnte durch die Reintegration eines intakten *CMP1*-Gens in den komplementierten Stämmen CMP1K1A und

B aufgehoben werden, nachdem diese vergleichbar zum Wildtyp-Stamm SC5314 wachsen konnten. Bei Zugabe von NaCl in einer Konzentration von 1.8 M war das Wachstum nicht nur bei den Mutanten CMP1M4A und B, sondern auch bei dem Uridin-auxotrophen Wildtyp-Stamm CAI4 inhibiert (nicht gezeigt), was auf eine erhöhte Basissensitivität dieses Stammes aufgrund der Inaktivierung des *URA3*-Lokus hindeutet. Deshalb wurde hier die NaCl-Konzentration verringert, so daß auch in diesen Stämmen ein deutlicher Unterschied im Wachstum zwischen Mutanten und Wildtyp beobachtet werden konnte, was das Ergebnis in den Uridin-prototrophen Stämmen verifizierte. Darüber hinaus war es interessant, daß die Calcineurin-Mutanten sensitiv gegenüber einem hohen Calcium-Ionenspiegel waren, nicht aber der Wildtyp- bzw. Laborstamm, da in *S. cerevisiae* genau der gegenteilige Phänotyp beschrieben worden war. In *S. cerevisiae* erlangten Calcineurin-Mutanten nämlich eine größere Toleranz gegenüber hohen Calcium-Konzentrationen als der Wildtyp.

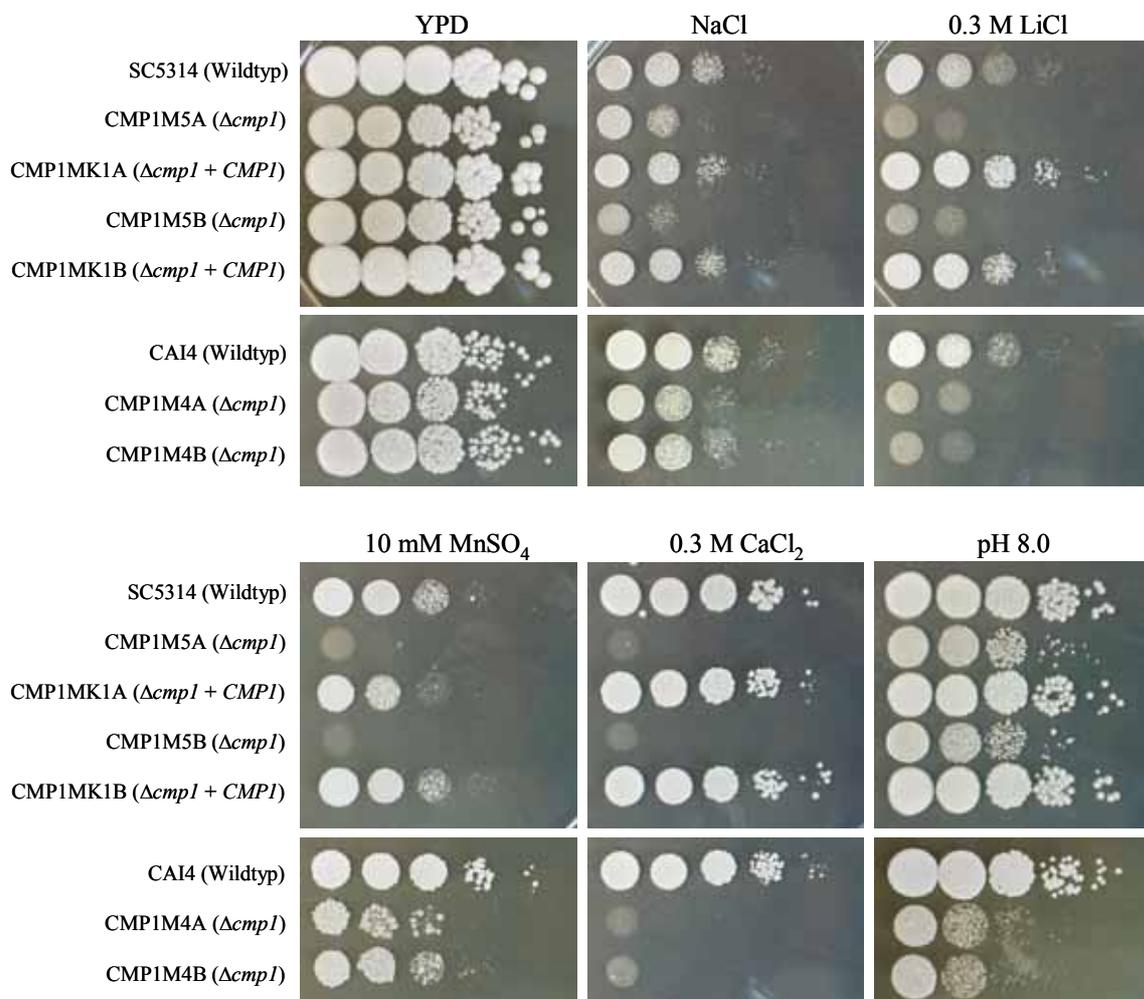


Abb. 4 Hypersensitivität der $\Delta cmp1$ -Mutanten gegenüber Kationen- und alkalischem Streß. Serielle 10-fach-Verdünnungen der links angezeigten Stämme wurden auf YPD und auf entsprechend supplementierten YPD-Platten aufgetropft (1.8 M NaCl für *URA3*⁺-Stämme und 1.0 M NaCl für *ura3*⁻ Stämme; 0.3 M LiCl; 10 mM MnSO₄; 0.3 M CaCl₂). Platten mit pH 8.0 wurden mit 155 mM Tris/Cl gepuffert. Die jeweils oben dargestellten Platten wurden mit den *URA3*⁺, die unteren mit den *ura3*⁻ Stämmen betropft. Alle Platten wurden für 2 Tage bei 30°C bebrütet.

Übereinstimmend mit dem Phänotyp in der Bäckerhefe konnte auch in der *C. albicans*- Δ *cmp1*-Mutante eine erhöhte Suszeptibilität gegenüber alkalischem pH-Wert nachgewiesen werden (Abb. 4). Während die Wildtyp-Stämme sowie die Komplementanten-Stämme gut bei einem pH-Wert von 8.0 wachsen konnten, wuchsen die Mutanten-Stämme langsamer und zeigten eine leicht veränderte Makromorphologie, da die Kolonien eine rauhe Oberfläche aufwiesen. Zusammenfassend bekräftigen diese Ergebnisse die Hypothese, daß *CMP1* tatsächlich für das orthologe Gen der katalytischen Untereinheit des Calcineurins in *C. albicans* kodiert.

4.1.4 *CMP1* ist nicht notwendig für das Wachstum bei erhöhten Temperaturen und für die Ausbildung von Hyphen

Wie bereits erwähnt, können Calcineurin-Mutanten der pathogenen Hefe *C. neoformans* nicht bei 37°C wachsen und sind damit avirulent (Odom *et al.*, 1997). Der Test der Δ *cmp1*-Mutanten in *C. albicans* ergab, daß keine Beeinträchtigung des Wachstums verglichen mit dem Wildtyp und den komplementierten Stämmen bei 37°C vorlag (Abb. 5). Lediglich bei 43°C konnte ein geringfügig reduziertes Wachstum sowohl bei den Mutanten *CMP1M5A* und *B* als auch bei den Komplementanten *CMP1K1A* und *B* in bezug auf den Wildtyp-Stamm SC5314 beobachtet werden (Abb. 5, obere Reihe). Allerdings ist dieser Phänotyp nicht auf die *CMP1*-Deletion oder Komplementation, sondern auf den genetischen Hintergrund des Ausgangsstammes CAI4 zurückzuführen, weil im direkten Vergleich zwischen den auxotrophen Mutanten *CMP1M4A* und *B* und CAI4 kein Wachstumsunterschied dokumentiert werden konnte (Abb. 5, untere Reihe).

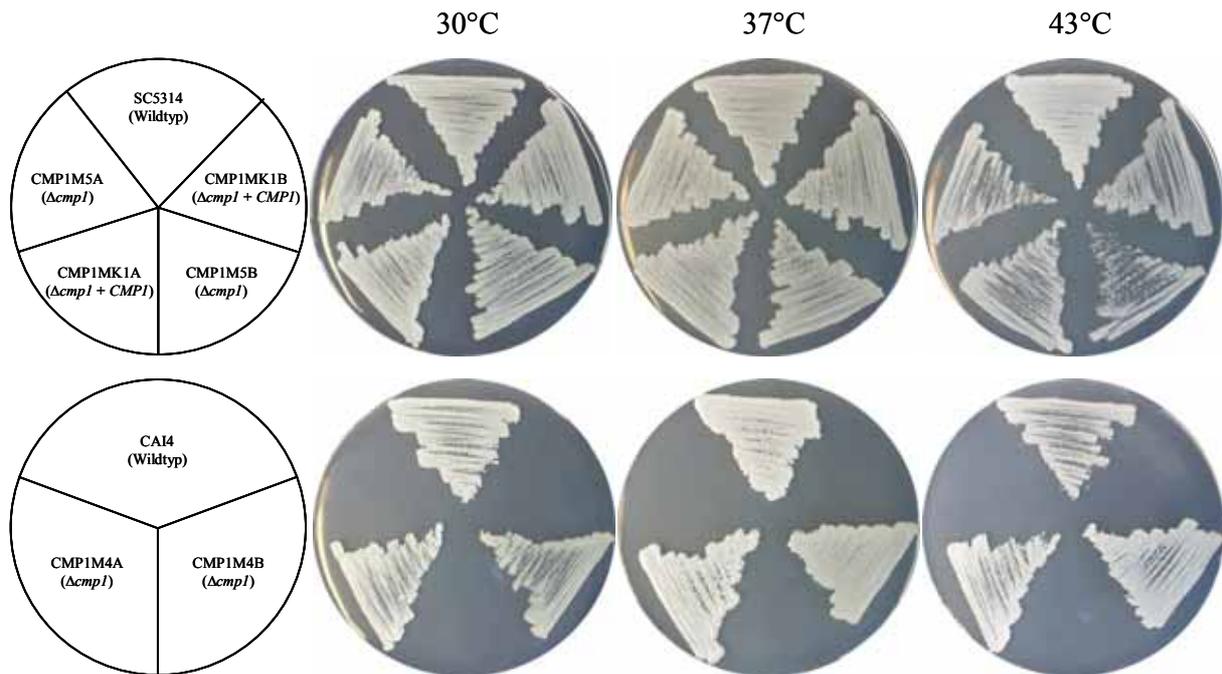


Abb. 5 Die *CMPI*-Deletion verursacht keine Temperatursensitivität in *C. albicans*. Die einzelnen Stämme wurden wie im Schema links angezeigt auf YPD-Platten ausgestrichen und für 2 Tage bei 30 oder 37°C oder für 7 Tage bei 43°C inkubiert. Die obere Reihe zeigt *URA3+*, die untere *ura3-*-Stämme.

Nachdem Calcineurin-Mutanten in *C. neoformans* einen Defekt im filamentösen Wachstum zeigen, sollte untersucht werden, ob die Deletion des *CMPI*-Gens in *C. albicans* ebenfalls eine Beeinträchtigung des Hyphenwachstums nach sich zieht, zumal die Fähigkeit zum Dimorphismus auch als wichtige Virulenzeigenschaft in *C. albicans* gilt. Dies war jedoch nicht der Fall, da die $\Delta cmpl$ -Mutanten auf bekannten hypheninduzierenden Fest- und Flüssigmedien genauso effektiv Hyphen bildeten wie die Kontrollstämme (Abb. 6 und Abb. 7). Auffälligerweise konnten die Mutanten unter bestimmten Bedingungen sogar schneller und in stärkerem Maße Filamente ausbilden. Nach zwei Tagen zeigten sich auf Lee's Agarplatten rauhe Kolonien, während die der Wildtyp-Stämme und der komplementierten Stämme zu diesem Zeitpunkt noch glatt erschienen (Abb. 6). Dennoch glich sich die Koloniemorphologie nach längerer Inkubation immer mehr an, so daß man nach fünf Tagen fast keinen Unterschied mehr beobachten konnte. Die verstärkte Hyphenbildung war auch in flüssigem Lee's Medium nachweisbar, in welchem die Mutanten stärker aggregierten und sich im Inkubationsgefäß schneller absetzten als die Kontrollstämme (Abb. 7B).

Diese Ergebnisse demonstrieren, daß Calcineurin unter den getesteten Bedingungen keine signaltransduzierende Rolle für die Hyphenbildung spielt, die Deletion von *CMPI* aber sekundäre Effekte wie eine stärkere Aggregation oder eine veränderte Koloniemorphologie verursachen kann.

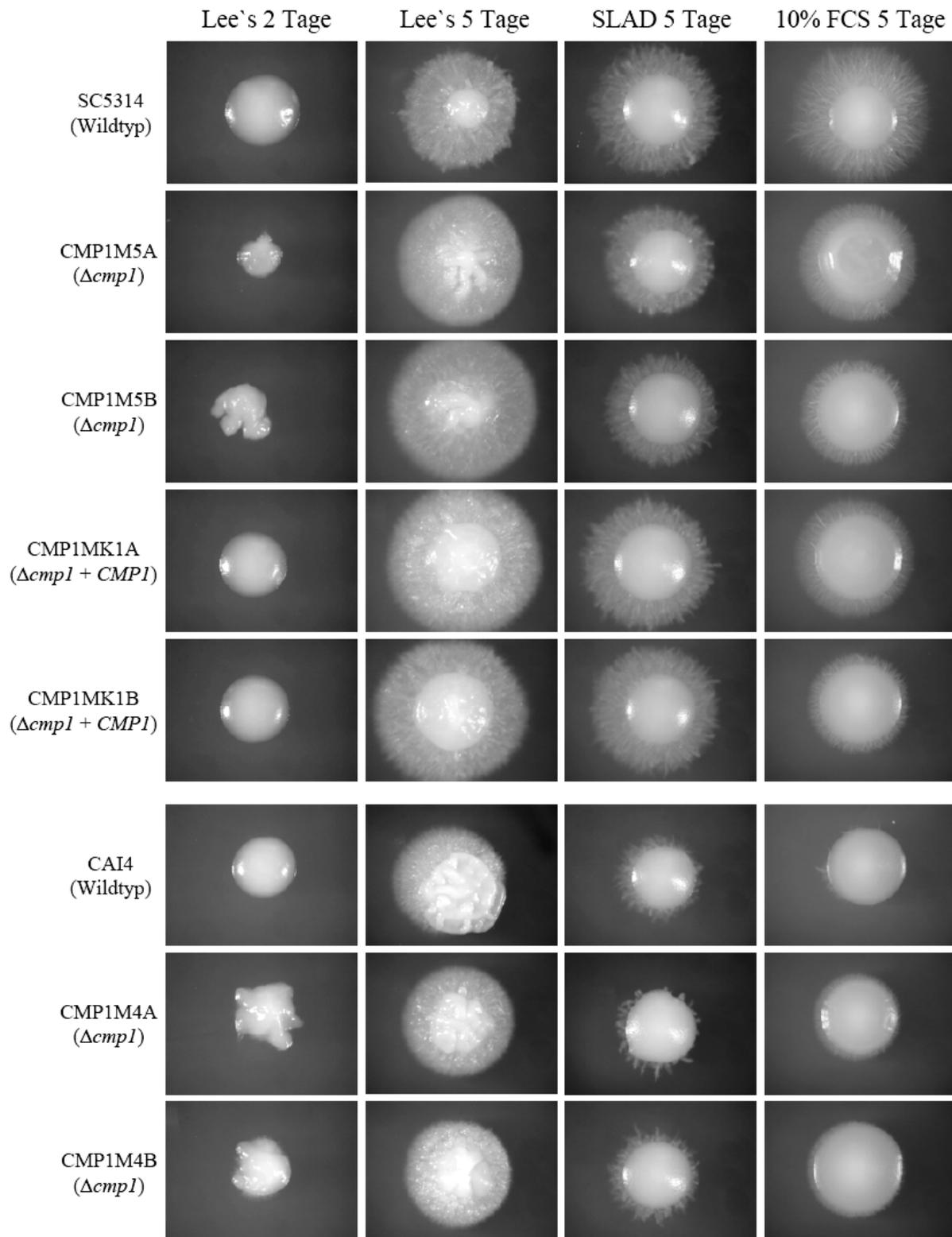


Abb. 6 Filamentöses Wachstum der Δ *cmp1*-Mutanten und Kontroll-Stämme auf hypheninduzierenden Festmedien bei 37°C. Die Kolonien wurden wie angezeigt nach 2 bzw. 5 Tagen fotografiert. FCS: „fetal calf serum“.

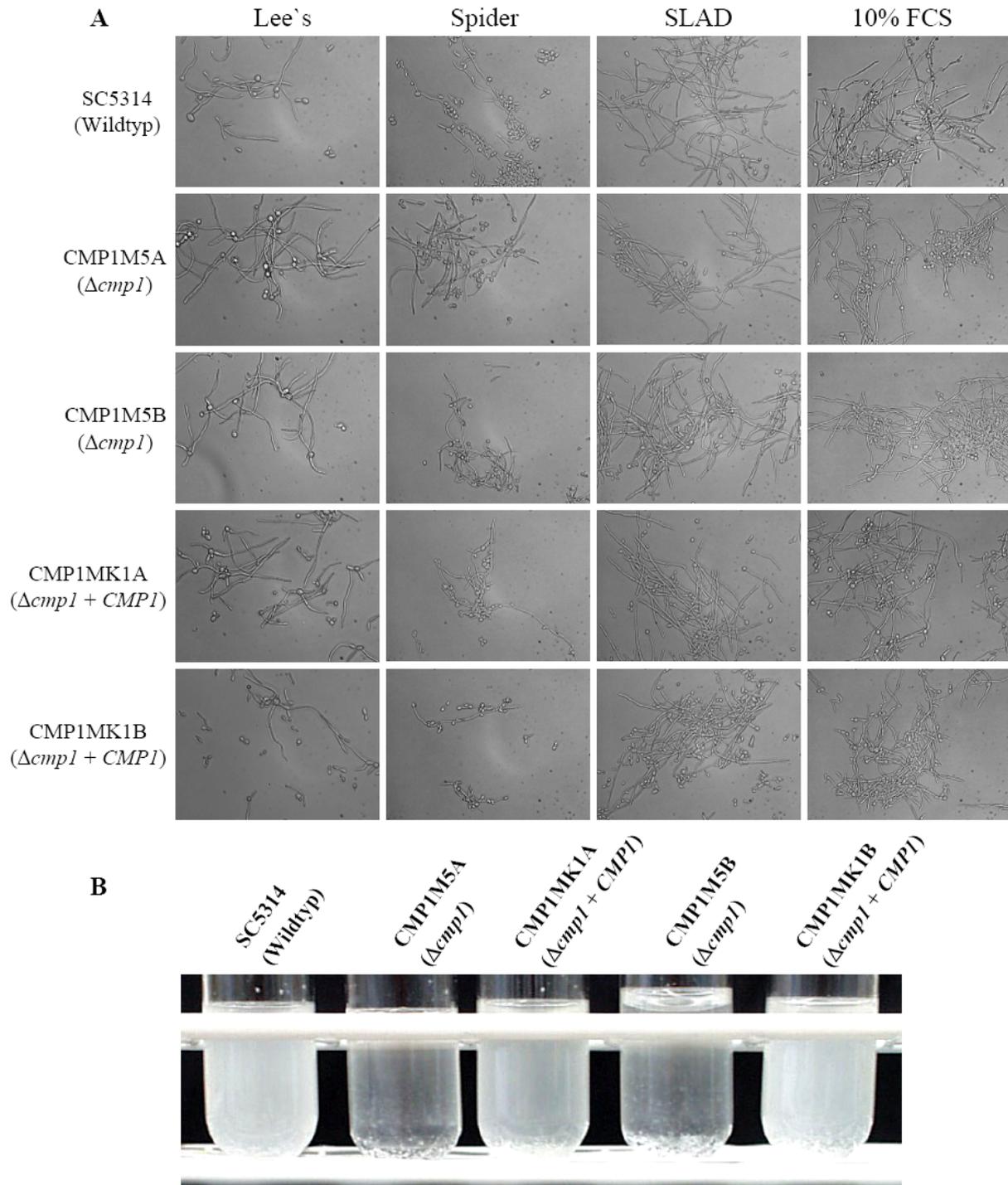


Abb. 7 Filamentöses Wachstum der $\Delta cmp1$ -Mutanten und Kontroll-Stämme in hypheninduzierenden Flüssigmedien bei 37°C. **A.** Mikroskopische Aufnahmen mit 400facher Vergrößerung der angegebenen Stämme nach 7 h in Lee`s Medium (pH 7.0), 7 h in Spider Medium, 8 h in SLAD Medium oder 4 h in RPMI Medium plus 10% FCS. **B.** Aggregations-Pänotypen der $\Delta cmp1$ -Mutanten und Kontroll-Stämme nach Wachstum über Nacht in Lee`s Medium (pH 7.0). Die Kulturen wurden vor den Aufnahmen kurz geschüttelt und für 1 min zum Absetzen stehengelassen.

4.1.5 Erhöhte Sensitivität gegenüber Membranstreß und Fluconazol

Von einer anderen Arbeitsgruppe wurde während der hier vorgestellten Arbeit ein hypersensitiver Phänotyp gegenüber Membranstreß bei der Charakterisierung einer Mutante der regulatorischen Untereinheit des Calcineurins in *C. albicans* beschrieben, der sich indirekt auch gegenüber Fluconazol, einem der am häufigsten eingesetzten Antimykotika, bemerkbar macht (Cruz *et al.*, 2002). In Übereinstimmung dazu war das Wachstum der $\Delta cmp1$ -Mutanten bei Anwesenheit von 0.01% SDS, das als Tensid direkt die Lipiddoppelschicht der Membran angreift, vollständig inhibiert, wobei die Reintegration des *CMP1*-Gens den Effekt komplementieren konnte (Abb. 8). Da Fluconazol die Synthese des Membranbestandteils Ergosterol in Pilzen blockiert und somit indirekt die Membranintegrität stört, war es naheliegend, auch diesen Effekt in den $\Delta cmp1$ -Mutanten zu überprüfen. Wie man bei einem Spot-Test auf YPD-Agar plus 50 $\mu\text{g/ml}$ Fluconazol in Abb. 8 erkennen kann, war das Wachstum der prototrophen Mutanten CMP1M5A und B sowie der auxotrophen Mutanten CMP1M4A und B fast vollständig inhibiert im Gegensatz zu den Kontrollstämmen und den komplementierten Stämmen, bei denen nur ein leichter Wachstumsrückgang zu verzeichnen war, sichtbar an der kleineren Koloniengröße im Vergleich zum Wachstum auf YPD-Agar. Die geringe Abweichung zwischen dem Wildtyp-Stamm und den komplementierten Stämmen bei der prototrophen Reihe ist wohl, ähnlich wie bei dem Temperaturtest bei 43°C, auf den unterschiedlichen Stammhintergrund der mutageniesierten Stämme zurückzuführen. Zusätzlich wurden in Flüssigkulturen mit Fluconazol-Zugabe Lebendzellzahl-Bestimmungen durchgeführt, die zeigen konnten, daß sich die Zahl lebensfähiger Zellen bei den Mutanten CMP1M5A und B stetig verringerte, während sich der Wildtyp-Stamm und die komplementierten Stämme nach transients Stagnationsphase wieder vermehrten (nicht gezeigt). Dies deutet auf eine Veränderung der Wirkeigenschaft des Fluconazols in Abwesenheit von Calcineurin hin, zumal Fluconazol in *C. albicans*-Wildtyp-Stämmen nur eine fungistatische Eigenschaft besitzt. Daß eine Wachstumshemmung der Mutanten im Spot-Test und eine stetige Abnahme der Lebendzellzahl in Flüssigkultur nachgewiesen werden konnte, spricht für eine synergistische Wirkung des Calcineurin-Defekts mit der Fluconazol-Behandlung, was dem Medikament unter diesen Umständen einen fungiziden, also abtötenden Charakter verleiht. Dies steht ebenfalls im Einklang mit den Beobachtungen bei der von Cruz *et al.* beschriebenen Calcineurin B-Mutante (Cruz *et al.*, 2002). Die Übereinstimmung dieser Phänotypen beweist darüber hinaus die essentielle Bedeutung beider Untereinheiten für ein funktionelles Calcineurin in *C. albicans*.

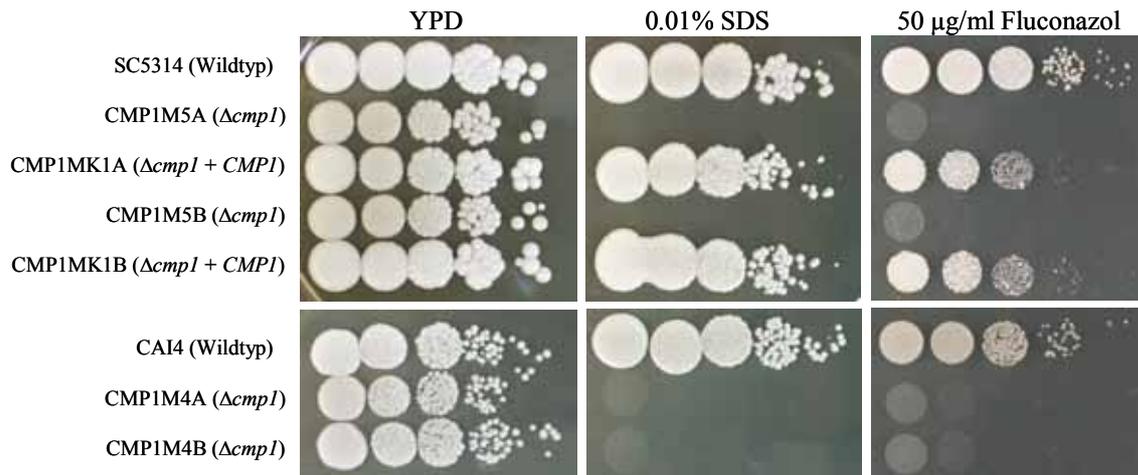


Abb. 8 Hypersensitivität der $\Delta cmp1$ -Mutanten gegenüber direkten und indirekten Membranstreß. Serielle 10-fach Verdünnungen wurden aufgetropft auf YPD plus 0.01% SDS (direkter Membranstreß) und YPD plus 50 $\mu\text{g/ml}$ Fluconazol (indirekter Membranstreß), und für 2 Tage bei 30°C bebrütet. Als Kontrolle ist das Wachstum der Stämme auf YPD aus Abb. 4 gezeigt. Oben sind wie angegeben die $URA3^+$ -Stämme, unten die $ura3^-$ -Stämme dargestellt.

4.1.6 Calcineurin ist essentiell für die Virulenz *in vivo*

Obwohl *in vitro* die Bedeutung des Calcineurins für die Toleranz gegenüber bestimmten Streßsituationen nachgewiesen werden konnte, fehlten jedoch entscheidende Hinweise auf einen Defekt der $\Delta cmp1$ -Mutante hinsichtlich ihrer Virulenz. Zum einen war keine Einschränkung im Wachstum bei Körpertemperatur zu beobachten, und zum andern schien die Hypheninduktion und deren Ausbildung unter *in vitro*-Bedingungen nicht gestört zu sein. Deshalb war es wichtig zu überprüfen, ob eine Calcineurin-vermittelte Signaltransduktion notwendig für eine Infektion mit *C. albicans* in einem Säuger-Wirt ist. Um dieser Frage nachzugehen, wurden Mäuse intravenös mit einer der beiden $\Delta cmp1$ -Mutanten CMP1M5A oder B oder mit dem entsprechenden komplementierten Stamm CMP1K1A oder B infiziert. Wie in Abb. 9A dargestellt, erlagen alle Mäuse einer Infektion mit den komplementierten Stämmen innerhalb von 17 Tagen, während der klinische Verlauf der Infektion mit den $\Delta cmp1$ -Mutanten deutlich milder ausfiel. Alle Tiere, die mit den Mutanten infiziert worden waren, überlebten bis über den Tag 63 nach der Infektion („post Infektion“, p. i.) hinaus (Mutante versus komplementierte Stämme, $P \leq 0.026$). Nieren, die aus CMP1K1B-infizierten Mäusen isoliert worden waren, zeigten zunehmende Anzeichen einer Hyperämie (Abb. 9B, Tag 6 p. i.), gefolgt von einer totalen Zerstörung des Gewebes (Abb. 9B, Tag 8 p. i.). Das darin befindliche Mycel aus Hefezellen wurde durch „Calcofluor white“-Färbung detektiert (nicht gezeigt). Im Gegensatz dazu wirkten die Nieren der $\Delta cmp1$ -Mutanten-infizierten Mäuse

die ganze Zeit über gesund (Abb. 9B, Tage 6 und 14 p. i.), und nach mikroskopischer Betrachtung der KOH-gelösten Organe konnten weder *C. albicans*-Hyphen noch Blastokonidien nachgewiesen werden. Zusätzlich wurden Lebendzellzahl-Bestimmungen aus den Nieren infizierter Tiere durchgeführt. Dies ergab, daß die $\Delta cmp1$ -Mutanten sehr schnell nach der Infektion durch die Immunabwehr des Wirts eliminiert worden waren, wie in Abb. 9C dargestellt ist. Anders als bei dem komplementierten Stamm CMP1K1B, wo ansteigende Zellzahlen zu vermerken waren, konnten von den Mutantenzellen nach 7 Tagen nur wenige aus den infizierten Organen reisoliert werden, nach 11 Tagen war gar keine Zelle mehr detektierbar. Diese Ergebnisse zeigen, daß Calcineurin essentiell für die Virulenz in *C. albicans* ist.

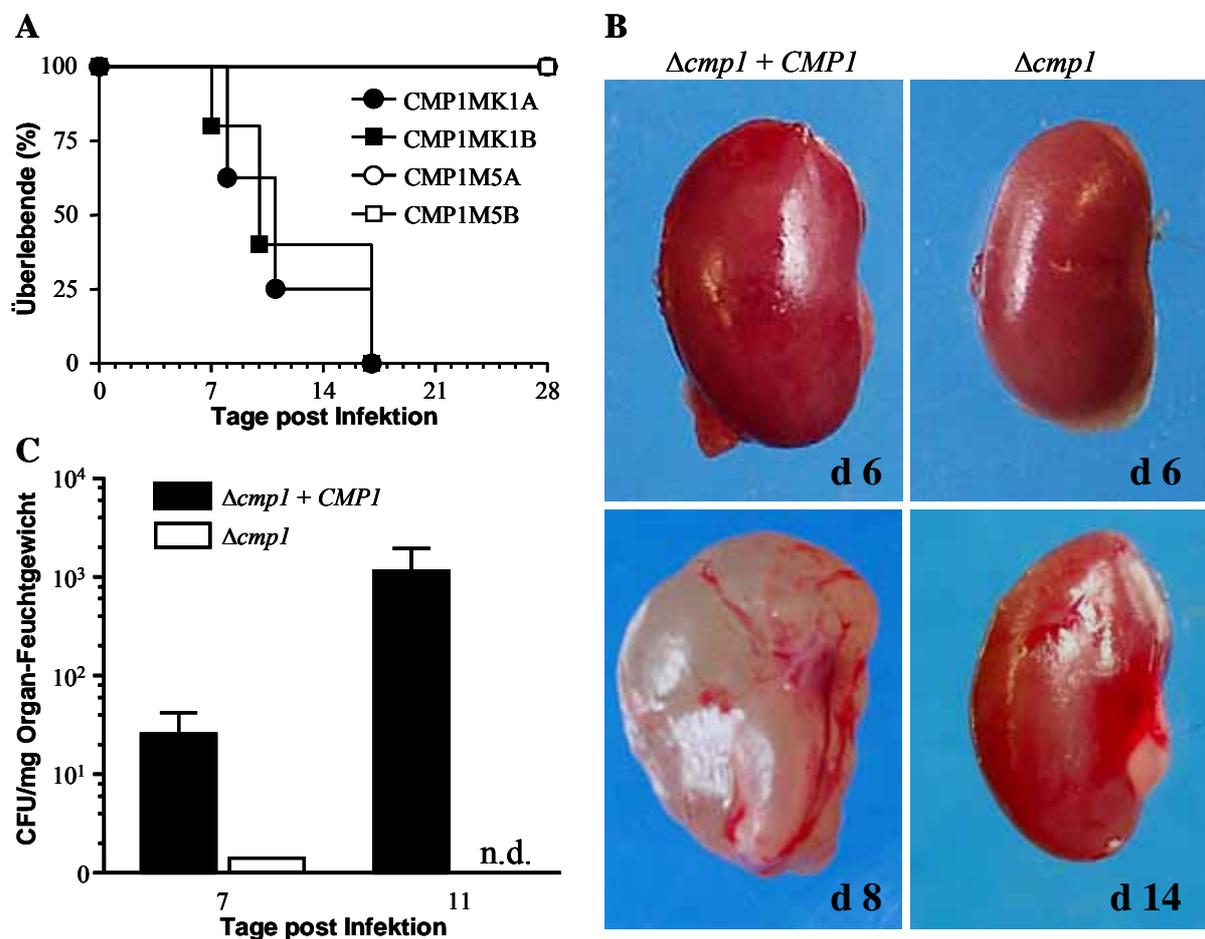


Abb. 9 $\Delta cmp1$ -Mutanten von *C. albicans* sind avirulent. **A.** Überlebenskurven von Mäusen, die intravenös mit 5×10^5 Zellen der Mutanten CMP1M5A oder B oder den entsprechenden komplementierten Stämmen CMP1K1A oder B infiziert worden waren. **B.** Aufnahmen von Nieren von infizierten Tieren, mit CMP1M5B (links) und mit CMP1K1B (rechts). Der Zeitpunkt der Präparationen ist in Tage nach der Infektion (d, day p. i.) angegeben. **C.** Pilzbefall der Nieren gemessen an cfu-Bestimmungen (Mittelwerte und Standard-Abweichungen berechnet für je 2 oder 3 Nierenpaare) nach der Infektion mit 5×10^5 Zellen entweder des CMP1M5B-Stammes (helle Balken) oder des CMP1K1B-Stammes (dunkle Balken) zu angegebenen Zeitpunkten.

4.1.7 Verhalten einer Calcineurin-Mutante mit dem Wildtyp-Stamm SC5314 als Ausgangsstamm

Seit der Generierung des Uridin-auxotrophen Stammes CAI4 (Fonzi and Irwin, 1993) sind für die Herstellung von „knock-out“-Mutanten in fast allen wissenschaftlichen Arbeiten auxotrophe Stämme verwendet worden, darunter vor allem CAI4 selbst, aber auch Histidin- und/oder Arginin-auxotrophe Derivate von CAI4 (Wilson *et al.*, 1999). Der CAI4-Stamm war durch gezielte Mutagenese des *URA3*-Lokus entstanden, wobei auch das offene Leseraster flankierende Sequenzen mit eventuellen regulatorischen oder kodierenden Funktionen deletiert wurden. Außerdem sind bei jeder Mutagenese unerwünschte Mutationsereignisse an anderen Loci nicht auszuschließen. Demzufolge könnte sich der genetische Hintergrund des CAI4-Stammes auch auf phänotypische Verhaltensweisen auswirken, und Phänotypen von CAI4-Derivaten können nur bedingt mit denen wildtypischer Isolate verglichen werden. Eine größere Problematik bei der genetischen Manipulation des CAI4-Stammes ist jedoch mit der Nutzung des *URA3*-Gens als Selektionsmarkers verbunden, da dieser normalerweise in den zu manipulierenden chromosomalen Locus eingeführt wird. Dazu erschienen in den letzten Jahren Arbeiten, die belegen, daß die ektopische Insertion des *URA3*-Gens im Rahmen einer Mutagenese von *C. albicans* zu einer Veränderung der *URA3*-Expression und somit zu sekundären pleiotropen Effekten führen kann, wie beispielsweise Variation der Hyphenbildung und der Virulenz (Bain *et al.*, 2001; Cheng *et al.*, 2003; Lay *et al.*, 1998), weshalb Ergebnisse aus entsprechenden Studien vor allem hinsichtlich der Virulenz von *C. albicans*-Mutanten kritisch betrachtet werden sollten. Um die hier präsentierten Phänotypen der CAI4-basierten $\Delta cmpl$ -Mutante zu verifizieren, sollten diese nun mit einer $\Delta cmpl$ -Mutante, resultierend aus dem wildtypischen Isolat SC5314, *in vitro* und *in vivo* überprüft werden. Im Gegensatz zu den Tierversuchen in Kapitel 4.1.6, wo die Mutanten lediglich den komplementierten Stämmen gegenüber gestellt werden konnten, sollte dadurch auch ein Vergleich der neuen SC5314-basierten Calcineurin-Mutante direkt mit dem SC5314-Ausgangsstamm *in vivo* hinsichtlich ihrer Virulenz ermöglicht werden, da dies die wahren Verhältnisse bei einer Inaktivierung des Calcineurins in einem wildtypischen Isolat widerspiegelt und somit fundiertere Erkenntnisse über die Rolle des Calcineurins während einer Infektion gewonnen werden können.

4.1.7.1 Konstruktion der *CMP1*-Mutante im Wildtyp-Stamm SC5314

Die Konstruktion einer $\Delta cmp1$ -Mutante in einem prototrophen Wildtyp-Stamm erforderte den Einsatz eines dominanten Selektionsmarkers für die Transformation. Schon früher wurde der dominante Marker MPA^R zur Mutagenese in klinischen Isolaten von *C. albicans* beschrieben (Wirsching *et al.*, 2000). Es handelt sich dabei um ein mutiertes Allel des *C. albicans* *IMH3*-Gens, das für das Enzym Inosin-Monophosphat-Dehydrogenase kodiert, aber in seiner mutierten Form Resistenz gegenüber dem spezifischen Inhibitor Mycophenolsäure (MPA) verleiht. Durch die Homologie zum originalen *IMH3*-Gen kam es aber immer wieder zu unerwünschten Integrationen des MPA^R -Markers in diesen Locus. Dieses Problem tauchte bei der MPA^R -basierten Transformation von *C. dubliniensis* nicht auf, wahrscheinlich weil eine geringere Homologie zum *CdIMH3*-Gen bestand (Staib *et al.*, 2000b). Daher sollte nun umgekehrt für die *C. albicans*-Mutagenese der von Dr. Gerwald Köhler (University of California, San Francisco, USA) neu entwickelte *CdMPA^R*-Marker, der dem *C. dubliniensis*-Genom entnommen wurde (nicht publiziert), zum ersten Mal verwendet werden. Des weiteren sollte für die Konstruktion eines „ MPA^R -Flippers“ der *SAP2*-Promotor (*SAP2P*) aus einem Fosmidklon, der bisher im *URA3*-Flipper eingesetzt wurde, gegen den Promotor des *SAP2-I*-Allels (*SAP2-IP*) aus SC5314 ausgetauscht werden, was in einer veränderten Promotorstruktur bezüglich der Anzahl zweier repetitiver Pentamere von 5/5 zu 4/6 resultierte (Staib, 2001). Nachdem *SAP2-IP* sich *in vitro* als weniger leicht induzierbar erwiesen hatte als *SAP2-2P*, und weil der *SAP2P* des Fosmidklons sich bei früheren Mutagenesen als „leaky“ herausgestellt hatte, sollte hier auch überprüft werden, ob der *SAP2-IP* möglicherweise unter nicht induzierten Bedingungen strikter reguliert sein würde.

Zur Konstruktion des *CdMPA^R*-Flippers (*CdMPA^R-FLIP*) wurde das Leseraster des *CdMPA^R*-Gens mit *XhoI-PstI* aus $pCdMPA^R$ herausgespalten und zusammen mit dem *EcoRI-SalI*-[3`*caFLP-ACTIT*] -Fragment aus pSFU1 in den *EcoRI-PstI*-gespaltenen Vektor pSFU1 kloniert. In dem resultierenden Plasmid pSFI2 wurde der *SAP2*-Promotor durch den *SAP2-I*-Promotor aus pSFL211 ausgetauscht, indem die Promotorfragmente jeweils mit *BamHI-SalI* herausgespalten und der *SAP2-IP* mit pSFI2 ligiert wurde. Das so entstandene Plasmid pSFI3 diente als Vektor für die Klonierung des *PstI-SacI*-gespaltenen [*FRT-3`CMP1*] -Fragmentes aus pCMP1M2 und wurde pCMP1M5 genannt. Für den letzten Klonierungsschritt mußte zunächst das 5`*CMP1*-Fragment mit den Primern CMP12 und CMP2 amplifiziert werden. CMP12 enthielt an Position -1011 bezüglich des Start-Codons eine eingeführte *ApaI*-site, CMP2 an Position +77 eine *XhoI*-site, so daß das *ApaI-XhoI*-gespaltene PCR-Produkt in den

gleichermaßen verdauten Vektor pCMP1M5 kloniert werden konnte. Das *ApaI*-*SacI*-Insert des fertigen Konstrukts pCMP1M6 diente der Transformation des *C. albicans* SC5314-Stammes zur Inaktivierung der *CMP1*-Allele nach der Flipper-Strategie (Abb. 10A).

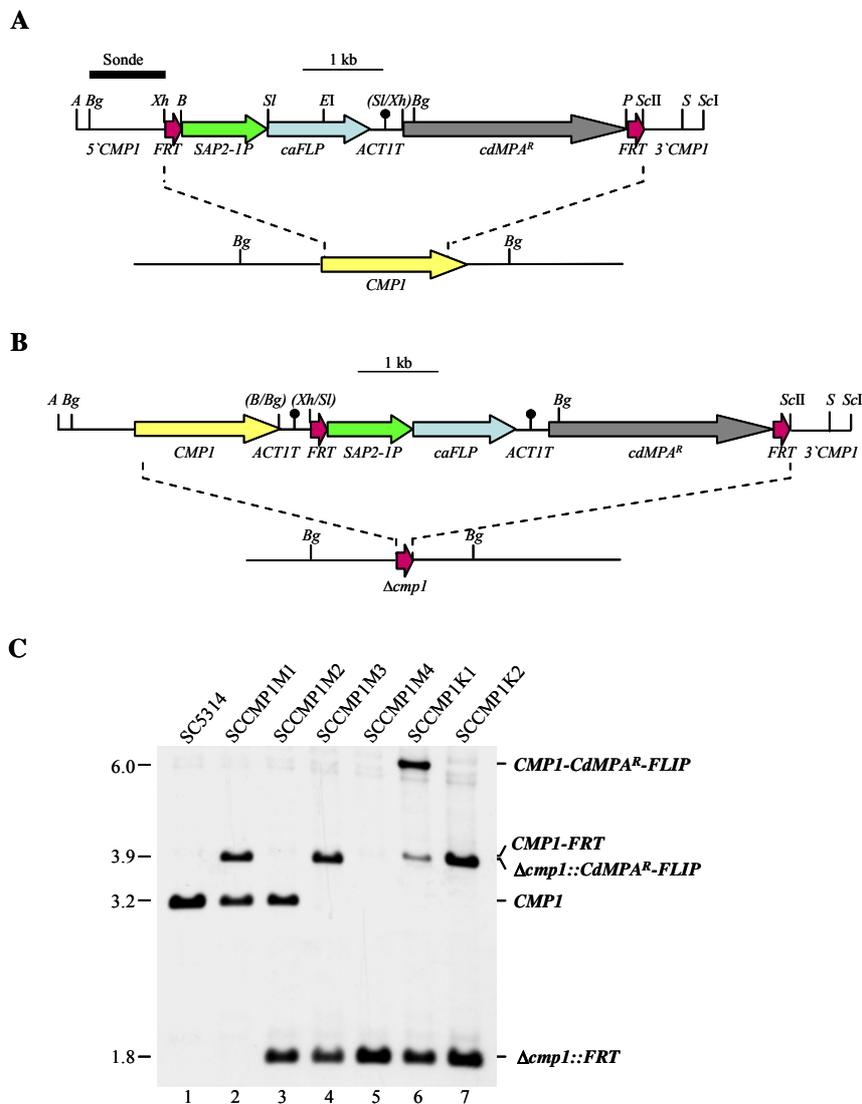


Abb. 10 Konstruktion der *CMP1*-Mutante in SC5314. Struktur der Mutagenesekassetten aus pCMP1M6 zur Inaktivierung des *CMP1*-Gens (**A**) und aus pCMP1K3 zur Komplementierung (**B**). Die Lage der Sonde für die Southern-Hybridisierung, sowie relevante Restriktionsschnittstellen sind angezeigt. Schnittstellen in Klammern symbolisieren fusionierte und damit zerstörte Erkennungssequenzen. *A*: *ApaI*; *B*: *BamHI*; *Bg*: *BgIII*; *EI*: *EcoRI*; *P*: *PstI*; *S*: *SmaI*; *ScI*: *SacI*; *ScII*: *SacII*; *SI*: *Sall*; *Xh*: *XhoI*. Für weitere Erklärungen siehe Text. Mit Ausnahme der *FRT*-sites sind alle Größen maßstabsgetreu wiedergegeben. **C**. Southernblot-Hybridisierung *BgIII*-gespaltener chromosomaler DNA mit einer *CMP1*-spezifischen Sonde. Die Größen der detektierten Fragmente sind links in Kilobasen angeben. Rechts befinden sich die entsprechenden Genotyp-Beschreibungen.

Das Ergebnis der Transformation mit dem *CdMPA^R*-Flipper bzw. der Exzision durch die *SAP2-1*-Promotor-Induktion wurde jeweils durch Southern-Hybridisierung überprüft. Wie bei der Hybridisierung mit einer 5`*CMPI*-spezifischen Sonde in Abb. 10C gezeigt, wurde nach der ersten Transformation von SC5314 die wildtypische 3.2 kb-Bande eines *CMPI*-Allels durch eine größere Bande von 3.9 kb ersetzt (SCCMP1M1, Spur 2). Diese verschwand nach der Exzision des *CdMPA^R*-Flippers, und im Gegenzug wurde ein 1.8 kb-Fragment sichtbar, das ein deletiertes *CMPI*-Allel widerspiegelte (SCCMP1M2, Spur 3). Nach der zweiten Transformationsrunde entstand der MPA-resistente Stamm SCCMP1M3 (Spur 4), in dem auch die verbliebene Wildtyp-Bande durch die Flipper-Bande von 3.9 kb ersetzt war. Eine erneute Exzision des *CdMPA^R*-Flippers resultierte in der homozygoten, MPA-sensitiven Δ *cmp1*-Mutante SCCMP1M4 (Spur 5), die für die weiteren Experimente eingesetzt wurde.

4.1.7.2 Konstruktion des komplementierten Stammes SCCMP1K2

Um Phänotypen der SCCMP1M4-Mutante verifizieren zu können, mußte das intakte Leseraster und Promotorsequenzen des *CMPI*-Lokus in eines der beiden inaktivierten Allele reintegriert werden. In diesem komplementierten Stamm sollten alle Phänotypen, die auf die *CMPI*-Deletion zurückzuführen sind, wieder aufgehoben werden können. Zu diesem Zweck wurde das Plasmid pCMP1K3 konstruiert, das neben der *CMPI*-Kopie den *CdMPA^R*-Flipper enthielt, was eine spätere Exzision des Markers ermöglichte (Abb. 10B). Zunächst wurde dafür ein Fragment des *CMPI*-Lokus von Position -1020 bis +1847 mittels PCR mit den Primern CMP12 und CMP8 aus chromosomaler DNA von SC5314 amplifiziert, an den Positionen -1011 mit *ApaI* und an +1831 unmittelbar nach dem Stop-Codon an der eingeführten *BamHI*-site gespalten und vor das *BgIII-SalI*-gespaltene *ACT1T*-Fragment aus pCBF1M4 in das *ApaI-XhoI*-gespaltene Plasmid pCMP1M6 kloniert. Das Plasmid pCMP1K3 wurde für die Transformation in den SCCMP1M4-Stamm mit den Restriktionsenzymen *ApaI* und *SmaI* gespalten, wobei *SmaI* an der Position +2031 bezüglich des Start-Codons im 3`*CMPI*-Bereich lokalisiert ist (Abb. 10B). In der Southernblot-Analyse erkennt man die Insertion des pCMP1K3-Fragmentes in eines der beiden Δ *cmp1*-Allele durch die 6.0 kb-Bande (Abb. 10C, Spur 6). Die schwächere 3.9 kb-Bande repräsentiert eine bereits stattgefunden Induktion des *SAP2-1*-Promotors und somit eine Exzision des Flippers in einem kleinen Anteil der SCCMP1K1-Kultur, die für die Isolierung der chromosomalen DNA in YPD-Medium unter nicht-selektiven, aber auch nicht-induzierenden Bedingungen angezüchtet worden war. Der *SAP2-1*-Promotor scheint also ebenso wie der *SAP2*-Promotor des Fosmidklons „leaky“ zu sein, was möglicherweise durch die ektopische Expression

begründet ist. Unter induzierenden Bedingungen erfolgte darauf die spezifische Exzision des *CdMPA^R*-Flippers, woraus der komplementierte Teststamm SCCMP1K2 hervorging (Abb. 10C, Spur 7). SCCMP1K2 unterscheidet sich vom Wildtyp SC5314 lediglich darin, daß er bezüglich des *CMP1*-Gens heterozygot ist und nach der kodierenden Region einen *ACT1*-Terminator, eine *FRT*-Sequenz und erst danach 3`*CMP1*-Sequenzen besitzt.

4.1.7.3 Hypersensitivität gegenüber Kationen-, alkalischem und Membranstreß der Mutante SCCMP1M4

Um die Phänotypen der Δ *cmp1*-Mutanten aus CAI4 mit der Mutante aus SC5314 zu vergleichen, wurden zunächst Spot-Tests hinsichtlich der Sensitivität gegenüber Ionen, alkalischem und Membranstreß durch Fluconazol bzw. SDS durchgeführt. Hierfür wurden Agar-Medien mit verschiedenen Supplementen hergestellt und die zu testenden Stämme in seriellen 10fach-Verdünnungen aufgetropft. In den oberen beiden Reihen aus Abb. 11 sind YPD-Agarplatten gezeigt, die mit 1.9 M NaCl, 0.3 M LiCl, 20 mM MnSO₄ oder 0.3 M CaCl₂ versetzt und mit den Verdünnungen des Wildtyp-Stammes, der Mutante SCCMP1M4 und der Komplementante SCCMP1K2 betropft worden waren. Während die Stämme auf der YPD-Platte allein sehr gut und gleichermaßen wachsen konnten, war das Wachstum der Mutante auf den ionenhaltigen Platten stärker inhibiert als das der Kontrollstämme. Auch bei Zugabe von 50 µg/ml Fluconazol bzw. 0.01% SDS in das Medium, was einen Membranstreß in den Hefezellen verursacht, war nur schwaches bzw. kein Wachstum des Mutanten-Stammes möglich (Abb. 11, mittlere Reihe rechts bzw. untere links). Das Puffern des Mediums auf einen pH-Wert von pH 9.0 zeigte ebenso eine geringe Wachstumsreduktion. Bei pH 10.0 trat eine totale Wachstumshemmung der Mutante ein, wobei hier auch bei den Kontrollstämmen ein deutlicher Hemmeffekt zu beobachten war (Abb. 11, untere Reihe Mitte und rechts). Die hier beschriebenen Phänotypen waren auch bei den Calcineurin-Mutanten aus CAI4 aufgetreten, so daß die Hypersensitivität gegenüber den untersuchten Streßfaktoren durch die SC5314-basierte Mutante bestätigt werden konnte.

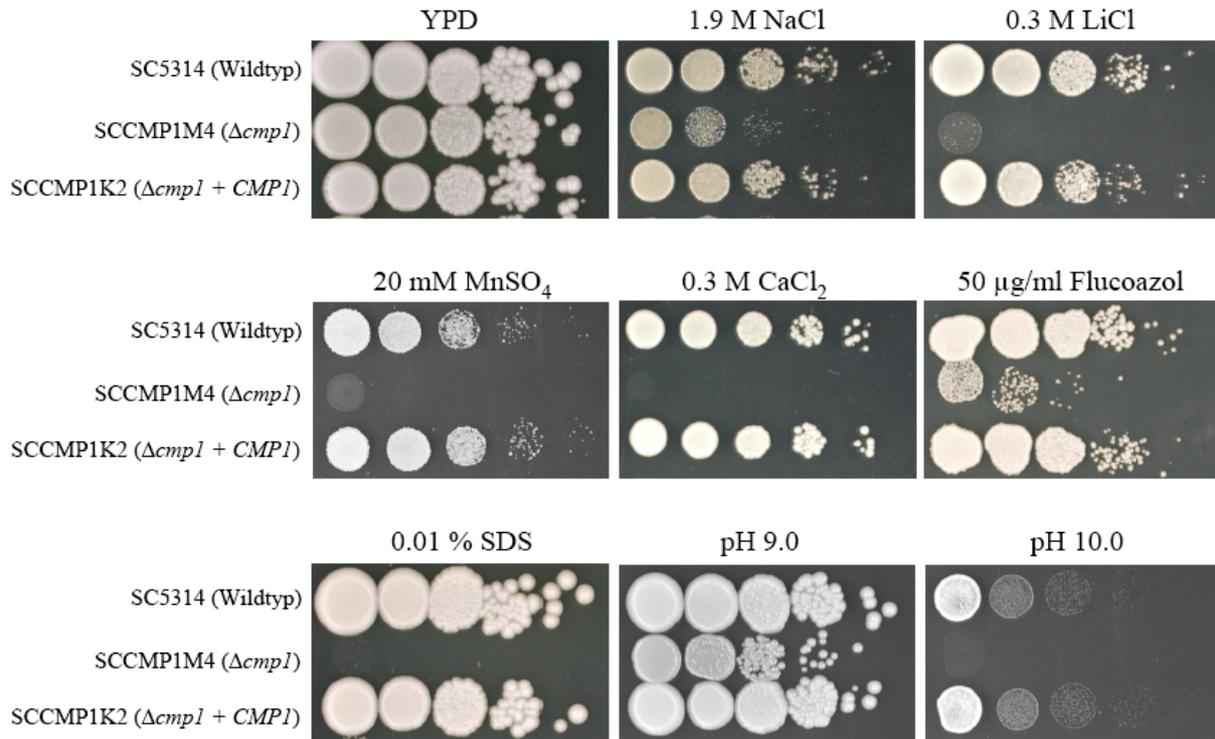


Abb. 11 Hypersensitivität der $\Delta cnp1$ -Mutanten aus SC5314 gegenüber Kationen-, Membran- (Fluconazol- bzw. SDS-) und alkalischem Streß. Serielle 10-fach-Verdünnungen der links angezeigten Stämme wurden auf YPD und auf entsprechend supplementierten YPD-Platten aufgetropft. Platten mit pH 9.0 und 10.0 wurden mit 155 mM Tris/Cl gepuffert. Alle Platten wurden für 3 Tage bei 30°C bebrütet.

4.1.7.4 Kein Phänotyp der Calcineurin-Mutante SCCMP1M4 bei erhöhter Temperatur und unter hypheninduzierenden Bedingungen

Nach der Verifizierung des Streßphänotyps der $\Delta cnp1$ -Mutanten sollte nun auch die Toleranz gegenüber erhöhten Temperaturen sowie die Hypheninduktion der SC5314-basierten Mutante überprüft werden. Wie in Abb. 12 dargestellt, zeigte diese genauso wie die CAI4-basierten Mutanten keine Sensitivität gegenüber Temperaturen von 37°C und 43°C. Die Stämme SC5314, SCCMP1M4 und SCCMP1K2 konnten vergleichbar gut wachsen, lediglich bei 37°C wies die Mutante SCCMP1M4 im Gegensatz zu den Kontrollstämmen eine auffällig rauhe Kolonienmorphologie auf dem YPD-Festmedium auf.

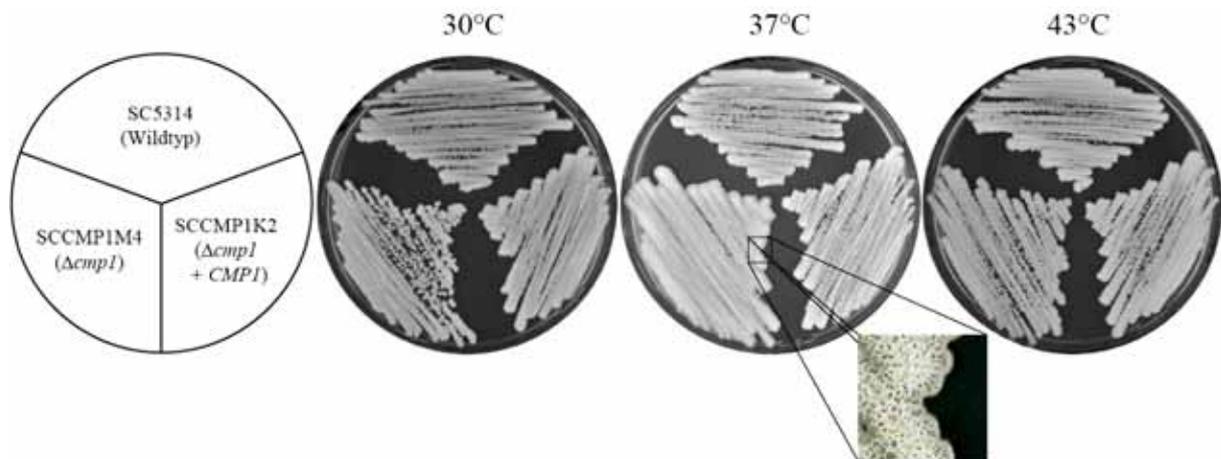


Abb. 12 Die Calcineurin-Mutante SCCMP1M4 zeigt keine Temperatursensitivität. Die einzelnen Stämme wurden wie im Schema links angezeigt auf YPD-Platten ausgestrichen und für 2 Tage bei 30 oder 37°C oder für 5 Tage bei 43°C inkubiert.

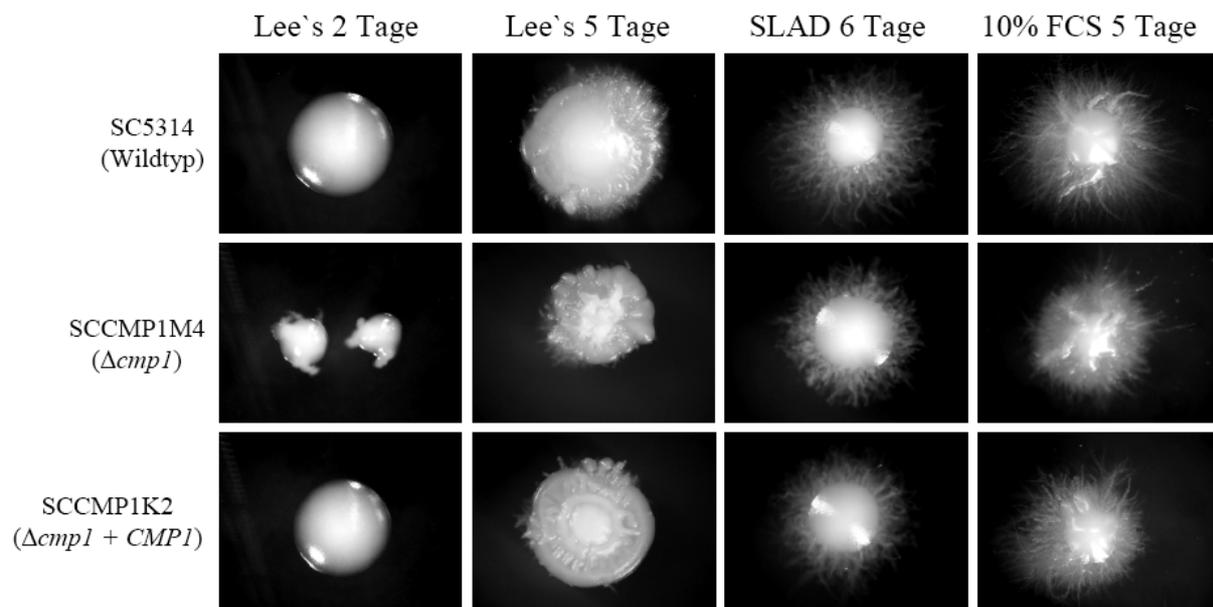


Abb. 13 Filamentöses Wachstum der $\Delta cmp1$ -Mutante aus SC5314 und Kontroll-Stämme auf hyphen-induzierenden Festmedien bei 37°C. Die Kolonien wurden wie angezeigt nach 2, 5 oder 6 Tagen fotografiert. FCS: „fetal calf serum“.

Bei der Analyse der Hypheninduktion auf Fest- und in Flüssigmedien ergab sich das identische Bild wie bei der CAI4-basierten Calcineurin-Mutante (Abb. 13 und Abb. 14). Während die Mutante auf Lee's Agarplatten schon nach zwei Tagen beginnende Hyphenbildung und eine faltige Kolonienmorphologie zeigte, starteten die Kontrollstämme mit der Filamentierung später, glichen sich aber mit zunehmender Inkubationszeit immer mehr an (Abb. 13). Bei Bebrütung auf SLAD-Medium und Agarplatten mit 10% FCS waren keine Unterschiede in der Hypheninduktion nachzuweisen. In den verschiedenen

Flüssigmedien Lee's, Spider, SLAD sowie RPMI plus 10% FCS, die bekanntermaßen Hyphenwachstum induzieren können, war ebenfalls kein Defekt in der Ausbildung der Filamente erkennbar, wie die mikroskopischen Aufnahmen in Abb. 14A präsentieren. Darüber hinaus sieht man in Abb. 14B den ebenfalls schon bei der CAI4-basierten $\Delta cmp1$ -Mutante beschriebenen Aggregationsphänotyp im Lee's-Medium (Kapitel 4.1.4). Zusammenfassend liefern die hier vorgestellten Ergebnisse den Beleg, daß bei einer Calcineurin-Mutante das Wachstum bei Körpertemperatur und Temperaturen darüber sowie die Fähigkeit zur Ausbildung von Hyphen grundlegend nicht gestört sind.

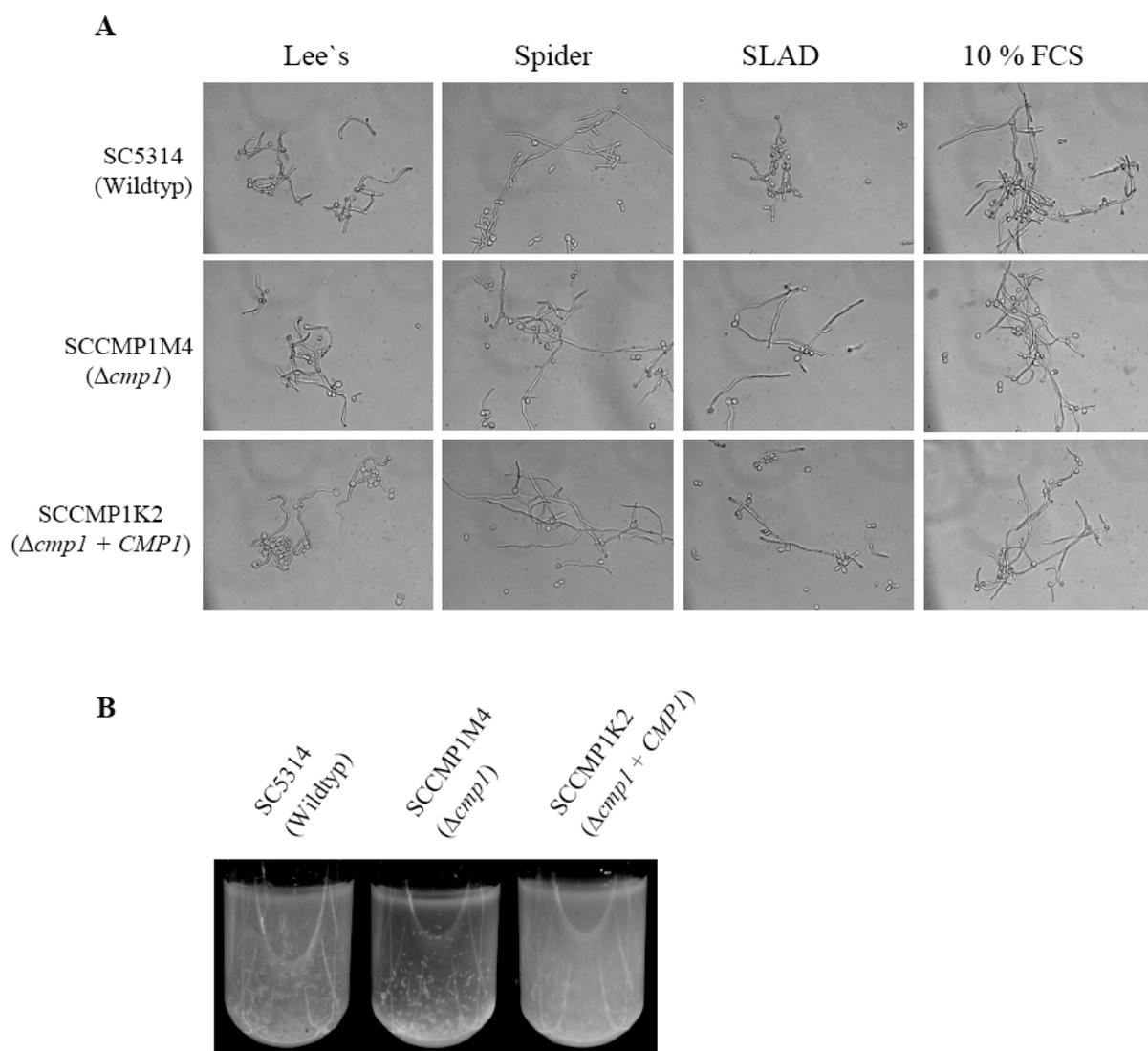


Abb. 14 Filamentöses Wachstum der SC5314-basierten $\Delta cmp1$ -Mutante und Kontroll-Stämme in hypheninduzierenden Flüssigmedien bei 37°C. **A.** Mikroskopische Aufnahmen mit 400facher Vergrößerung der angegebenen Stämme nach 8 h in Lee's Medium (pH 7.0), 8 h in Spider Medium, 8 h in SLAD Medium oder 4.5 h in RPMI Medium plus 10% FCS. **B.** Aggregations-Pänoypen der $\Delta cmp1$ -Mutante und Kontroll-Stämme nach Wachstum über Nacht in Lee's Medium (pH 7.0). Die Kulturen wurden vor den Aufnahmen kurz geschüttelt und für 1 min zum Absetzen stehengelassen.

4.1.7.5 Attenuierte Virulenz der SCCMP1M4-Mutante *in vivo*

Nachdem alle Phänotypen einer Calcineurin-Inaktivierung *in vitro* mit der SC5314-abgeleiteten Mutante bestätigt werden konnten, sollte nun zur vollständigen Überprüfung auch die Virulenz *in vivo* im systemischen Mausmodell einer Candidose untersucht werden. Außerdem ermöglichte die Konstruktion der SCCMP1M4-Mutante nicht nur einen Vergleich mit dem komplementierten Stamm, worauf sich die Virulenztests der CAI4-basierten Calcineurin-Mutante beschränken mußten, sondern einen direkten Vergleich mit dem Wildtypstamm, so daß diese Ergebnisse die wahren Verhältnisse besser reflektierten als bei den früheren Tierversuchen. Wie zuvor in Kapitel 4.1.6 wurden die Mäuse intravenös mit SC5314, der *CMP1*-heterozygoten Mutante SCCMP1M2, der *cmp1*-Nullmutante SCCMP1M4 oder dem komplementierten Stamm SCCMP1K2 infiziert. Der heterozygote Stamm wurde zusätzlich in das Experiment miteinbezogen, da er genauso wie der komplementierte Stamm nur eine *CMP1*-Kopie besitzt und deshalb bei eventuellen Diskrepanzen zwischen Wildtyp und komplementiertem Stamm als zusätzlicher Vergleichsstamm dienen konnte. Die Überlebenskurven der einzelnen Stämme sind in Abb. 15 dargestellt. Darin wird deutlich, daß alle Tiere, die mit der Mutante infiziert worden waren, bis zum Tag 70 p. i. überlebten, während die Mäuse einer Infektion mit dem heterozygoten und dem komplementierten Stamm innerhalb von 22 bzw. 25 Tagen erlagen (Mutante versus komplementierter Stamm, $P \leq 0.0325$). Von den Mäusen, die mit dem Wildtyp SC5314 infiziert worden waren, war eine Überlebensrate von 20% bis zum Tag 70 p. i. zu verzeichnen, was aber angesichts der geringen Zahl von fünf Versuchstieren bedeutet, daß lediglich eine Maus überlebte. Aus der Kurve kann man darüber hinaus ablesen, daß die übrigen vier Tiere innerhalb von 21 Tagen p. i. an der Infektion starben, was dem klinischen Verlauf der Infektionen mit dem heterozygoten bzw. komplementierten Stamm weitestgehend entsprach. Deshalb ist das Überleben der einen Maus, die mit dem Wildtyp infiziert worden war, als Artefakt anzusehen und wurde nicht weiter berücksichtigt. Diese Resultate belegen, daß die SC5314-basierte Calcineurin-Mutante über ein deutlich abgeschwächtes Virulenzpotential verfügt, und somit bestätigte sich die Essentialität des Calcineurins für die Virulenz in *C. albicans*.

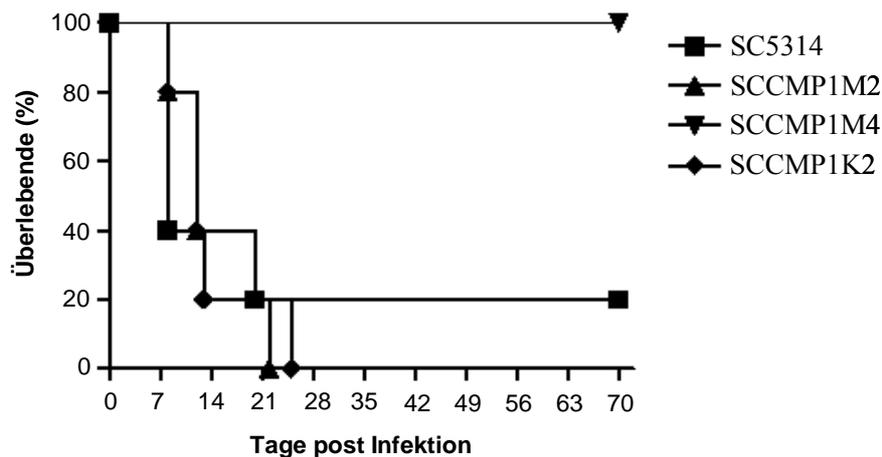


Abb. 15 Die Wildtyp-basierte Calcineurin-Mutante verhält sich avirulent. Gezeigt sind Überlebenskurven von Mäusen, die intravenös mit 5×10^5 Zellen des Wildtyps SC5314, des *CMP1*-heterozygoten Stammes CMP1M2, der Δ *cmp1*-Mutante SCCMP1M4A oder des komplementierten Stammes CMP1K2 infiziert worden waren.

4.1.7.6 Verhalten der Δ *cmp1*-Mutante SCCMP1M4 in Serum

Die Toleranz gegenüber der Wirt-Körpertemperatur ist für *C. albicans* sowohl für die Etablierung einer Infektion als auch für das Dasein als Kommensale essentiell, und auch der Fähigkeit zur Hypheninduktion wird eine entscheidende Rolle bei der Zelladhäsion sowie Gewebeinvasion zugeschrieben. Da die Calcineurin-Mutante keine diesbezüglichen Phänotypen *in vitro* ausbildete (Abb. 12, 13 und 14), stellte sich die Frage, warum *in vivo* im murinen Modell einer systemischen Infektion eine derart starke Virulenzattenuation auftrat (Abb. 15). Studien einer Calcineurin A- und Calcineurin B-Mutante dokumentierten kürzlich, daß diese Zellen bei Inkubation in Serum innerhalb weniger Stunden eliminiert wurden (Blankenship *et al.*, 2003; Sanglard *et al.*, 2003). Daher postulierten die Autoren, daß Calcineurin-Mutanten bei intravenöser Infektion schon im Blut absterben, mit dem die Organismen als erstes Wirtsmilieu bei disseminativer Candidose konfrontiert werden. Um zu überprüfen, ob diese Serumtoxizität auch bei der Wildtyp-basierten Δ *cmp1*-Mutante auftritt, wurden Mutante, SC5314 und komplementierter Stamm in humanem Serum und FCS inkubiert, um zu Beginn, nach vier, acht und 24 Stunden Lebendzellzahlbestimmungen durchzuführen. Die relativen Populationszunahmen bezogen auf die jeweiligen Inokulumszellzahlen sind in Abb. 16 im Verlauf der Inkubationszeit dargestellt. Zunächst fällt auf, daß die *cmp1*-defizienten Zellen in humanem Serum tatsächlich in ihrem Wachstum stark gehemmt waren, da die Lebendzellzahl während der 24-stündigen Dauer des Experiments stetig abnahm, während sich die Populationen des Wildtyps und des komplementierten Stammes vergrößerten. Dennoch waren acht Stunden nach der Inokulierung 48% und nach 24

Stunden 35% der Mutanten-Zellen immer noch vital (Abb. 16, links), was nicht dem derart starken und schnellen Abtötungs-Effekt des Serums entsprach, der in den genannten Publikationen beschrieben worden war (Blankenship *et al.*, 2003; Sanglard *et al.*, 2003). Darüber hinaus war ein Unterschied bezüglich des Ursprungs des Serums erkennbar, da die Wachstumsinhibition der Calcineurin-Mutante in FCS deutlich milder ausfiel. Im Gegensatz zu dem Verhalten in Humanserum ging die Lebendzellzahl der Mutante dort zu keinem Zeitpunkt zurück, vielmehr stieg die Zellzahl kontinuierlich an, allerdings langsamer als bei den Kontrollpopulationen mit einer geringeren Populationszunahme um mehr als die Hälfte nach 24 Stunden (Abb. 16, rechts).

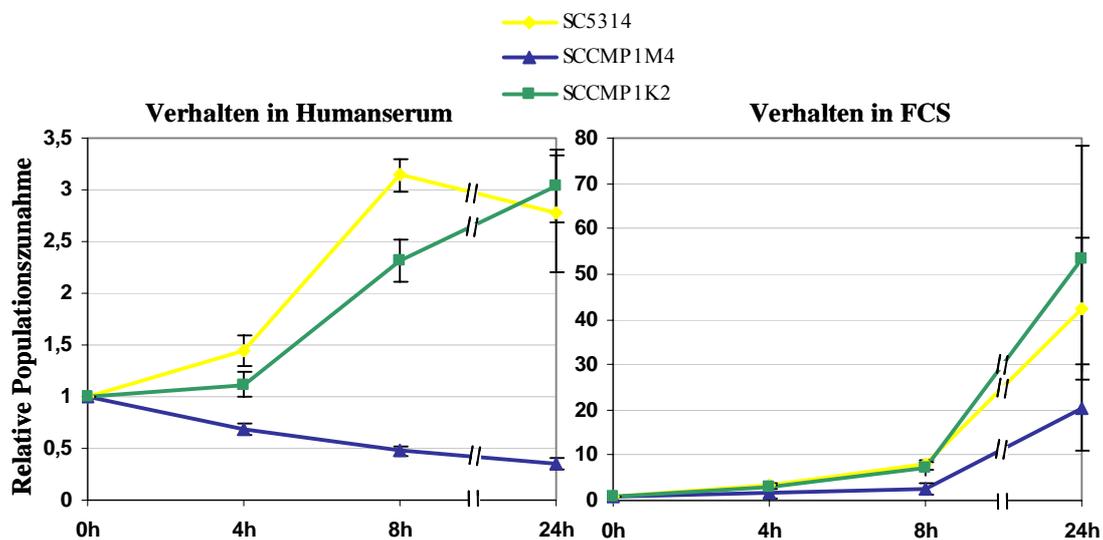


Abb. 16 Verhalten der Stämme SC5314, SCCMP1M4 und SCCMP1K2 in Humanserum (links) und in fötalem Kälberserum (FCS, rechts) bei 37°C. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden cfu-Bestimmungen durchgeführt und mit den anfänglichen cfu-Zahlen (jeweils ca. 2×10^6 /ml) verglichen, um die mittleren relativen Populationszunahmen mit Standardabweichungen aus je drei Experimenten zu berechnen. Werte unter 1 zeigen eine cfu-Abnahme, Werte über 1 eine cfu-Zunahme an.

Ein dritter Aspekt läßt sich anhand der Lebendzellzahl-Daten erkennen, nämlich daß in Humanserum verglichen mit FCS generell niedrigere Wachstumsraten zu verzeichnen waren. Da in beiden Seren in allen Stämmen eine Hypheninduktion beobachtet werden konnte (nicht gezeigt), ist ein Zusammenhang der Zellzahl-Zunahme mit den morphologischen Veränderungen weitestgehend vernachlässigbar. Eine Erklärung für die unterschiedliche Wachstumsrate könnte ein Kontrollexperiment bieten, bei dem *Escherichia coli* (K12 DH5 α) als Indikator für die bakterizide Aktivität des Serums, das vor allem durch das Komplementsystem vermittelt wird (Schreiber *et al.*, 1979), herangezogen wurde. Demnach konnte nur das Humanserum die anfänglich ca. 10^7 Bakterienzellen pro ml innerhalb von vier

Stunden zu 100% eliminieren, während eine bakterizide Wirkung in FCS eventuell wegen seines fötalen Ursprungs ausblieb (nicht gezeigt). Somit unterschieden sich die Seren in einer grundlegenden, Wirtsabwehr-relevanten Eigenschaft, was auch Auswirkungen auf die Wachstumsraten des wildtypischen und komplementierten Stammes im jeweiligen Serum und auch auf die Überlebensfähigkeit der Calcineurin-Mutante haben könnte.

Aus diesen Beobachtungen läßt sich schließen, daß sich *C. albicans*-Zellen je nach Art und Zusammensetzung des Serums variabel bezüglich ihres Wachstums verhalten. Aufgrund von Versuchen, in denen die Zugabe eines Calciumchelators in das Serum ein Überleben von *C. albicans*-Mutanten der regulatorischen Untereinheit des Calcineurins ermöglichte, wurde nun die Hypothese aufgestellt, daß das Calcium im Serum verantwortlich für die Dezimierung dieser Zellen war (Blankenship and Heitman, 2004). Demgegenüber stehen Experimente mit der $\Delta cmp1$ -Mutante SCCMP1M4, bei denen diese auf YPD-Agarplatten mit der in Humanserum physiologischen Konzentration an freien Calciumionen (1.15-1.27 mM) (Faulkner, 1994) ohne erkennbares Wachstumsdefizit blieb (Abb. 17). Laut den Ergebnissen aus Kapitel 4.1.7.3 kann man eine Calciumsensitivität *in vitro* bei 300 mM feststellen, nicht aber bei 100 mM (nicht gezeigt) oder darunter. Dieses Resultat ist insofern nicht allzu verwunderlich, als Blankenship *et al.* den Serum-Effekt durch die Zugabe von nährstoffreichem YPD-Medium ins Serum im Verhältnis 1:1 fast vollständig aufheben konnten (Blankenship *et al.*, 2003), also YPD-Medium eine kompensatorische Wirkung auf die Calciumsensitivität ausüben könnte. Dennoch stellt sich angesichts der relativ hohen tolerierten Konzentration von 100 mM in YPD-Medium die Frage, ob die Calciumsensitivität allein für das Absterben einer Calcineurin-defizienten *C. albicans*-Mutante in Serum verantwortlich gemacht werden kann.



Abb. 17 Kein Wachstumsdefizit der $\Delta cmp1$ -Mutante SCCMP1M4 auf YPD plus 1, 2 bzw. 5 mM CaCl₂ nach Inkubation für 2 Tage bei 30°C.

4.2 Charakterisierung der essentiellen Gene *YML127*, *YPR143* und *YML93* in *Candida albicans*

Die Charakterisierung essentieller Gene ist äußerst schwierig, da sich homozygote knock-out-Mutanten dieser Gene nicht vermehren lassen, und man somit die Auswirkungen des Verlusts nicht ohne weiteres analysieren kann. Die Funktionen solcher Gene sind unter Betrachtung von *Candida albicans* als pathogenen Organismus insbesondere für die Medizin sehr interessant, da sie möglicherweise neue Angriffsziele für antimykotische Wirkstoffe repräsentieren. Deshalb sucht man nach Systemen, mit denen man konditional letale Mutanten dieser Kandidaten-Gene herstellen kann, in denen nach Anzucht einer Kultur unter bestimmten Bedingungen das Gen ausgeschaltet wird und man so phänotypische Untersuchungen mit der vorhandenen Population an Zellen machen kann. Im folgenden wird eine effiziente Methode zur Konstruktion konditionaler Mutanten vorgestellt und die Durchführung an drei verschiedenen essentiellen Genen in *C. albicans* beschrieben, auf deren Funktion zu Beginn dieser Arbeit noch keine Hinweise vorhanden waren. Anschließend wird eine funktionelle Eingrenzung ihrer Genprodukte vorgenommen. Die drei untersuchten Gene *YML127*, *YPR143* und *YML93* wurden im Rahmen eines Drittmittelprojektes eines Pharmaunternehmens (damals Aventis, inzwischen Sanofi, Paris) anhand bestimmter Kriterien ausgewählt, um mögliche neue molekulare Angriffsziele in den Pilzen für eine Therapie auszuloten. Die Gene mußten bestimmte Bedingungen erfüllen, wie Essentialität für das Überleben in *Saccharomyces cerevisiae*, keine signifikante Homologie zu Genen von Vertebraten oder *Caenorhabditis elegans* und eine molekulare Masse geringer als 100 kDa, um die wichtigsten Kriterien zu nennen.

4.2.1 Die Gene *YML127*, *YPR143* und *YML93* sind essentiell für das Überleben von *Candida albicans*

Zu Beginn dieser Arbeit mußten zunächst die homologen Gene in *Candida albicans* identifiziert werden. Dies geschah über BLAST-Suche mit dem „assembly“ 6 der *Candida*-Genom-Datenbank (<http://www-sequence.stanford.edu/group/candida/>), welche als Resultat die drei offenen Leserahmen (ORF) mit den Nummern orf6.4962 für *YML127*, orf6.367 für *YPR143* und orf6.8900 für *YML93* auf den jeweiligen Contigs 6-2378, 6-1523 bzw. 6-2518 ergab. Gemäß der chromosomalen Kartierung ist *YML127* auf dem Chromosom 1 lokalisiert,

YML93 auf Chromosom R, bei *YPR143* ist die Kartierung noch unbekannt. Der ORF *YML127* umfaßt eine Länge von 1905 bp und kodiert für ein Protein mit 634 Aminosäuren, das zum *S. cerevisiae*-Homolog eine Übereinstimmung von 32% und eine Ähnlichkeit von 50% aufweist. *YPR143* stellt mit 768 bp Länge ein recht kleines Gen dar; sein 255 Aminosäuren umfassendes Genprodukt zeigt eine 50%ige Identität sowie eine 71%ige Ähnlichkeit zum Bäckerhefe-Homolog. Das *YML93*-Gen ist mit 2619 bp das größte der untersuchten Gene und kodiert für ein Protein mit 872 Aminosäuren; die Identität bzw. Ähnlichkeit zum *S. cerevisiae*-Homolog auf Proteinebene beträgt 42% bzw. 62%.

Ausgehend von diesen Daten mußte die erste entscheidende Frage geklärt werden, ob die Gene genauso wie in *S. cerevisiae* auch in *C. albicans* essentiell für das Überleben sind. Dafür wurde zunächst mit der Deletion der Genloci nach der *URA3*-Flipper-Methode (siehe Kapitel 4.1.2.1 und Abb. 2A) in dem Uridin-auxotrophen Ausgangsstamm CAI4 begonnen. Nach der Inaktivierung des ersten Allels mit entsprechend konstruierten DNA-Kassetten (Abb. 19A, 21A und 23A) und der Wiedergewinnung des *URA3*-Selektionsmarkers wurden pro Gen jeweils zwei unabhängige CAI4-Derivate erneut mit der Deletionskassette transformiert. Mindestens 11 Uridin-prototrophe Derivate wurden daraufhin auf deren Genotyp mittels Southernblot-Analyse und einer Gen-spezifischen Sonde untersucht. Dabei konnte festgestellt werden, daß die DNA-Kassetten in fast allen Transformanten über die homologe Rekombination in das bereits inaktivierte Allel integriert worden waren, so daß sie immer noch heterozygot bezüglich des Zielgens waren. In vereinzelt Fällen hatte auch eine ektopische Integration an anderer Stelle im Genom stattgefunden. Obwohl aber die Frequenz für eine Integration in das bereits inaktivierte und in das intakte Allel zumindest bei *YML127* gleich groß war (nicht gezeigt), was sich anhand der Unterscheidung der beiden Allele feststellen ließ (siehe 4.2.2.2), konnten keine homozygoten Transformanten erhalten werden, in denen die Kassette in das zweite noch intakte Allel integriert war, was für eine Überlebensunfähigkeit solcher Derivate spricht. Für die beiden anderen Gene konnte eine Begünstigung eines Allels für die Integration nicht ausgeschlossen werden, jedoch ist eine Unterscheidung des anderen Allels in dem Maße, daß keine homologe Rekombination mehr stattfinden kann, sehr unwahrscheinlich. Somit war mit hoher Wahrscheinlichkeit von der Überlebensnotwendigkeit aller drei Gene *YML127*, *YPR143* und *YML93* in *C. albicans* auszugehen.

4.2.2 Herstellung konditional letaler Mutanten

4.2.2.1 Allgemeines Konstruktionsprinzip

Die Herstellung konditional letaler Mutanten wurde nach Michel *et al.* vorgenommen und beruht auf der Verwendung der induzierbaren FLP-Rekombinase, die bei Aktivierung eine verbliebene Kopie des zu untersuchenden Gens, das zwischen den *FRT*-Erkennungssequenzen gelegen ist, deletiert (Michel *et al.*, 2002). Dadurch läßt sich der letale Phänotyp in einem Pool von Zellen ausprägen und das Verhalten der Zellen kann studiert werden.

Ausgehend von den heterozygoten *ura3⁻* Stämmen war es dazu notwendig, zunächst die zusätzliche, deletierbare Kopie des essentiellen Gens in das Genom zu integrieren und das zweite wildtypische Allel zu inaktivieren, bevor die FLP-Rekombinase unter die Kontrolle des *SAP2*-Promotors gestellt wurde. Zudem erforderte die Mutagenese mehrerer Loci die Einführung des dominanten *MPA^R*-Gens als zweiten Selektionsmarker neben dem *URA3*-Gen. Die einzelnen Schritte der Konstruktion einer konditional letalen Mutante in *C. albicans* sind in Abb. 18 dargestellt. In den *ACT1*-Lokus der heterozygoten Mutante (Abb. 18A) wurde zunächst eine DNA-Kassette bestehend aus *FRT*-Erkennungssequenzen, dem *MPA^R*-Selektionsmarker und der PCR-amplifizierten gesamten kodierenden Region zusammen mit up- und downstream-Sequenzen des Zielgens integriert (B). Der *ACT1*-Lokus wurde gewählt, weil eine effiziente Exzision des *MPA^R*-Markers dort bereits gezeigt werden konnte, und die Zerstörung eines *ACT1*-Allels keine Auswirkungen auf das Wachstum des Pilzes hatte (Staib *et al.*, 2000c; Staib *et al.*, 1999). Daraufhin wurde das zweite wildtypische Allel des Zielgens mit Hilfe der *URA3*-Flipper-Kassette deletiert, was nun keine Schwierigkeiten mehr bereitete (C). Die Korrektheit der erhaltenen Transformanten bestätigte deshalb zum einen die Funktionalität der zusätzlichen Genkopie und zum anderen die Essentialität des Gens. Nach der Deletion des *URA3*-Flippers wurde eine *ura3⁻*, *MPA^R* homozygote Mutante mit zusätzlicher Genkopie im *ACT1*-Lokus erhalten (D). Zuletzt mußte das *ecaFLP*-Gen unter die Kontrolle des *SAP2-1*-Promotors gestellt werden, was durch homologe Rekombination eines entsprechenden Konstrukts in das *SAP2-1*-Allel geschah (E). Während der *SAP2-1*-Promotor unter normalen Wachstumsbedingungen in YPD-Medium reprimiert war, wurde bei seiner Induktion in YCB-BSA-Medium die Rekombinase exprimiert, und somit die zusätzliche Genkopie und der *MPA^R*-Marker im *ACT1*-Allel irreversibel entfernt, so daß durch den Verlust des essentiellen Gens der letale Phänotyp ausgeprägt wurde (F).

Darüber hinaus wurden zwei Arten von Kontrollstämmen konstruiert. Zum einen wurde das *ecaFLP*-Gen unter die Kontrolle des *SAP2-1*-Promotors in den heterozygoten

Stammhintergrund mit zusätzlicher Genkopie (nach Schritt B) gestellt, so daß eine Induktion der Rekombinase zwar den Verlust der zusätzlichen Kopie verursachte, was an der MPA-Sensitivität dieser Zellen festgestellt werden konnte, die Zellen aber aufgrund ihres wildtypischen Allels des essentiellen Gens nicht abstarben. Zum anderen wurde die homozygote Mutante mit zusätzlicher Genkopie mit einem Konstrukt transformiert, das nur den *URA3*-Selektionsmarker zielgerichtet in das *SAP2-I*-Allel inserierte (nach Schritt D). Diese Stämme dienten als Negativkontrolle, da sie unfähig waren, die *ACT1*-integrierte Genkopie unter *SAP2*-induzierenden Bedingungen herauszuspalten.

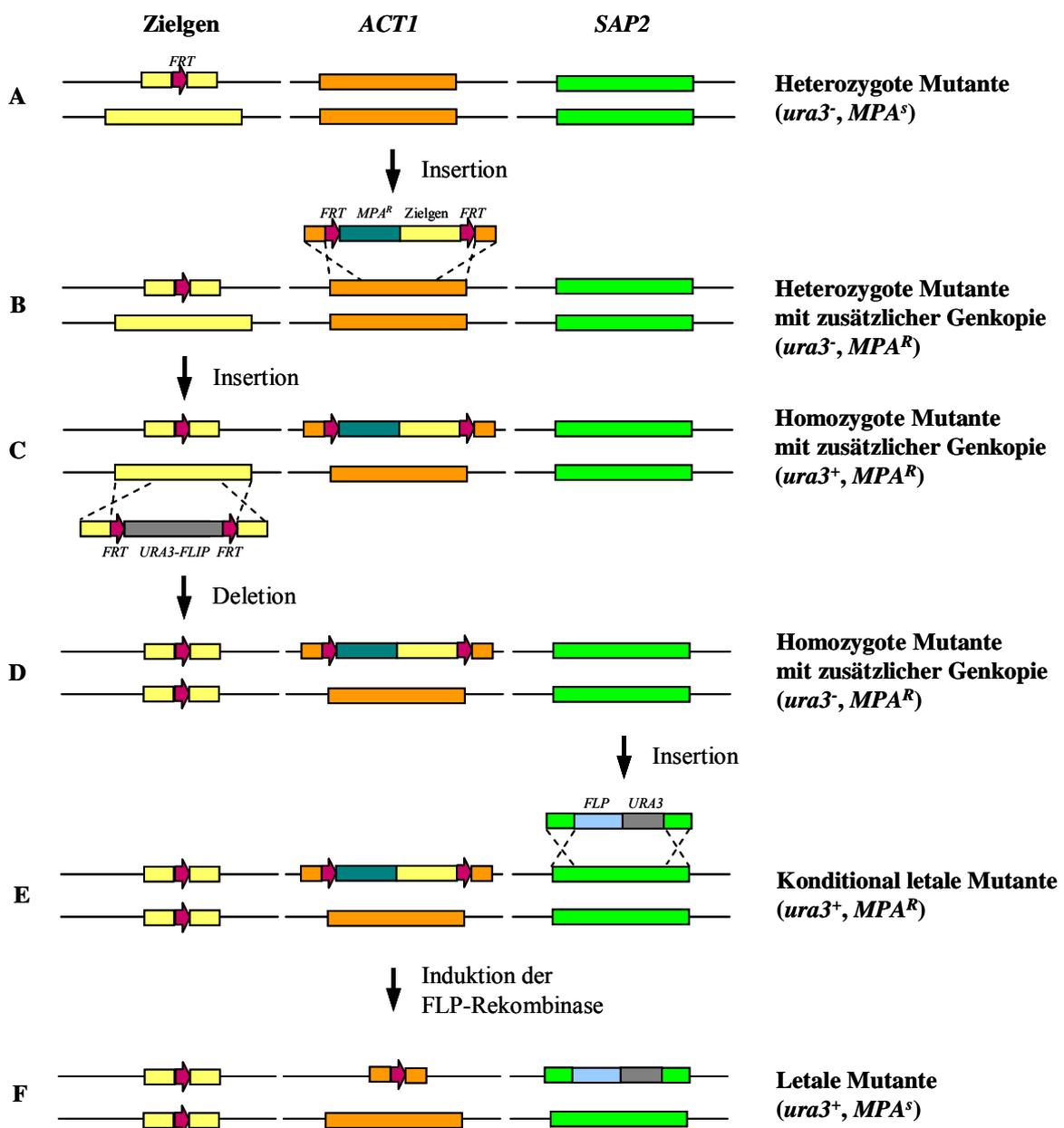


Abb. 18 Schrittweise Konstruktion einer konditional letalen Mutante in *C. albicans*. Für Erläuterungen siehe Text.

4.2.2.2 Konstruktion der konditional letalen Mutante des Gens *YML127*

Zur Inaktivierung der wildtypischen Allele des Gens *YML127* mußte zunächst eine *URA3*-Flipper-Kassette mit flankierenden 5'- und 3'-*YML127*-Enden konstruiert werden. Zu diesem Zweck wurde ein 5'-Fragment über PCR mit den Primern YML1 und YML2 amplifiziert und an den eingeführten Schnittstellen an den Positionen -1379 und +24 bezüglich des Start-Codons mit *ApaI* und *XhoI* gespalten und in das gleichermaßen verdaute Plasmid pSFU1 kloniert. Das resultierende Plasmid pYML127M1 wurde nun mit *XhoI-SacII* gespalten und mit einem 3'-*YML127*-Fragment, das zuvor mit den Primern YML3 und YML4 amplifiziert und an den eingeführten Schnittstellen an den Positionen +1860 mit *BglIII* und +2835 mit *SacII* gespalten worden war, zusammen mit dem *XhoI-BglIII*-Fragment aus pSFUC2, das den *URA3*-Flipper enthielt, zum Plasmid pYML127M2 ligiert. Dieses Konstrukt diente der Transformation des Ausgangsstammes CAI4, um das erste wildtypische *YML127*-Allel zu inaktivieren (Abb. 19A). Durch einen *EcoRV*-Restriktionspolymorphismus ließen sich die beiden Allele im Southernblot unterscheiden und je ein Transformant mit Insertion im Allel 1 und Allel 2 wurde für die weitere Konstruktion aufbewahrt. Die Stämme wurden als YML127M1A und B bezeichnet (Abb. 20A, Spuren 2 und 3). Nach der Deletion des *URA3*-Flippers wurden die Derivate YML127M2A und B erhalten, bei denen im Southernblot die 1.6 kb-Bande des mutagenisierten Allels gegen eine Bande von 0.6 kb Größe ausgetauscht war (Abb. 20A, Spuren 4 und 5).

Wie oben bereits erwähnt, war eine zweite Transformationsrunde zur Inaktivierung des zweiten Allels aufgrund der Essentialität des Gens vorerst nicht möglich. Deshalb mußte, wie im Schema dargestellt (Abb. 18), zunächst eine zusätzliche, deletierbare Kopie des Gens an anderer Stelle im Genom eingeführt werden. Aus den bereits genannten Gründen wurde dafür ein *ACT1*-Allel durch das Inserieren des Konstruktes aus pYML127D2 ersetzt, das den *MPA^R*-Marker, *YML127*-kodierende und -regulierende Sequenzen sowie flankierende *FRT*-sites und 5'- und 3'-*ACT1*-Fragmente für die homologe Rekombination enthielt (Abb. 19B). Die Konstruktion dieses Plasmids erfolgte in drei Schritten. Zunächst wurde das *YML127*-Gen über PCR mit den Primern YML5 und YML6 amplifiziert. In den Primern wurden an der Position -1006 eine *PstI*- und bei +2566 eine *BamHI*-Schnittstelle eingeführt, an denen das Fragment gespalten und in pKSII zum Plasmid pYML127 kloniert wurde. Nach Sequenzierung des Inserts wurde es mittels *PstI-BamHI*-Restriktion herausgespalten und zusammen mit dem *SalI-BamHI-MPA^R*-Fragment aus pAFI3 in das *SalI-PstI*-gespaltene pKSII zum Plasmid pYML127D1 ligiert und kloniert. Das Endprodukt pYML127D2 ging aus der Klonierung des *BamHI-SalI*-Fragmentes aus pAFI3, das 5'-*ACT1* und eine *FRT*-site

enthielt, mit dem *SalI-PstI*-[*MPA^R-YML127*]-Fragment aus pYML127D1 in das *BamHI-PstI*-gespaltene pAFI3 hervor. Der Erfolg der Transformation des heterozygoten Stammes YML127M2A mit pYML127D2 war im Southernblot in Abb. 20B, Spur 6 sichtbar, in der neben der wildtypischen *ACT1*-Bande eine zweite mutierte *ACT1*-Bande von 4.6 kb Größe erscheint. Auch bei Betrachtung von Spur 6 in Abb. 20A fällt die zusätzliche, auf Höhe des wildtypischen *YML127-2*-Allels gelegene, aber aus der Genkopie im *ACT1*-Lokus resultierende Bande auf. Nach dem Screening mehrerer Transformanten des YML127M2B-Stammes konnte leider kein korrektes Derivat identifiziert werden. Deshalb erfolgten alle weiteren Mutageneseschritte auf Basis des Stammes YML127M3A.

Nach der Integration der zusätzlichen Genkopie konnte das zweite wildtypische *YML127*-Allel ohne Probleme durch Transformation von YML127M3A mit dem *URA3*-Flipper aus pYML127M2 inaktiviert werden, wobei das Derivat YML127M4A hervorging (Abb. 20A, Spur 7). Durch Induktion der FLP-Rekombinase wurde der *URA3*-Flipper deletiert, und der *URA3*-Selektionsmarker stand im resultierenden Stamm YML127M5A für den letzten Transformationsschritt zur Verfügung (Abb. 20A, Spur 8). Dieser bestand darin, daß die [*SAP2-IP-ecaFLP*]-Fusion aus dem Konstrukt pSFL213 (Abb. 19C, oben) in diesen Stamm eingebracht wurde, woraus zwei unabhängige konditional letale Mutanten erhalten und als YML127M6A und B bezeichnet wurden. Der Erfolg der Transformation war in der Southern-Hybridisierung mit einer *SAP2*-spezifischen Sonde erkennbar, wobei das Zielallel jeweils durch eine 4.0 kb-Bande ersetzt worden war (Abb. 20C, Spuren 9 und 10).

Daneben wurden zwei Kontrollstamm-Paare konstruiert, indem zum einen der heterozygote YML127M3A-Stamm mit der [*SAP2-IP-ecaFLP*]-Fusion aus pSFL213 transformiert wurde, woraus die Stämme YML127M7A und B resultierten (Abb. 20C, Spuren 11 und 12). Zum anderen erfolgte die Integration des *URA3*-Selektionsmarkers allein, welches aus dem Plasmid pSFL28 (Abb. 19C, unten) gewonnen wurde, in denselben Lokus des Stammes YML127M5A. Zwei unabhängige Transformanten wurden aufbewahrt und als YML127M8A und B benannt (Abb. 20C, Spuren 13 und 14).

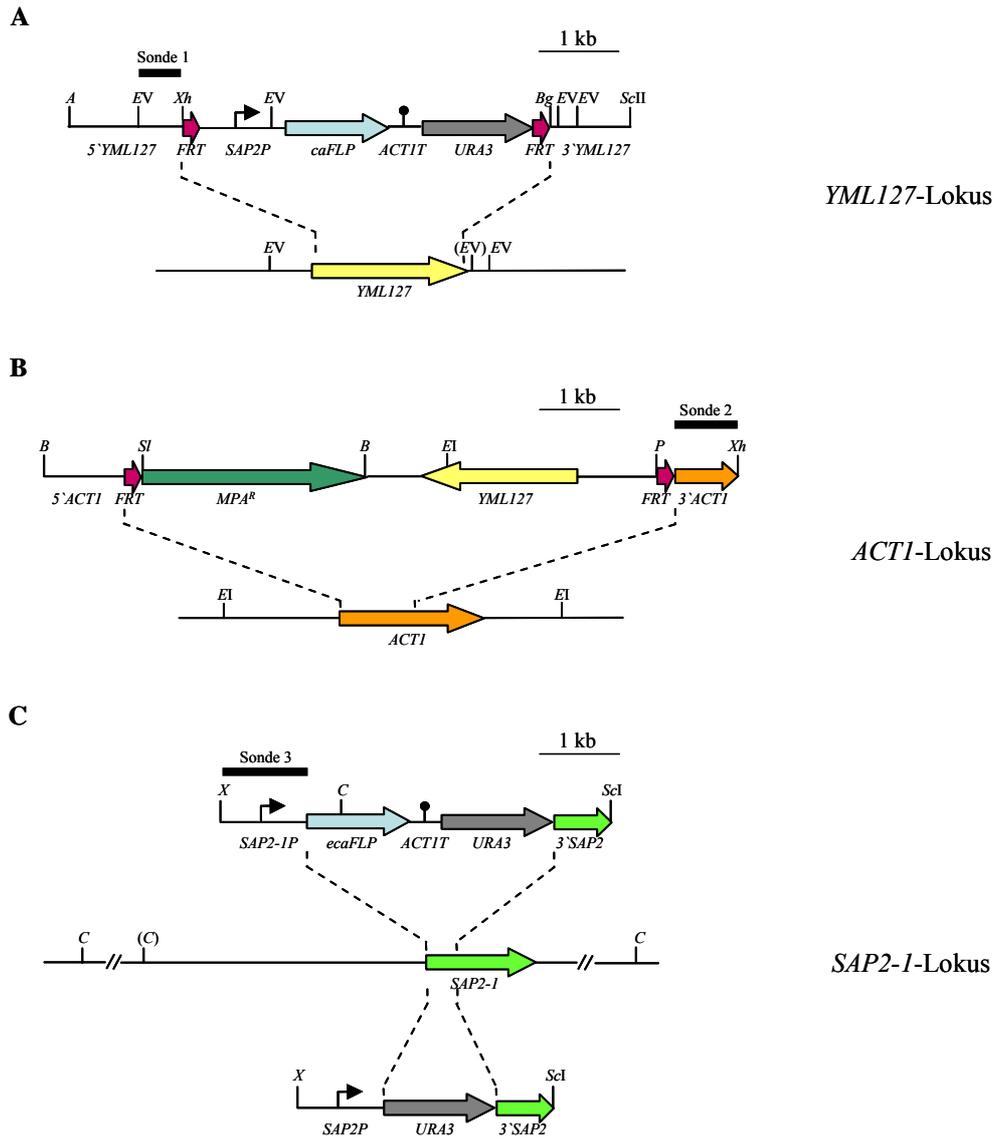


Abb. 19 Konstrukte zur Generierung der *YML127*-Mutantenstämme. **A.** Insert des Plasmids pYML127M2 mit dem *URA3*-Flipper zur Inaktivierung der wildtypischen *YML127*-Allele. **B.** Insert des Plasmids pYML127D2 zur Inserierung der zusätzlichen *YML127*-Kopie zusammen mit dem *MPA^R*-Marker in den *ACT1*-Lokus. **C.** Insert der Plasmide pSFL213 (oben) bzw. pSFL28 (unten) zur Integration der FLP-Rekombinase bzw. des *URA3*-Markers allein in das *SAP2-1*-Allel. Relevante Schnittstellen sowie die Lage der für die Southern-Hybridisierungen benutzten Sonden 1-3 sind angegeben. *A*: *Apa*I; *B*: *Bam*HI; *Bg*: *Bg*III; *C*: *Cla*I; *EI*: *Eco*RI; *EV*: *Eco*RV; *P*: *Pst*I; *ScI*: *Sac*I; *ScII*: *Sac*II; *Sl*: *Sal*I; *X*: *Xba*I; *Xh*: *Xho*I. Schnittstellen, die polymorph, d. h. nur in einem Allel vertreten sind, sind mit Klammern gekennzeichnet. Mit Ausnahme der *FRT*-sites sind alle Größen maßstabsgetreu wiedergegeben.

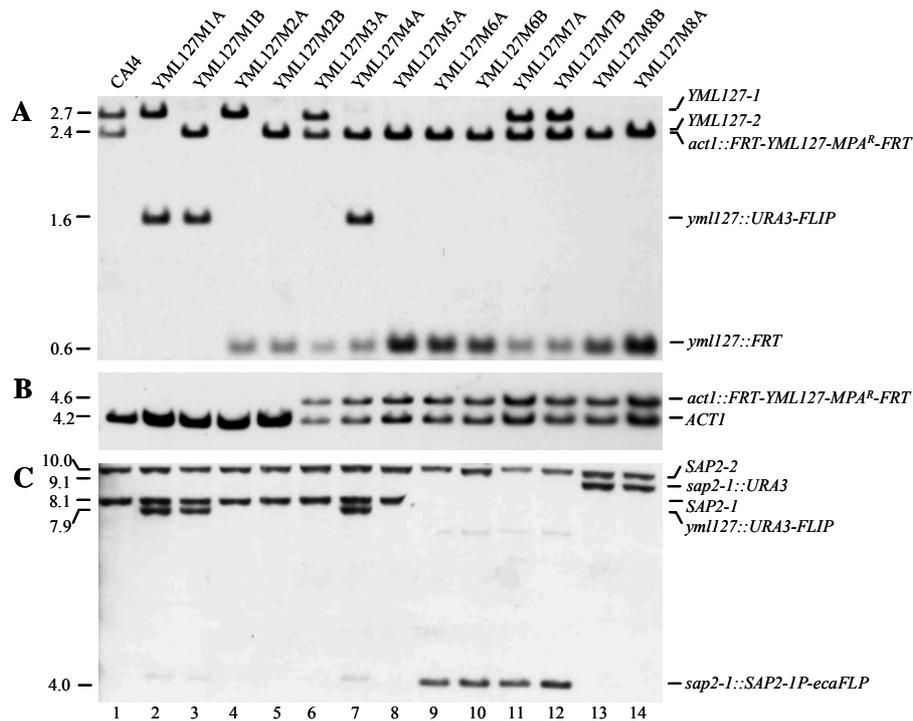


Abb. 20 Southernblot-Analyse zur Überprüfung der *YML127*-Stämme. Die Bezeichnungen der Stämme sind oben, die Größen der Fragmente in kb sind links angegeben. Die Lage der Sonden ist in Abb. 19 gekennzeichnet. **A.** Hybridisierung *EcoRV*-gespaltener chromosomaler DNA mit der *YML127*-spezifischen Sonde. **B.** Hybridisierung *EcoRI*-gespaltener chromosomaler DNA mit der *ACT1*-spezifischen Sonde. **C.** Hybridisierung *ClaI*-gespaltener chromosomaler DNA mit der *SAP2*-spezifischen Sonde.

4.2.2.3 Konstruktion der konditional letalen Mutante des Gens *YPR143*

Zunächst wurde mit der Inaktivierung des ersten wildtypischen Allels von *YPR143* begonnen. Das dafür erforderliche Plasmid pYPR143M2 (Abb. 21A) entstand in zwei Schritten, wobei zuerst pYPR143M1 kloniert wurde, indem ein 3`*YPR143*-Fragment über PCR mit den Primern YPR3 und YPR4 erhalten, an den eingeführten Schnittstellen bei +619 und +1111 mit *Bgl*III und *Sac*II gespalten und anstelle des 3`*YML127*-Fragments in den *Bgl*III-*Sac*II-gespaltene Vektor pYML127M2 eingebracht wurde. Anschließend wurde über PCR ein 5`*YPR143*-Bereich mit den Primern YPR5 und YPR2 amplifiziert, an den Positionen -489 und +15 mit *Apa*I und *Xho*I verdaut und anstelle des 5`*YML127*-Fragments in das gleichermaßen gespaltene Plasmid pYPR143M1 kloniert. Die CAI4-Transformation mit dem Insert des entstandenen pYPR143M2 ergab, ermittelt durch Southern-Hybridisierung mit *YPR143*-spezifischer Sonde, mehrere korrekte Derivate. Zwei davon wurden als YPR143M1A und B aufbewahrt (Abb. 22A, Spuren 2 und 3). In diesen wurde der *URA3*-Flipper exzidiert, und nach Selektion und Überprüfung der Derivate wurden die heterozygoten Mutanten YPR143M2A und B erhalten (Abb. 22A, Spuren 4 und 5).

Für die Integration der zusätzlichen Genkopie in den *ACT1*-Lokus wurde die nötige DNA-Kassette mit dem *MPA^R*-Marker und den *YPR143*-Sequenzen wie folgt konstruiert. Der *YPR143*-Bereich mit kodierenden sowie up- und downstream-Sequenzen wurde über PCR mit den Primern YPR7 und YPR8 amplifiziert. An den eingebrachten Schnittstellen *PstI* und *BglII* an den Positionen -967 und +1119 wurde das PCR-Produkt gespalten und in das gleichermaßen verdaute Plasmid pCMP1M3 kloniert. Daraufhin wurde das Insert des entstandenen pYPR143D1 durch Sequenzierung überprüft, wieder mittels *PstI*-*BglII*-Restriktion herausgespalten und zusammen mit dem *SalI*-*BamHI*-*MPA^R*-Fragment aus pAFI3 in den *SalI*-*PstI*-verdauten Vektor pKSII kloniert, wodurch pYPR143D2 entstand. Aus diesem Plasmid wurde wiederum das [*MPA^R*-*YPR143*]-Fragment mit *SalI* und *PstI* herausgespalten und zusammen mit dem *BamHI*-*SalI*-[5' *ACT1*-*FRT*]-Fragment aus pAFI3 in das *BamHI*-*PstI*-gespaltene pAFI3 ligiert. Mit dem Insert des fertigen Klonierungsprodukts pYPR143D3 (Abb. 21B) wurden nun die Stämme YPR143M2A und B transformiert. Nach erfolgter Selektion auf *MPA*-haltigen Agarplatten wurden die erhaltenen Transformanten im Southernblot überprüft, und korrekte Derivate mit der Integration in ein *ACT1*-Allel wurden als YPR143M3A und B bezeichnet (Abb. 22B, Spuren 6 und 7). Die Integration wird auch in Abb. 22A als neue 5.6 kb-Bande in den Spuren 6 und 7 sichtbar.

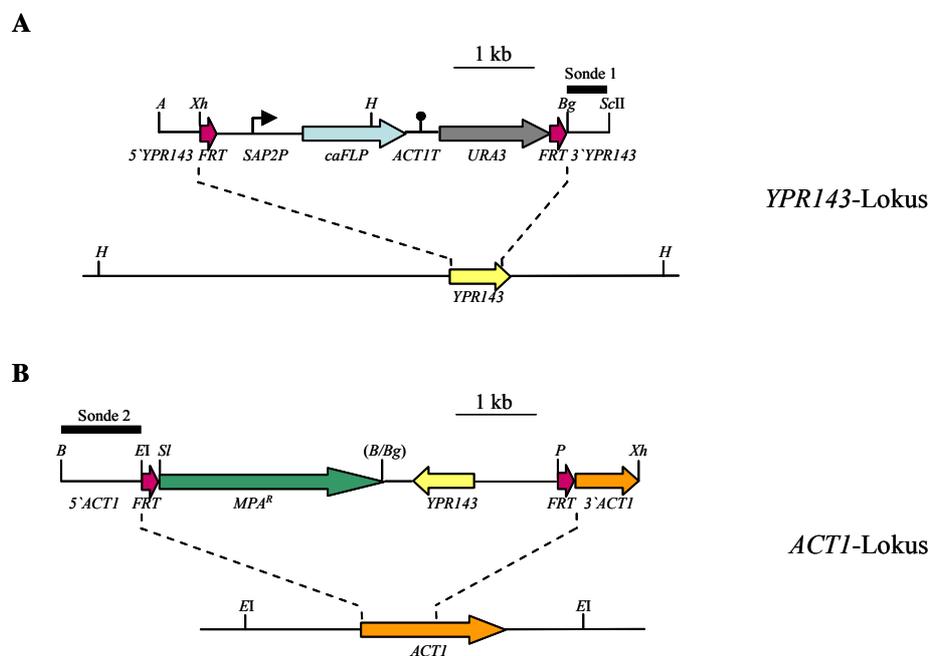


Abb. 21 Konstrukte zur Generierung der *YPR143*-Mutantenstämmen. **A.** Insert des Plasmids pYPR143M2 mit dem *URA3*-Flipper zur Inaktivierung der wildtypischen *YPR143*-Allele. **B.** Insert des Plasmids pYPR143D3 zur Inserierung der zusätzlichen *YPR143*-Kopie zusammen mit dem *MPA^R*-Marker in den *ACT1*-Lokus. Relevante Schnittstellen sowie die Lage der Sonden 1 und 2 für die Southern-Hybridisierungen sind angegeben. *A*: *ApaI*; *B*: *BamHI*; *Bg*: *BglII*; *EI*: *EcoRI*; *H*: *HindIII*; *P*: *PstI*; *ScII*: *SacII*; *SI*: *SalI*; *Xh*: *XhoI*. Schnittstellen, die durch Fusion bei der Ligation zerstört worden sind, sind mit Klammern gekennzeichnet. Mit Ausnahme der *FRT*-sites sind alle Größen maßstabsgetreu wiedergegeben.

Nach der Einführung der zusätzlichen Genkopie ging die Inaktivierung des zweiten wildtypischen Allels mit dem *URA3*-Flipper aus pYPR143M2 leicht vonstatten, was die Funktionalität der zusätzlichen Kopie bestätigte. In den erhaltenen *ypr143*-homozygoten, Uridin-prototrophen Stämmen YPR143M4A und B wurde die FLP-Rekombinase induziert, wodurch der *URA3*-Flipper deletiert wurde, und die Uridin-auxotrophen Derivate YPR143M5A und B entstanden (Abb. 22A, Spuren 8-11).

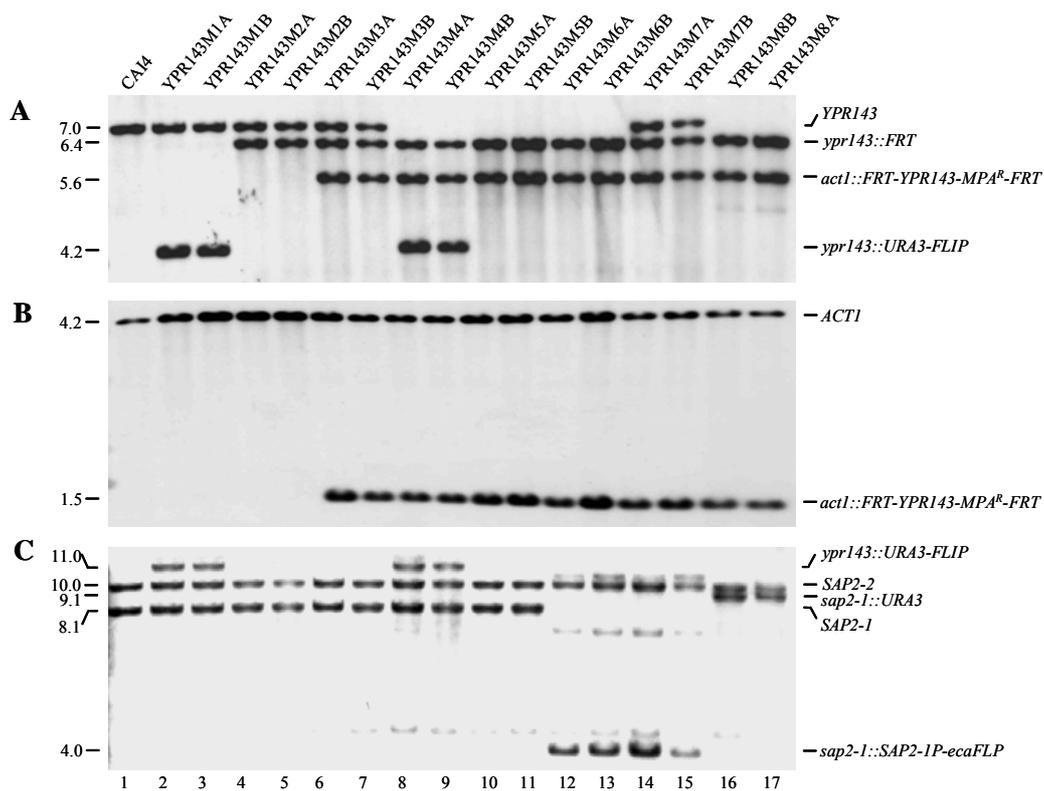


Abb. 22 Southernblot-Analyse zur Überprüfung der *YPR143*-Stämme. Die Bezeichnungen der Stämme sind oben, die Größen der Fragmente in kb sind links angegeben. Die Lage der Sonden ist in Abb. 19C bzw. Abb. 21 gekennzeichnet. **A.** Hybridisierung *Hind*III-gespaltener chromosomaler DNA mit der *YPR143*-spezifischen Sonde. **B.** Hybridisierung *Eco*RI-gespaltener chromosomaler DNA mit der *ACT1*-spezifischen Sonde. **C.** Hybridisierung *Cla*I-gespaltener chromosomaler DNA mit der *SAP2*-spezifischen Sonde. Zum Teil sind Kreuzhybridisierungen, d. h. schwach hybridisierende unspezifische Banden zu sehen, was auf nicht optimale Versuchsbedingungen zurückzuführen ist.

Zuletzt mußte das *ecaFLP*-Rekombinasegen in den *SAP2-1*-Lokus eingebracht werden, was analog zur *YML127*-Mutagenese mittels Integration des Konstrukts aus pSFL213 am entsprechenden Locus der Stämme YPR143M5A und B geschah (Abb. 19C, oben). Die resultierenden konditional letalen Mutanten wurden mittels Southern-Hybridisierung mit einer 5' *SAP2*-Sonde auf ihre Korrektheit überprüft und als YPR143M6A und B bezeichnet (Abb. 22C, Spuren 12 und 13). Daneben wurden die Stämme YPR143M7A und B, die der Kontrolle

der *MPA^R*-Deletion dienten, durch Integration des pSFL213-Konstrukts in die heterozygoten Stämme YPR143M3A und B generiert (Abb. 22C, Spuren 14 und 15). Als Negativkontrolle sowie als isogene Vergleichsstämme wurden außerdem durch Transformation der YPR143M5A und B-Stämme mit dem pSFL28-Insert, das nur den *URA3*-Selektionsmarker enthielt (Abb. 19C, unten), die Stämme YPR143M8A und B erhalten, die auch unter induzierenden Bedingungen das zusätzliche *YPR143*-Gen nicht verlieren konnten (Abb. 22C, Spuren 16 und 17).

4.2.2.4 Konstruktion der konditional letalen Mutante des Gens *YML93*

Das erste wildtypische *YML93*-Allel wurde mit Hilfe der *URA3*-Flipper-Kassette aus dem Plasmid pYML93M2 (Abb. 23A) inaktiviert. Die Konstruktion erfolgte in Analogie zum Plasmid pYPR143M2 über die schrittweise Klonierung zuerst des 3'- und dann des 5'-Bereichs des *YML93*-Gens anstelle der *YML127*-Fragmente in den Vektor pYML127M2 über das Zwischenprodukt pYML93M1. Das 3'-Fragment wurde über PCR mit den Primern YML93-3 und YML93-4, das 5'-Fragment mit den Primern YML93-1 und YML93-2 amplifiziert. Für die Klonierungen wurden in die Primer YML93-3 eine *Bgl*II-site (Position +2562), in YML93-4 eine *Sac*II-site (Position +3141), in YML93-1 eine *Apa*I-site (Position -388) und in YML93-2 eine *Xho*I-site (Position +96) eingeführt, so daß die PCR-Produkte durch entsprechende Restriktion kloniert werden konnten. Nach erfolgreicher Transformation des Ausgangsstammes CAI4 wurde bei der Kontrolle im Southernblot mit einer *YML93*-spezifischen Sonde die wildtypische 2.3 kb-Bande um eine 4.2 kb-Bande ergänzt, welche den Austausch eines Wildtyp-Allels gegen den *URA3*-Flipper widerspiegelte, und zwei korrekte heterozygote Derivate wurden als YML93M1A und B aufbewahrt (Abb. 24A, Spuren 2 und 3). Nach Verlust des *URA3*-Flippers in beiden Stämmen gingen die Derivate YML93M2A und B hervor, in denen der deletierte Bereich anhand der 3.3 kb-Bande im Southernblot sichtbar wurde (Abb. 24A, Spuren 4 und 5).

Bevor die zweite wildtypische Kopie des *YML93*-Gens ebenfalls deletiert werden konnte, mußte die zusätzliche Kopie des Gens mit regulatorischen Sequenzen in die Stämme mit Hilfe des Konstrukts aus pYML93D2 (Abb. 23B) eingebracht werden. Zunächst wurde dafür die *YML93*-Sequenz mittels PCR mit dem Primerpaar YML93-5 und YML93-6 amplifiziert. Durch die eingebrachten Schnittstellen ließ sich das Produkt an Position -996 mit *Pst*I und an +3072 mit *Bam*HI spalten und in den gleichermaßen verdauten pKSII klonieren. Das entstandene Plasmid pYML93 wurde hinsichtlich der Korrektheit des *YML93*-Inserts durch

Sequenzierung überprüft. Anschließend wurde das Insert mit denselben Endonukleasen wieder herausgeschnitten, um es zusammen mit dem *SalI*-*Bam*HI-*MPA^R*-Fragment aus pAFI3 in den *SalI*-*Pst*I-gespaltenen pKSII zum Plasmid pYML93D1 zu klonieren. Das Plasmid pYML93D2 entstand letztlich durch Ligation des *Bam*HI-*SalI*-[5' *ACT1*-*FRT*]-Fragments aus pAFI3 und des *SalI*-*Pst*I-[*MPA^R*-*YML93*]-Fragments aus pYML93D1 mit dem *Bam*HI-*Pst*I-gespaltenen pAFI3, in dem der 3' *ACT1*-Bereich bereits enthalten war. Aus der Transformation der YML93M2-Stämme mit diesem Konstrukt wurden *MPA*-resistente Klone selektiert, und nach der Southernblot-Analyse mit einer *ACT1*-spezifischen Sonde wurden Transformanten mit korrekt integrierter Kassetten identifiziert und als YML93M3A und B bezeichnet (Abb. 24B, Spuren 6 und 7). Die zusätzliche Genkopie tauchte auch bei der Hybridisierung mit der 5' *YML93*-Sonde in Abb. 24A in den Spuren 6 und 7 auf.

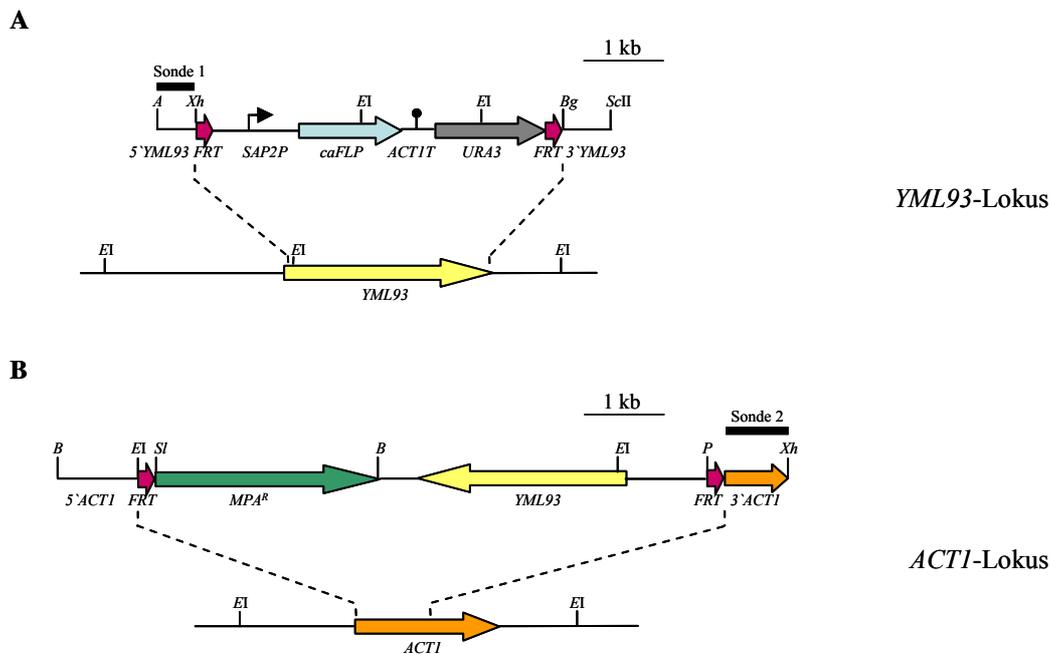


Abb. 23 Konstrukte zur Generierung der *YML93*-Mutantenstämme. **A.** Insert des Plasmids pYML93M2 mit dem *URA3*-Flipper zur Inaktivierung der wildtypischen *YML93*-Allele. **B.** Insert des Plasmids pYML93D2 zur Inserierung der zusätzlichen *YML93*-Kopie zusammen mit dem *MPA^R*-Marker in den *ACT1*-Lokus. Relevante Schnittstellen sowie die Lage der für die Southern-Hybridisierungen benutzten Sonden 1 und 2 sind angegeben. *A:* *Apa*I; *B:* *Bam*HI; *Bg:* *Bg*II; *EI:* *Eco*RI; *P:* *Pst*I; *ScII:* *Sac*II; *Sl:* *Sal*I; *Xh:* *Xho*I. Mit Ausnahme der *FRT*-sites sind alle Größen maßstabsgetreu wiedergegeben.

Daraufhin erfolgte die Inaktivierung des noch verbliebenen wildtypischen Allels mit Hilfe des *URA3*-Flippers aus dem Plasmid pYML93M2. Der Austausch des *YML93*-Allels gegen den *URA3*-Flipper in den Stämmen YML93M4A und B ist in Abb. 24A in den Spuren 8 und 9 gezeigt. Durch die Flipperdeletion wurden die Stämme YML93M5A und B generiert (Abb. 24A, Spuren 10 und 11), die einen *ura3⁻* und *MPA^R* Phänotyp aufwiesen. In diesen

Stammhintergrund wurde die *ecaFLP*-Rekombinase mit Hilfe des Plasmids pSFL213 in den *SAP2-1*-Lokus eingebracht, woraus die konditional letalen Mutanten YML93M6A und B entstanden (Abb. 24C, Spuren 12 und 13). Auch hier wurden die Kontrollstämme YML93M7A und B sowie YML93M8A und B hergestellt. Im Falle der M7-Stämme waren es YML93M3A und B-Derivate, die neben der wildtypischen Kopie des *YML93*-Gens und dem mutagenisierten *ACT1*-Allel noch die *ecaFLP*-Rekombinase aus pSFL213 erhielten (Abb. 19C, oben; Abb. 24C, Spuren 14 und 15). Die M8-Stämme unterschieden sich von den M6-Stämmen dadurch, daß anstelle der Rekombinase nur ein *URA3*-Gen aus dem Plasmid pSFL28 in den *SAP2-1*-Lokus integriert wurde (Abb. 19, unten; Abb. 24C, Spuren 16 und 17).

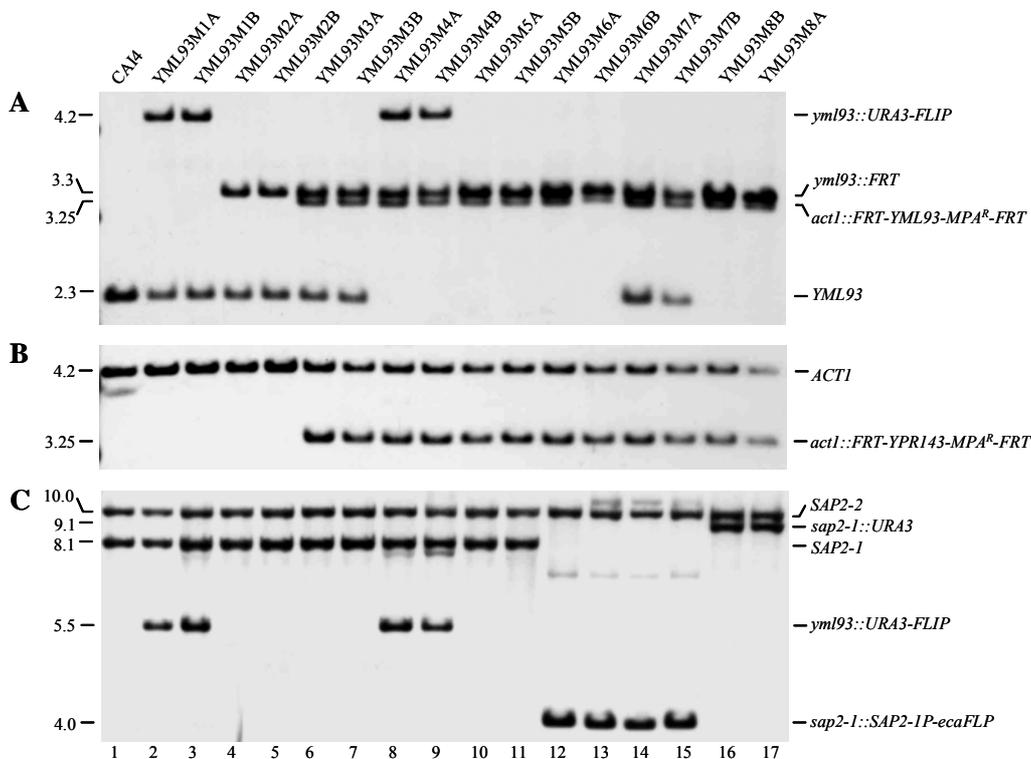


Abb. 24 Southernblot-Analyse zur Überprüfung der *YML93*-Stämme. Die Bezeichnungen der Stämme sind oben, die Größen der Fragmente in kb sind links angegeben. Die Lage der Sonden ist in Abb. 19C bzw. Abb. 23 gekennzeichnet. **A.** Hybridisierung *EcoRI*-gespaltener chromosomaler DNA mit der *YML93*-spezifischen Sonde. **B.** Hybridisierung *EcoRI*-gespaltener chromosomaler DNA mit der *ACT1*-spezifischen Sonde. **C.** Hybridisierung *ClaI*-gespaltener chromosomaler DNA mit der *SAP2*-spezifischen Sonde.

4.2.3 Induktionskinetik und Wachstum nach der Induktion

4.2.3.1 Induktionskinetik der Mutanten YML127M6A und B

Die Stämme YML127M7A und B sollten eigentlich der Kontrolle der Induktion dienen, indem aus dem Anteil MPA-resistenter und -sensitiver Klone aus einer Population, die über Nacht in *SAP2*-induzierendem YCB-BSA-Medium angezogen worden war, die Induktionsrate bestimmt wurde. Allerdings mußte beim Wachstumsvergleich des Wildtyps SC5314 und der M7-Kontrollstämmen mit den Teststämmen YML127M6A und B sowie mit den Kontrollen YML127M8A und B festgestellt werden, daß die Stämme, die anstelle einer wildtypischen *YML127*-Kopie nur die Kopie im *ACT1*-Lokus besaßen, eine langsamere Wachstumsrate aufwiesen, so daß ein Vergleich der Induktion zwischen M7- und M6-Stämmen nicht möglich war. Eine Ursache dafür mag die ektopische Expression des Gens sein, bei der *cis*- oder *trans*-regulatorische Komponenten nicht vorhanden oder nicht auf adäquate Weise agieren können. Somit beschränkte sich die Bestimmung der Induktionsraten auf die relative Differenz der Lebendzellzahl-Bestimmungen zwischen den induzierten M6- und M8-Stämmen, die einen isogenen Stammhintergrund mit nur einer ektopischen *YML127*-Kopie aufwiesen. Dabei wurde darauf geachtet, daß die optische Dichte (OD) dieser Kulturen einen etwa gleichen Wert aufwies, der im Bereich von 20 bis 25 lag. In den M6-Stämmen wurde während der Induktion die zusätzliche *YML127*-Kopie durch die FLP-Rekombinase deletiert, weshalb solche Zellen nach dem Ausplattieren auf Vollmedium keine sichtbaren Kolonien hervorbringen konnten. In den Kontrollstämmen YML127M8A und B konnte keine Deletion erfolgen, da sie kein *FLP*-Gen besaßen.

Laut früheren Experimenten zur Etablierung dieser Methodik war für eine $\geq 99.9\%$ ige Induktion, gemessen am Anteil MPA-sensitiver zu MPA-resistenten Klonen in Kontrollstämmen analog zu den M7-Stämmen, eine Inkubationsdauer im YCB-BSA-Medium von ca. 15 h ausreichend (Michel *et al.*, 2002). Im Fall der YML127M6-Stämme zeigte sich jedoch, daß sie aufgrund ihrer geringeren Wachstumsrate eine längere Inkubationsdauer für eine annähernd gleichgute Induktion benötigten. Daher sollte zunächst der Zeitpunkt für eine maximale Induktion ermittelt werden, indem in einem Experiment der zeitliche Verlauf der Induktion nach 17 bis 21 h Inkubation in YCB-BSA anhand von Lebendzellzahl-Bestimmungen dokumentiert wurde (Abb. 25). Dabei wurde deutlich, daß nach 17 h immer noch eine unzureichende Induktion nur in ca. 88 bzw. 90% der Zellen stattgefunden hatte, während ab 19 h ein Plateau erreicht wurde, was ein Maximum bei 21 h von knapp über 99% Induktion erreichte. Durch weitere Experimente mit vergleichbaren Daten bestätigt, ließ sich

ableiten, daß für eine maximale Induktion mindestens eine Inkubation von 19 h Dauer in YCB-BSA erfolgen mußte. Die durchschnittliche Induktionsrate aus sechs unabhängigen Experimenten betrug $99.4 \pm 0.4\%$ für YML127M6A und $99.1 \pm 0.7\%$ für YML127M6B. Dies lieferte eine gute Ausgangsbasis für Experimente mit dem Pool induzierter Zellen, da man die knapp 1% nicht-induzierter Zellen selbst nach dem Überimpfen in frisches Medium für eine längere Zeit vernachlässigen konnte.

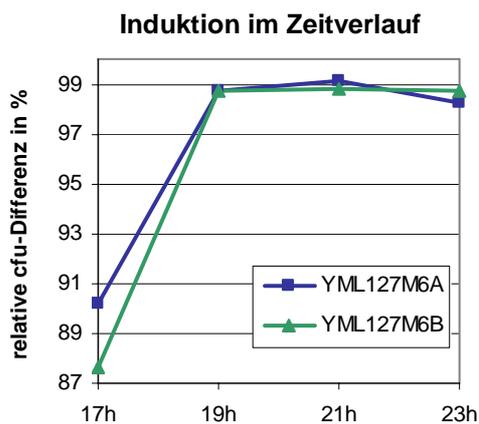


Abb. 25 Induktionskinetik der Mutanten YML127M6A und B. Induktion im zeitlichen Verlauf von 17-23 h während der Inkubation in YCB-BSA gemessen an der relativen Differenz der Lebendzellzahlen zwischen den M6- und den korrespondierenden M8-Stämmen in Prozent.

4.2.3.2 Wachstum der Mutanten YML127M6A und B

Nach der Induktion sollte ebenfalls das Wachstumsverhalten der letalen Mutanten YML127M6A und B in Vollmedium untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden Aliquots der Induktionskulturen 1:1000 in YPD-Medium überführt und im Verlauf der Zeit die optischen Dichten bestimmt (Abb. 26). Dabei konnte, wie oben bereits erwähnt, aufgezeigt werden, daß die M8-Stämme eine deutlich längere lag-Phase als der Wildtyp-Stamm SC5314 aufwiesen. Darüber hinaus waren die zu 99% letalen M6-Stämme erwartungsgemäß über einen langen Zeitraum bis zu 15 h in ihrem Wachstum fast vollständig inhibiert und erst danach machte sich das 1% der Zellen, in denen die *YML127*-Kopie noch vorhanden war, bemerkbar und die Kurve begann langsam anzusteigen. Angesichts dieser Beobachtungen konnte man von einer effizienten Deletion des *YML127*-Gens und der Erschöpfung seines Genprodukts in den induzierten Zellen ausgehen.

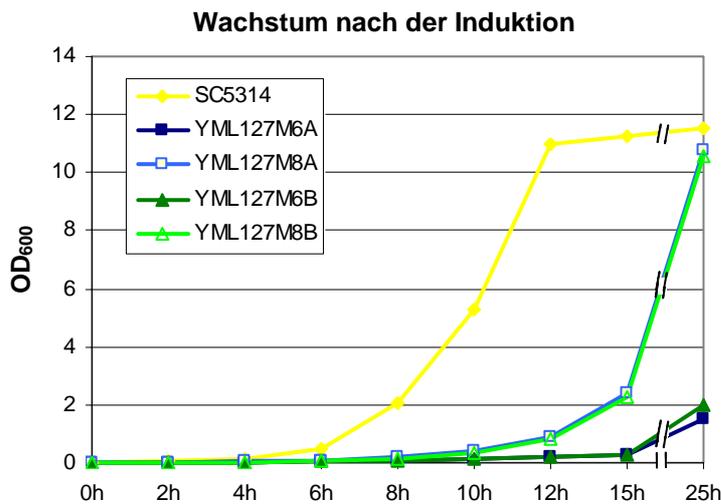


Abb. 26 Wachstum des Wildtyps SC5314 und der Mutanten YML127M6A und B sowie YML127M8A und B nach Induktion in YCB-BSA und nach Überimpfen in frisches YPD-Medium (1:1000) gemessen an der optischen Dichte der Kulturen.

4.2.3.3 Induktionskinetik der Mutanten YPR143M6A und B

Bei Betrachtung der Induktion der YPR143M6- und M7-Stämme in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer in einem einmaligen Experiment fiel auf, daß die maximale Induktion früher erreicht wurde als bei den YML127M6-Stämmen (Abb. 27). Allerdings gab es auch Unterschiede im Vergleich der M6- und M7-Stämme. Während die M6-Stämme in dem Experiment schon bei 15 h Inkubation in YCB-BSA eine maximale Induktion erreicht hatten (Abb. 27A), zeigten die M7-Stämme ein Maximum erst nach 17 h Inkubation (Abb. 27B). Dies lag wahrscheinlich an der unterschiedlichen Art der Messung, nachdem im Fall der M6-Stämme sich die Induktionsrate aus dem relativen Verhältnis der Lebendzellzahlen zwischen M6- und dem korrespondierenden M8-Stamm ergab. Dieses Verfahren unterlag naturgemäß aufgrund der Abhängigkeit von mehreren Parametern höheren Fehlerquoten als die Messung der Induktionsrate bei den M7-Stämmen, wobei aus derselben Population der Anteil MPA-sensitiver Kolonien bestimmt wurde. Deshalb wurde von einer optimalen Induktionszeit von 17 h ausgegangen und bei den folgenden Experimenten entsprechend eingehalten. Die Durchschnittswerte aus acht unabhängigen Experimenten betragen für die Induktion des Stammes YPR143M6A $93.9 \pm 6.0\%$, für YPR143M6B ergab sich eine effiziente Deletion in $99.5 \pm 0.3\%$ der Zellen. In Tendenz dazu erreichten die Kontrollstämme YPR143M7A und B einen durchschnittlichen Anteil MPA-sensitiver Klone von $98,2 \pm 0.5\%$ bzw. $99.4 \pm 0.2\%$ (aus vier Experimenten). Bis auf die durchschnittlich schwächere Induktionsrate des Stammes YPR143M6A, wobei hier allerdings auch auf große Schwankungen in den einzelnen Experimenten (Standardabweichung $\pm 6.0\%$) hingewiesen werden muß, waren diese Werte im

Rahmen des Erwarteten. Auf Basis des relativ guten Wertes des korrespondierenden YPR143M7A-Kontrollstammes von 98.2% wurde dies als Voraussetzung für aussagekräftige Experimente mit den induzierten, letalen Mutanten YPR143M6A und B angesehen.

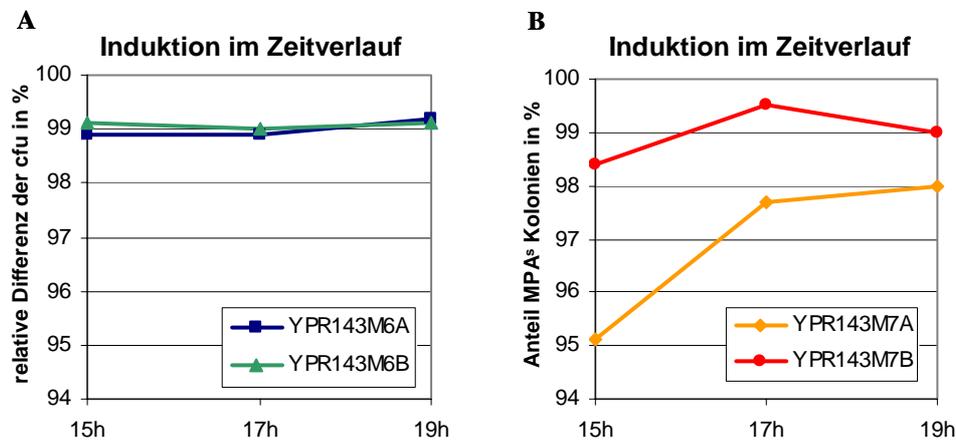


Abb. 27 Induktionskinetik der Mutanten YPR143M6A und B sowie der Kontrollstämme YPR143M7A und B. **A.** Induktion im zeitlichen Verlauf von 15-19 h der M6-Stämme während der Inkubation in YCB-BSA gemessen an der relativen Differenz der Lebendzellzahlen zwischen den M6- und den korrespondierenden M8-Stämmen in Prozent. **B.** Induktion im zeitlichen Verlauf von 15-19 h der M7-Stämme während der Inkubation in YCB-BSA gemessen am Anteil MPA-sensitiver Kolonien in Prozent.

4.2.3.4 Wachstum der Mutanten YPR143M6A und B

Das Wachstum der induzierten Mutanten YPR143M6A und B im Vergleich zu den Kontrollstämmen YPR143M8A und B sowie zum Wildtyp SC5314 ist in Abb. 28 dargestellt. Die Stämme wurden dafür nach der Induktion 1:300 in frisches Vollmedium YPD überimpft und das Wachstum anhand optischer Dichte gemessen. Die Inokulierung mit einem größeren Aliquot als bei den YML127-Stämmen wurde gewählt, da sich aus Vorversuchen ein schnelles Wachstumsdefizit der YPR143M6-Stämme abzeichnete. Bei Betrachtung der Wachstumskurven fällt auf, daß sich die beiden letalen M6-Stämme trotz der Diskrepanz in der durchschnittlichen Induktionsrate in diesem Versuch vollkommen identisch verhielten. Ihre optische Dichte erreichte nach 10 h nur 0.4, während die optische Dichte der Kontrollstämme diese etwa um das 16fache überstieg. Die Kurve der M6-Stämme verlief bis zum Ende der Messung außerordentlich flach, woraus sich schließen läßt, daß annähernd keine Vermehrung der induzierten Mutanten stattfand und der leichte Anstieg vornehmlich auf den vernachlässigbar kleinen Prozentsatz der Zellen zurückzuführen war, in denen das *YPR143*-Gen nicht deletiert worden war. Bei einem Vergleich der M8-Kontrollstämme mit dem Wildtyp-Stamm fällt auf, daß der Wildtyp SC5314 geringfügig schneller wuchs als die

Kontrollstämme. Eine Erklärung dafür bietet die Tatsache, daß alle YPR143-Stämme mit dem *ura3*-defizienten Ausgangsstamm CAI4 hergestellt wurden, also einen anderen genetischen Hintergrund besaßen als der prototrophe SC5314. Eine andere Möglichkeit besteht darin, daß das Vorhandensein von nur einer *YPR143*-Kopie in den M8-Stämmen einen Effekt der Haploinsuffizienz hervorrief, der sich in einer leicht verringerten Wachstumsrate äußerte.

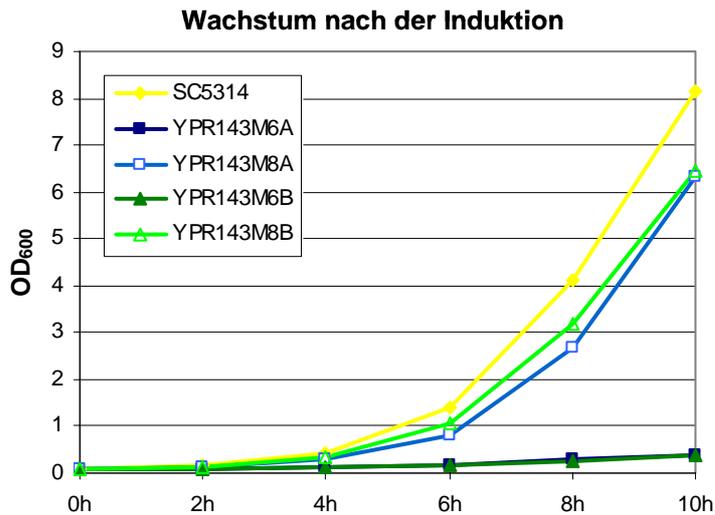


Abb. 28 Wachstum des Wildtyps SC5314 und der Mutanten YPR143M6A und B sowie YPR143M8A und B nach Induktion in YCB-BSA und nach Überimpfen in frisches YPD-Medium (1:300) gemessen an der optischen Dichte der Kulturen.

4.2.3.5 Induktionskinetik der Mutanten YML93M6A und B

Die Induktion der Mutantenstämme YML93M6A und B war analog zu den Kontrollstämmen YML93M7A und B nicht besonders zufriedenstellend. Auch nach längerer Inkubationszeit in YCB-BSA-Medium bis zu 23 h konnte der Anteil induzierter Zellen der A-Stammreihe nicht über 93% gesteigert werden (Abb. 29). Außerdem lag die Induktionsrate der B-Stammserie vor allem bei M6B, aber auch bei M7B unter der Induktionsrate der A-Stämme, so daß in dem gezeigten Versuch in Abb. 29A zu den Zeitpunkten vor 19 h keine Bestimmung der Induktion des M6B-Stammes aufgrund einer zu großen Koloniedichte durchgeführt werden konnte. Da kein erkennbares Wachstumsdefizit dieser Stämme vorlag, mußte eine Eigenschaft der Stämme die Induktionsfähigkeit auf direkte oder indirekte Weise negativ beeinflußt haben. Eine unspezifische Mutation könnte sich in einem frühen Schritt der Stammkonstruktion ereignet haben, zumal YML93M6B und YML93M7B ihren letzten gemeinsamen Ausgangsstamm in YML93M3B haben.

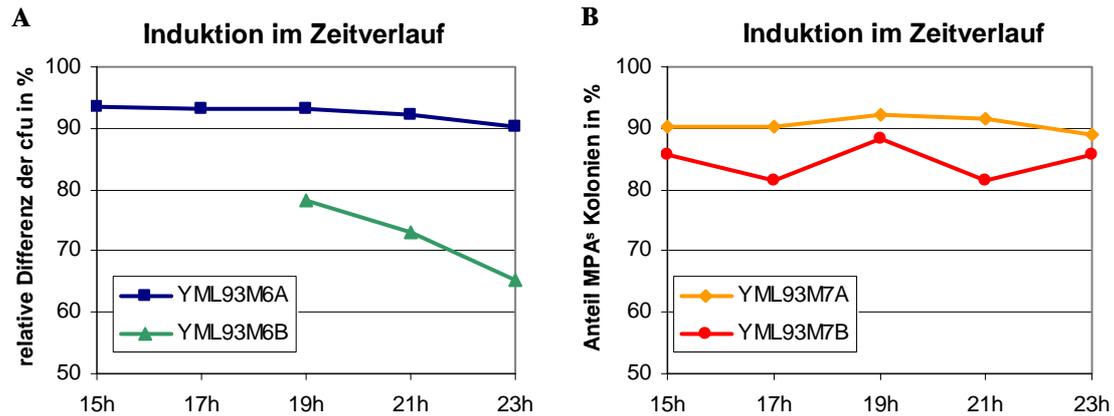


Abb. 29 Induktionskinetik der Mutanten YML93M6A und B sowie der Kontrollstämmen YML93M7A und B. **A.** Induktion im zeitlichen Verlauf von 15-23 h des Stammes YML93M6A bzw. im Verlauf von 19-23 h des Stammes YML93M6B während der Inkubation in YCB-BSA gemessen an der relativen Differenz der Lebendzellzahlen zwischen den M6- und den korrespondierenden M8-Stämmen in Prozent. **B.** Induktion im zeitlichen Verlauf von 15-23 h der M7-Stämme während der Inkubation in YCB-BSA gemessen am Anteil MPA-sensitiver Kolonien in Prozent.

Nach diesem Vorversuch wurde für zukünftige Induktionsversuche eine Inkubationsdauer im Induktionsmedium zwischen 18 h und 19 h ausgewählt. Jedoch blieb auch die durchschnittliche Induktion der A-Stämme mit $92.9 \pm 1.4\%$ für YML93M6A bezüglich der Lebendzellzahl-Bestimmungen (aus sieben unabhängigen Experimenten) und $90.5 \pm 1.8\%$ für YML93M7A bezüglich des Anteils MPA-sensitiver Kolonien (aus vier unabhängigen Experimenten) hinter den Erwartungen zurück, was auf eine generell schlechtere Induzierbarkeit für die komplette YML93-Stammreihe schließen ließ. Die durchschnittliche Induktionsrate der Stämme YML93M6B und YML93M7B betrug lediglich $80.7 \pm 6.7\%$ bzw. $83.5 \pm 3.6\%$ (aus sechs bzw. vier Experimenten). Nichtsdestotrotz wurden Induktionen und nachfolgende Experimente mit beiden M6-Stämmen durchgeführt, allerdings sollte bei der Bewertung der Ergebnisse unbedingt beachtet werden, daß nur ca. 90 bzw. 80% der Zellen einen letalen Phänotyp durch den Verlust des *YML93*-Gens besaßen.

4.2.3.6 Wachstum der Mutanten YML93M6A und B

Die Unterschiede im Verhalten der A- und B-Stammserie spiegelten sich auch bei Betrachtung der Wachstumskurven in YPD nach der Induktion wider, die bei einer Inokulation von 1:1000 durchgeführt wurde (Abb. 30) Sowohl die Kurven der Stämme YML93M6A und B, als auch die der Stämme YML93M8A und B wichen voneinander ab. Dabei ist die leicht steilere Kurve von YML93M6B im Vergleich zu YML93M6A nicht verwunderlich, wenn man bedenkt, daß hier der Anteil nicht induzierter Zellen um das

Doppelte höher lag als beim A-Stamm. Die Diskrepanz zwischen YML93M8A und B läßt sich vermutlich, wie bereits erwähnt, auf ein ungewolltes Mutationsereignis zu einem frühen Zeitpunkt der Konstruktion zurückführen. Das verlangsamte Wachstum beider M8-Stämme im Vergleich zum Wildtyp gleicht dem Verhalten, wie es auch bei den YPR143M8-Stämmen beobachtet wurde (Abb. 28), und beruht ebenfalls entweder auf dem unterschiedlichen genetischen Hintergrund des Ausgangsstamms CAI4 gegenüber SC5314 oder auf einem Haploinsuffizienz-Effekt des *YML93*-Gens.

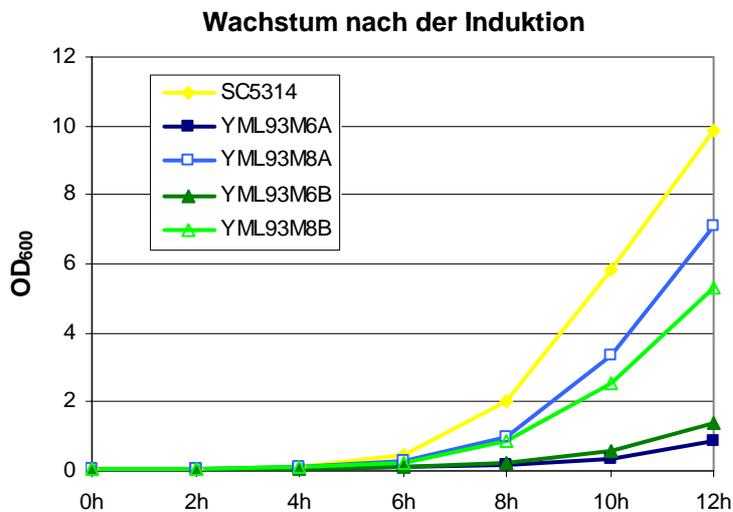


Abb. 30 Wachstum des Wildtyps SC5314 und der Mutanten YML93M6A und B sowie YML93M8A und B nach Induktion in YCB-BSA und nach Überimpfen in frisches YPD-Medium (1:1000) gemessen an der optischen Dichte der Kulturen.

4.2.4 Phänotypen und funktionelle Analysen

4.2.4.1 *YML127* ist ein Homolog des *ScRSC9*-Gens, das für eine Komponente des RSC-„chromatin-remodeling complex“ kodiert

Zu Beginn dieser Arbeit lagen weder bei *C. albicans* noch bei der besser untersuchten Bäckerhefe Hinweise über die Funktion von *YML127* vor. Im Jahr 2002 wurde allerdings eine Studie veröffentlicht, in der das homologe Gen in *S. cerevisiae* als Komponente des RSC „chromatin remodeling complex“ („remodels the structure of chromatin“) identifiziert und beschrieben werden konnte (Damelin *et al.*, 2002). Das mit *ScRSC9* bezeichnete Gen ist damit eines von insgesamt 15 Proteinen, die in der Bäckerhefe zu einem stabilen Komplex zusammengeschlossen sind und der Umpositionierung der Nukleosomen im Zellkern dienen, um das Transkriptionsgeschehen durch Anlagerung an bzw. Freisetzung von bestimmten DNA-Bereichen an die gegebenen Bedingungen anzupassen. Der RSC-Komplex ist an die ATP-Hydrolyse als Energiespender gebunden, und seine Funktionalität ist essentiell für das Überleben und den Fortschritt des Zellzyklus in der Hefe (Angus-Hill *et al.*, 2001). ScRsc9p besitzt eine DNA-Bindedomäne vom ARID-Typus („AT-rich interacting domain“), die in einer Reihe von Proteinen im Menschen, der Hefe und *Drosophila* präsent ist (Gregory *et al.*, 1996; Herrscher *et al.*, 1995), und weist eine hohe Konserviertheit zur putativen DNA-Erkennungshelix der ARID-Domäne des *Drosophila* „dead ringer“ Proteins auf (Damelin *et al.*, 2002; Iwahara and Clubb, 1999). In Analogie dazu ist bei Yml127p in *C. albicans* ebenfalls eine hohe Homologie zur ARID-Domäne des ScRSC9p zu erkennen (nicht gezeigt). Verschiedene DNA-Bindedomänen wurden in anderen RSC-Komponenten entdeckt wie AT-„hooks“ oder Zink-Cluster (Cairns *et al.*, 1998; Cairns *et al.*, 1999). Durch ein Zusammenspiel der verschiedenen Bindeeigenschaften wird somit eine gezielte transkriptionelle Regulation bewerkstelligt. ScRsc9p und damit der RSC-Komplex in der Bäckerhefe scheinen involviert zu sein in die Expressionskontrolle Streß-induzierter Gene, vorwiegend der TOR-regulierten Gene, einem für das Wachstum und den Zellzyklus zentralen Signalweg, aber auch von Proteinen der Ribosomen und der rRNA-Synthese (Damelin *et al.*, 2002).

Aufgrund der Aufdeckung der Funktion des ScYML127-Proteins als Untereinheit des RSC-Komplexes und seiner Bezeichnung als ScRsc9p, wird im folgenden das *C. albicans*-homologe Gen bzw. Protein *YML127* bzw. Yml127p gleichgestellt mit den Benennungen *RSC9* bzw. Rsc9p.

4.2.4.1.1 Induzierte M6-Stämme durchlaufen noch einige Zellzyklen bis zum Absterben der *rsc9*-defizienten Zellen

Aufgrund von Versuchen mit Lebend- und Totfärbungen der *rsc9*-defizienten Zellen der Stämme YML127M6A und B konnte man erahnen, daß die Zellen noch recht lange am Leben blieben, nachdem selbst nach 8 h Wachstum in frischem Medium nur ein sehr kleiner Teil mit dem Totfarbstoff anfärbbar war (nicht gezeigt). Daraufhin wurden die YPD-Agarplatten unter dem Mikroskop untersucht, auf denen die Kulturen nach der Induktion zur Bestimmung der Induktionsrate ausplattiert worden waren. Tatsächlich konnte man neben den sichtbaren großen Kolonien der nicht induzierten Zellen etliche größere und kleinere Mikrokolonien ausmachen, die mit dem bloßen Auge nicht zu erkennen waren. Plattierte man die induzierten Kulturen nach Wachstum in frischem YPD-Medium nach 2, 4 oder 6 h aus, so nahm die Anzahl der Zellen, aus denen die Mikrokolonien bestanden, immer mehr ab. Die Zellen schienen sich somit nach der Deletion des *RSC9*-Gens solange noch zu teilen und zu wachsen, bis das *RSC9*-Genprodukt durch Aufteilung auf die Tochterzelle und durch zelleigenen Proteinabbau vollständig aufgebraucht worden war. Je länger sie in YPD-Medium inkubiert wurden, desto weniger Zellzyklen konnten die Zellen anschließend durchlaufen und somit verkleinerten sich auch die Mikrokolonien. In Abb. 31 sind jeweils einige Beispiele von Mikrokolonien der beiden M6-Stämme abgebildet, nachdem sie direkt nach der Induktion in geeigneter Verdünnung auf mit YPD-Agar-beschichteten Objektträgern ausplattiert und für mindestens einen Tag bebrütet worden waren. Es zeigten sich Kolonien bestehend aus im Mittel etwa 20 Zellen, was etwa vier bis fünf Zellzyklen entspricht, die die Zellen noch durchlaufen konnten. Dies stimmt mit der Beobachtung überein, daß nach 8 h nur ein kleiner Anteil der Zellen mit dem Totfarbstoff reagierte und zu diesem Zeitpunkt ausgehend von einer längeren Verdopplungszeit als beim Wildtyp (siehe Kapitel 4.2.3.1 und 4.2.3.2) die vier bis fünf Zellzyklen noch nicht abgeschlossen waren. In den mikroskopischen Aufnahmen kann man außerdem deutliche Anzeichen von Defekten in der Zellmorphologie erkennen. Sehr häufig kamen stark elongierte Zellen vor, aber auch große und runde Zellformen (Abb. 31). In einigen Fällen war der Übergang von Mutter- zu Tochterzelle gar nicht durch eine sichtbare Abgrenzung getrennt (rote Pfeile), oder einige Zellen besaßen gleichzeitig mehrere Knospen (schwarze Pfeile). Eine normale, gleichmäßig ovale Form der Zellen war kaum zu beobachten. Bei der Frage, ob dieser morphologische Phänotyp erst als Folge des Zelltods auftrat, oder ob die Deformierungen aufgrund der *rsc9*-Deletion unter anderem den Zelltod verursachten, muß angemerkt werden, daß bereits nach 8 h in vielen Zellen anfängliche

Anomalien bezüglich der Zellmorphologie und der Knospung festzustellen waren (nicht gezeigt). Deshalb ist davon auszugehen, daß dieser Phänotyp eher auf den Mangel an *RSC9*-Genprodukt zurückzuführen war, während die Zellen noch am Leben waren, als auf einen sekundären Effekt nach dem Zelltod.

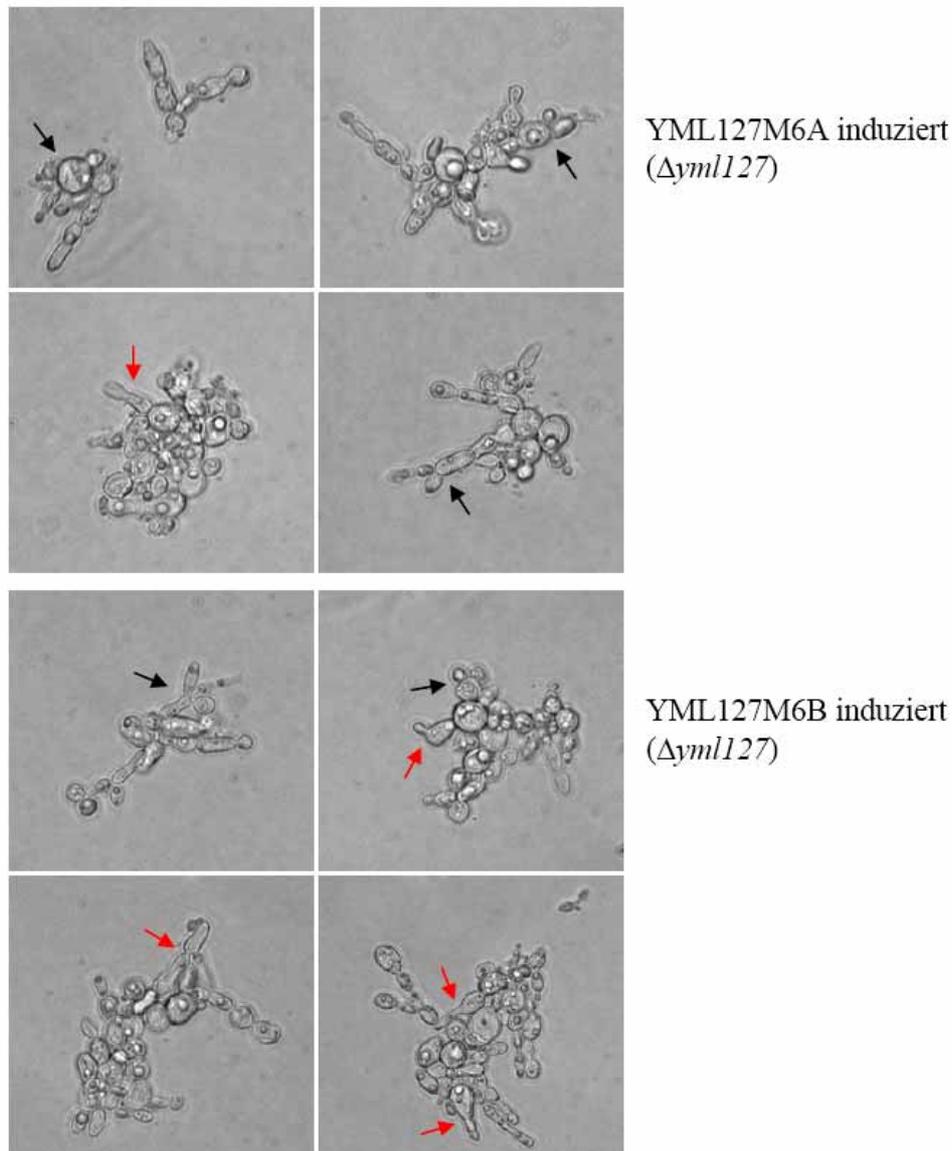


Abb. 31 Jeweils vier Beispiele von Mikrokolonien der induzierten Stämme YML127M6A und B nach dem Ausplattieren auf Objektträgern, die mit YPD-Agar beschichtet worden waren. Die Aufnahmen erfolgten nach mindestens 24 h Inkubation bei 30°C. Die schwarzen Pfeile deuten auf Zellen hin, die mehr als eine Knospe tragen. Auffallend ist die große Anzahl vergrößerter und elongierter Zellen; die roten Pfeile kennzeichnen Übergänge von Mutter- zu Tochterzelle, die über keine sichtbare Abgrenzung verfügen.

4.2.4.1.2 *Es treten Zellzyklus-Anomalien der rsc9-defizienten Zellen auf*

Um die Effekte der *RSC9*-Gendeletion auf den Zellzyklus genauer zu studieren, wurden Zellkernfärbungen mit dem Höchst-Farbstoff durchgeführt. Falls eine Entkopplung der Zytokinese von der Mitose stattfinden sollte, wären in den Tochterzellen keine Zellkerne zu erwarten. Umgekehrt wäre es möglich, daß die Mitose im Gegensatz zur Zellteilung nicht gestört ist, wodurch mehrere Zellkerne pro Zelle entstehen könnten. Bei längerer Inkubationsphase in YPD-Medium zeigte sich, daß die induzierten Zellen der M6-Stämme sowohl fehlende Nuklei (Abb. 32, weiße Pfeile) als auch bisweilen zwei getrennte DNA-Signale pro Zelle (Abb. 32, rote Pfeile) aufwiesen. Zu diesem Stadium nach 10 h Wachstum war die morphologische Ausprägung der verlängerten und vergrößerten Zellen bereits sichtbar, in welchen man auch die Defekte des Zellzyklus feststellen konnte. In einer Zelle des YML127M6A-Stammes sowie in zwei Zellen des YML127M6B-Stammes wurde eine nicht abgeschlossene Mitose offensichtlich, da in den „ausgewachsenen“ Zellen keine Nuklei enthalten waren (weiße Pfeile). In Knospen bzw. Zellen dieser Größe sollte die Mitose normalerweise schon abgeschlossen sein, und somit, wie ein Vergleich mit dem Kontrollstämmen YML128M8A und YML127M8B zeigt, ein vollständig getrennter Kern vorhanden sein. Allerdings ist auffällig, daß die Nuklei zum einen in den Tochterzellen, und zum anderen in einer Mutterzelle defizient waren, während hier die Tochterzelle einen Zellkern besaß. Dies kann nur dadurch erklärt werden, daß der vorhandene Zellkern von der Mutter- zur Tochterzelle weitergegeben wurde, ohne daß zuvor eine Mitose durchgeführt worden war. Im Fall des überzähligen Nukleus sowohl bei YML127M6A als auch bei YML127M6B (rote Pfeile), waren jeweils schon Knospen vorhanden, jedoch befanden sich beide Zellkerne eindeutig getrennt in der Mutterzelle und nicht, wie normalerweise in der späten Mitose, noch verbunden und lang gesteckt zwischen Mutter- und Tochterzelle. Aus diesen Befunden läßt sich schließen, daß der Zellzyklus korrelierend zum Defekt in der Zellmorphologie und der Knospung ebenso Anomalien aufweist, die man sowohl einem Arrest der Kernteilung als auch einem Verlust der zeitlichen und/oder örtlichen Koordination von Mitose und Zytokinese zuschreiben kann.

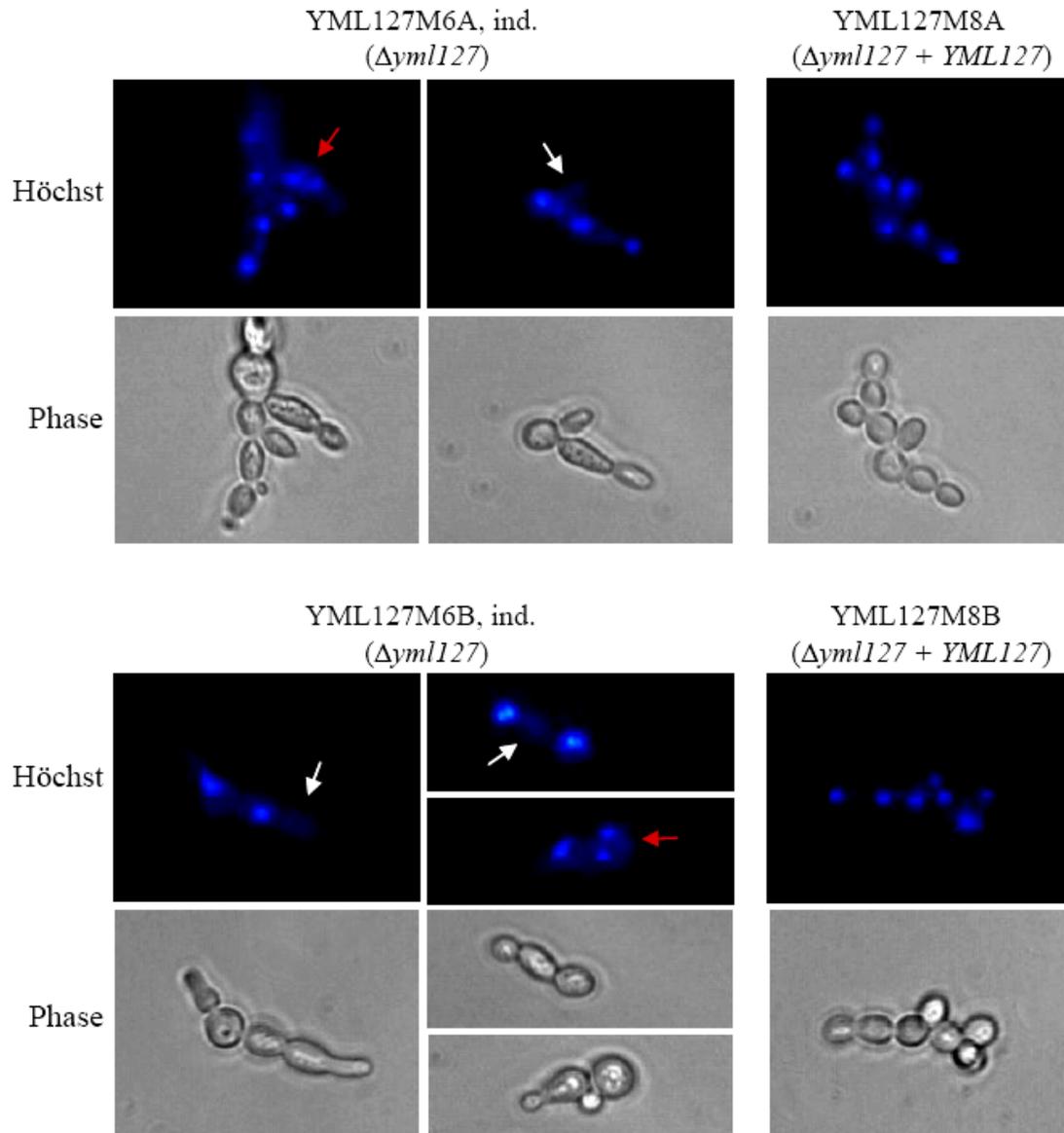


Abb. 32 Mikroskopische Aufnahmen von Zellkernfärbungen mit dem fluoreszierenden Höchst-Farbstoff der induzierten Mutanten YML127M6A und B sowie der Kontrollstämmen YML127M8A und B. Fehlende Nuklei sind durch weiße Pfeile angezeigt; rote Pfeile weisen auf inadäquate Kernteilungen hin. Die korrespondierenden Phasenkontrast-Fotos sind jeweils unterhalb abgebildet. Die Stämme wurden nach der Induktion in frisches YPD-Medium überimpft und für 10 h bei 30°C inkubiert.

4.2.4.1.3 *CaRsc9p* ist im Nukleus lokalisiert

Nachdem bereits zwei Arbeitsgruppen das *S. cerevisiae* Rsc9p anhand von GFP-Fusionsproteinen („green fluorescent protein“) im Zellkern lokalisieren konnten (Damelin *et al.*, 2002; Huh *et al.*, 2003), wurde dieser Versuch auch für das *C. albicans* Rsc9p unternommen. Allerdings stellte sich heraus, daß die C-terminale GFP-Fusion, obwohl das Fusionsprotein funktionell war, entweder aufgrund einer zu geringen Expression durch den *YML127*-Promotor oder aufgrund der Instabilität des Fusionsproteins kaum fluoreszierte und somit seine intrazelluläre Lokalisierung unmöglich machte (nicht gezeigt). Daraufhin wurden Konstrukte hergestellt, in denen das *RSC9*-Gen über zwei zusätzliche Aminosäuren (Gly-Ser) C-terminal mit drei hintereinander geschalteten Epitopen des Hämagglutinin des humanen Influenzavirus (HA-Epitop) fusioniert war. Eine Beeinträchtigung der Faltung, Stabilität sowie der Wechselwirkung mit anderen Proteinen und damit seiner Lokalisation war durch die wesentlich kürzere Sequenz (3x 27 bp bzw. 3x 9 Aminosäuren) unwahrscheinlicher als bei der GFP-Fusion. Die Sequenz des HA-Epitops wurde hierfür mittels der PCR zusammen mit dem *ACT1*-Terminator mit den Primern HAT6, der eine *Bam*HI-Schnittstelle, drei Kopien des HA-Epitops, ein Stop-Codon sowie *ACT1*-downstream-Sequenzen enthielt, und *URA16*, der *URA3*-Sequenzen enthielt, aus pYML127G2-DNA als Template amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde *Bam*HI-*Sal*I gespalten und anstelle des [*GFP-ACT1T*]-Fragments in das gleichermaßen gesplante pYML127G2 kloniert. Das Insert des entstandenen Plasmids pYML127HAT1 wurde durch *Kpn*I-*Sac*II-Restriktion herausgespalten und in den *yml127*-heterozygoten Stamm YML127M2A integriert, wobei das Fusionsgen in den einzigen intakten, für das Überleben notwendigen *YML127*-Lokus dirigiert wurde, und seine Expression der Kontrolle des originalen *YML127*-Promotors unterstellt war (Abb. 33A). Der Erhalt korrekter Transformanten bestätigte die Funktionalität dieses *YML127-3xHA*-Fusionsgens. Die beiden resultierenden isogenen Stämme wurden als YML127HAT1A und B bezeichnet, wobei HAT für „HA-tag“ steht. Sie weisen im Southernblot zwei verschiedene Größen des mutierten Allels auf, da der klonierte 3' *YML127*-Bereich die polymorphe *Eco*RV-Schnittstelle des Allels 2 enthielt, während im transformierten Stamm nur das intakte Allel 1 ohne die polymorphe Schnittstelle vorhanden war (Abb. 33B). Der Größenunterschied in den detektierten Banden deutet demnach darauf hin, daß das „Crossing Over“ bei der homologen Rekombination einmal vor und einmal nach der zusätzlichen *Eco*RV-site stattfand.

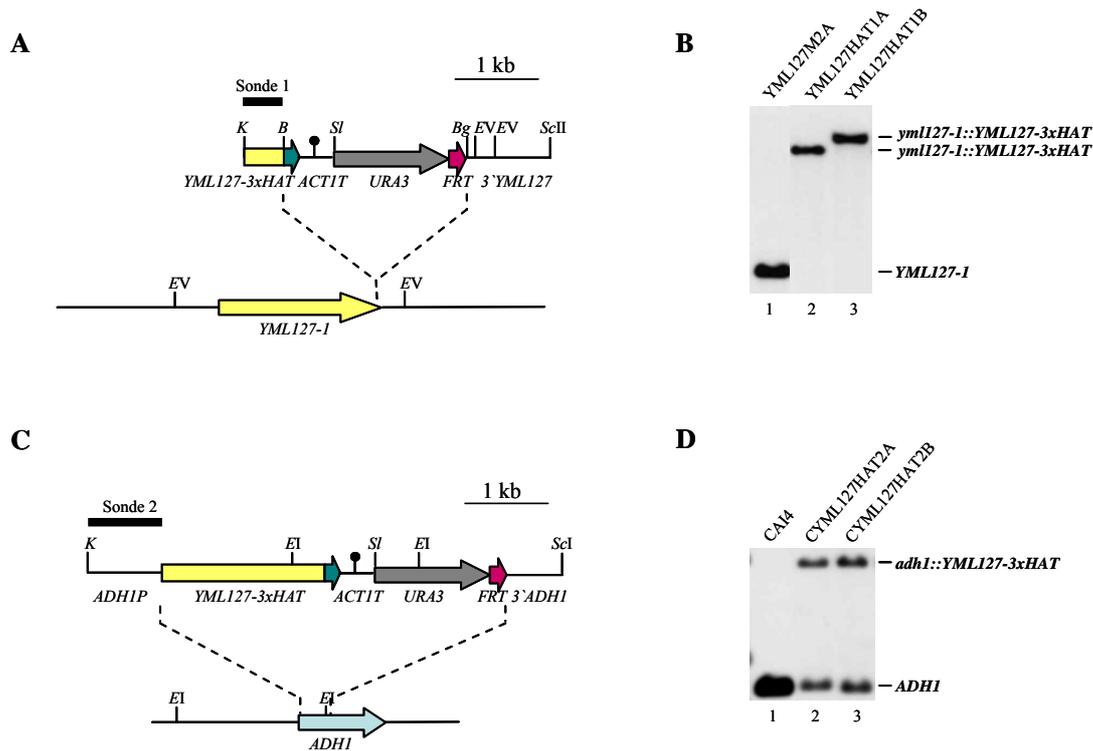


Abb. 33 Konstruktion der HA-getaggten YML127-Hefestämme. **A.** Integration des Inserts von pYML127HAT1 in den *YML127*-Lokus und **B.** die resultierenden, durch Southernblot-Analyse (*EcoRV*-gespaltene chromosomale DNA, Sonde 1) überprüften Stämme YML127HAT1A und B. **C.** Integration des Inserts von pYML127HAT2 in den *ADH1*-Lokus und **D.** die resultierenden, durch Southernblot-Analyse (*EcoRI*-gespaltene chromosomale DNA, Sonde 2) überprüften Stämme CYML127HAT2A und B. Die relevanten Schnittstellen sind wie folgt abgekürzt. *B*: *Bam*HI; *Bg*: *Bg*II; *EI*: *Eco*RI; *EV*: *Eco*RV; *K*: *Kpn*I; *ScI*: *Sac*I; *ScII*: *Sac*II; *SI*: *Sal*I. Mit Ausnahme der *FRT*-sites sind alle Größen maßstabsgetreu wiedergegeben.

Außerdem wurde der Vektor pYML127HAT2 hergestellt, indem das *KpnI-EcoRI*-[*ADH1P*-5'*YML127*]-Fragment aus pYML127G7 und das *EcoRI-SalI*-[3'*YML127-3xHAT-ACT1T*]-Fragment aus pYML127HAT1 in den *KpnI-SalI*-gespaltenen pYML127G7 kloniert wurde. Darin war das Fusionskonstrukt unter die Kontrolle des konstitutiv aktiven *ADH1*-Promotors gestellt (Abb. 33C). Das *KpnI-SacI*-linearisierte Plasmid wurde in den *ADH1*-Lokus des Uridin-auxotrophen Stammes CAI4 integriert, woraus die Stämme CYML127HAT2A und B hervorgingen, die neben den beiden wildtypischen Kopien des *RSC9*-Gens die konstitutiv exprimierte HA-getaggte Version enthielten (Abb. 33D).

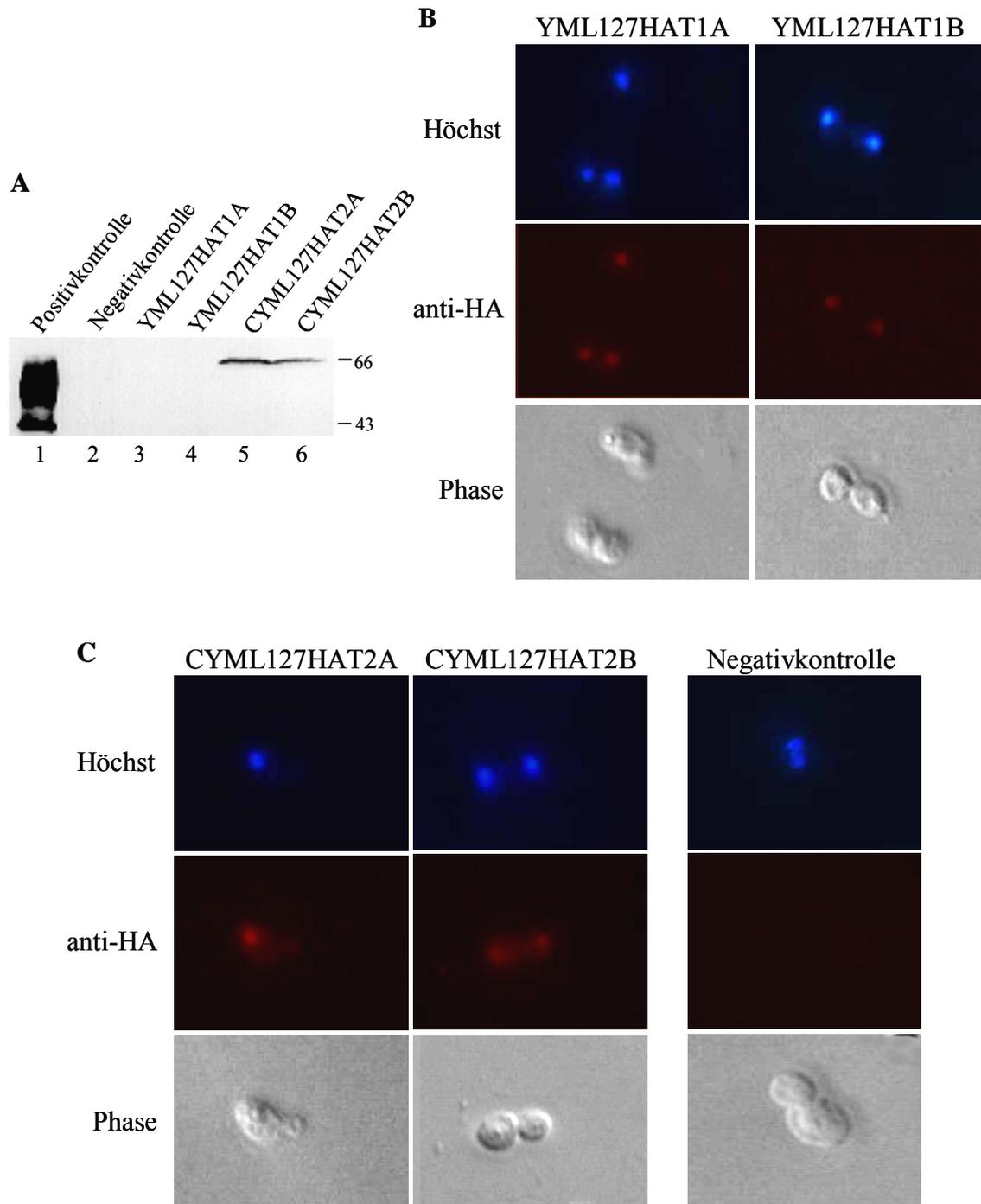


Abb. 34 **A.** Westernblot-Analyse zur Überprüfung des YML127-3xHA-Fusionsproteins. Die Spuren sind mit den Proteinextrakten der oben angegebenen Stämme bzw. der Positivkontrolle CAG55S2HAT22A (Kulturüberstand) und der Negativkontrolle SC5314 belegt. Rechts sind die Größen der SAP2-HA- (43 kDa) und der YML127-3xHA-Fusion (66 kDa) angegeben. **B./C.** Mikroskopische Aufnahmen der Stämme YML127HAT1A und B (**B**) und CYML127HAT2A und B (**C**), in denen das *YML127*-Genprodukt über indirekte Immunfluoreszenz seines HA-tags sichtbar gemacht wurde (jeweils mittlere Reihe). In YML127HAT1A und B wurde je ein wildtypisches *YML127*-Gen markiert, in CYML127HAT2A und B je ein zusätzliches *YML127*-Gen unter der Kontrolle des konstitutiv aktiven *ADHI*-Promotors. Die Lokalisation des Yml127p stimmt mit den fluoreszierenden Bereichen bei der Zellkernfärbung mit Höchst-Farbstoff überein (jeweils obere Reihe). Zur besseren Orientierung sind in den jeweils unteren Reihen die Zellen im Phasenkontrast gezeigt. **C.** zeigt außerdem eine Negativkontrolle, in welcher der Stamm CYML127HAT2A bei der indirekten Immunfluoreszenz nur mit dem zweiten fluoreszierenden Antikörper behandelt worden war (siehe Material und Methoden 3.7.1).

Zum Nachweis eines funktionellen Genprodukts wurde der gesamte Proteinextrakt aus den genannten Stämmen gewonnen und die Fusionsproteine mittels Westernblot-Analyse mit anti-HA-Antikörpern detektiert (Abb. 34A). Dabei konnte nur bei der konstitutiv aktiven Variante in den Stämmen CYML127HAT2A und B das gewünschte Produkt nachgewiesen werden (Spuren 5 und 6), wohingegen bei der Variante mit dem eigenen *YML127*-Promotor in den Stämmen YML127HAT1A und B kein Signal zu erkennen war (Spuren 3 und 4). Dieses Produkt lag wohl aufgrund der geringeren Expressionsstärke unterhalb der Nachweisgrenze, nachdem das Fusionsprotein als einzige Kopie des essentiellen Gens funktionell zu sein schien. Andernfalls wäre ein Überleben dieser Stämme nicht möglich gewesen. Unter Berücksichtigung dieses Sachverhalts wurden zunächst mit den Stämmen CYML127HAT2A und B Versuche zur intrazellulären Lokalisierung mittels indirekter Immunfluoreszenz durchgeführt. Das Ergebnis ist in Abb. 34C dargestellt. Die gleichzeitige Anfärbung der Zellkerne mit dem Höchst-Farbstoff zeigt die Kollokalisierung der rotfluoreszierenden Fusionsprodukte mit den Nuklei in verschiedenen Stadien der Zellteilung. Um einen Einfluß der *ADHI*-regulatorischen Sequenzen auf die Lokalisation des *YML127-3xHA*-Produktes auszuschließen, wurde auch mit den Stämmen YML127HAT1A und B trotz der geringeren Expressionstärke eine indirekte Immunfluoreszenz durchgeführt, zumal diese Methode im Gegensatz zum Westernblot, wo ein Peroxidase-gekoppelter Antikörper verwendet wurde, einen Signalverstärkungseffekt aufgrund der Verwendung zweier Antikörper beinhaltet. Als Resultat konnte auch hier die Lokalisierung des Rsc9p im Kern zu jedem Zeitpunkt des Zellzyklus nachgewiesen und bestätigt werden (Abb. 34B). Somit verhalten sich die homologen RSC9-Proteine von *S. cerevisiae* und *C. albicans* bezüglich der Kernlokalisierung identisch.

4.2.4.2 Ypr143p ist in die rRNA-Prozessierung involviert

Erste Ansätze zur funktionellen Aufklärung bezüglich des *YPR143*-Gens lieferte eine von Lum *et al.* vor kurzem veröffentlichte Studie über *S. cerevisiae*. Sie beschäftigte sich mit einer genomweiten Bank von heterozygoten Hefemutanten, die hinsichtlich ihrer Suszeptibilität gegenüber einer Reihe von therapeutischen Wirkstoffen getestet wurden (Lum *et al.*, 2004). Dabei verursachten die Substanzen in Mutanten bestimmter Gene eine Haploinsuffizienz-bedingte Wachstumshemmung, woraus sich Rückschlüsse auf die oft unbekannt oder nur teilweise bekannten Angriffspunkte der Therapeutika ziehen ließen. Dabei trat auch das *S. cerevisiae* *YPR143*-Homolog in Erscheinung, dessen heterozygote

Mutante eine signifikant erhöhte Sensitivität gegenüber 5-Fluorocytosin (5-Flucytosin) und ebenfalls gegenüber 5-Fluoruracil aufwies. Unter den Mutanten mit demselben Suszeptibilitätsmuster befanden sich auch solche, die heterozygot in bezug auf Gene waren, die für Komponenten eines spezifischen ribosomalen RNA- (rRNA-) Prozessierungsapparates kodieren, genannt Exosom, oder die an anderen rRNA-Prozessierungsereignissen und der Produktion der großen Ribosomen-Untereinheit beteiligt oder mit anderen nukleolaren Komponenten assoziiert sind. Daher und aufgrund zusätzlicher Nachforschungen postulierten die Autoren die Zugehörigkeit von ScYpr143p in diese funktionelle Gruppe. Neben den grundlegenden Beobachtungen zum zellmorphologischen Phänotyp sowie zur Betrachtung des Zellzyklus, was im nachfolgenden Kapitel vorgestellt werden soll, war es interessant zu analysieren, inwieweit die Hypothese der rRNA-prozessierenden Funktion auch auf das *YPR143*-Homolog in *C. albicans* zutreffen könnte.

4.2.4.2.1 Die ypr143-defizienten Zellen zeigen Defekte in der Zellmorphologie sowie einen gestörten Zellzyklus

Nach der Induktion veränderte sich die Zellmorphologie der *ypr143*-defizienten Zellen zusehends hin zu vergrößerten, runden und später auch zu unförmigen, mit der Tochterzelle verschmolzenen Zellformen. In Abb. 35 sind einige Beispiele von den Erscheinungsbildern der induzierten M6-Stämme nach 8 h (A) sowie nach 24 h (B) Inkubation in YPD-Medium im Vergleich zu ihren Kontrollstämmen YPR143M8A und B gezeigt. Dabei wird deutlich, daß die M6-Stämme nach 8 h sehr viel größere Zellen besaßen als die M8-Stämme. Zellteilungen fanden noch statt, allerdings wuchsen die Knospen ebenfalls zu ungewöhnlich großen Zellen heran. Die Bildung von Zellverbänden, d. h. aneinandergereihte Ketten von Zellen, schien noch nicht wesentlich gestört oder abgebrochen zu sein. In Übereinstimmung dazu ergaben Lebend-Tot-Färbungen unter den gleichen Bedingungen, daß sich zu diesem Zeitpunkt nur verhältnismäßig wenige Zellen mit dem Totfarbstoff anfärben ließen (nicht gezeigt). Nach 24-stündiger Inkubation ergab sich ein heterogenes Bild im Fall der M6-Stämme: neben den großen runden oder unförmigen Zellen konnten ebenso einige Zellen normaler Größe und Zellmorphologie (Abb. 35B) entdeckt werden. Letztere stellten sicherlich die seit Beginn des Überimpfens in YPD-Medium wachsende Population der nicht-induzierten Zellen dar, die ausgehend von den zunächst vernachlässigbaren 0.5 bis 6% des gesamten Zellpools (siehe Kapitel 4.2.3.3) nun immer mehr die induzierten letalen Mutanten überwucherten. Die Knospenbildung war offensichtlich erheblich gestört, da Mutter- und Tochterzelle oftmals

keine sichtbare Abgrenzung besaßen. Außerdem kamen solche „mißgebildete“ Zellen meist nur einzeln oder mit ein oder zwei Tochterzellen vor, so daß sich daraus schließen läßt, daß sie sich bedingt durch diese sichtbaren Defekte nicht weiter teilen konnten.

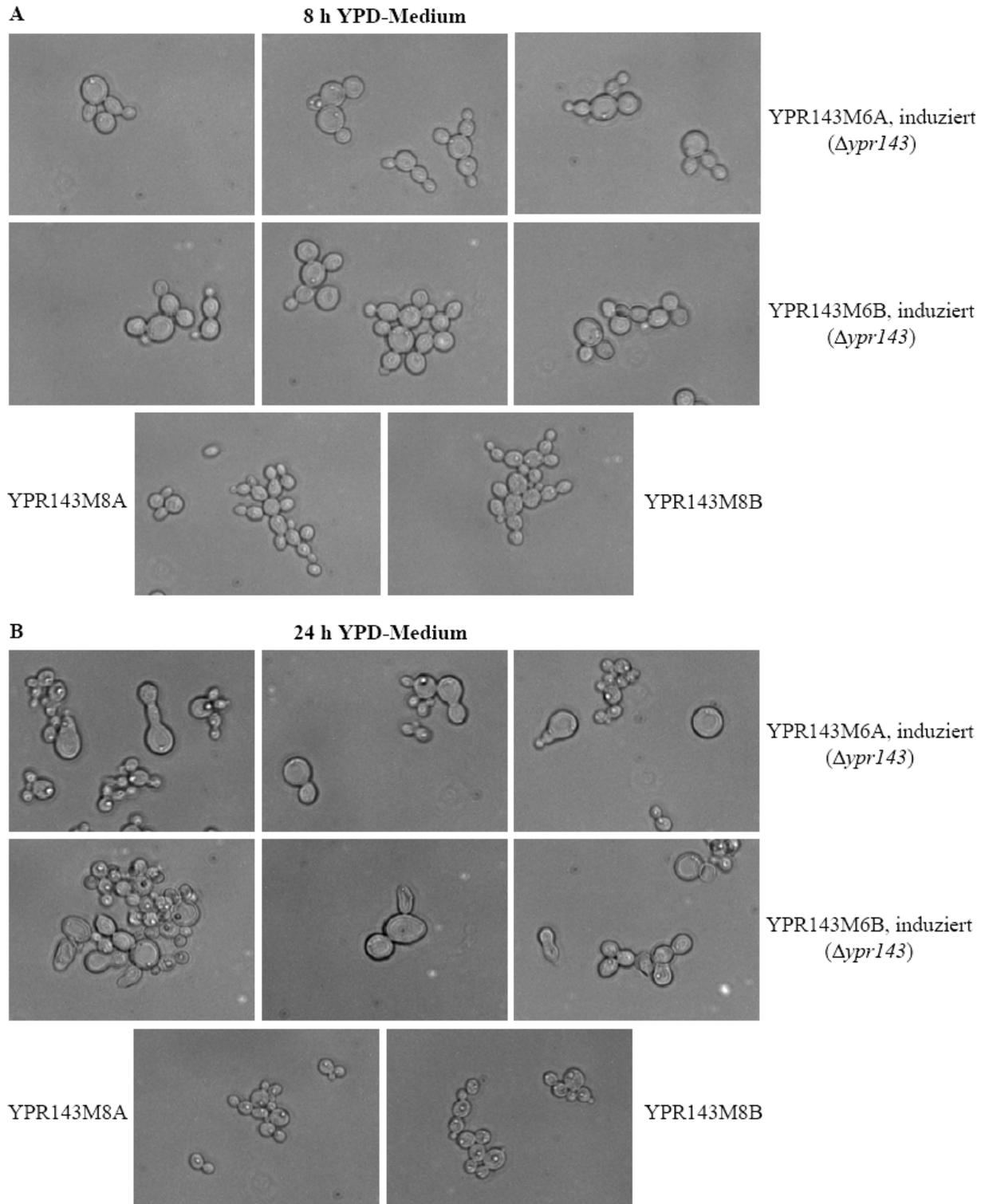


Abb. 35 Abnorme Zellmorphologie induzierter *ypr143*-defizienter Zellen der Stämme YPR143M6A und B verglichen mit den Kontrollstämmen YPR143M8A und B nach 8 h (A) sowie nach 24 h (B) Inkubation in YPD-Medium.

Nachdem sich nach der zellmorphologischen Betrachtung bereits Defekte in der Zytokinese der letalen Mutanten abzeichneten, wurde als nächstes der sichtbare Ablauf der Mitose anhand von Zellkernfärbungen mit dem fluoreszierenden Höchst-Farbstoff überprüft. Tatsächlich zeigte sich, wie in Abb. 36 dargestellt, daß in vergrößerten oder unförmigen Zellen in einigen Fällen entweder keine detektierbare DNA vorhanden war (weiße Pfeile), oder aber sich innerhalb einer Zelle zwei räumlich getrennte DNA-Anhäufungen nachweisen ließen (roter Pfeil bei YPR143M6A), oder sich ein Nukleus neben dem Nukleus in der Mutterzelle nicht komplett in der Tochterzelle befand, sondern zwischen Mutter- und Tochterzelle in Mitose-ähnlicher langgezogener Form arretiert zu sein schien (roter Pfeil bei YPR143M6B). Diese Beobachtungen weisen darauf hin, daß der Zellzyklus durch die *ypr143*-Deletion in einem späten phänotypischen Stadium, erkennbar an den Anomalitäten in der Morphologie, empfindlich gestört und möglicherweise die Mitose arretiert war, da fehlende Nuklei als häufigste Störung dokumentiert werden konnten. In den übrigen Zellen der induzierten M6-Stämme schien der Zellzyklus nicht beeinträchtigt zu sein. Hier war pro Zelle nur ein Nukleus sichtbar, oder, wenn sich die Zelle gerade in der Mitose-Phase befand, ein langgezogener Nukleus, der, bedingt durch das Auseinanderziehen der Chromosomen durch den Spindelapparat, von der Mutter- zur Tochterzelle hindurchgespannt war. Diese Situation entsprach der in den Zellen der Kontrollstämme YPR143M8A und B. Das normale Verhalten bei den Zellen der M6-Stämme läßt sich zum einen so erklären, daß es sich um nicht-induzierte Zellen handelte. Zum anderen ist es möglich, daß die Induktion hier später erfolgt war, und so das *YPR143*-Genprodukt noch nicht erschöpft war und sich so die Effekte der Gendeletion noch nicht bemerkbar machten.

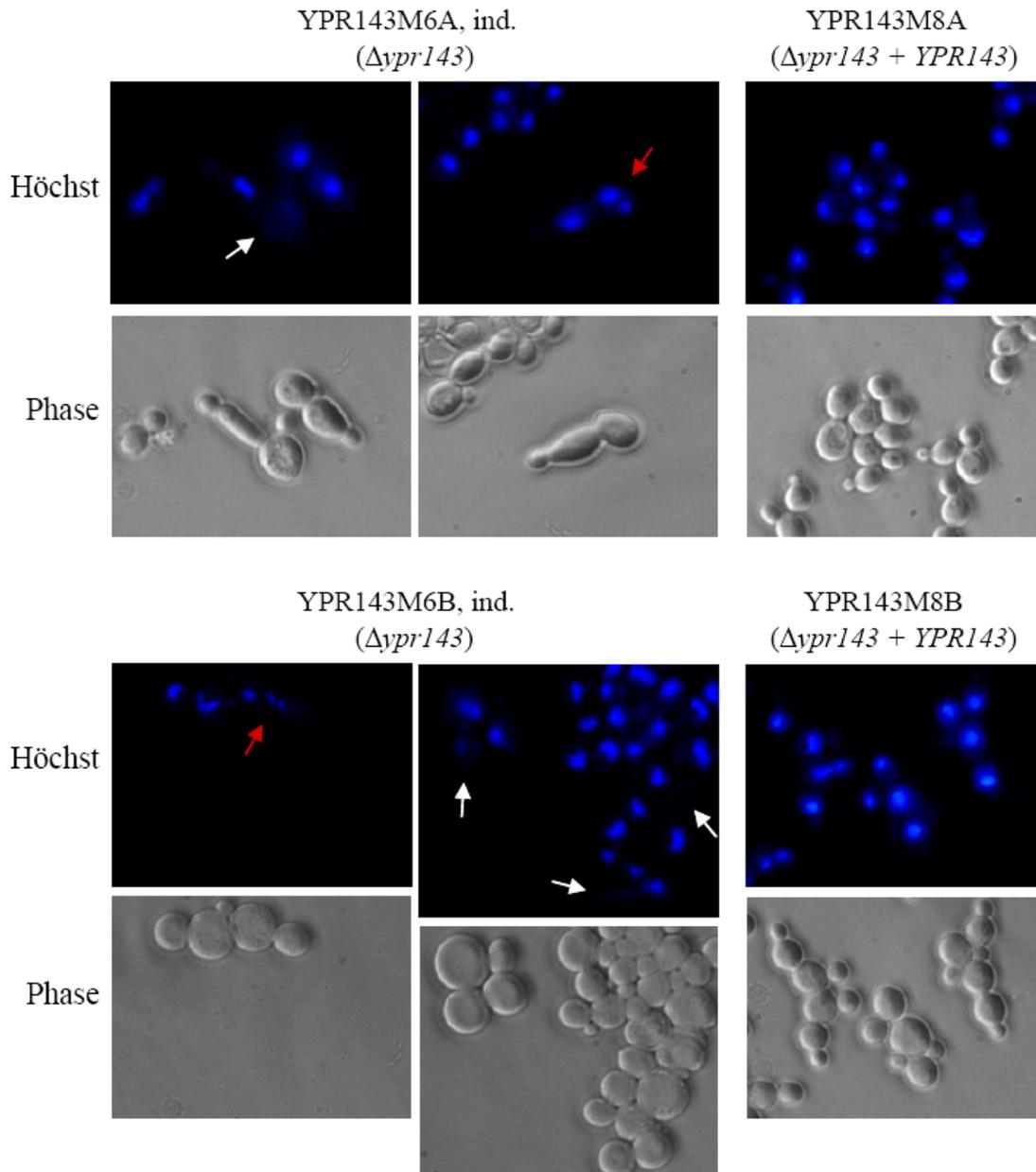


Abb. 36 Mikroskopische Aufnahmen von Zellkernfärbungen mit dem fluoreszierenden Höchst-Farbstoff der induzierten Stämme YPR143M6A und B sowie der Kontrollstämme YPR143M8A und B. Fehlende Nuklei sind durch weiße Pfeile angezeigt; rote Pfeile weisen auf inadäquate Kernteilungen hin. Die korrespondierenden Phasenkontrast-Fotos sind jeweils unterhalb abgebildet. Die Stämme wurden nach der Induktion in frisches YPD-Medium überimpft und für 8 h bei 30°C inkubiert.

4.2.4.2.2 In den *ypr143*-defizienten Zellen kommt es zu einer Akkumulierung von Vorstufen der ribosomalen RNA

Wie bereits angedeutet, sollte nun analysiert werden, ob auch das *C. albicans* Ypr143p eine Funktion in der Prozessierung der ribosomalen RNA (rRNA) ausübt, wie es für das *S. cerevisiae*-Homolog postuliert wurde. Zu diesem Zweck wurden Northernblot-Hybridisierungen mit radioaktiv markierten Sonden durchgeführt, die spezifisch mit verschiedenen Intermediaten der rRNA-Prozessierung reagierten. Ein schematischer, vereinfachter Ablauf der posttranskriptionellen Geschehnisse bei der rRNA-Synthese in der Bäckerhefe ist in modifizierter Form nach Venema und Tollervey in Abb. 37A wiedergegeben (Venema and Tollervey, 1999). Das durch die RNA-Polymerase I erhaltene 35S-Primärtranskript des rRNA-Operons wird durch eine Reihe von endo- und exonukleolytischen Spaltungen in die drei der vier reifen rRNAs prozessiert. Zunächst erfolgen am 5'- und 3'*ETS* („external transcribed spacer“) Verkürzungen zum 32S-Intermediat, das dann in der *ITS1*-Region („internal transcribed spacer“) zu einem 20S bzw. 27S-Produkt gespalten wird. In getrennten Wegen werden diese Zwischenstufen zum einen zur reifen 18S rRNA und zum anderen über die 7S und 25.5S rRNAs, die durch Spaltung in der *ITS2*-Region erhalten werden, zu den reifen 5.8S und 25S pre-rRNAs prozessiert. Die einzelnen Schritte gehen normalerweise so schnell vor sich, daß sich die Zwischenstufen kaum nachweisen lassen. Weil die genauen Ereignisse in *C. albicans* noch nicht erforscht sind, muß hier auf das Modell der Bäckerhefe zurückgegriffen werden. Allerdings wird angesichts der hohen Konserviertheit in vielen eukaryontischen Organismen eine weitgehende Übereinstimmung des Ablaufs in beiden Hefen angenommen.

In den Northernblot-Analysen wurden nun Oligosonden eingesetzt, die zum einen mit der *ITS1*-Region und zum anderen in der *ITS2*-Region von *C. albicans* hybridisierten (Abb. 37A, rot gekennzeichnet). Die RNA wurde dafür aus den induzierten Stämmen isoliert, nachdem sie für 8 h in frischem YPD-Medium inkubiert worden waren, damit sich die möglichen molekularen Defekte in den *ypr143*-defizienten Stämmen ausprägen konnten. Als Resultat der Hybridisierungen konnte man in der Tat eine Akkumulierung bestimmter rRNA-Vorstufen in den Stämmen YPR143M6A und B feststellen (Abb. 37B). Generell schienen schon die ersten Vorstufen 35S und 32S, die von beiden Sonden detektiert wurden, von einer Verzögerung der Prozessierung betroffen zu sein. Darüber hinaus fiel vor allem bei der Hybridisierung mit der *ITS2*-Sonde eine Anhäufung der 27S-Produkte auf. Die *ITS1*-Sonde schien ebenfalls mit einem 27S-Intermediat zu hybridisieren. Hierbei muß erwähnt werden, daß es zumindest bei

der Bäckerhefe verschiedene Spaltstellen innerhalb von *ITS1* gibt und zunächst das Intermediat 27SA₃ gebildet wird, das über einen größeren *ITS1*-Anteil verfügt (Abb. 37A). Daraufhin entsteht 27SA₂ mit einem kürzeren 3'*ITS1*-Bereich. Während also mit der *ITS1*-Sonde wahrscheinlich nur das größere der 27SA-Produkte detektiert werden konnte, hybridisierte die *ITS2*-Sonde mit allen Varianten des 27S-Typus, also auch mit den Varianten des 27SB-Intermediates, so daß hier eine stärkere Bande zu erkennen war. Als nächstes tauchten in dem *ITS2*-hybridisierten Blot Signale auf, die auf Höhe der reifen 25S und 18S rRNAs lokalisiert waren. Sie sind mit der Markierung „*“ versehen, da sie unspezifische Signale darstellen, die wahrscheinlich auf das „Einfangen“ von (degradierten) RNA-Produkten durch die reife rRNA („trapping“) zurückzuführen sind. Eine rRNA, die größer als das 20S-Produkt war, hybridisierte verstärkt mit der *ITS1*-Sonde. Ein solches Produkt kann durch eine verfrühte Spaltung in der *ITS1*-Region entstehen, bevor die Prozessierung der 5'ETS abgeschlossen ist, und wird bei der Bäckerhefe sehr schnell exonukleolytisch abgebaut. Ein akkumuliertes 20S-Zwischenprodukt, das dem normalen Prozessierungsgeschehen entspräche, ließ sich in Übereinstimmung dazu nicht nachweisen. Außerdem bleibt noch anzumerken, daß mit der *ITS2*-Sonde ein verstärktes Signal auf Höhe der 7S-Vorstufe bei den *ypr143*-defizienten M6-Stämmen nachgewiesen werden konnte. Seltsamerweise tauchte dieses Signal auch beim Wildtyp SC5314 auf, was nicht erklärbar ist und als mögliches Artefakt angesehen werden muß. Interessanterweise konnte man weder beim Gehalt an reifer 18S noch an reifer 25S rRNA eine Verringerung im Vergleich zu den Kontrollstämmen feststellen, wie man an der Methylenblau-Färbung der RNA auf der Membran erkennen kann (Abb. 37B, oben).

Zusammenfassend läßt sich nach diesen Beobachtungen vermuten, daß die Abwesenheit des *YPR143*-Genproduktes den korrekten Ablauf der rRNA-Prozessierung in der *ITS1*-Region und möglicherweise auch der 5'ETS beeinträchtigt, da sich zum einen die 27S-Produkte und zum anderen eine aberrante Vorstufe der 18S rRNA anhäufte, wobei für deren Entstehung in beiden Fällen Spaltprozesse in 5'ETS sowie *ITS1* vorausgehen müßten. Zudem kann die Akkumulierung der 7S rRNA in den M6-Stämmen verglichen mit den M8-Kontrollstämmen ebenfalls als Hinweis auf eine Inhibierung des letzten Schrittes der 3'-Prozessierung der 5.8S rRNA gewertet werden.

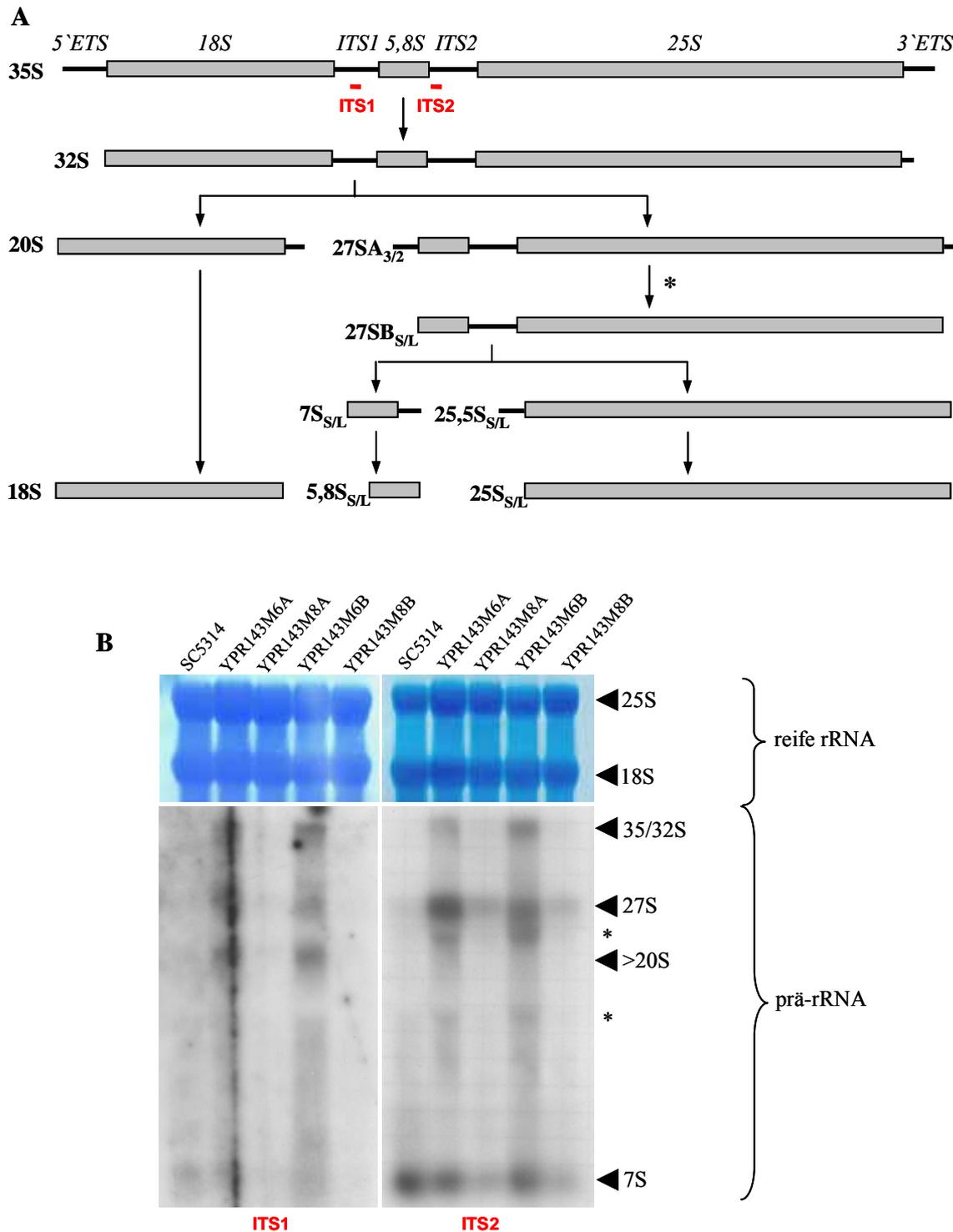


Abb. 37 In den *ypr143*-defizienten Stämmen kommt es zu einer Anhäufung von bestimmten rRNA-Vorstufen. **A.** Schematischer, vereinfachter Ablauf der posttranskriptionellen Prozessierung der ribosomalen RNA mit ihren wichtigsten Intermediaten in *S. cerevisiae*. Die grauen Balken symbolisieren die rRNA-Gene des rRNA-Operons. In rot ist die Lage der verwendeten Oligosonden ITS1 und ITS2 für die Northern-Analyse gekennzeichnet. Das Sternchen weist darauf hin, daß hier zwei alternative Wege eingeschlagen werden können, deren Produkte sich aber nur unwesentlich in ihren Sedimentationskonstanten (S) unterscheiden. *ETS*: „external transcribed spacer“; *ITS*: „internal transcribed spacer“ **B.** Methyleneblau-Färbungen (oben) und Northern-Hybridisierungen (unten) isolierter RNA aus den angezeigten Stämmen mit den radioaktiv markierten Sonden ITS1 und ITS2. Die rechts angegebenen rRNA-Intermediate sind nach 8 h Inkubation in YPD in den *ypr143*-defizienten M6-Stämmen akkumuliert im Gegensatz zum Wildtyp und den M8-Kontrollstämmen. Die Sterne markieren unspezifische Hybridisierungen. Die Methyleneblau-Färbung der reifen rRNA zeigt, daß in allen Spuren gleiche Mengen an RNA eingesetzt wurden.

4.2.4.2.3 *Hypersensitivität der heterozygoten YPR143-Mutanten gegenüber Inhibitoren der Ribosomen- und Proteinbiosynthese*

Angelehnt an die Studie mit heterozygoten *S. cerevisiae*-Mutanten (Lum *et al.*, 2004) sollten zur Bestätigung der Befunde aus den ITS-Hybridisierungen Tests hinsichtlich der Suszeptibilität der *YPR143*-heterozygoten Stämme gegenüber dem Antimykotikum 5-Flucytosin und dem Translationshemmer Cycloheximid vorgenommen werden. Dafür wurde der sogenannte MHK- (Minimaler Hemmstoffkonzentrations-) Test ausgewählt, weil hierbei eine große Konzentrationsspanne der zu testenden Substanzen abgedeckt werden konnte. 5-Flucytosin wurde als signifikant Haploinsuffizienz-induzierendes Agens bei der *YPR143*-heterozygoten *S. cerevisiae*-Mutante genannt. Das Medikament wurde zu Beginn seiner Nutzung als Antimetabolit von Cytosin nur mit einer Inhibierung von DNA-Synthese und RNA-Metabolismus vorwiegend in Pilzen in Verbindung gebracht, da Pilze im Gegensatz zu menschlichen Zellen das Enzym Cytosin-Desaminase besitzen, welches die Reaktion von 5-Flucytosin in 5-Fluoruracil katalysiert, was wiederum die Thymidylat-Synthetase kompetitiv blockiert, oder das fälschlicherweise in RNA eingebaut wird. Immer mehr Hinweise ergeben sich allerdings darauf, daß die Wirkung von 5-Fluoruracil und damit auch von 5-Flucytosin auf der Inhibierung des Ribosomenbiosynthese beruht (Longley *et al.*, 2003). Nach ihren Ergebnissen vermuten Lum *et al.*, daß das Exosom, das der rRNA-Prozessierungsmaschinerie zugehörig ist, als wichtigstes Angriffsziel dieser Substanzen in Hefezellen fungiert. Cycloheximid hingegen verursachte in der *S. cerevisiae*-Studie bezüglich *YPR143* keine signifikante Haploinsuffizienz-Erscheinung. Dennoch wurde es hinzugezogen, weil es als Translationshemmer eine zusätzliche Störung auf einer Ebene darstellt, die unmittelbar nach der rRNA-Prozessierung und Ribosomenbiosynthese stattfindet. Somit kann eine erhöhte Suszeptibilität indirekt einen Defekt im Ribosomenaufbau reflektieren. Als Kontrollsubstanz für die Spezifität des Haploinsuffizienz-Effekts diente Cerulenin, ein Inhibitor der Fettsäure- und Sterolbiosynthese bei Pilzen. Wenn sich die heterozygoten Stämme gegenüber Cerulenin genauso sensitiv verhalten wie die Kontrollstämme mit zwei intakten *YPR143*-Kopien, aber nicht gegen die Hemmstoffe der Ribosomen- und der Proteinbiosynthese, so würde dies auf eine spezifische Wirkung gegen die heterozygoten Stämme hinweisen.

Bei den MHK-Tests wurden jeweils zwei Stammserien verwendet. Die erste Uridin-prototrophe Serie bestand aus dem Kontrollstamm S2U11 und den *ypr143*-heterozygoten Stämmen YPR143M8A und B, wobei das einzig noch vorhandene *YPR143*-Gen hier in einem ektopischen Lokus exprimiert wird. S2U11 ist den M8-Stämmen insofern isogen, als er sich

lediglich durch die Anwesenheit beider wildtypischer *YPR143*-Kopien und die Abwesenheit der ektopischen Kopie unterscheidet. Die zweite Uridin-auxotrophe Stammserie umfaßte CAI4 sowie die heterozygoten Stämme YPR143M2A und B, wobei der Laborstamm CAI4 beide wildtypischen *YPR143*-Kopien besitzt und die M2-Derivate nur noch eine intakte wildtypische Kopie. Die Ergebnisse der MHK-Tests sind in Tab. 5 dokumentiert. Darin ist erkennbar, daß für beide getesteten Substanzen 5-Flucytosin und Cycloheximid eine Haploinsuffizienz-bedingte erhöhte Sensitivität sowohl bei den M8- als auch bei den M2-Stämmen vorlag. Dagegen war die minimale Hemmkonzentration der Stämme der jeweiligen Stammserie für Cerulenin gleich, was für die Spezifität des haploinsuffizienten Phänotyps der *ypr143*-heterozygoten Mutanten spricht. Daß die ermittelte Suszeptibilitätsschwelle im Fall des 5-Flucytosins für die Uridin-prototrophen und –auxotrophen Stämme derart voneinander abwich, hing mit der für das Wachstum nötigen Zugabe von Uridin ins Medium der auxotrophen Hefen zusammen. Dieses Uridin wurde von den Zellen natürlich bevorzugt verwendet und schwächte den Effekt des 5-Flucytosins bzw. des daraus gebildeten 5-Fluoruracils ab, wodurch sich die gemessenen MHKs entsprechend erhöhten. Dennoch lassen sich für 5-Flucytosin die Befunde für das *ScYPR143*-Homolog bestätigen. Im Fall der Behandlung mit Cycloheximid verhielten sich die *YPR143*-heterozygoten Stämme gleich sensitiv und jeweils um das vier- bzw. zweifache sensitiver als die korrespondierenden Kontrollstämme. Insgesamt können diese Resultate als zusätzliche Hinweise auf eine Beteiligung des Ypr143p an Prozessen der rRNA-Synthese oder der Ribosomen-Produktion gewertet werden.

Tab. 5 Minimale Hemmkonzentrationen der *ypr143*-heterozygoten prototrophen YPR143M8A und B- bzw. der *ypr143*-heterozygoten auxotrophen YPR143M2A und B-Stämme und der jeweiligen Kontrollstämme S2UI1 bzw. CAI4 gegenüber Cerulenin (Kontrolle), 5-Flucytosin und Cycloheximid

	Cerulenin [$\mu\text{g/ml}$] (Kontrolle)	5-Flucytosin [$\mu\text{g/ml}$]	Cycloheximid [$\mu\text{g/ml}$]
S2UI1A (<i>URA3</i> ⁺)	0.4	0.2	312.5
YPR143M8A (<i>URA3</i> ⁺)	0.4	0.05	78
YPR143M8B (<i>URA3</i> ⁺)	0.4	0.05	78
CAI4 (<i>ura3</i> ⁻)	0.8	>12.8*	156
YPR143M2A (<i>ura3</i> ⁻)	0.8	1.6	78
YPR143M2B (<i>ura3</i> ⁻)	0.8	1.6	78

* in diesem Fall konnte die minimale Hemmkonzentration nicht ermittelt werden, da maximal 12.8 $\mu\text{g/ml}$ 5-Flucytosin getestet wurden

4.2.4.3 Yml93p ist ein Homolog von ScUtp14p, einer Komponente des U3 Ribonukleoprotein-Komplexes

Wie schon bei den anderen essentiellen Genen konnte zu Beginn dieser Arbeit noch keine Aussage über die Funktion des *YML93*-Gens in *C. albicans* getroffen werden. Mitte des Jahres 2002 jedoch veröffentlichten Dragon *et al.* eine Charakterisierung des U3 Ribonukleoprotein-Komplexes (U3 snoRNP) von *S. cerevisiae*, in der sie dessen Zusammensetzung und Größe identifizierten sowie neue Erkenntnisse über dessen Funktion präsentierten (Dragon *et al.*, 2002). Die Autoren benennen diesen Komplex als „Prozessom der kleinen Untereinheit“ („small subunit (SSU) processome“), weil er nötig ist für die nukleolare Prozessierung der prä-18S ribosomalen RNA, die Bestandteil der kleinen Untereinheit des Ribosoms ist. Mittels affinitätschromatographischer Aufreinigung auf Proteinebene mit einem U3-spezifischen Protein konnten insgesamt 28 assoziierte Proteine isoliert und über Massenspektrometrie identifiziert werden. Neben 11 bereits bekannten Proteinen wurden 17 neue Proteine entdeckt, die als Utp1p bis Utp17p („U three protein“) bezeichnet wurden. Eines davon, das Utp14p, stellt das Homolog zu *C. albicans* Yml93p dar und besitzt „coiled-coils“-Domänen für Protein-Protein-Interaktionen sowie eine ATP/GTP-Bindestelle (P-loop) für eine mögliche katalytische Aktivität. Ein Großteil dieser Komponenten, auch ScUtp14p, ist essentiell für das Wachstum des Pilzes und läßt auf die wichtige Bedeutung des mit einer 80S Sedimentationskonstante sehr großen U3 Prozessoms schließen. Neben einer nachgewiesenen Rolle bei der 18S prä-rRNA-Prozessierung wird auch eine putative Funktion in der prä-rRNA-Faltung diskutiert. Im folgenden wird zunächst der zellmorphologische und zytologische Phänotyp der letalen *C. albicans yml93/utp14*-Mutante vorgestellt. Anschließend wurde untersucht, ob das Genprodukt auch in dieser Hefe eine Rolle für die rRNA-Prozessierung spielen könnte.

4.2.4.3.1 Die YML93-Gendeletion beeinträchtigt sowohl die Zellmorphologie als auch den Zellzyklus

Aufgrund der möglichen Funktion des *YML93*-Gens in der Biosynthese der kleinen Ribosomen-Untereinheit waren weitreichende Auswirkungen in den homozygot mutierten Stämmen vor der letalen Ausprägung zu erwarten. Bei der Betrachtung der Morphologie der induzierten Zellen konnten ähnlich wie beim Phänotyp der *ypr143*-Mutanten beginnend nach etwa 6 h Wachstum in frischem YPD-Medium vereinzelt sphärische Zellen im Gegensatz zu der ovalen Zellform der Kontrollstämmen festgestellt werden (nicht gezeigt).

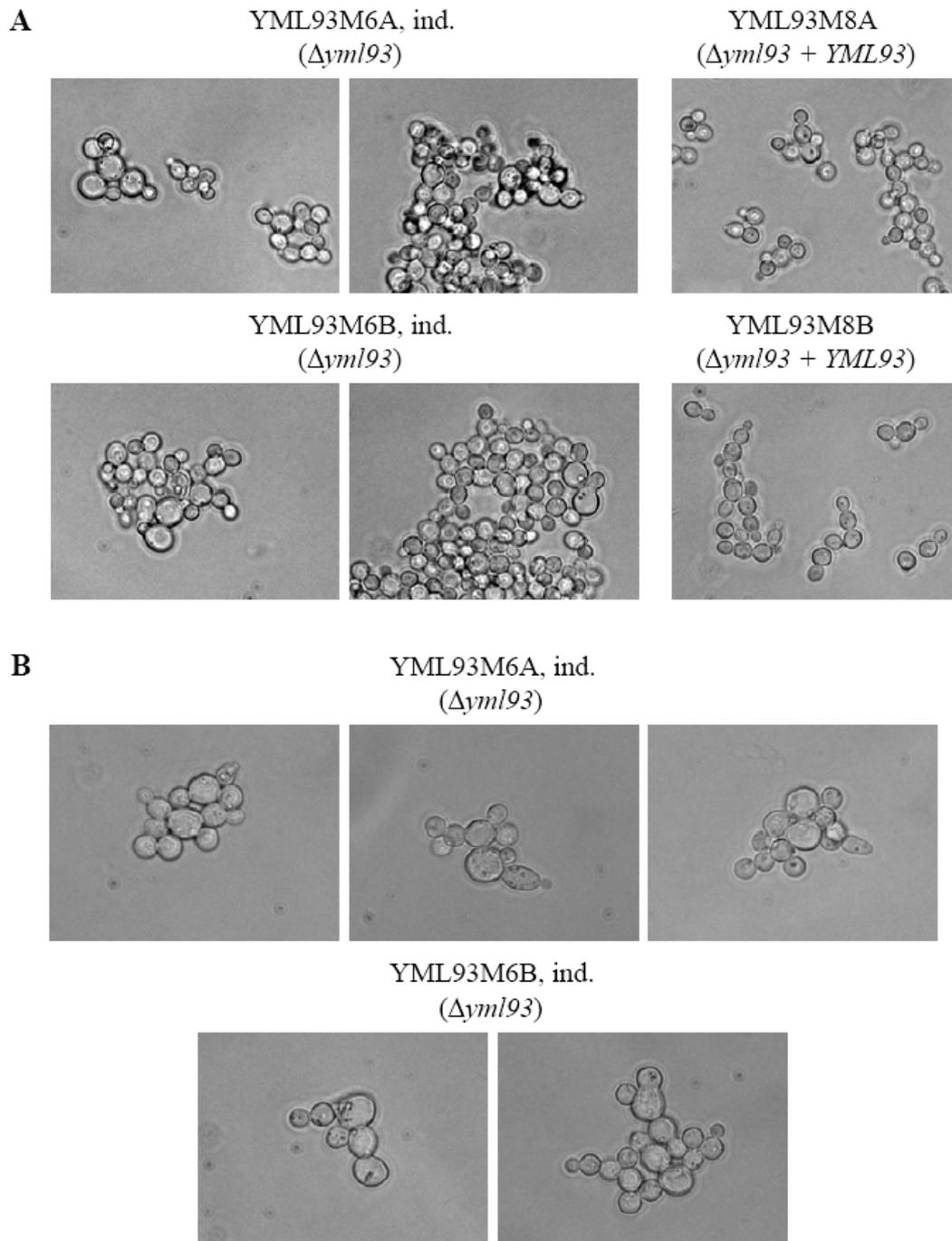


Abb. 38 Morphologie der induzierten *yml93*-defizienten Zellen der Stämme YML93M6A und B sowie der Kontrollstämme YML93M8A und B. **A.** nach 10 h Inkubation in frischem YPD-Medium bei 30°C. **B.** Mikrokolonien nach Ausplattieren auf Objektträger, die mit YPD-Agar beschichtet worden waren, und Wachstum für mindestens 24 h bei 30°C.

Nach 10 h zeigte sich ein heterogenes, mit etlichen vergrößerten und rundlichen Zellen durchzogenes Bild der induzierten Kulturen (Abb. 38A). Zudem waren die Zellen verschiedener Größe in der Flüssigkultur mehr als bei den Kontrollstämmen YML93M8A und B aneinander adhärirt. Der terminale Phänotyp war wie schon nach 10 h vorwiegend geprägt von ungewöhnlich großer rundlicher Zellmorphologie, wie die Aufnahmen von

Mikrokolonien in Abb. 38B zeigen, die nach dem Ausplattieren der induzierten M6-Kulturen auf YPD-Agar entstanden sind. Bisweilen hatten diese Zellen auch eine elongierte oder birnenförmige Form, diese Erscheinung bildete jedoch eher die Ausnahme. Die Existenz von Mikrokolonien setzte außerdem voraus, daß sich die Zellen nach der Induktion noch wenige Male teilen konnten, bevor sie an den Folgen des Mangels an *YML93*-Genprodukt abstarben. Jedoch wurden, nach Anzahl der Zellen pro Mikrokolonie zu urteilen, weniger Zellteilungen (ca. zwei bis drei) durchlaufen als bei den bereits behandelten *yml127*-defizienten Zellen (siehe Abb. 31 und Kapitel 4.2.4.1.1). Zusammengefaßt erinnert die rundliche Zellmorphologie der letalen *yml93*-Mutanten nach anfänglicher Inkubation sehr an die der *ypr143*-defizienten Mutanten, allerdings war der terminale Phänotyp von $\Delta yml93$ weniger auffällig, da sich dieser Phänotyp auch nach längerer Inkubation nicht veränderte und keine gänzlich deformierten Zellen zeigte, wie es bei $\Delta ypr143$ oder auch $\Delta yml127$ der Fall war.

Obwohl keine schwerwiegenden Defekte bei der Knospung der *yml93*-defizienten Zellen auftraten, ließ eine vergrößerte Zellmorphologie nicht nur eine fehlerhafte Regulation des Größenwachstums, sondern möglicherweise einen fehlerhaften Zellzyklus vermuten, da eventuell Wachstum, Zytokinese und Mitose nicht mehr adäquat koordiniert werden konnten. Die Effekte auf die Mitose sollten nun im folgenden anhand von Zellkern-Färbungen mit dem Höchst-Farbstoff untersucht werden. In Abb. 39 sind Fluoreszenz-Aufnahmen von induzierten Zellen der Stämme YML93M6A und B sowie der Kontrollstämmen YML93M8A und B dargestellt, die für 8 h in Vollmedium inkubiert worden waren. Die dazugehörigen Phasenkontrastbilder zeigen im Fall der $\Delta yml93$ -Mutanten neben normalgroßen auch vergrößerte Zellen, die bei einem Blick auf die Fluoreszenzaufnahmen entweder fehlende Nuklei (weiße Pfeile) oder zwei Kerne in einer Zelle aufwiesen, wobei offensichtlich der neu synthetisierte Kern bei der Mitose nicht in die vorhandene Knospe transportiert werden konnte (rote Pfeile). Diese Phänomene ähneln ebenfalls den Befunden für die induzierten YPR143M6-Stämme, so daß man funktionelle Analogien der jeweiligen Genprodukte in bezug auf die Beteiligung an rRNA-Prozessierungsvorgängen wie schon bei den Homologen in *S. cerevisiae* annehmen kann. In einem Großteil der Zellen der induzierten *YML93*-Kulturen waren jedoch wie bei den Kontrollstämmen keine Defekte bezüglich des Zellzyklus zu erkennen. Entweder handelte es sich dabei um nicht induzierte Zellen, was vor allem bei dem YML93M6B-Stamm angesichts seiner mit etwa 80% sehr niedrigen Induktionsrate naheliegender erscheint, oder diese Zellen wurden zu einem späteren Zeitpunkt induziert und würden einen aberranten Zellzyklus erst später ausprägen.

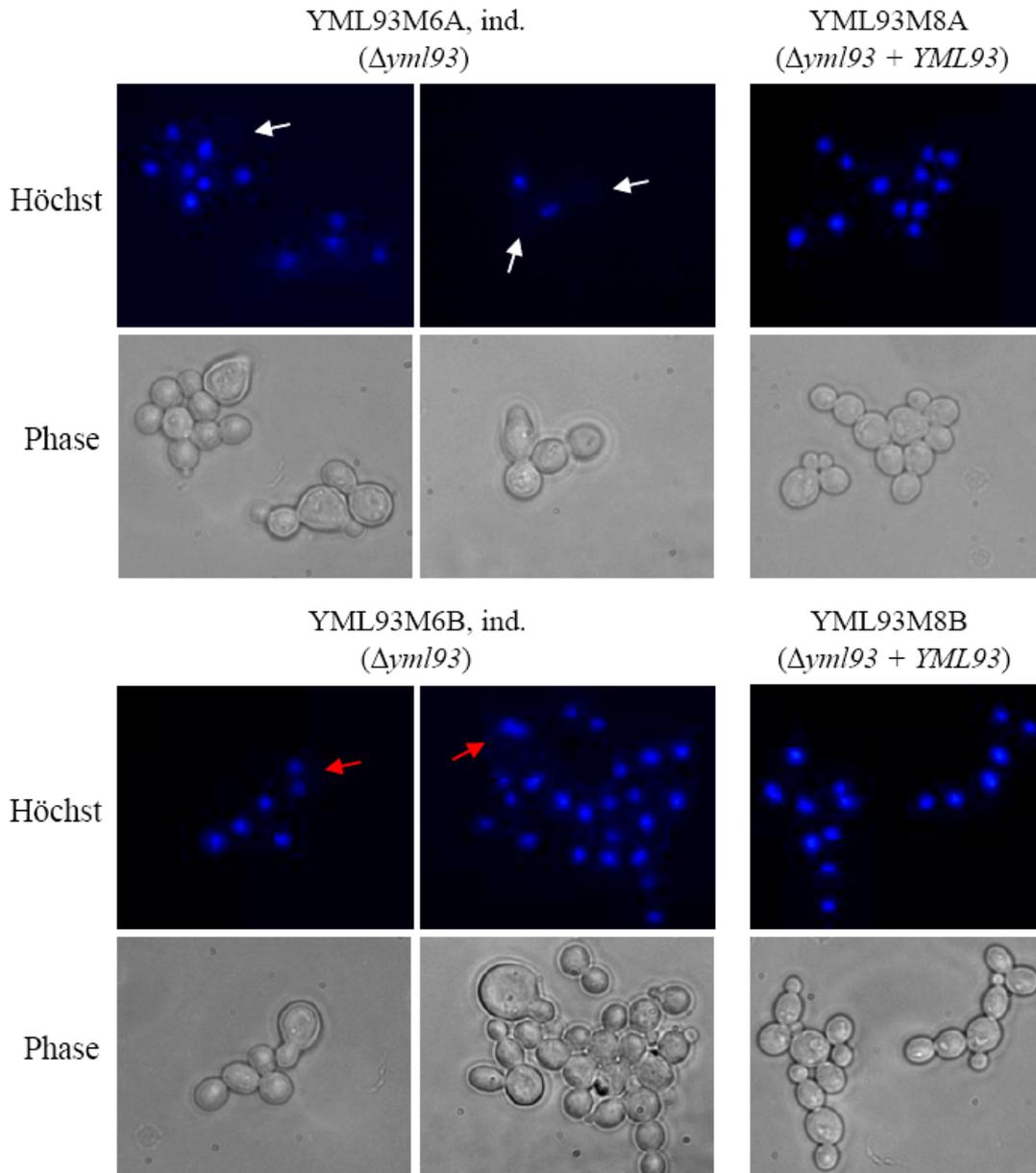


Abb. 39 Mikroskopische Aufnahmen von Zellkern-Färbungen mit dem fluoreszierenden Höchst-Farbstoff der induzierten Stämme YML93M6A und B sowie der Kontrollstämmen YML93M8A und B. Fehlende Nuklei sind durch weiße Pfeile angezeigt; rote Pfeile weisen auf inadäquate Kernteilungen hin. Die korrespondierenden Phasenkontrast-Fotos sind jeweils unterhalb abgebildet. Die Stämme wurden nach der Induktion in frisches YPD-Medium überimpft und für 8 h bei 30°C inkubiert.

4.2.4.3.2 In den *yml93*-defizienten Zellen kommt es zu einer Akkumulierung von ribosomalen RNA-Vorstufen

Wie schon bei den YPR143-Stämmen wurden auch bei den induzierten YML93-Stämmen Northernblot-Analysen durchgeführt, um die Anhäufung von ribosomalen RNA-Vorstufen zu untersuchen. Die RNA wurde nach 8 h Inkubation in frischem Medium gewonnen und im Northernblot mit *ITS1*- und *ITS2*-spezifischen Sonden des rRNA-Operons hybridisiert. Bei der Interpretation der erhaltenen Resultate, die in Abb. 40 dargestellt sind, ist ein Blick auf das allgemeine Schema der Vorgänge bei der rRNA-Prozessierung unter Abb. 37A hilfreich. Zunächst einmal konnte man feststellen, daß sich auch hier mehrere Intermediate von prä-rRNAs anhäuferten. Bei einem Vergleich mit der RNA-Hybridisierung der YPR143-Stämme fällt auf, daß sich die Akkumulierungsmuster der jeweiligen letalen Mutanten weitestgehend gleichen (vgl. Abb. 37B und Kapitel 4.2.4.2.2). Generell konnte man deshalb ebenfalls auf eine Funktion des *CaYML93*-Genprodukts bei der Prozessierung der rRNA schließen. Dennoch gab es aber auch feine Unterschiede im Verhältnis der akkumulierten Intermediate zueinander bzw. was das Verhalten der heterozygoten M8-Stämme betraf. Dies deutete wiederum auf Unterschiede bezüglich der spezifischen Funktionen innerhalb dieser Prozesse der beiden Genprodukte Ypr143p und Yml93p hin. Im einzelnen konnte man zunächst erkennen, daß bei den heterozygoten YML93M8-Stämmen ein, verglichen mit den letalen YML93M6-Stämmen, abgeschwächtes aber identisches Hybridisierungsmuster auftrat, was als intermediärer Phänotyp bezeichnet werden kann. Dies wurde wahrscheinlich durch die halbe Gendosis an *YML93* verursacht, demzufolge war in den Zellen wohl nicht genügend Genprodukt vorhanden, um eine rasche rRNA-Prozessierung zu gewährleisten, so daß auch hier mehr Intermediate anfielen als beim Wildtyp SC5314. Außerdem war die 27S-Bande bei der Hybridisierung mit *ITS1* stärker vertreten als die >20S-Bande, und auch bei der *ITS2*-Hybridisierung bildete sie das stärkste Signal. Die mit den beiden Sonden detektierten Vertreter des 27S-Intermediates waren wohl am stärksten von einer Akkumulierung infolge des *YML93*-Gendefizits betroffen. Neben dem >20S-Intermediat, das aufgrund von inadäquater Spaltung innerhalb *ITS1* und fehlender 5'ETS-Prozessierung zustande kommen kann, detektierte die *ITS1*-Sonde auch ein Produkt, das auf Höhe der 7S-rRNA-Vorstufe zu sein scheint und sich in den *yml93*-defizienten M6-Stämmen anhäufte. Möglicherweise blieb auch ein Teil der *ITS1*-Region stromaufwärts von der 5.8S-rRNA auf fehlerhafte Weise erhalten, was die Entstehung eines Produktes solcher Größe erlauben könnte. Andererseits könnte aber auch eine Kreuzhybridisierung mit der 7S prä-rRNA vorliegen. Der Blot mit der

ITS2-Hybridisierung zeigt neben der besonders starken Anhäufung der 27S-Produkte auch eine Akkumulierung der frühen 35S- und 32S-Intermediate sowohl bei den M6- als auch bei den M8-Stämmen. Zudem ist hier auch die 7S-Vorstufe vertreten, allerdings bei allen untersuchten Stämmen in etwa vergleichbarer Stärke, so daß dem keine besondere Bedeutung zugesprochen wird. Die mit „*“ markierten Banden sind, wie schon unter Kapitel 4.2.4.2.2 erwähnt, auf Höhe der reifen 25S und 18S rRNA gelegen und deren Hybridisierung mit der ITS2-Sonde ist vermutlich durch einen „trapping“-Effekt zu erklären.

Aus diesen Ergebnissen läßt sich ableiten, daß sich ein Defekt aufgrund des fehlenden *YML93*-Gens im Fall der M6-Stämme bzw. aufgrund der halben *YML93*-Gendosis im Fall der M8-Stämme in einem der frühen Schritte der rRNA-Prozessierung ausprägte, da verstärkt frühe Produkte wie 35/32S sowie vor allem 27S angehäuft wurden. Die Akkumulierung von >20S- und 7S-rRNAs könnten eine Folgeerscheinung davon sein.

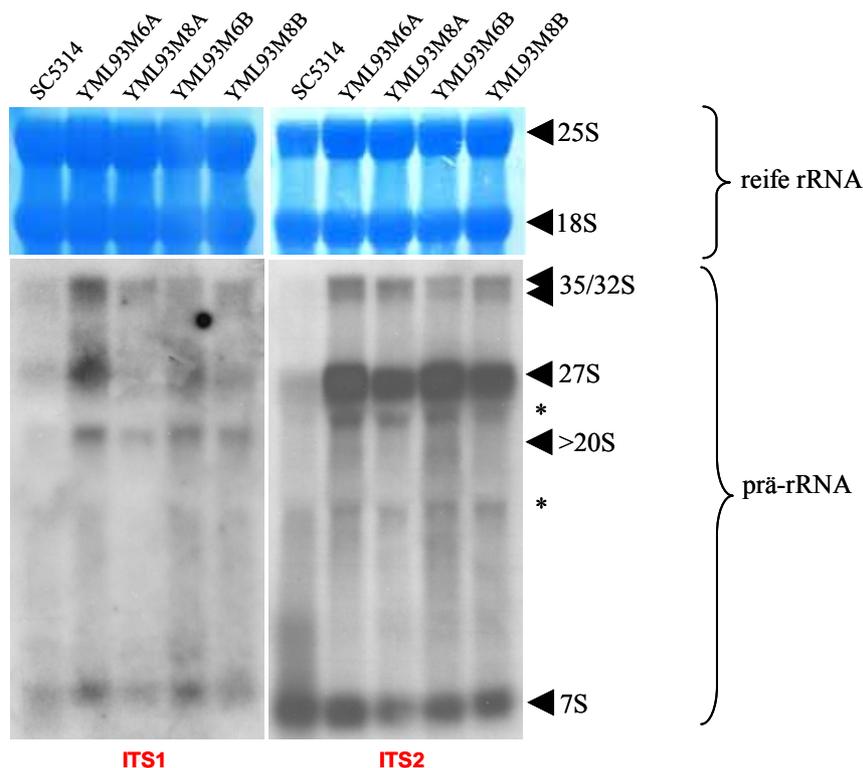


Abb. 40 In den *yml93*-defizienten M6-Stämmen, aber auch in den *YML93*-heterozygoten M8-Stämmen kommt es zu einer Anhäufung von rRNA-Vorstufen. Methyleneblau-Färbungen (oben) und Northern-Hybridisierungen (unten) isolierter RNA aus den angezeigten Stämmen mit den radioaktiv markierten Sonden ITS1 und ITS2. Die rechts angegebenen rRNA-Intermediate sind nach 8 h Inkubation in YPD in den *yml93*-defizienten M6-Stämmen und zum Teil auch in den M8-Stämmen, die eine ektopische *YML93*-Kopie besitzen, akkumuliert im Gegensatz zum Wildtyp. Sterne markieren unspezifische Hybridisierungen. Die Methyleneblau-Färbung der reifen rRNA zeigt, daß in allen Spuren gleiche Mengen an RNA eingesetzt wurden.

Das *YML93*-Homolog in *S. cerevisiae* ist Teil des U3 Ribonukleoproteins, das an der 18S rRNA-Prozessierung beteiligt ist. Daher trat dort in Zellen, in denen dieses Gen ausgeschaltet worden war, ein durch Northernblot detektierbarer Mangel an reifer 18S rRNA auf (Dragon *et al.*, 2002). In den Methylenblau-Färbungen der Membranen, auf denen die RNA der induzierten YML93M6-Stämme für die Hybridisierungen fixiert worden war, konnte dieser Befund nicht bestätigt werden (Abb. 40, oben). Die 18S-Bandenstärken waren in allen untersuchten Stämmen vergleichbar mit denen ihrer zugehörigen 25S-Banden.

4.2.4.3.3 *Hypersensitivität der heterozygoten YML93-Mutanten gegenüber Inhibitoren der Ribosomen- und Proteinbiosynthese*

Um die Beteiligung des *YML93*-Genprodukts in der rRNA-Prozessierung und der Ribosomenbiosynthese zu untermauern, wurde in Analogie zu den Versuchen mit den heterozygoten *YPR143*-Stämmen die Suszeptibilität der heterozygoten *YML93*-Stämme gegenüber 5-Flucytosin sowie Cycloheximid mit Hilfe des MHK-Tests untersucht. Gründe für die Auswahl dieser beiden Testsubstanzen sind schon im Kapitel 4.2.4.2.3 erläutert. Cerulenin wurde wiederum als Kontrollsubstanz für die Spezifität des Haploinsuffizienz-Effekts eingesetzt. Die Teststämme waren zum einen die Uridin-prototrophen *yml93*-heterozygoten Stämme YML93M8A und B mit ihrem prototrophen Kontrollstamm S2UI1 und zum anderen die Uridin-auxotrophen *yml93*-heterozygoten Stämme YML93M2A und B mit ihrem auxotrophen Kontrollstamm CAI4. Betrachtet man die Ergebnisse der MHK-Tests in Tab. 6, so zeigten beide heterozygoten M8- bzw. M2-Stammpaare eine erhöhte Suszeptibilität sowohl gegenüber 5-Flucytosin als auch gegenüber Cycloheximid, während alle prototrophen bzw. auxotrophen Stämme jeweils bei der gleichen Konzentration an Cerulenin sensitiv reagierten. Im Fall des 5-Flucytosins zeigten sich die auxotrophen Stämme, wie schon bei den YPR143M2-Stämmen, weniger anfällig als die *YML93*-Mutanten im S2UI1-Hintergrund, da sie durch das von außen zugesetzte Uridin begünstigt wurden. Im Test mit dem Translationshemmer Cycloheximid erwies sich der prototrophe Kontrollstamm S2UI1 resistenter als der auxotrophe Kontrollstamm CAI4, ihre entsprechenden *YML93*-heterozygoten Stämme verhielten sich jeweils um das zwei- bis vierfache sensitiver. Hierbei fiel aber auf, daß eine Diskrepanz in der Suszeptibilität zwischen YML93M8A und B vorhanden war, was erneut auf einen leichten Stammunterschied vermutlich durch ein ungewolltes Mutationsereignis hindeutet (siehe Kapitel 4.2.3.5). Die M2-Stämme dagegen waren gegenüber Cycloheximid gleich sensitiv.

Daß 5-Flucytosin als Inhibitor der rRNA-Prozessierung (Lum *et al.*, 2004) und Cycloheximid als Inhibitor der Proteinbiosynthese Haploinsuffizienz-Effekte bezüglich des *YML93*-Gens hervorriefen, liefert weitere Anhaltspunkte für eine funktionelle Einordnung des *YML93*-Gens in den Bereich der rRNA-Biosynthese und damit des Ribosomenaufbaus.

Tab. 6 Minimale Hemmkonzentrationen der *ym193*-heterozygoten prototrophen YML93M8A und B- bzw. der *ym193*-heterozygoten auxotrophen YML93M2A und B-Stämme und der jeweiligen Kontrollstämme S2UI1 bzw. CAI4 gegenüber Cerulenin (Kontrolle), 5-Flucytosin und Cycloheximid

	Cerulenin [$\mu\text{g/ml}$] (Kontrolle)	5-Flucytosin [$\mu\text{g/ml}$]	Cycloheximid [$\mu\text{g/ml}$]
S2UI1A (<i>URA3</i> ⁺)	0.4	0.2	312.5
YML93M8A (<i>URA3</i> ⁺)	0.4	0.1	156
YML93M8B (<i>URA3</i> ⁺)	0.4	0.1	78
CAI4 (<i>ura3</i> ⁻)	0.8	>12.8*	156
YML93M2A (<i>ura3</i> ⁻)	0.8	1.6	40
YML93M2B (<i>ura3</i> ⁻)	0.8	1.6	40

* in diesem Fall konnte die minimale Hemmkonzentration nicht ermittelt werden, da maximal 12.8 $\mu\text{g/ml}$ 5-Flucytosin getestet wurden

5 Diskussion

Die Bedeutung von Mykosen nimmt wegen einer wachsenden Zahl immunsupprimierter Patienten immer mehr zu. *Candida albicans* ist dabei eine der häufigsten Ursachen solcher Infektionen. Oft ist eine wiederholte Therapie oder eine Langzeit-Medikation mit Antimykotika notwendig, um die Pilze in Schach zu halten. Des Weiteren sind wirksame Antimykotika wie Amphotericin B mit schwerwiegenden Nebenwirkungen verbunden, so daß oft nur wenige besserverträgliche Medikamente zum Einsatz kommen. Am häufigsten findet das Fungistatikum Fluconazol allein oder in Kombination mit anderen Präparaten Verwendung. Allerdings führt die Fluconazol-Behandlung häufig zu Antimykotikum-resistenten *Candida*-Stämmen und deren Anzahl steigt stetig an. Weil dies die Therapiemöglichkeiten zunehmend erschwert, ist es wichtig, nach immer neuen Angriffspunkten in der Hefe für die Entwicklung neuartiger Wirkstoffe zu suchen. Im Hinblick darauf wurden in dieser Arbeit Gene in *C. albicans* untersucht, in denen man lediglich aufgrund von Homologievergleichen Funktionen vermuten konnte, die entweder erforderlich für die Adaptation an streßvolle Bedingungen im Wirt sein könnten, oder eine für das Überleben des Keimes essentielle Rolle einnehmen würden. Da Gattungs- und auch Spezies-spezifische Unterschiede in den Funktionen von homologen Genen auftreten können, ist eine Analyse eines Gens gezielt in dem Organismus von Interesse absolut unerlässlich. Einen Beitrag dazu sollte die hier vorgestellte Charakterisierung und funktionelle Eingrenzung der Gene *CMP1*, *RSC9/YML127*, *YPR143* und *UTP14/YML93* im opportunistisch humanpathogenen Pilz *C. albicans* leisten.

5.1 Charakterisierung des Calcineurins in *Candida albicans*

Calcineurin ist in allen Eukaryonten von großer Bedeutung

Calcineurin ist in allen eukaryontischen Organismen hoch konserviert von den Pilzen bis hin zu Säugetieren. Allein diese Tatsache läßt darauf schließen, daß es vielfältige und wichtige Funktionen in allen Organismen ausübt. In den eukaryontischen Genomen tauchen jeweils mindestens ein Gen für die katalytische und die regulatorische Untereinheit der Proteinphosphatase auf. Säuger verfügen meist über mehrere Calcineurin-Isoenzyme, die in unterschiedlichen Verhältnissen zueinander gewebespezifisch exprimiert werden und so auch spezifische Aufgaben erfüllen. Andere Hefen wie *Cryptococcus neoformans* besitzen jeweils singuläre Gene, während *Saccharomyces cerevisiae* zwei Gene für die katalytische

Untereinheit besitzt (Rusnak and Mertz, 2000). Hierbei konnte eine redundante Funktion der beiden Gene nachgewiesen werden, da nur ein Calcineurin A-Gen für ein normales Verhalten benötigt wird. Welche Funktion das Calcineurin in den einzelnen Spezies übernimmt, ist demnach variabel und hängt vom Organisiertheitsgrad, sprich dem genetischen und physiologischen Umfeld des Organismus ab. So war es nicht verwunderlich, daß in *C. albicans* nur ein orthologes Gen der katalytischen Calcineurin-Untereinheit identifiziert werden konnte. Die Southernblot-Hybridisierungen, in denen nur eine Bande bei der Hybridisierung wildtypischer DNA mit einer Calcineurin-spezifischen Sonde detektiert werden konnte, sowie die erfolgte Aufhebung der Phänotypen der *cmp1*-Mutanten durch Komplementation bestätigen diese Ansicht.

Calcineurin ist wichtig für das Überleben unter Streßbedingungen

Viele Beispiele aus anderen Pilzen zeigen uns, daß Calcineurin maßgeblich sowohl an morphologischen als auch an physiologischen Prozessen beteiligt ist. In *S. cerevisiae* ist Calcineurin erforderlich für die Aufhebung des Pheromon-induzierten Wachstumsarrestes, für die Zellwand-Biosynthese sowie für die Adaptation an hohe Salzkonzentrationen und hohe pH-Werte (Mazur *et al.*, 1995; Mendoza *et al.*, 1994; Moser *et al.*, 1996; Nakamura *et al.*, 1993). In *C. neoformans* spielt die Phosphatase eine Rolle für die Hyphenelongation während des Matings und haploiden Fruchtens (Cruz *et al.*, 2001), ähnlich wie im filamentösen Pilz *Neurospora crassa*, wo sie essentiell ist für das hyphale Wachstum und die Morphologie (Prokisch *et al.*, 1997).

Eine wichtige Funktion im Hinblick auf die Situation im Wirt ist das Vermögen eines pathogenen Organismus, sich an die dort herrschenden Streßbedingungen zu adaptieren und seine Vermehrung in diesem Milieu zu gewährleisten. Schon bei den Pilzvertretern *S. cerevisiae* und *C. neoformans* ist die Rolle des Calcineurins für die Streßtoleranz gegenüber hohen Ionenkonzentrationen und pH-Werten beschrieben (Nakamura *et al.*, 1993; Odom *et al.*, 1997). Dennoch gibt es einige Unterschiede in den einzelnen Hefespezies bezüglich der Calcineurin-vermittelten zellulären Antworten auf spezifische Streßsituationen. Hohe Konzentrationen an Ca^{2+} werden von *S. cerevisiae* Wildtyp-Zellen beispielsweise nicht toleriert, was auf eine in diesem Fall nachteilige Aktivierung des Calcineurins zurückgeführt wird, während die Mutation des Calcineurins in *S. cerevisiae* eine Resistenz gegenüber hohen Ca^{2+} -Konzentrationen verleiht (Cunningham and Fink, 1994). Dem gegenüber steht, daß *C. albicans* hohe Ca^{2+} -Konzentrationen sehr gut toleriert, aber das Wachstum nach der

CMPI-Deletion unter diesen Umständen allerdings inhibiert war. Daraus läßt sich ableiten, daß eine Aktivierung des Calcineurins in *C. albicans* notwendig ist für die Adaptation an hohe Ca^{2+} -Konzentrationen. Ähnlich gegenteilige Effekte einer Calcineurin-Mutation sind beschrieben für *S. cerevisiae* und *C. neoformans*. Während Calcineurin-Mutanten der Bäckerhefe eine verstärkte Sensitivität gegenüber Mn^{2+} zeigen, was den Verhältnissen der Calcineurin-vermittelten Streßantwort in *C. albicans* entspricht, resultiert die Calcineurin-Inaktivierung in *C. neoformans* in Toleranz gegenüber Mn^{2+} (Farcasanu *et al.*, 1995; Odom *et al.*, 1997). Ein Vergleich zweier Serotypen von *C. neoformans* ergab, daß sogar innerhalb einer Spezies Unterschiede bezüglich der Ionensensitivität auftreten können. Serotyp D-Stämme waren von Natur aus sensitiver gegenüber hohen Kationenkonzentrationen als ein Stamm des Serotyps A, und eine Inaktivierung des Calcineurins führte nur im Serotyp A-Stamm zu einer signifikanten Wachstumsinhibierung bei Kationenstreß gegenüber dem Wildtyp, was auf variable physiologische Antworten auf Stressoren in den verschiedenen Serotypen hindeutet (Cruz *et al.*, 2000). Vergleichbar mit diesem Beispiel könnte es auch Unterschiede in Calcineurin-vermittelten Signalen in verschiedenen *C. albicans*-Stämmen geben, die auf genetische, physiologische oder auch biochemische Variabilitäten beruhen können. In dieser Arbeit wurden die Effekte einer Calcineurin-Deletion sowohl im genetischen Hintergrund des Uridin-auxotrophen Laborstammes CAI4, als auch des prototrophen, wildtypischen Stammes SC5314 untersucht. Jedoch ließen sich bei Betrachtung beider Calcineurin-Mutanten unabhängig vom jeweiligen Ausgangsstamm Hypersensitivitäten gegenüber den Ionen Natrium, Lithium, Mangan und Calcium sowie gegenüber alkalischem Streß feststellen. Erklären lassen sich diese Phänotypen, wenn man die Calcineurin-vermittelte Signalkaskade verfolgt. Dabei hat man in *S. cerevisiae* als Haupteffektor und Substrat des Calcineurins das Crz1-Protein entdeckt, ein Transkriptionsfaktor, der bei Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle Calcineurin-abhängig dephosphoryliert wird, somit in den Zellkern gelangen kann und dort unter anderem Gene für die Ionenhomöostase aktiviert (Matheos *et al.*, 1997; Stathopoulos and Cyert, 1997; Stathopoulos-Gerontides *et al.*, 1999; Yoshimoto *et al.*, 2002). Darunter befinden sich P-Typ ATPase-Gene wie *PMCI*, eine vakuoläre Ca^{2+} -ATPase, die Calcium-Ionen aktiv in die Vakuole transportiert, die Golgi-spezifische $\text{Ca}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$ -ATPase *PMRI* und die membranständige Na^+/Li^+ -ATPase-Pumpe *ENAI/PMR2*. Diese gewährleisten die Ionenhomöostase, indem sie bei Bedarf Kationen entweder in die zellulären Speicher Vakuole oder Golgiapparat hinein, oder aus der Zelle heraustransportieren. Im Verlauf der hier vorgestellten Arbeit konnten Sanglard *et al.* bei der Analyse der von ihnen hergestellten

$\Delta cmp1$ -Mutante zeigen, daß in *C. albicans* zumindest die Expression des orthologen *PMCI*-Gens von einer Calcineurin-Aktivierung abhängt (Sanglard *et al.*, 2003). Bei der Untersuchung der transkriptionellen Antwort auf alkalischen Streß in Zellen von *S. cerevisiae* fanden Serrano und Kollegen heraus, daß neben anderen Signalwegen ein relevanter Anteil der Reaktion über Calcium/Calcineurin/Crz1p-vermittelt wird (Serrano *et al.*, 2002), wie beispielsweise die Induktion des *ENAI*-Gens und des *PHO89*-Gens, das für einen Phosphat-Transporter kodiert.

Nicht zuletzt wegen der Zunahme Antimykotika-resistenter *Candida*-Stämme und der daraus resultierenden Suche nach neuen Wirkstoffen stieß man auf die Bedeutung Calcineurins in *C. albicans* für die Streßtoleranz, indem man verschiedenartigste Wirkstoffe miteinander kombinierte und deren Effekt auf die Pilzzellen untersuchte. Marchetti *et al.* entdeckten eine synergistische Wirkung von Calcineurin-hemmenden Pharmazeutika zusammen mit Fluconazol, die das Pathogen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* in infizierten Tieren abtöteten, obwohl Fluconazol *per se* nur fungistatische Eigenschaft besitzt (Marchetti *et al.*, 2000b; Marchetti *et al.*, 2000a). Auch in *S. cerevisiae* ist ein Block des Calcium-Signalweges durch pharmakologische oder genetische Inhibition von Calcineurin oder über Calcium-Komplexbildungen verbunden mit einer verstärkten Sensitivität der Hefezellen gegenüber Azolen und Terbinafin, beides Antimykotika, welche die Ergosterolbiosynthese beeinträchtigen und somit einen Membranstreß auf die Zellen ausüben (Edlind *et al.*, 2002). Derselbe Effekt konnte auch durch Unterbrechung des Signalwegs unterhalb des Calcineurins über eine Inaktivierung des Transkriptionsfaktors Crz1p erzielt werden. Detaillierter wurde der Membranstreß-Effekt durch SDS und Ergosterolbiosynthese-Inhibitoren in *C. albicans* von Cruz *et al.* beschrieben, welche die Existenz eines konservierten Ergosterol-sensorischen Zellmembranintegritäts-Signalweges vorschlagen, der bei Azol-Exposition über Calcineurin aktiviert wird (Cruz *et al.*, 2002). Ähnlich wie beim Menschen, wo der Cholesterolanteil in den Membranen sensorisch wahrgenommen und die Neusynthese entsprechend reguliert wird, könnte ein solcher Mechanismus auch in Hefen zu finden sein. Die Calcineurin-Aktivität scheint aber nicht verantwortlich zu sein für die Azol-getriggerte Induktion eines Gens des Ergosterol-Biosyntheseweges, *ERG6*. Im Gegensatz dazu bleibt die Sensitivität gegenüber Zellwandsynthese-Inhibitoren beim Wildtyp und der Calcineurin B-Mutante gleich, so daß man mögliche Zellwand- und Zellmembran-Integritäts-Signalwege getrennt voneinander betrachten muß. In den $\Delta cmp1$ -Mutanten aus CAI4 und SC5314 konnte die Sensitivität gegenüber Membranstreß bestätigt werden. Die Calcineurin-Mutanten konnten auf Agarplatten, die mit 0.01% SDS supplementiert worden waren, keine Kolonien bilden (Abb. 8

und Abb. 11). Außerdem war das Wachstum der *CMPI*-defizienten Zellen auf Fluconazolhaltigen Agarplatten stark inhibiert, während die komplementierten Stämme und der Wildtyp bei der eingesetzten Konzentration nur leicht bzw. fast unmerklich im Wachstum beeinträchtigt waren (Abb. 8 und Abb. 11). Nicht nur bei Membranstreß, sondern auch bei Hemmung der Proteinfaltungsmaschinerie im Endoplasmatischen Retikulum durch Tunicamycin wurde der Stimulierung eines Ca^{2+} -Einstroms und damit einer Calcineurin-Aktivierung eine essentielle Rolle für das Überleben sowohl in *S. cerevisiae* als auch in *C. albicans* zugeschrieben (Bonilla *et al.*, 2002). Dieser Wirkmechanismus scheint allerdings unabhängig vom Transkriptionsfaktor Crz1p zu sein, da sich *crz1*-Mutanten unter Tunicamycin-Streß genauso verhielten wie die Wildtyp-Zellen.

Zusammenfassend kann man anmerken, daß Calcineurin in *C. albicans*, wie auch in anderen Hefepilzen, für die Bewältigung vielfältiger Arten von Streß eine zentrale Rolle spielt. Die einzelnen Mechanismen der Streßantwort können jedoch unterschiedlich ausfallen; ein Großteil scheint über die transkriptionelle Kontrolle des Crz1-Proteins gesteuert zu sein, aber es existieren wohl noch andere, nicht bekannte Calcineurin-Substrate, welche der Signalweiterleitung unter spezifischen Bedingungen dienen (Onyewu *et al.*, 2004).

Calcineurin ist essentiell für die Pathogenität von *C. albicans*

Von besonders großem Interesse ist die Rolle des Calcineurins in der Pathogenität von *C. albicans*, da sich Calcineurin-Mutanten von *C. neoformans* als avirulent erwiesen hatten (Odom *et al.*, 1997). In der Tat kann man anhand der Ergebnisse aus den Kapiteln 4.1.6 und 4.1.7.5 demonstrieren, daß Calcineurin auch in *C. albicans* eine essentielle Rolle für die Virulenz spielt. Dennoch ist hier, anders als bei *C. neoformans*, Calcineurin nicht notwendig für das Überleben bei 37°C. Daher kann der Virulenzdefekt der Δcmpl -Mutanten nicht einfach über eine Temperatursensitivität erklärt werden. Eine weitere wichtige Eigenschaft von *C. albicans*, die mit dessen pathogenem Potential assoziiert wird, ist seine Fähigkeit, zwischen Hefeform und filamentösem Wachstum zu wechseln. Nachdem filamentöses Wachstum in *C. neoformans* nach einer Inaktivierung von Calcineurin inhibiert war (Cruz *et al.*, 2001), war es naheliegend zu überprüfen, ob auch bei *C. albicans* eine Beeinträchtigung der Induktion und der Elongation der Hyphen zu beobachten ist. Keimschlauchbildung wird in diesem Organismus durch verschiedene Umweltsignale stimuliert, beispielsweise neutraler pH, erhöhte Temperatur, Mangel an Nährstoffen oder die Anwesenheit von Serum (Ernst, 2000), und Calcium wird als „second messenger“ für die Hypheninduktion über

Umweltsignale in Verbindung gebracht (Gow, 1994). Auch die Tatsache, daß Calcineurin in der transkriptionellen Antwort auf alkalischen pH in *S. cerevisiae* involviert zu sein scheint (Serrano *et al.*, 2002), und die *C. albicans* Calcineurin-Mutante hypersensitiv gegenüber alkalischem pH reagiert, würde für einen Einfluß Calcineurins auf das filamentöse Wachstum des pathogenen Pilzes sprechen. Dennoch zeigen die Resultate in den Abschnitten 4.1.4 und 4.1.7.4, daß die Hyphenausbildung, die in verschiedenen Medien, d. h. über verschiedene Umweltsignale induziert worden war, durch eine Deletion von *CMPI* nicht beeinträchtigt zu sein scheint. Die Mutanten zeichneten sich unter bestimmten Bedingungen, in einem nährstoffarmen Medium mit neutralem pH (Lee's Medium), sogar durch eine verstärkte Hyphenbildung und Aggregation aus. Dies könnte darauf hindeuten, daß einige physikalische oder biochemische Eigenschaften der Hyphen in den $\Delta cmpl$ -Mutanten verglichen zum Wildtyp verändert sind, zumal Hyphenausprägung mit Veränderungen in der Zellwand einhergehen und Sanglard und Kollegen mögliche Zellwanddefekte postulieren, nachdem ihre Calcineurin-Mutante eine leicht erhöhte Sensitivität gegenüber den Farbstoffen „Calcofluor white“ und Kongorot zeigte, die sich in die Zellwand einlagern (Sanglard *et al.*, 2003).

Diese Störung der Zellwandintegrität könnte eventuelle Auswirkungen auf die Pilz-Wirts-Interaktion haben, beispielsweise bei der Adhäsion an oder Kolonisation von Wirtsgewebe. In den fast zeitgleichen Veröffentlichungen von Blankenship *et al.* sowie von Sanglard *et al.*, die jeweils die Virulenzattenuation einer Calcineurin B- bzw. einer Calcineurin A-Mutante bestätigten, wurden gegenteilige Aussagen zur Beteiligung von Calcineurin an der Hypheninduktion in *C. albicans* getroffen. Während die Mutante der Calcineurin-Untereinheit A in Spider- und SLAD-Medium keine Filamente ausprägen konnte (Sanglard *et al.*, 2003), zeigte die Mutante der regulatorischen Calcineurin-Untereinheit in Übereinstimmung mit den hier vorgestellten Ergebnissen keinen Hyphendefekt in Spider-, Lee's Medium und 10% Serum (Blankenship *et al.*, 2003). Darüber hinaus konnten die Autoren durch mikroskopische Aufnahmen von filamentösen Hefezellen bei der Adhärenz an Epithelzellen und in infiziertem Nierengewebe die Entbehrlichkeit des Calcineurins für die Hypheninduktion *in vivo* belegen.

Nun stellte sich allerdings die Frage, wie die starke Virulenzattenuation der $\Delta cmpl$ -Mutante zustande kommt, wenn weder die Temperaturtoleranz noch die Fähigkeit zur Hyphenausbildung gestört waren. In Analogie zu den Daten der Lebendzellzahlbestimmungen aus den Nieren infizierter Tiere (Abb. 9C), nach denen am siebten Tag nach der Infektion deutlich weniger und am elften Tag gar keine $\Delta cmpl$ -Hefezellen mehr im Vergleich zum komplementierten Stamm nachgewiesen werden konnten, sprachen Blankenship und

Kollegen von einer mangelnden Kolonisierungsfähigkeit ihrer Calcineurin-Mutante (Blankenship *et al.*, 2003). Im Zuge ihrer Analyse postulierten sie einen Effekt der „Serumtoxizität“, d.h. Absterben der Calcineurin-defizienten Zellen schon im Blutserum. Auch die Gruppe um Sanglard hat einen drastischen Rückgang der Lebendzellzahl der Calcineurin-Mutante in Serum beschrieben. In den hier vorgestellten Versuchen zum Verhalten des $\Delta cmp1$ -mutierten SC5314-Derivats in Serum offenbarte sich allerdings ein weniger eindeutiges Bild des Serumeffekts (Abb. 16). Nur im Humanserum war eine stetige Abnahme der Zellzahlen der Mutante zu verzeichnen, dennoch überlebten innerhalb von 24 Stunden Inkubation immer noch 35% des Inokulums, während Sanglard *et al.* sowie Blankenship *et al.* von einer fast 100%igen Abtötung der Mutanten-Populationen in einer weit kürzeren Zeitspanne berichteten. Nach den hier präsentierten Daten fiel also der Abtötungseffekt wesentlich milder aus. Noch dazu war im fötalen Kälberserum (FCS) nur ein wachstumshemmender Effekt bedingt durch die Calcineurin-Deletion zu beobachten, da die Wachstumskurve der Mutante zwar langsamer als die der Kontrollstämme, aber dennoch ansteigend war. Zwischen beiden Seren gab es also einen drastischen Unterschied, was sich auch in den absoluten Lebendzellzahlen widerspiegelte: in Humanserum war die Wachstumsrate aller Stämme deutlich geringer als in FCS, so daß sich für die Kontrollstämme SC5314 und SCCMP1K2 die Populationen um den Faktor 3 im Humanserum und in FCS um etwa 50 innerhalb von 24 Stunden erhöhte. Dieser generelle Unterschied zwischen Humanserum und FCS läßt sich eventuell auf die Abwesenheit von Komplementfaktoren in FCS zurückführen, da das Bakterium *Escherichia coli* sich dort ohne Probleme vermehren konnte, was bei intaktem Komplementsystem im Normalfall nicht möglich ist (Schreiber *et al.*, 1979). In Humanserum wurde *E. coli* schon nach 4 h vollständig eliminiert. Dies läßt den Schluß zu, daß das Komplementsystem einen möglichen negativen Einfluß auf das Wachstum von *C. albicans* in Serum besitzt, der unabhängig von der Calcineurin-Inaktivierung zu sein scheint. Zudem könnte es als Wirtsabwehr-relevante Eigenschaft auch Einfluß auf die Überlebensfähigkeit der Calcineurin-Mutante nehmen. Jedoch müßte, um diese Annahmen endgültig zu klären, das Wachstumsverhalten der Stämme nach einer Hitzeinaktivierung des Humanserums überprüft werden. Eine interessante Studie, die das Expressionsprofil von *C. albicans* in menschlichem Blut *in vitro* untersucht hat, stellte eine Hochregulierung von Genen der Proteinbiosynthese, des Kohlenstoff-Stoffwechsels, der Streß-Antwort und der Hyphenproduktion im Vergleich zu Zellen fest, die nach ihrer Vorkultur für 30 Minuten in PBS geruht hatten (Fradin *et al.*, 2003). Obwohl diese Effekte zum Teil durch die Vorkultur-Bedingungen beeinflußt worden waren, so ließen sich viele Expressionsunterschiede in

Pilzzellen infizierter Tiere reproduzieren. Diese Ergebnisse sprechen daher zum einen dafür, daß die Zellen im Blut einer streßvollen Situation ausgesetzt sind, z. B. angesichts des pH-Wertes von 7.0 bis 7.7, und daß zum anderen ein Umorganisieren des Stoffwechsels stattfindet, zumal es sich bei Blut bzw. Serum um ein relativ nährstoffarmes Medium handelt. Allerdings werden ähnliche Prozesse auch in hypheninduzierenden Medien erwartet, da sich dort durch Mangel an Nährstoffen sowie durch den Temperaturwechsel von 30 zu 37°C der Stoffwechsel entsprechend adaptieren muß. Dies scheinen die Calcineurin-Mutanten *in vitro* jedoch ohne Probleme zu bewältigen. Da die Calcineurin-Inaktivierung eine massive Sensibilisierung gegenüber verschiedenen Arten von Streß nach sich zieht, mag das eine relevante Rolle in Serum spielen. Dazu haben Blankenship und Heitman erst kürzlich durch Behandlung des Serums mit einem Calcium-Chelator, der den abtötenden Effekt auf die Calcineurin B-Mutante verhinderte, die Hypothese aufgestellt, daß Calcium das entscheidende Killer-Element in Serum sei (Blankenship and Heitman, 2004). Bei dem Spot-Test jedoch, bei dem physiologische Konzentrationen an freiem Calcium eingesetzt wurden, zeigte die Mutante keinerlei Sensitivität (Abb. 17), auch nicht bei 100-fach erhöhter Konzentration. Zumindest zum Teil muß jedoch eine kompensatorische Wirkung des YPD-Mediums eingeräumt werden (Blankenship *et al.*, 2003), ob es allerdings eine 100-fach erhöhte physiologische Calcium-Konzentration ohne Wachstumsdefizit abfangen kann, wenn Calcium der alleinige Killer-Faktor wäre, erscheint fragwürdig. Calcineurin-Mutanten sind nachgewiesenermaßen äußerst sensibel gegenüber Membranstreß. Aktive Faktoren im Serum, wie beispielsweise Komplementfaktoren oder Antimikrobielle Peptide (AMPs), welche die Zellmembranen von Bakterien und pathogenen Pilzen durchlöchern, könnten eine entscheidende Rolle bei der Wachstumshemmung von *CMPI*-defizienten Zellen spielen, da sie den Angriffen mit einer „anfälligen“ Plasmamembran nur unzureichend begegnen können. Mehrere Arbeiten belegen, daß die niedermolekularen, hitze- und proteasestabilen AMPs unter anderem antimykotische Aktivität besitzen (Gallo *et al.*, 2002; Yeaman *et al.*, 1993). Bei den vorgestellten Versuchen in Serum war die Inokulumsmenge von etwa 2×10^6 Zellen/ml möglicherweise zu hoch, um alle Zellen des SCCMP1M4-Stammes in Humanserum zu eliminieren, da eventuell der Pool an AMPs im Serum durch Oberflächenbindung an die Pilzzellen erschöpft war. Durch eine generell höhere Wachstumsrate in FCS resultierte deshalb möglicherweise nur ein inhibitorischer Effekt auf die Calcineurin-Mutante.

Dennoch erscheint angesichts des milden Abtötungseffekts der Calcineurin-defizienten Zellen in Humanserum und der Abhängigkeit des Abtötens von Art und Zusammensetzung des

Serums dieser Effekt allein nicht ausreichend für die Erklärung der starken Virulenzattenuation der $\Delta cmp1$ -Mutante. Als weitere Ursachen antifungaler Wirkung kommen noch folgende Möglichkeiten in Frage: Zum einen könnten zelluläre Bestandteile im Blut, die im Serum nicht vorhanden sind, ihren Beitrag zur schnellen Abtötung der Calcineurin-Mutanten leisten. Makrophagen phagozytieren die Pilzzellen (Thompson and Wilton, 1992), und Neutrophile, die Hauptvertreter der Leukozyten, produzieren bei Anwesenheit von pathogenen Organismen reaktive Sauerstoffmoleküle (Diamond *et al.*, 1980). Da *C. albicans*-Zellen Gene für antioxidative Enzyme in Blut hochregulieren (Fradin *et al.*, 2003), scheint ein Anpassungsdefizit verursacht durch fehlende Calcineurin-vermittelte Signaltransduktion denkbar, das die Zellen zugänglicher für solche Stressoren macht. Zum anderen ist es möglich, daß die Eliminierung der Mutanten zu einem späteren Zeitpunkt der Infektion stattfindet, beispielsweise bei der Adhäsion an Wirtszellen oder, wie bereits erwähnt, bei der Kolonisierung von Organen, weil eventuell veränderte Oberflächenmerkmale der Pilzzellen durch die Calcineurin-Inaktivierung dies nicht mehr erlauben.

Problematik des *URA3*-Selektionsmarkers und Lösungen hinsichtlich der Calcineurin-Analyse

Innerhalb der letzten Jahre wurde eine immer stärkere Kritik daran geübt, daß der Selektionsmarker *URA3* bei vielen CAI4 „knock-out“ Mutanten ektopisch exprimiert wird und diese Stämme phänotypisch mit dem Wildtyp verglichen werden, der sich somit in zweierlei Hinsicht, nicht nur in der Deletion des Zielgens, sondern auch im Expressionslokus und meist auch in der Anzahl seiner *URA3*-Gene, von den Mutanten-Stämmen unterscheidet. Lay *et al.* berichteten dazu, daß die *URA3*-Expressionsstärken und damit die spezifischen Aktivitäten der Orotidin-5'-Monophosphat-Decarboxylase, des *URA3*-Genproduktes, in *C. albicans*-Stämmen mit einer oder zwei *URA3*-Kopien unterschiedlich ausfielen, was nicht allein auf die Gendosis zurückzuführen war (Lay *et al.*, 1998). Da außerdem die *URA3*-Auxotrophie *C. albicans*-Stämme avirulent macht (Cole *et al.*, 1995), können diese Expressions-unterschiede die Virulenz und auch Virulenz-relevante Parameter wie die Hyphenausbildung und die Adhärenz beeinflussen (Bain *et al.*, 2001; Cheng *et al.*, 2003). Zusätzlich fanden Cheng und Kollegen bei der Reintegration von *URA3* an seinen nativen Lokus in Deletionsmutanten vier verschiedener Gene heraus, daß die erstmals beobachteten phänotypischen Virulenzdefekte in drei Fällen nicht die Konsequenz der Inaktivierung des Zielgens, sondern der Relokalisierung des *URA3*-Markers waren (Cheng *et al.*, 2003). Eine

weitere Studie deckte einen ähnlichen Fall auf und wies unter anderem auf weitreichende Änderungen im zellulären Proteom im Vergleich des Stammes CAI4 (*ura3⁻*) mit SC5314 (*URA3⁺*) hin, die 14 Gene mit Funktionen im Purin-/Pyrimidin-Metabolismus, der Hämbiosynthese, dem aromatischen Aminosäure-Umsatz sowie der Transkription und Translation (Brand *et al.*, 2004) einschlossen. Die Änderungen von 13 dieser Proteine erwiesen sich dabei als *URA3*-abhängig, während die Änderung des verbliebenen Genprodukts als Resultat der teilweisen Inaktivierung eines *URA3*-benachbarten Genlokus im Zuge der Generierung des CAI4-Stammes angesehen wurde (Brand *et al.*, 2004; Garcia *et al.*, 2001). Daher ist die Interpretation von Ergebnissen *in vitro* und vor allem auch *in vivo*, die auf Mutanten mit ektopischer *URA3*-Expression basieren, kritisch zu beurteilen. Um solche Probleme zu vermeiden, wurde in der hier vorgestellten Analyse der CAI4-basierten Δ *cmp1*-Mutante besondere Aufmerksamkeit auf die Konstruktion der Stämme gelegt. Sowohl in den Mutanten- als auch in den komplementierten Stämmen wurde der *URA3*-Marker an demselben genomischen Lokus in exakt derselben Weise integriert. Außerdem wurden, um das *URA3*-Gen von möglichen davor gelegenen regulatorischen Sequenzen abzuschirmen, *ACT1*-Terminatorsequenzen vor dem *URA3*-Marker positioniert. Somit unterschieden sich die Mutanten von den komplementierten Stämmen lediglich in der Abwesenheit bzw. der Anwesenheit des Zielgens *CMPI*. Darüber hinaus wurden in allen phänotypischen *in vitro*-Tests nicht nur die Uridin-prototrophen Δ *cmp1*-Mutanten mit prototrophen Kontrollstämmen, sondern auch die Uridin-auxotrophen Δ *cmp1*-Mutanten mit dem auxotrophen Ausgangsstamm CAI4 verglichen. Wenn nun phänotypische Diskrepanzen zwischen *URA3*-positiven Mutanten und Kontrollstämmen beobachtet würden, die auf eine unterschiedliche *URA3*-Expression zurückzuführen sind, so sollten diese nicht in den *ura3*-negativen Stämmen auftauchen. Alle phänotypischen Effekte fanden sich jedoch in beiden Gegenüberstellungen, so daß man von spezifischen Effekten ausgehen kann, die durch die Inaktivierung des Calcineurins verursacht werden. Für die Virulenzversuche *in vivo* wurden nur die Stämme herangezogen, die einen optimalen Vergleich erlaubten, nämlich die Mutanten und die komplementierten Stämme, die jeweils nur eine *URA3*-Genkopie auf identische Weise im Genom integriert hatten. Ein Vergleich mit dem Wildtyp-Stamm SC5314 war dagegen weniger sinnvoll, da er zwei funktionelle *URA3*-Kopien besitzt und sich vom Ausgangsstamm CAI4 neben der *URA3*-Auxotrophie zusätzlich mindestens durch einen trunkierten benachbarten Lokus in CAI4 unterscheidet (Garcia *et al.*, 2001).

Obwohl die Übereinstimmung aller Ergebnisse *in vitro* und *in vivo* bei beiden unabhängig konstruierten, CAI4-basierten Paaren der Mutanten- und Kontrollstämmen eindeutig auf die

Spezifität der Effekte aufgrund des Calcineurin-Verlusts hindeuteten, wurde eine neue $\Delta cmp1$ -Mutante aus dem Wildtyp SC5314 als Ausgangsstamm konstruiert, um die Resultate zu untermauern und das Verhalten der Mutante im genetischen Hintergrund von SC5314 zu testen. Dabei erfolgte die Insertionsmutagenese unter Verwendung des dominanten Selektionsmarkers $CdMPA^R$, der nach der Inaktivierung des zweiten $CMP1$ -Allels wieder entfernt wurde, so daß sich die Mutante vom Wildtyp nur durch die Abwesenheit dieses einen Gens unterschied. Ebenso wurde nach der Reintegration einer $CMP1$ -Kopie in dem komplementierten Stamm verfahren, der somit $CMP1$ -heterozygot war, aber sonst keine genetischen Veränderungen verglichen mit dem Wildtyp aufwies. Brand und Kollegen sprachen sich in einer Publikation kürzlich dafür aus, daß zur Reevaluierung von CAI4-basierten Mutanten, die in vielen Publikationen als avirulent charakterisiert worden waren und die das $URA3$ -Gen innerhalb des deletierten Locus positioniert hatten, die Expression von $URA3$ im stark exprimierten $RPS10$ -Lokus erfolgen sollte, da dies eine ähnliche $URA3$ -Expressionsstärke wie im heterozygoten CAI4-Vorfahren CAF2-1 erzielte (Brand *et al.*, 2004). Staab und Sundstrom dagegen schlagen die Verwendung eines „Wildtyp“-Stammes vor, der aus CAI4 durch die Integration des $URA3$ -Gens in den stark exprimierten $ENO1$ -Lokus hervorgeht, da dieser Stamm eine bessere Kontrolle darstelle als der CAI4-Vorfahre CAF2-1 oder SC5314 (Staab and Sundstrom, 2003). Diese Ansätze sind jedoch unzureichend, da sie die Verhältnisse im genetischen Hintergrund eines echten Wildtypstammes ebensowenig reflektieren wie die Uridin-auxotrophen oder $URA3$ -heterozygoten Stämme. Vielmehr käme mit den heterozygoten $RPS10$ - bzw. $ENO1$ -Loci noch ein zusätzlicher Parameter hinzu, der den Phänotyp beeinflussen könnte. Daher ist die spezifische Mutagenese im Wildtyp-Stamm mit nachfolgender Eliminierung des Selektionsmarkers, wie es in dieser Arbeit für das $CMP1$ -Gen vorgestellt wurde, die sicherste und gründlichste Methode zur Charakterisierung genspezifischer Effekte *in vitro* und *in vivo*, da sie einen optimalen Vergleich der Mutante mit dem echten Wildstamm ermöglicht. Bei der Kontrolle der Phänotypen bezüglich Sensitivität gegenüber Ionen- und Membranstreß, gegenüber alkalischem pH sowie bezüglich Temperaturtoleranz und Hyphenausbildung dieser $\Delta cmp1$ -Mutante konnte eine Übereinstimmung mit den Phänotypen der CAI4-basierten Mutante festgestellt werden. Auch der Vergleich der CAI4-basierten Mutante mit der Mutante aus SC5314 bezüglich der Virulenztests *in vivo* zeigte eine Übereinstimmung in der starken Virulenzattenuation, so daß die Mäuse, die mit der SC5314-basierten Mutante infiziert worden waren, bis zum Tag 70 p. i. überlebten. Somit waren die Verhaltensweisen beider Mutanten als gleich anzusehen, und alle Phänotypen konnten eindeutig bestätigt werden.

Wertung und Ausblick zur Calcineurin-Analyse

Calcineurin scheint in allen bislang untersuchten Pilzen wichtige Funktionen für das Überleben selbst oder für das Überleben unter bestimmten Streßbedingungen zu erfüllen. Damit verbunden haben pathogene Pilze wohl ihre eigenen spezialisierten Rollen Calcineurins für die Virulenz entwickelt, so daß Mutanten in *C. neoformans* (Cruz *et al.*, 2000; Fox *et al.*, 2001; Odom *et al.*, 1997), aber auch in *C. albicans*, in denen Calcineurin inaktiviert wurde, sich avirulent verhalten. Dies macht Calcineurin im Hinblick auf die medizinische Forschung besonders interessant, da es ein attraktives Angriffsziel für neue antimykotische Wirkstoffe darstellt. Cruz *et al.* stellten die mögliche Nutzung nicht-immunsuppressiver Analoga der Calcineurin-Inhibitoren FK506 und Cyclosporin A in Aussicht, die über eine Pilz-selektive Immunophilin-Interaktion Calcineurin hemmen und in Kombination mit Azolen *Candida*-Infektionen bekämpfen können (Cruz *et al.*, 2002). Auch Onyewu und Kollegen berichteten über eine synergistische Wirkung zwischen einem nicht-immunsuppressiven FK506-Analogen und Fenpropimorph oder Terbinafin, fungistatische Wirkstoffe, die ebenfalls an der Ergosterolbiosynthese angreifen, gegenüber mehreren *Candida*-Spezies (Onyewu *et al.*, 2003). Obwohl diese Inhibitoren das Wachstum der Pilze unter Standardbedingungen *in vitro* nicht inhibieren, und auch das Wachstum der Calcineurin-Mutanten unter diesen Bedingungen nicht beeinflußt zu sein scheint, führt die Inaktivierung von Calcineurin allein zu einer Virulenzattenuation. Dies läßt vermuten, daß allein eine Inhibierung Calcineurins schon ausreichen könnte, um eine *Candida*-Infektion zu verhindern.

Die Calcineurin Signalkaskade kontrolliert in mehreren Pilzen Aspekte der Virulenz. Dennoch treten aber auch Unterschiede zwischen den einzelnen Organismen auf, die auf unterschiedliche molekulare Mechanismen schließen lassen. Deshalb ist es notwendig, die Calcineurin-Funktionen in jeder Hefe experimentell zu untersuchen. Die vor wenigen Jahren identifizierte Calcineurin-bindende Proteinfamilie der Calcipressine, von denen Vertreter bereits im Menschen, in *S. cerevisiae* sowie in *C. neoformans* entdeckt wurden, wurde dabei mit der Feinregulation des Calcineurins in Verbindung gebracht, wobei sie aber nicht an allen Calcineurin-vermittelten Funktionen beteiligt zu sein scheinen (Fox and Heitman, 2002). Eine Identifikation solcher regulatorischer Proteine sowie der im Calcineurin-Signalweg nachfolgenden Faktoren und deren Charakterisierung in *C. albicans* könnten dabei weiterhelfen, das molekulare Netzwerk der Calcineurin-abhängigen Signalwege aufzuschlüsseln. Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse konnten einen Beitrag dazu leisten, Funktionen des Calcineurins in *C. albicans in vitro* und seine wichtige Bedeutung für

die Pathogenität dieser Hefe *in vivo* aufzudecken. Trotzdem bleibt das Verständnis der entscheidenden Calcineurin-vermittelten Signale, die ein Überleben im Wirt sichern, noch weitgehend verborgen. Der Mangel an Anpassungsfähigkeit bei einem Calcineurin-Verlust an verschiedene Streßbedingungen wie erhöhtem pH-Wert oder Membranstreß liefert dazu mögliche Erklärungsansätze, die *in vivo* noch genauer untersucht werden müssen.

5.2 Funktionelle Aufklärung der essentiellen Gene *RSC9/YML127*, *YPR143* und *UTP14/YML93* mit Hilfe von konditional letalen Mutanten in *Candida albicans*

Über die Nutzbarkeit konditional letaler Mutanten durch induzierbare, FLP-Rekombinase-vermittelte Gendeletion

In den meisten Arbeiten, in denen essentielle Gene sowohl in *C. albicans* als auch in *S. cerevisiae* untersucht werden, ist der Einsatz regulierbarer Promotoren zur Repression des Zielgens die Methode der Wahl. Dieses ist jedoch mit einigen Einschränkungen verbunden, die durch das hier angewandte Verfahren, das in unserem Labor entwickelt worden ist, vermieden werden (Michel *et al.*, 2002). Die induzierbare, FLP-Rekombinase-vermittelte Gendeletion hat zum einen den Vorteil, daß man echte Nullmutanten erhält, wodurch man die Möglichkeit eines „leaky“ Promotors, d. h. einer geringfügigen Genexpression, unter nicht-permissiven Bedingungen ausschließen kann. Das kann vor allem zu falschen Resultaten führen, wenn für eine normale Funktion eines Gens schon eine geringe Expressionsstärke ausreichend ist. Zum zweiten muß ein regulierbarer Promotor immer unter reprimierenden Bedingungen gehalten werden, um die Auswirkungen des Verlusts eines essentiellen Gens zu studieren, weshalb sich die Testbedingungen meistens nur auf ein Medium beschränken. Anders kann man mit der hier benutzten Methode nach der einfachen Passage im Induktionsmedium die Zellen in verschiedenartigste experimentelle Bedingungen überführen und ihr Verhalten darin analysieren. Auch bei den hier untersuchten Genen wurden ein Aliquot der induzierten Mutanten nicht nur in YPD-Vollmedium, sondern auch in Keimschlauch-induzierendem RPMI-Medium mit 10% Serum überführt, um ihre Fähigkeit zur Hyphenausbildung zu überprüfen. Nachdem hier keine Auffälligkeiten feststellbar waren, sind diese Versuche im Ergebnisteil nicht erwähnt. Darüber hinaus ist es von Vorteil, daß das

zu untersuchende Gen vor der Deletion von seinem eigenen Promotor reguliert wird. Dies ist ein wichtiger Aspekt, da manche Gene abhängig vom Zellzyklus oder von der Wachstumsphase differentiell exprimiert werden. Somit kann der Einsatz eines fremden, regulierbaren Promotors zu einer inadäquaten Expression des Gens unter permissiven Bedingungen führen, die bei der Analyse der konditionalen Mutanten zu undetektierten kompensatorischen Verhaltensweisen der Zellen und somit zu falschen Ergebnissen führen kann. Angesichts dieser Betrachtungen stellt das hier eingesetzte Verfahren der induzierbaren Gendeletion ein effizientes System zur Generierung und Analyse konditional letaler *C. albicans* Mutanten dar.

Die Expression der FLP-Rekombinase wird durch den *SAP2*-Promotor gesteuert, der durch die Anwesenheit von Proteinen als alleinige Stickstoffquelle im Induktionsmedium angeschaltet wird. Dies und somit auch die FLP-vermittelte Deletion erfolgt erst zu einem späten Zeitpunkt der Kultur, wenn sie nach 15 bis 19 h fast die stationäre Phase erreicht hat. Da nach der Gendeletion aber erst die mRNA-Degradation sowie das Aufbrauchen des Genprodukts abgewartet werden muß, kann in der stationären Induktionskultur noch kein phänotypischer Effekt beobachtet werden. Dafür muß die Zellpopulation erst in frisches Medium verdünnt werden, wo die Zellen wieder versuchen zu wachsen, und wo sie im Verlauf der Zeit die letalen Phänotypen ausprägen. Betrachtungen der mRNA- und Proteinstabilität des zu untersuchenden Gens spielen eine wichtige Rolle bei der Frage, wann Phänotypen detektiert und auch wann von einem terminalen Phänotyp gesprochen werden kann. So benötigten die Nullmutanten von *YML127* und *YML93* längere Zeit verglichen mit den Mutanten von *YPR143*, um ein klares Wachstumsdefizit bei gleicher Behandlung nachweisen zu können. Auch bei der Untersuchung des morphologischen Phänotyps dieser Mutanten fiel auf, daß bei den *ypr143*-defizienten Zellen schon früher Unterschiede zu den Kontrollstämmen festzustellen waren. Demnach könnten die mRNAs oder die entsprechenden Genprodukte von *YML127* und *YML93* möglicherweise stabiler sein als das von *YPR143*. Nachdem darüber aber nur vage Aussagen getroffen werden können, hat sich als praktikables Werkzeug zur Analyse des morphologischen terminalen Phänotyps die Betrachtung von Mikrokolonien herausgestellt. Diese wurden nach dem Ausplattieren eines verdünnten Aliquots der Induktionskultur auf YPD-Agarplatten und ausreichender Inkubation im Brutschrank erhalten. Neben den sichtbaren Kolonien von nicht-induzierten Zellen waren unter dem Mikroskop auch Zellhaufen sichtbar, in denen das zu untersuchende Gen deletiert worden war. Diese Zellen führten im Fall von *ym127*- und *ym193*-Nullmutanten noch einige Zellteilungen durch, bevor das Protein aufgebraucht war, was sich in der Ausbildung

ungewöhnlicher Zellformen äußerte, und sie schließlich abstarben. Die Durchführung physiologischer Tests macht jedoch das Arbeiten mit einer Flüssigkultur erforderlich, um beispielsweise RNA zu isolieren oder Zellkerne anzufärben. Bis zum Verbrauch des Genprodukts bedarf es, wie bereits erwähnt, einige Zeit, die aber auch den nicht-induzierten Zellen der Population zur Verfügung steht, um sich zu vermehren. Dies stellt bei kürzeren Inkubationszeiten, wie auch anhand der flachen Wachstumskurven für die hier untersuchten Nullmutanten-Stämme erkennbar war, kein Problem dar, weil der Anteil nicht-induzierter Zellen selbst nach Stunden vernachlässigbar klein ist, wenn man von einer Induktionsrate von ca. 99% ausgeht. Jedoch zeigte sich, daß besonders im Fall der konditionalen *YML93*-Mutanten *YML93M6A* und *B* eine schlechtere Induktion von nur 92.9 bzw. 80.7% beim Vergleich der Lebendzellzahlen mit den isogenen *M8*-Stämmen erreicht wurde. Auch die Kontrollstämme für die Induktion *YML93M7A* und *B*, die bei erfolgter Induktion einen meßbaren MPA-sensitiven Phänotyp bekommen, verhielten sich ähnlich mit Induktionsraten von 90.5 bzw. 83.5%. Angesichts des entsprechend hohen Anteils nicht-induzierter Zellen von etwa 10 bis 20% konnten hier Probleme bei Versuchsansätzen und bei der Interpretation der Ergebnisse entstehen, darauf wird aber später noch eingegangen. Die Frage, wie es zu einer solch schlechten Induktion kommen konnte, läßt sich nicht eindeutig beantworten. Da dies bei beiden unabhängig voneinander konstruierten Stammserien auftrat, scheint eine generell schlechtere Induzierbarkeit für die *YML93M6*- und *-M7*-Stämme vorzuliegen. Möglicherweise wurden bei mehrmaligen Passagen der Bakterienstämme, die entweder das Konstrukt mit der FLP-Rekombinase oder die *FRT*-Erkennungssequenzen enthielten, schon bei den Transformationen eine durch Mutationen bedingte inaktivere Rekombinase oder mutierte *FRT*-Stellen in die Hefestämme integriert. Eine andere Möglichkeit wäre, daß schon beim Ausgangsstamm *CAI4* zu Beginn der Konstruktion der konditionalen Mutante eine Mutation vorlag, welche die Aktivität der FLP-Rekombinase beeinträchtigte. Allerdings konnte man bei den Schritten, welche die FLP-vermittelten Deletionen der wildtypischen Allele betrafen, keine schlechtere Induzierbarkeit feststellen. Eine dritte und wahrscheinlichste Möglichkeit wäre, daß *YML93*-spezifische Sequenzen selbst dafür verantwortlich sind, indem beispielsweise eventuell angelagerte Proteine oder ungünstige DNA-Struktureigenschaften wie z. B. die windungsbedingte sterische Lage der *FRT*-Stellen zueinander eine Rekombination erschweren. Zusätzlich muß angemerkt werden, daß sich die Stämme *YML93M6B* und *-M7B* nochmals um 10% schlechter induzieren ließen als die *A*-Stämme. Daher kann hier ein zusätzliches, nicht detektierbares Mutationsereignis während der Konstruktion nicht ausgeschlossen werden. Dies müßte allerdings zu einem recht frühen

Zeitpunkt geschehen sein, zumal YML93M6B und YML93M7B ihren letzten gemeinsamen Ausgangsstamm in YML93M3B hatten. Solche Ereignisse können generell in der genetisch sehr flexiblen Hefe *C. albicans* nicht ausgeschlossen werden und ist auch für den Stamm YML143M6A denkbar, da seine Induktionsrate nach mehreren Experimenten mit großen Schwankungen verbunden war. Diese Erfahrungen machen deutlich, daß trotz der hohen Effizienz und Reproduzierbarkeit des Systems das Mitführen von Kontrollstämmen wie der M7- und M8-Stämme überaus wichtig ist, um das System im Einzelfall zu überprüfen und mögliche Probleme bei der Interpretation von Ergebnissen abschätzen zu können.

Ist *C. albicans* Rsc9p/Yml127p eine Komponente eines RSC „chromatin remodeling complex“?

Der RSC „chromatin remodeling complex“ wurde 1996 in der Bäckerhefe von Cairns und Kollegen entdeckt. Nicht zuletzt seine Essentialität für das Wachstum der Hefe, sondern auch die Tatsache, daß seine Kopienzahl pro Zelle die des besser bekannten SWI/SNF-Komplexes um mehr als das zehnfache übersteigt, macht seine weitreichende Bedeutung für das Überleben der Hefezellen deutlich (Cairns *et al.*, 1996). In der hier vorliegenden Arbeit wurde ein homologes Gen von *ScRSC9* aus *C. albicans* untersucht, das für eine Komponente des RSC-Komplexes kodiert. Wie schon bei den homologen Genen in der Bäckerhefe sowie in dem humanpathogenen Pilz *A. fumigatus* (Damelin *et al.*, 2002; Firon *et al.*, 2003) wies das *C. albicans* *RSC9/YML127*-Gen eine essentielle Funktion für das Überleben des Pilzes auf, eine Eigenschaft, die noch weitere RSC-Untereinheiten in *S. cerevisiae* gemeinsam haben (Angus-Hill *et al.*, 2001; Cairns *et al.*, 1996; Cao *et al.*, 1997; Taneda and Kikuchi, 2004). Zudem spricht die hohe Konserviertheit innerhalb einer annotierten ARID-DNA-Bindedomäne in ScRsc9p und auch in anderen Teilen des Proteins für eine Funktion des Gens in einem homologen RSC-Komplex in *C. albicans*. Um diese Frage genauer zu erörtern, wurden in dieser Arbeit konditional letale Mutanten des *RSC9/YML127*-Gens hinsichtlich ihrer Zellmorphologie und des Zellzyklus untersucht. Darüber hinaus konnte bei der Lokalisierung mittels indirekter Immunfluoreszenz eines HA-markierten Rsc9p/Yml127p nachgewiesen werden, daß das Protein unter der Kontrolle eines konstitutiven wie auch seines eigenen Promotors in allen Phasen des Zellzyklus ausschließlich im Nukleus lokalisiert war. Angesichts der Funktion des RSC-Komplexes in der Umstrukturierung der Chromatinordnung im Nukleus erscheint dieses Ergebnis mehr als schlüssig und stimmt mit den Beobachtungen des GFP-markierten Bäckerhefe-Homologs von Damelin und Kollegen

überein (Damelin *et al.*, 2002). Ebenso konnte in einer proteomweiten Lokalisationsstudie in demselben Organismus eine Kernlokalisierung und eine Kopienzahl von ca. 2600 Molekülen pro Zelle festgestellt werden (Huh *et al.*, 2003). Diese hohe Zahl spiegelt das breite Aufgabenspektrum des RSC-Komplexes und das Agieren an vielen Loci in der Bäckerhefe wider. In der *ScRSC9*-Studie wurden durch Chromatin-Immunpräzipitation mit anschließender Microarray-Analyse Loci identifiziert, an die ScRsc9p während normaler Wachstumsbedingungen bindet. Dabei fand man vorwiegend Ribosomen-assoziierte Gene, Gene der Streß-Antwort sowie Gene des Zellzyklus wie Histone und Cycline von dem Protein besetzt (Damelin *et al.*, 2002). Ferner konnten sie, wie auch in anderen Studien des RSC-Komplexes gezeigt (Angus-Hill *et al.*, 2001; Koyama *et al.*, 2004), bei Rapamycin-Behandlung, das den TOR-Signalweg inhibiert, sowohl eine Aktivierung als auch Reprimierung von Genen feststellen, die mit dem ScRsc9p assoziiert waren. Neben der transkriptionellen Regulation von Genen spielt der Komplex auch eine Rolle bei den Prozessen der Mitose selbst, wie der Chromosomen-Segregation durch die Anlagerung des RSC-Komplexes an Zentromer-DNA und bei der Adhäsion der Schwesterchromatiden (Hsu *et al.*, 2003; Huang *et al.*, 2004), und auch bei der Organisation des Zytoskeletts und der Mikrotubuli scheint der RSC-Komplex involviert zu sein (Chai *et al.*, 2002). Über die Kopienzahl in *C. albicans* kann nach den hier vorgestellten Ergebnissen keine Aussage getroffen werden. Jedoch zeigte sich in den Untersuchungen hinsichtlich der Zellmorphologie, Knospung und des Zellzyklus, daß auch in *C. albicans* weitreichende Funktionen vom *RSC9/YML127*-Gen und damit eines putativen RSC-Komplexes in diesem Organismus bewerkstelligt werden. So konnte man bei der Betrachtung der Zellmorphologie der induzierten *rsc9/yml127*-defizienten Zellen erkennen, daß nach der Erschöpfung des Genprodukts die Steuerung zwischen isotropem und apikalem Wachstum nicht mehr adäquat ablaufen konnte, weil die Zellen bei den letzten Zellgenerationen eine verstärkt elongierte Zellform aufwiesen. In der Literatur finden sich zwar keine Beschreibungen eines solchen Phänotyps bei RSC-Mutanten in *S.cerevisiae*, aber zumindest ein ähnlicher Effekt, nämlich das Vorhandensein vergrößerter Knospen, ist bei den Mutanten des Bäckerhefe-Homologs und weiteren RSC-Genen erwähnt (Angus-Hill *et al.*, 2001; Cao *et al.*, 1997; Damelin *et al.*, 2002). Darüber hinaus bemerken diese Autoren die Anhäufung von vielfach knospenden Zellen. Auch die *C. albicans rsc9/yml127*-Mutanten zeigten diesen Defekt in der Zellteilung. Bei der Frage, wie diese Defekte zustande kommen können, kann zum einen angeführt werden, daß RSC allgemein und auch speziell ScRsc9p an der transkriptionellen Regulation von Zellwand-Genen beteiligt ist (Angus-Hill *et al.*, 2001; Damelin *et al.*, 2002). Außerdem

waren Doppelmutanten des Gens für die Proteinkinase C, einem Regulator der Zellwandbiosynthese, und des *RSC3*-Gens in der Bäckerhefe letal (Angus-Hill *et al.*, 2001), so daß sich von einer Rolle des RSC für die Zellwandintegrität ausgehen läßt. In Übereinstimmung dazu zeigen die *rsc9/yml127*-defizienten Zellen in *C. albicans* zum Teil auch ein scheinbares „Zusammenwachsen“ von Mutter- und Tochterzelle, was aufgrund von mangelnder Zellwandstabilität zustande kommen kann. Zum anderen könnte aber auch eine Misorganisation des Aktin-Zytoskeletts, wie bei temperatursensitiven Mutanten der ATPase-Einheit des RSC in der Bäckerhefe beschrieben, die Deformierung der Mutanten verursachen (Chai *et al.*, 2002). Demnach ist es jedoch verwunderlich, daß die induzierten M6-Stämme bei der Überführung in hypheninduzierendes Medium offensichtlich normale Keimschläuche ausbilden konnten. Möglicherweise wirken die dafür nötigen Signalwege unabhängig von RSC und Rsc9p/Yml127p. Das Auftauchen mehrfach knospender Zellen kann darüber hinaus durch eine Expressionskontrolle von Genen, welche die Ausbildung neuer Knospen steuern, vermittelt über den RSC-Komplex erklärt werden. Dies muß jedoch auch im Zusammenhang mit dem Zellzyklus gesehen werden, da für ein normales Wachstum eine passende Koordination zwischen Mitose und Zytokinese gegeben sein muß. Den Färbungen der Zellkerne induzierter *rsc9/yml127*-Mutanten zufolge war auch der Zellzyklus durch die Gendelektion beeinträchtigt. Eine Funktion des RSC-Komplex für den Fortschritt des Zellzyklus durch die G₂/M-Phase ist in einigen Mutanten seiner Komponenten, ScNps1p/ScSth1p, ScSfh1p, ScRsc3p und ScRsc9p, in der Bäckerhefe beschrieben (Angus-Hill *et al.*, 2001; Cao *et al.*, 1997; Damelin *et al.*, 2002; Du *et al.*, 1998; Tsuchiya *et al.*, 1992). Dieser Arrest ist gekennzeichnet durch groß knospende oder vielfach knospende Zellen, bei denen die Knospen keine Nuklei mehr besitzen. Ihr DNA-Gehalt ist vom normalerweise haploiden zum diploiden Chromosomensatz hin verschoben. Auch bei den *C. albicans rsc9/yml127*-Mutanten ist die Tendenz zu vergrößerten und verlängerten Knospen sowie zu vielfach knospenden Zellen gegeben. In einigen dieser Knospen konnte auch die Abwesenheit eines Zellkerns nachgewiesen werden, was einen Hinweis auf den Arrest des Zellzyklus vor der Mitose liefert. Eine Analyse des DNA-Gehaltes über FACS („fluorescence associated cell sorting“) könnte Aufschluß darüber geben, ob die Replikation schon stattgefunden hat und somit ein G₂/M-Arrest in diesen Zellen vorliegt. Zugleich konnten aber auch Zellen mit kleineren Knospen entdeckt werden, in denen die Mitose offensichtlich schon abgeschlossen war, da zwei räumlich getrennte DNA-Signale detektiert werden konnten, ohne daß aber der neu gebildete Kern in die Tochterzelle migriert war. Dabei könnte es sich um indirekte Effekte bedingt durch das verstärkt apikale oder isotope Wachstums handeln.

Andererseits könnte dies auch mögliche Ursachen in der fehlerhaften Ausbildung und im Wirken des Spindelapparates während der Mitose haben. Chai und Kollegen konnten bei einer temperatursensitiven Mutante der ATPase-Untereinheit ScSth1p des RSC-Komplexes neben Defekten im Aktin-Zytoskelett auch eine Hypersensitivität gegenüber einem Mikrotubuli-Hemmstoff feststellen, was eine solche Möglichkeit auch für die *C. albicans* *rsc9/yml127*-Mutanten bekräftigt (Chai *et al.*, 2002). Generell scheint der Zellzyklus kurz vor G₂/M oder während der Mitose gestört zu sein, so daß keine korrekte Migration der Zellkerne stattfinden konnte. Kürzlich wurde von Hsu und Kollegen die Anlagerung des *S. cerevisiae* RSC-Komplexes an die Kinetochore mitotischer Zellen nachgewiesen (Hsu *et al.*, 2003), und Huang *et al.* konnten kürzlich zeigen, daß RSC für die Zellzyklus-abhängige Assoziation von Cohäsin an die Chromosomenarme benötigt wird, wobei im Falle eines RSC-Defektes sich die Schwesterchromatiden bei der Mitose verfrüht voneinander trennten (Huang *et al.*, 2004). Genauso gibt es im Menschen Beweise dafür, daß der homologe RSC-Komplex durch Anlagerung an die Kinetochore an der Chromosomen-Segregation beteiligt ist (Xue *et al.*, 2000). Jedoch sollte man auch eine mögliche Funktion von Rsc9p/Yml127p in die transkriptionelle Regulation in die Überlegung miteinbeziehen. Das Genprodukt könnte durch die Interaktion mit Transkriptionsfaktoren den RSC-Komplex an spezifische Loci dirigieren, wodurch Zellzyklus-abhängige Gene aktiviert oder reprimiert werden, wie es bereits für das Bäckerhefe-Homolog nachgewiesen werden konnte (Damelin *et al.*, 2002). Die zahlreichen Beispiele einer Assoziation des RSC-Komplex mit dem Zellzyklus und der Mitose machen auch ähnliche Funktionen für das essentielle *RSC9/YML127*-Gen in einem homologen *C. albicans* RSC-Komplex wahrscheinlich und sind möglicherweise entscheidend für den letalen Phänotyp der Gendeletion bzw. eines Funktionsverlustes des RSC.

Zusammenfassend liefern die Ergebnisse viele Hinweise auf eine Zugehörigkeit des *RSC9/YML127*-Genprodukts zu einem homologen RSC-Komplex in *C. albicans*. Jedoch sollte man für einen sicheren Nachweis einen möglichen assoziierten Komplex beispielsweise durch Koimmunpräzipitation isolieren und die einzelnen Komponenten auf ihre Homologie bezüglich der Kernbestandteile bei *S. cerevisiae* überprüfen. Danach könnten weiterführende funktionelle Analysen wie beispielsweise die Aufdeckung des Verteilungsmusters von Rsc9p an genomische Loci unternommen werden.

YPR143 ist in die Prozessierung der ribosomalen RNA involviert

In dieser Arbeit wurde das bislang sowohl in der Bäckerhefe als auch in *C. albicans* uncharakterisierte Gen *YPR143* untersucht. Man kannte aus *S. cerevisiae* lediglich Hinweise auf dessen mögliche Aufgaben in der rRNA-Prozessierung durch eine Lokalisierung im Nukleolus sowie der Tatsache, daß sich das Gen *YPR143* unter rRNA-Prozessierungsrelevanten Genen befand, deren heterozygote Mutanten sich hypersensitiv gegenüber 5-Flucytosin und 5-Fluoruracil verhielten (Huh *et al.*, 2003; Lum *et al.*, 2004). Angesichts der Essentialität einer funktionierenden Translationsmaschinerie für jede Zelle ist es verständlich, daß Störungen in den komplexen Reifungsprozessen der rRNA nur schwerlich toleriert werden können. Viele der darin involvierten Proteine und kleine nukleoläre RNAs (snoRNAs) sind deshalb ebenso essentiell für das Überleben des Pilzes, wie es auch für das Protein Ypr143p in *C. albicans* nachgewiesen werden konnte. Die Autoren Lum *et al.* finden das Bäckerhefe-Homolog in einer funktionellen Gruppe mit Proteinen, die entweder Komponenten des sogenannten Exosoms sind, eines konservierten Komplexes, der für die 3'Prozessierung der 5.8S rRNA sowie der snoRNAs benötigt wird, oder die an der 25S rRNA-Prozessierung oder des 60S Ribosomenaufbaus beteiligt sind (Lum *et al.*, 2004). Daß *C. albicans* Ypr143p ebenso in diese Prozesse involviert ist, wurde anhand von Northernblot-Hybridisierungen mit prä-rRNA-spezifischen Sonden aufgedeckt. Verschiedene rRNA-Zwischenstufen, darunter das 35S Primärtranskript, die 27S- und die 7S rRNA-Vorstufe, waren in den *ypr143*-defizienten Stämmen im Gegensatz zu den Kontrollstämmen akkumuliert. Außerdem konnte man ein fehlerhaftes Produkt von einer Größe über 20S nachweisen. Daraus kann man ableiten, daß die Prozessierung der prä-rRNAs nicht korrekt und verzögert ablief. Bei welchen Schritten der Prozessierung eine Störung auftrat, ist unklar, da sowohl das Primärtranskript als auch Produkte in den nachfolgend getrennt verlaufenden Wegen für die Reifung der rRNAs für die kleine (>20S-Produkt) und die große Ribosomenuntereinheit (27S-, 7S-Intermediate) von einer Akkumulierung betroffen waren. Die Anhäufung des >20S Produktes kann nur durch ein Fehlen der 5'ETS-Spaltung zustande kommen und erinnert an das in der Bäckerhefe beschriebene 23S-Produkt, das den gesamten 5'ETS-Bereich, die 18S rRNA und einen großen Teil der ITS1 umfaßt, und bei dem außerdem eine fehlerhafte Spaltung zu weit im 3'-Bereich des ITS1 erfolgt ist (Venema and Tollervey, 1999). Dadurch ist die 18S rRNA-Synthese blockiert, da das fälschliche Produkt normalerweise durch das Exosom abgebaut wird (Zanchin and Goldfarb, 1999). Eine Differenz in den relativen Mengen der reifen 18S und 25S rRNAs ließ sich allerdings nicht

feststellen. Jedoch ist beschrieben, daß ein solcher Defekt in der 18S rRNA-Synthese oft einhergeht mit Mutationen, die die Synthese der reifen 25S und 5.8S rRNAs betreffen (Venema and Tollervey, 1999). Venema und Tollervey sprechen von einer Art „Feedback“-Kontrolle, wodurch als Konsequenz einer Störung in der Reifung der rRNAs für die große Ribosomenuntereinheit auch die frühen Abläufe in der 18S rRNA-Reifung verlangsamt werden (Venema and Tollervey, 1999). Somit wäre es denkbar, daß der Gehalt beider rRNAs, der 18S und der 25S rRNA gleichermaßen abfiel, so daß man beim Einsatz gleicher RNA-Konzentrationen im Experiment keinen Unterschied zu den Kontrollstämmen detektieren konnte. Andererseits läßt sich eine Funktion von Ypr143p für die Synthese beider rRNA-Untereinheiten nicht ausschließen.

Die Tatsache, daß sich neben 27SB-Intermediaten eine 27SA-Spezies anhäuft, die auch über die ITS1-spezifische Sonde detektiert werden konnte, könnte auf einen Defekt in einer 5'→3' Exonukleaseaktivität hinweisen, die in der Bäckerhefe für die Generierung des 27SB-Vorläufers verantwortlich ist (Henry *et al.*, 1994). Auch in einer kürzlich veröffentlichten Studie von Pertschy und Kollegen wurde infolge einer Diazaborin-Behandlung eine Anhäufung eines frühen 27S-Produkts beschrieben und mit der Fehlfunktion eines Proteins Nop4p in Verbindung gebracht (Pertschy *et al.*, 2004). Bei Nop4p handelt es sich um ein essentielles RNA-Bindeprotein, das für die 60S Ribosomenprozessierung nötig ist und Bestandteil eines frühen prä-60S-Komplexes ist (Fatica *et al.*, 2002; Sun and Woolford, 1994). Interessanterweise erwies sich eine *NOP4*-heterozygote Mutante ebenfalls hypersensitiv gegenüber 5-Flucytosin wie auch das *YPR143*-Gen (Lum *et al.*, 2004), was die Möglichkeit einer funktionellen Verwandtschaft bzw. einer Kooperation unterstreicht. Allerdings resultierte eine *NOP4*-Mutation auch in einer Verringerung der nachfolgenden 27S-Vorstufen. Ob dies auch bei der hier untersuchten *ypr143*-defizienten Mutante der Fall ist, müßte noch genauer durch die Differenzierung der in *C. albicans* vorkommenden 27S-Spezies und Bestimmung ihrer Mengenverhältnisse zueinander beispielsweise durch „primer extension“-Experimente untersucht werden. In der Northern-Hybridisierung zeigte sich das 7S rRNA-Transkript ebenfalls im Gegensatz zu den Kontrollstämmen YPR143M8A und B in den induzierten M6-Stämmen akkumuliert. Im Ablauf der rRNA-Reifung in der Bäckerhefe trifft man bei diesem Schritt auf das Exosom, das den 3'→5' exonukleolytischen Abbau zum reifen 5.8S rRNA-Produkt hin ausführt (Mitchell *et al.*, 1997; Venema and Tollervey, 1999). Beispiele von Mutationen in Exosom-Komponenten belegen einen solchen Phänotyp. Im übrigen finden sich bei diesen auch das 23S-Produkt sowie ein allmählicher Verlust der reifen 5.8S rRNA, und fast alle der bislang identifizierten und charakterisierten Untereinheiten des

Exosoms sind überlebensnotwendig (Mitchell *et al.*, 1997). Obwohl der Gehalt an reifer 5.8S rRNA nicht überprüft wurde, kann man aufgrund der hohen Konserviertheit des Exosom-Komplexes in Eukaryonten und aufgrund der 7S- und >20S-Phänotypen eine Funktion des Ypr143p in diesem Kontext einräumen.

Die Suszeptibilitätsversuche mit den heterozygoten Stämmen YPR143M2A und B sowie YPR143M8A und B gegenüber den Substanzen 5-Flucytosin und Cycloheximid konnten zeigen, daß sie sich deutlich in ihrer Sensitivität zu den entsprechenden Kontrollstämmen unterschieden, welche die normale Gendosis aus beiden *YPR143*-Allelen aufwiesen. Dies stimmt mit den Beobachtungen an heterozygoten *S. cerevisiae*-Mutanten von Lum *et al.* überein, daß dieser Wirkstoff wie auch sein Derivat 5-Fluoruracil eine Hypersensitivität durch die halbe Dosis an *ScYPR143* hervorrief, neben einer Reihe anderer Gene, die für die rRNA-Prozessierung nötig sind, und dem bereits bekannten Angriffsziel *CDC21* (Lum *et al.*, 2004). Auch dieser Befund spricht dafür, daß man *YPR143* in dieselbe funktionelle Gruppe der rRNA-Prozessierung eingliedern kann. Die Hypersensitivität der Gendosis-reduzierten Stämme gegenüber Cycloheximid, das die Peptidyltransferaseaktivität der 60S-Ribosomenuntereinheit inhibiert (Stocklein and Piepersberg, 1980) und somit auf einer der rRNA-Reifung nachfolgenden Stufe fungiert, unterstützt zum einen diese Hypothese, jedoch deutet es auch darauf hin, daß sich ein Defekt in der Ribosomenreifung bis hin zum eigentlichen Translationsgeschehen im Cytoplasma ausprägt, obwohl die *ypr143*-defizienten Zellen anscheinend einen normalen Status an reifen 18S und 25S rRNAs besaßen. Ein Beispiel hierfür lieferten Rosado und de la Cruz in ihrer Studie, in der sie einen neuen nukleolären, trans-agierenden Faktor in der Ribosomenreifung Npa1p bei *S. cerevisiae* vorstellten, dessen langsam wachsende Mutante ebenso eine verstärkte Sensitivität gegenüber Cycloheximid aufwies und trotz normaler Akkumulierung der reifen 5.8S und 25S rRNAs einen Defekt in der 27S-Prozessierung zeigte (Rosado and de la Cruz, 2004).

Was die Rolle des Ypr143p in der Zellmorphologie betrifft, ist in Betracht der vorangehenden Ausführungen davon auszugehen, daß es sich um sekundäre Effekte aufgrund einer defekten Translation handelt. Proteine können nicht mehr auf adäquate Weise synthetisiert werden und als Folge dessen findet eine Degeneration der Zellen und auch der Zellform statt. Indirekte Wirkungen könnten zwar auch in bezug auf den Zellzyklus zutreffen, jedoch gibt es in der Literatur einige Belege dafür, daß Proteine, die in der Ribosomen-Biosynthese involviert sind, auch eine Funktion in der Regulation des Zellzyklus haben (Du and Stillman, 2002; Oeffinger and Tollervey, 2003; Pestov *et al.*, 2001). Umgekehrt wurde eine Deregulation der Ribosomen-Biosynthese mit unkontrolliertem Wachstum und Tumorentstehung in Säuger-

Zellen in Verbindung gebracht (Ruggero and Pandolfi, 2003). Für andere Proteine wie das nukleoläre, an das Prä-60S-Ribosom assoziierte Npa1p ist eine Interaktion im Zwei-Hybrid-System mit dem wichtigen Zellzyklus-Regulator Cdc28p beschrieben worden (Uetz *et al.*, 2000). Deshalb könnten die Defekte im Zellzyklus, die bei den *ypr143*-defizienten Zellen beobachtet wurden, genauso auf einem direkten Einfluß des Genprodukts auf die Steuerung des Zellzyklus beruhen. Außerdem wurde bereits erwähnt, daß das bekannte Target von 5-Flucytosin und 5-Fluoruridin die Thymidylat-Synthase ist, die als weiterer Faktor der Zellzyklus-Regulation für den Fortschritt des mitotischen Zyklus in der S-Phase von Bedeutung ist (Hardman *et al.*, 2001). Die Autoren Lum *et al.* erwähnen sogar, daß unpublizierten Ergebnissen zufolge 5-Fluoruracil die G₂/M-Phase des Zellzyklus verlängert und daß dieser Effekt durch Mutationen im Exosom noch verstärkt wird (Lum *et al.*, 2004). Dies würde bedeuten, daß das Exosom Einfluß auf die Koordination des Zellzyklus hat. In den *ypr143*-defizienten Zellen konnten oftmals fehlende Nuklei in den unnormale großen Knospen festgestellt werden, was auf einen G₂/M-Arrest schließen läßt. Somit wäre es durchaus denkbar, daß Ypr143p als möglicher Bestandteil eines *C. albicans* Exosoms ein Bindeglied zwischen der rRNA-Prozessierung und der Zellzyklus-Regulation darstellt.

Yml93p stellt ein Homolog des ScUtp14 dar, einer Komponente des SSU-Prozessoms, und ist in die Prozessierung der ribosomalen RNA involviert

Während dieser Arbeit wurde eine Studie veröffentlicht, in der das homologe Protein ScYml93p in *S. cerevisiae* zusammen mit weiteren 17 bislang uncharakterisierten Proteinen als Bestandteil des U3 Ribonukleoprotein-Komplexes (RNP-Komplex) vorgestellt wurde (Dragon *et al.*, 2002). In Anlehnung an die spezifische Interaktion mit der U3 „small nucleolar RNA“ (snoRNA) wurde es als Utp14p benannt. Dieser Komplex wurde als „small subunit“ (SSU) Prozessom bezeichnet und umfaßt insgesamt 28 nicht-ribosomale sowie fünf ribosomale Proteine der kleinen Ribosomenuntereinheit. Die nicht-ribosomalen Proteine Utp1p bis Utp17p sind mit einer Ausnahme essentiell für das Überleben des Pilzes und im Nukleolus lokalisiert. In Übereinstimmung dazu konnte für das *C. albicans*-Homolog ebenfalls eine Essentialität festgestellt werden, da keine homozygot deletierten Mutanten des *UTP14/YML93*-Gens isoliert werden konnten. Erst die Konstruktion einer konditional letalen Mutante ermöglichte die Analyse der Effekte auf die Zellen infolge einer Erschöpfung des Genprodukts, welche primär die Prozesse in der Reifung der rRNAs betreffen. Dragon und Kollegen konstatieren nach konditionaler Repression des *ScUTP14*-Gens nach 24 Stunden

eine Dezimierung der reifen 18S rRNA. Die hier untersuchte konditionale *C. albicans* Mutante von *UTP14/YML93* zeigte dagegen keine auffallende Reduktion der 18S rRNA. Allerdings ist anzumerken, daß hier die RNA-Ernte nach erfolgter Induktion schon nach acht Stunden Inkubation in YPD-Medium stattfand, weshalb sich die Reduktion der 18S rRNA relativ zur 25S rRNA möglicherweise noch nicht detektieren ließ. Auf eine längere Inkubation wurde jedoch bewußt verzichtet, da aufgrund der Induktionsrate von 80 bis 90% die sich vermehrenden nicht-induzierten Zellen das Resultat bei längerer Inkubationsdauer immer mehr verfälscht hätten. Auch die Befunde, daß eine deutliche Veränderung in der Zellmorphologie relativ spät auftrat und daß die Zellen noch einige Zellteilungen bis zum Arrest durchliefen, lassen auf eine längere Dauer schließen, bis das Genprodukt in den Zellen aufgebraucht war und schwerwiegende Phänotypen ausgeprägt wurden. Allerdings konnte anhand des momentanen Status der prä-rRNA-Intermediate festgestellt werden, daß die rRNA-Prozessierung im Gegensatz zum Wildtyp SC5314 auch schon nach acht Stunden nachhaltig gestört war. Das 35S-Primärtranskript, das 32S-Folgetranskript sowie 27S-Derivate und ein >20S-Produkt waren in den induzierten YML93M6-Stämmen, aber auch in schwächerem Maße in den YML93M8-Stämmen akkumuliert. Die Verzögerung der ersten endonukleolytischen Spaltungen des Primärtranskriptes und die Entstehung eines fehlerhaften Produktes >20S, das aus fehlenden frühen Spaltungen resultieren könnte und bei *S. cerevisiae* wohl dem beschriebenen 23S-Transkript entspricht, sind deutliche Anzeichen für eine defekte 18S rRNA-Prozessierung und kommen bei fast allen bekannten Komponenten des U3 snoRNP-Komplexes vor (Venema and Tollervey, 1999). Dieses fehlerhafte Produkt kann nicht zur reifen 18S rRNA weiterprozessiert werden, sondern wird umgehend von dem Exosom abgebaut (Zanchin and Goldfarb, 1999), was auch die geringere Stärke der Bande relativ zur 27S-Akkumulation erklären würde. Die Detektion einer akkumulierten prä-27S rRNA-Bande erfolgte nicht nur bei der Hybridisierung mit der ITS1-spezifischen Sonde, sondern auch sehr stark bei der Hybridisierung mit der ITS2-spezifischen Sonde, was eine Verzögerung in der Prozessierung sowohl der längeren 27SA-Spezies, die noch einen 3' *ITS1*-Bereich besitzt, als auch der kürzeren 27SB-Spezies, in der bereits ein reifes 5'-Ende der 5.8S rRNA vorliegt, bedeutet. Ein vergleichbares Bild mit 35S-, 23S- und 27S-Akkumulation zeigt sich bei einer Studie über die RNA-Helikase Has1p in der Bäckerhefe, die für die Biosynthese der 40S Ribosomenuntereinheit benötigt wird, aber zugleich auch eine Rolle für die Reifung der 60S-Ribosomen rRNAs zu spielen scheint (Emery *et al.*, 2004). Obwohl für das ScUtp14 keine Interaktion mit einem 60S prä-ribosomalen Partikel beschrieben worden ist und Komponenten für die 60S-Ribosomen-Reifung oftmals nicht in dem frühen 90S prä-

ribosomalen Partikel assoziiert sind (Grandi *et al.*, 2002), der sich kotranskriptionell an das Primärtranskript anlagert, sprechen die hier vorgestellten Ergebnisse für eine zumindest indirekte Beeinflussung der 60S-Ribosomen-Biogenese durch die *UTP14/YML93*-Gendeletion in *C. albicans*. Dragon und Kollegen finden in der Aminosäuresequenz von ScUtp14 eine Domäne für eine ATP/GTP-Bindestelle (Dragon *et al.*, 2002), die wahrscheinlich für eine katalytische Aktivität wie beispielsweise in den RNA-Helikasen benötigt wird. Da solche Enzyme überaus wichtig sind für die korrekte strukturelle Organisation ihrer RNA-Substrate, um sie beispielsweise für Endonukleasen oder Modifikationen zugänglich zu machen, kann eine transiente Assoziation auch mit dem 60S prä-ribosomalen Komplex, in dem sich auch die 27S-rRNA-Vorstufe befindet, nicht ausgeschlossen werden. Ein solcher Fall wäre aufgrund der Konserviertheit auch für das *C. albicans*-Homolog denkbar.

Wie bereits erwähnt, zeigten die M8-Stämme mit nur einer *YML93*-Genkopie bei den ITS-Hybridisierungen ein abgeschwächtes Muster, das dem Phänotyp der *yml93*-defizienten M6-Stämme entsprach. Sowohl die 35/32S-Banden, als auch die 27SB-Banden bei der ITS2-Hybridisierung und die aberrante >20S-Bande erscheinen im Gegensatz zu den Verhältnissen im Wildtyp akkumuliert. Dies kann auf einen Haploinsuffizienz-Effekt hindeuten, weil eventuell für eine adäquate Funktion des Genprodukts in der rRNA-Prozessierung zwei intakte Genkopien benötigt werden. Ebenso kommt ein Gendosis-Effekt bei der Untersuchung der Suszeptibilitätsgrenzen der M8-Stämme, aber auch der Uridin-auxotrophen M2-Stämme gegenüber 5-Flucytosin und Cycloheximid zum Ausdruck. Genauso wie bei *YPR143* waren die Stämme mit nur einer *YML93*-Kopie wesentlich sensitiver als ihre *YML93*-homozygoten isogenen Kontrollstämme gegenüber den Hemmstoffen, die zum einen den rRNA-Metabolismus stören (Lum *et al.*, 2004) und zum anderen die Ribosomenaktivität inhibieren (Stocklein and Piepersberg, 1980), und untermauern somit die funktionelle Einordnung des Gens in die rRNA-Prozessierung.

Als sekundäre Effekte der *UTP14/YML93*-Gendeletion sind wie schon bei der *YPR143*-Gendeletion die Veränderungen in der Zellmorphologie zu werten, die allerdings verglichen mit den YPR143M6-Stämmen weniger schwerwiegend ausfielen. Die induzierten Zellen wurden rundlicher und größer, bis sie nach einigen Knospungen das Wachstum einstellten. Daneben neigten die Zellen zu einer stärkeren gegenseitigen Adhärenz als es bei Wildtyp-Zellen der Fall war (nicht gezeigt). Dies konnte im übrigen auch für die heterozygoten *YML93*M8-Stämme festgestellt werden, was die Hypothese unterstützt, daß diese Zellen einen abgeschwächten Phänotyp aufgrund der halben *YML93*-Gendosis, also einer

Haploinsuffizienz, ausprägten. Die Befunde aus den Zellkernfärbungen ähneln stark den Anomalien der *ypr143*-defizienten Zellen, was eine ähnliche Einflußnahme der beiden Gene auf den mitotischen Zellzyklus unterstreicht. Dazu wurden bei der Diskussion zum *YPR143*-Gen bereits einige Beispiele für direkte Verbindungen zwischen der Ribosomenbiogenese und der Zellzyklus-Regulation genannt. Darüber hinaus soll erwähnt werden, daß ein weiterer Vertreter des SSU Prozessoms, ScUtp17p, assoziiert an den sogenannten RENT-Komplex aufgereinigt wurde, in dem der Zellzyklus-Regulator ScCdc14p im Nukleolus zum Austritt aus der Mitose gebunden wird (Dragon *et al.*, 2002; Shou *et al.*, 1999). Außerdem wurde bei dem Protein ScKrr1p, bei dem eine physikalische Assoziation mit dem 90S prä-ribosomalen Partikel nachgewiesen worden ist und der in die 18S rRNA-Synthese involviert ist (Grandi *et al.*, 2002; Gromadka and Rytka, 2000), eine mögliche Rolle im S-Phasen-„checkpoint“ eingeräumt (Kondoh *et al.*, 2000). Diese Beispiele belegen, daß auch Faktoren, die an der Reifung der kleinen Ribosomenuntereinheit beteiligt sind, auf direkte Weise in den Zellzyklus eingreifen können. Die hier vorgestellten Daten lassen darauf schließen, daß Utp14p neben der Funktion in der rRNA-Reifung ebenso in der Regulation des Zellzyklus mitwirken könnte, zumal Karkusiewicz *et al.* kürzlich bei der Bäckerhefe eine Interaktion von Krr1p mit Utp14p im Zwei-Hybrid-System nachweisen konnten (Karkusiewicz *et al.*, 2004).

Ausblick auf die Analyse essentieller Gene in *C. albicans* im allgemeinen und der hier untersuchten Gene im besonderen

Die Untersuchungen der zu Beginn dieser Arbeit uncharakterisierten Gene *YML127*, *YPR143* und *YML93* in *C. albicans* wurde mit der Intention begonnen, attraktive Ziele für die Entwicklung neuer Antimykotika zu entdecken, da das Aufkommen von *Candida*-Infektionen und die Entstehung resistenter *Candida*-Stämme ein immer größer werdendes Problem darstellen. Als Basis dafür wurden die Gene aus der nahverwandten und besser untersuchten Bäckerhefe *S. cerevisiae* nach bestimmten Kriterien ausgewählt, unter anderem der Essentialität und keine signifikante Homologie zu Genen von Vertebraten oder *Caenorhabditis elegans*. Nachdem die entsprechenden homologen *C. albicans*-Gene durch BLAST-Analyse identifiziert worden waren und deren Essentialität für das Überleben nachgewiesen worden war, erforderte deren Charakterisierung die Anwendung eines Systems, das konditionale Mutanten dieser Gene herstellt. Hierfür wurde das System der induzierbaren, FLP-Rekombinase-vermittelten Gendelektion ausgewählt (Michel *et al.*, 2002), da es eine effiziente Methode darstellt, mit der man eine Population von unabhängigen, echten

Nullmutanten erhält, mit denen man gezielten Fragestellungen nachgehen kann, so wie es im Falle der YPR143- und der YML93-Stämme erfolgt ist. Darüber hinaus ermöglicht dieser Ansatz aber auch eine Durchführung genomweiter Transkriptom- und Proteomanalysen, da nach der Induktion ausreichend Zellmaterial zur Verfügung steht, das daraufhin unter verschiedensten Bedingungen getestet werden kann. Da Datenverarbeitungsmöglichkeiten aufgrund der seit wenigen Jahren bekannten Genomsequenz von *C. albicans* und Verbesserungen in der Massenspektrometrie-Technologie groß angelegte Analysen erlauben, könnten so wertvolle Erkenntnisse auch über Gene gewonnen werden, deren Funktionen noch vollkommen unerforscht sind.

Die funktionelle Analyse der untersuchten konditional letalen Mutanten des *RSC9/YML127*- und *UTP14/YML93*-Gens erfolgte nach Annotierung der homologen Gene in *S. cerevisiae* (Damelin *et al.*, 2002; Dragon *et al.*, 2002), und auch für das *YPR143*-Gen lagen zu einem späteren Zeitpunkt Hinweise für eine funktionelle Einordnung vor (Lum *et al.*, 2004). Dennoch können die vorgestellten Ergebnisse nur einen Einblick in die Rollen der Genprodukte geben, die sie in den lebensnotwendigen Prozessen des Pilzes spielen. Für eine bessere Charakterisierung müssten jedoch noch weitere Untersuchungen erfolgen. Im Fall des *RSC9/YML127* könnte beispielsweise zum Nachweis der Zugehörigkeit zu einem RSC-Komplex in *C. albicans*, der noch nicht beschrieben worden ist, eine Koimmunpräzipitation erfolgen. Außerdem könnte man mit Hilfe von trunkierten oder punktmutierten Konstrukten die Bedeutung einzelner Domänen im Rsc9p-Protein für seine Funktionalität beurteilen. Für die beiden Gene *YPR143* und *UTP14/YML93* bieten sich Lokalisationsstudien mit markierten Proteinen an. Aber auch die Identifikation von assoziierten Proteinen sowie von gebundenen prä-rRNAs oder snoRNAs wie die U3 snoRNA durch Immunpräzipitationen (Venema *et al.*, 1998), oder die Erstellung von Sedimentationsprofilen mit der Quantifizierung der ribosomalen Untereinheiten über Saccharose-Gradienten (Kressler *et al.*, 1997) wären hilfreich für eine präzisere Eingliederung in die Geschehnisse der rRNA-Reifung.

Bei den untersuchten essentiellen Genen sind mit dem „chromatin remodeling“ und der rRNA-Prozessierung Abläufe betroffen, die zwar in allen eukaryontischen Organismen anzutreffen sind, aber offensichtlich doch wesentliche Unterschiede in höheren und niederen eukaryontischen Organismen aufweisen, da für die untersuchten Proteine keine konservierten Homologe in höheren Eukaryonten entdeckt werden konnten. Deshalb würden spezifische Hemmstoffe gegen ihre Genprodukte voraussichtlich auch nicht gegen menschliche Zellen wirksam sein. Ein spezifisches Wirkungsspektrum und eine damit gegebene gute Verträglichkeit stellen eine überaus wünschenswerte Eigenschaft eines Antimykotikums dar.

Als Einschränkung der Nutzbarkeit ist dagegen eventuell die Assoziation der vorgestellten Genprodukte in größeren Proteinkomplexen und die Lokalisation im Nukleus anzusehen, was einen Zugang antifungaler Agenzien möglicherweise erschweren könnte. Dennoch sollten sich die entsprechenden Genprodukte prinzipiell als Angriffsziele für die Entwicklung neuer antimykotischer Medikamente eignen. Darüber hinaus trägt eine fundierte Grundlagenforschung in jedem Fall dazu bei, die Voraussetzungen für eine erfolgreiche Bekämpfung des Keimes zu schaffen. So wurden in dieser Arbeit wertvolle Erkenntnisse über noch unerforschte, aber essentielle zellbiologische Prozesse in *C. albicans* gewonnen.

6 Literaturverzeichnis

- Aaron, K. E., Pierson, C. A., Lees, N. D., Bard, M. (2001)** The *Candida albicans* *ERG26* gene encoding the C-3 sterol dehydrogenase (C-4 decarboxylase) is essential for growth. *FEMS Yeast Res* 1: 93-101.
- Albrecht, A., Felk, A., Pichova, I., Schaller, M., Kretschmar, M., Nichterlein, T. 2004.** Sap9 and Sap10 of *Candida albicans*: localization, function and their relevance for virulence, ASM Conference on Candida and Candidosis, Austin, Texas.
- Allfrey, V. G., Faulkner, R., Mirsky, A. E. (1964)** Acetylation and methylation of histones and their possible role in regulation of RNA synthesis. *Proc Natl Acad Sci* 51: 786-794.
- Angus-Hill, M. L., Schlichter, A., Roberts, D., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Cairns, B. R. (2001)** A rsc3/rsc30 zinc cluster dimer reveals novel roles for the chromatin remodeler rsc in gene expression and cell cycle control. *Molecular Cell* 7: 741-751.
- Ausubel, F., Brent, R., Kingston, R., D., M., J., S., Smith, J., Struhl, K. 1989.** *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley&Sons, New York.
- Bain, J. M., Stubberfield, C., Gow, N. A. (2001)** Ura-status-dependent adhesion of *Candida albicans* mutants. *FEMS Microbiol Lett* 204: 323-328.
- Biswas, K., Rieger, K.-J., Morschhäuser, J. (2003)** Functional characterization of *CaCBF1*, the *Candida albicans* homolog of centromere binding factor 1. *Gene* 323: 43-55.
- Blankenship, J. R. and Heitman, J. 2004.** Calcineurin enables *Candida albicans* to survive exposure to calcium in serum. ASM conference on Candida and Candidiasis (7th), Austin, Texas, Austin, Texas.
- Blankenship, J. R., Wormley, F. L., Boyce, M. K., Schell, W. A., Filler, S. G., Perfect, J. R., Heitman, J. (2003)** Calcineurin is essential for *Candida albicans* survival in serum and virulence. *Eukaryotic Cell* 2: 422-430.
- Bonilla, M., Nastase, K. K., Cunningham, K. W. (2002)** Essential role of calcineurin in response to endoplasmatic reticulum stress. *EMBO J* 21: 2343-2353.
- Brand, A., MacCallum, D. M., Brown, A. J., Gow, N. A., Odds, F. C. (2004)** Ectopic expression of *URA3* can influence the virulence phenotypes and proteome of *Candida albicans* but can be overcome by targeted reintegration of *URA3* at the *RPS10* locus. *Eukaryotic Cell* 3: 900-909.
- Braun, B. R. and Johnson, A. D. (1997)** Control of filament formation in *Candida albicans* by the transcriptional repressor, *TUP1*. *Science* 277: 105-109.
- Braun, B. R., Kadosh, D., Johnson, A. D. (2001)** *NRG1*, a repressor of filamentous growth in *C. albicans*, is down-regulated during filament induction. *EMBO J* 20: 4753-4761.
- Braun, B. R., Head, W. S., Wang, M. X., Johnson, A. D. (2000)** Identification and characterization of *TUP1*-regulated genes in *Candida albicans*. *Genetics* 156: 31-44.
- Brown, A. J. 2002a.** Expression of growth-form specific factors during morphogenesis in *Candida albicans*, pp. 87-93. In R. A. Calderone [ed.], *Candida and Candidiasis*. American Society for Microbiology Press, Washington DC.

- Brown, A. J. 2002b.** Morphogenic signaling pathways in *Candida albicans*, pp. 95-106. In R. A. Calderone [ed.], *Candida and Candidiasis*. American Society for Microbiology Press, Washington DC.
- Brown, D. H., Slobodkin, I., Kumamoto, C. A. (1996)** Stable transformation and regulated expression of an inducible reporter construct in *Candida albicans* using restriction enzyme-mediated integration. *Mol Gen Genet* 251: 75-80.
- Brown, D. H., Giusani, A. D., Chen, X., Kumamoto, C. A. (1999)** Filamentous growth of *Candida albicans* in response to physical environmental cues and its regulation by the unique *CZF1* gene. *Mol Microbiol* 34: 651-662.
- Buurman, E. T., Westwater, C., Hube, B., Brown, A. J., Odds, F. C., Gow, N. A. (1998)** Molecular analysis of CaMnt1p, a mannosyl transferase important for adhesion and virulence of *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 7670-7675.
- Cairns, B. R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Winston, F., Kornberg, R. D. (1998)** Two actin-related proteins are shared functional components of the chromatin-remodeling complexes RSC and SWI/SNF. *Mol Cell* 2: 639-651.
- Cairns, B. R., Schlichter, A., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Kornberg, R. D., Winston, F. (1999)** Two functionally distinct forms of the RSC nucleosome-remodeling complex, containing essential AT hook, BAH, and bromodomains. *Molecular Cell* 4: 715-723.
- Cairns, B. R., Lorch, Y., Li, Y., Zhang, M., Lacomis, L., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Du, J., Laurent, B., Kornberg, R. D. (1996)** RSC, an essential, abundant chromatin remodeling complex. *Cell* 87: 1249-1260.
- Calderone, R. A. and Braun, P. C. (1991)** Adherence and receptor relationships of *Candida albicans*. *Microbiol Rev* 55: 1-20.
- Calderone, R. A. and Fonzi, W. A. (2001)** Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends Microbiol* 9: 327-335.
- Cao, Y., Cairns, B. R., Kornberg, R. D., Laurent, B. C. (1997)** Sfh1p, a component of a novel chromatin-remodeling complex, is required for cell cycle progression. *Mol Cell Biol* 17: 3323-3334.
- Care, R. S., Trevethick, J., Binley, K. M., Sudbery, P. E. (1999)** The *MET3* promoter: a new tool for *Candida albicans* molecular genetics. *Mol Microbiol* 34: 792-798.
- Chai, B., Hsu, J., Du, J., Laurent, B. C. (2002)** Yeast RSC function is required for organization of the cellular cytoskeleton via an alternative *PKC1* pathway. *Genetics* 161: 575-584.
- Cheng, S., Nguyen, M. H., Zhang, Z., Jia, H., Handfield, M., Clancy, C. J. (2003)** Evaluation of the roles of four *Candida albicans* genes in virulence by using gene disruption strains that express *URA3* from the native locus. *Infection and Immunity* 71: 6101-6103.
- Cole, M. F., Bowen, W. H., Zhao, X., Cihlar, R. L. (1995)** Avirulence of *Candida albicans* auxotrophic mutants in a rat model of oropharyngeal candidiasis. *FEMS Microbiol Lett* 126: 177-180.
- Cruz, M. C., Fox, D. S., Heitman, J. (2001)** Calcineurin is required for hyphal elongation during mating and haploid fruiting in *Cryptococcus neoformans*. *EMBO J* 20: 1020-1032.

- Cruz, M. C., Sia, R. A. L., Olson, M., Cox, G. M., Heitman, J. (2000)** Comparison of the roles of Calcineurin in physiology and virulence in serotype D and serotype A strains of *Cryptococcus neoformans*. *Infection and Immunity* 68: 982-985.
- Cruz, M. C., Goldstein, A. L., Blankenship, J. R., Del Poeta, M., Davis, D., Cardenas, M. E., Perfect, J. R., McCusker, J. H., Heitman, J. (2002)** Calcineurin is essential for survival during membrane stress in *Candida albicans*. *EMBO J* 21: 546-559.
- Cunningham, K. W. and Fink, G. R. (1994)** Calcineurin-dependent growth control in *Saccharomyces cerevisiae* mutants lacking *PMCl*, a homolog of plasma membrane Ca^{2+} ATPases. *J Cell Biol* 124: 351-363.
- Cutler, J. E. (1991)** Putative virulence factors of *Candida albicans*. *Annu Rev Microbiol* 45: 187-218.
- Cyert, M. S., Kunisawa, R., Kaim, D., Thorner, J. (1991)** Yeast has homologs (*CNA1* and *CNA2* gene products) of mammalian calcineurin, a calmodulin-regulated phosphoprotein phosphatase. *Proc Natl Acad Sci* 88: 7376-7380.
- Damelin, M., Simon, I., Moy, T. I., Wilson, B., Komili, S., Tempst, P., Roth, F. P., Young, R. A., Cairns, B. R., Silver, P. A. (2002)** The genome-wide localization of Rsc9, a component of the RSC chromatin remodeling complex, changes in response to stress. *Molecular Cell* 9: 563-573.
- Davis, D. A., Bruno, V. B., Loza, L., Filler, S. G., Mitchell, A. P. (2002)** *Candida albicans* Mds3p, a conserved regulator of pH responses and virulence identified through insertional mutagenesis. *Genetics* 162: 1573-1581.
- De Backer, M. D., Nelissen, B., Logghe, M., Viaene, J., Loonen, I., Vandoninck, S., de Hoogt, R., Dewaele, S., Simons, F. A., Verhasselt, P., *et al.* (2001)** An antisense-based functional genomics approach for identification of genes critical for growth of *Candida albicans*. *Nat Biotechnol* 19: 235-241.
- de Repentigny, L. (2004)** Animal models in the analysis of *Candida* host-pathogen interactions. *Curr Opin Microbiol* 7: 324-329.
- Devasahayam, G., Chaturvedi, V., Hanes, S. D. (2002)** The Ess1 prolyl isomerase is required for growth and morphogenetic switching in *Candida albicans*. *Genetics* 160: 37-48.
- Diamond, R. D., Clark, R. A., Haudenschild, C. C. (1980)** Damage to *Candida albicans* hyphae and pseudohyphae by the myeloperoxidase system and oxidative products of neutrophil metabolism *in vitro*. *J Clin Invest* 66: 908-917.
- Douglas, L. J. (2003)** *Candida* biofilms and their role in infection. *Trends Microbiol* 11: 30-36.
- Dragon, F., Gallagher, J. E., Compagnone-Post, P. A., Mitchell, B. M., Porwancher, K. A., Wehner, K. A., Wormsley, S., Settlage, R. E., Shabanowitz, J., Osheim, Y., *et al.* (2002)** A large nucleolar U3 ribonucleoprotein required for 18S ribosomal RNA biogenesis. *Nature* 417: 967-970.
- Du, J., Nasir, I., Benton, B. K., Kladde, M. P., Laurent, B. (1998)** Sth1p, a *Saccharomyces cerevisiae* Snf2p/Swi2p homolog, is an essential ATPase in RSC and differs from Sfn/Swi in its interactions with histones and chromatin-associated proteins. *Genetics* 150: 987-1005.
- Du, Y. C. and Stillman, B. (2002)** Yph1p, an ORC-interacting protein: potential links between cell proliferation control, DNA replication and ribosome biogenesis. *Cell* 109: 835-848.

- Edlind, T., Smith, L., Henry, K., Katiyar, S., Nickels, J. (2002)** Antifungal activity in *Saccharomyces cerevisiae* is modulated by calcium signaling. *Mol Microbiol* 46: 257-268.
- Emery, B., de la Cruz, J., Rocak, S., Deloche, O., Linder, P. (2004)** Has1p, a member of the DEAD-box family, is required for 40S ribosomal subunit biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* 52: 141-158.
- Engelmann, E. 1999.** Sproßpilze, pp. 701-710. *In* H. Hahn, D. Falke, S. Kauffman, U. Ullmann [eds.], *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*. Springer Verlag Berlin Heidelberg, New York.
- Enloe, B., Diamond, A., Mitchell, A. P. (2000)** A single-transformation gene function test in diploid *Candida albicans*. *J Bacteriol* 182: 5730-5736.
- Ernst, J. F. (2000)** Transcription factors in *Candida albicans* - environmental control of morphogenesis. *Microbiology* 146: 1763-1774.
- Farcasanu, I. C., Hirata, D., Tsuchiya, E., Nishiyama, F., Miyakawa, T. (1995)** Protein phosphatase 2B of *Saccharomyces cerevisiae* is required for tolerance to manganese, in blocking the entry of ions into the cell. *Eur J Biochem* 232: 712-717.
- Fatica, A. and Tollervey, D. (2002)** Making ribosomes. *Curr Opin Cell Biol* 14: 313-318.
- Fatica, A., Cronshaw, A. D., Dlakic, M., Tollervey, D. (2002)** Ssf1p prevents premature processing of an early pre-60S ribosomal particle. *Mol Cell* 9: 341-351.
- Faulkner, W. R. 1994.** Geriatric clinical chemistry: reference values. American Association for Clinical Chemistry, Inc.
- Firon, A., Villalba, F., Beffa, R., d'Enfert, C. (2003)** Identification of essential genes in the human fungal pathogen *Aspergillus fumigatus* by transposon mutagenesis. *Eukaryotic Cell* 2: 247-255.
- Fonzi, W. A. and Irwin, M. Y. (1993)** Isogenic strain construction and gene mapping in *Candida albicans*. *Genetics* 134: 717-728.
- Fox, D. S. and Heitman, J. (2002)** Good fungi gone bad: the corruption of calcineurin. *BioEssays* 24: 894-903.
- Fox, D. S., Cruz, M. C., Sia, R. A., Ke, H., Cox, G. M., Cardenas, M. E., Heitman, J. (2001)** Calcineurin regulatory subunit is essential for virulence and mediates interactions with FKBP12-FK506 in *Cryptococcus neoformans*. *Mol Microbiol* 39: 835-849.
- 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: 1523-1543.
- Fridkin, S. K. and Jarvis, W. R. (1996)** Epidemiology of nosocomial fungal infections. *Clin Microbiol rev* 9: 499-511.
- Gale, C. A., Bendel, C. M., McClellan, M., Hauser, M., Becker, J. M., Berman, J., Hostetter, M. K. (1998)** Linkage of adhesin, filamentous growth, and virulence in *Candida albicans* to a single gene, *INT1*. *Science* 279: 1355-1358.
- Gallo, R. L., Murakami, M., Othake, T., Zaiou, M. (2002)** Biology and clinical relevance of naturally occurring antimicrobial peptides. *J Allergy Clin Immunol* 110: 823-831.

- Garcia, M. G., O'Connor, J. E., Garcia, L. L., Martinez, S. I., Herrero, E., del Castillo Agudo, L. (2001)** Isolation of a *Candida albicans* gene, tightly linked to *URA3*, coding for a putative transcription factor that suppresses a *Saccharomyces cerevisiae aft1* mutation. *Yeast* 18: 301-311.
- Georgopapadakou, N. H. (1998)** Antifungals: mechanism of action and resistance, established and novel drugs. *Curr Opin Microbiol* 1: 547-557.
- Ghannoum, M. A. (2000)** Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. *Clin Microbiol Rev* 13: 122-143.
- Gillum, A. M., Tsay, E. Y., Kirsch, D. R. (1984)** Isolation of the *Candida albicans* gene for orotidine-5'-phosphate decarboxylase by complementation of *S. cerevisiae ura3* and *E. coli pyrF* mutations. *Mol Gen Genet* 198: 179-182.
- Gimeno, C. J., Ljungdahl, P. O., Styles, C. A., Fink, G. R. (1992)** Unipolar cell divisions in the yeast *S. cerevisiae* lead to filamentous growth: regulation by starvation and RAS. *Cell* 68: 1077-1090.
- Gorman, J. A., Chan, W., Gorman, J. W. (1991)** Repeated use of *GALI* for gene disruption in *Candida albicans*. *Genetics* 129: 19-24.
- Gow, N. A. (1994)** Growth and guidance of the fungal hypha. *Microbiology* 140: 3193-3205.
- Grandi, P., Rybin, V., Baßler, J., Petfalski, E., Strauß, D., Marzioch, M., Schäfer, T., Kuster, B., Tschochner, H., Tollervey, D., et al. (2002)** 90S pre-ribosomes include the 35S pre-rRNA, the U3 snoRNP and 40S subunit processing factors but predominantly lack 60S synthesis factors. *Mol Cell* 10: 105-115.
- Gregory, S. L., Kortschak, R. D., Kalionis, B., Saint, R. (1996)** Characterization of the dead ringer gene identifies a novel, highly conserved family of sequence-specific DNA-binding proteins. *Mol Cell Biol* 16: 792-799.
- Gromadka, R. and Rytka, J. (2000)** The *KRR1* gene encodes a protein required for 18S rRNA synthesis and 40S ribosomal subunit assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Acta Biochim Pol* 47: 993-1005.
- Hacker, J. 2000.** *Candida albicans*, pp. 240-244. In J. Hacker, J. Heesemann [eds.], *Molekulare Infektionsbiologie*. Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg, Berlin.
- Hardman, J. G., Limbard, L. E., Goodman Gilman, A. 2001.** Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. New York, NY: McGraw-Hill.
- Hartman, J. L., Garvik, B., Hartwell, L. (2001)** Principles for the buffering of genetic variation. *Science* 291: 1001-1004.
- Henry, Y., Wood, H., Morrissey, J. P., Petfalski, E., S., K., Tollervey, D. (1994)** The 5' end of yeast 5.8S rRNA is generated by exonucleases from an upstream cleavage site. *EMBO J* 13: 2452-2463.
- Herrscher, R. F., Kaplan, M. H., Lelsz, D. L., Das, C., Scheuermann, R., Tucker, P. W. (1995)** The immunoglobulin heavy-chain matrix-associating regions are bound by Bright: a B cell-specific transactivator that describes a new DNA-binding protein family. *Genes Dev* 9: 3067-3082.
- Higuchi, S., Tamura, J., Giri, P. R., Polli, J. W., Kincaid, R. L. (1991)** Calmodulin-dependent protein phosphatase form *Neurospora crassa*. *J Biol Chem* 266: 18104-18112.

- Horvath, A. and Riezman, H. (1994)** Rapid protein extraction from *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 10: 1305-1310.
- Hoyer, L. L. (2001)** The *ALS* gene family of *Candida albicans*. *Trends Microbiol* 9: 176-180.
- Hsu, J., Huang, J., Meluh, P. B., Laurent, B. C. (2003)** The yeast RSC chromatin-remodeling complex is required for kinetochore function in chromosome segregation. *Mol Cell Biol* 23: 3202-3215.
- Huang, J., Hsu, J., Laurent, B. C. (2004)** The RSC nucleosome-remodeling complex is required for cohesin's association with chromosome arms. *Molecular Cell* 13: 739-750.
- Huh, W.-K., Falvo, J. V., Gerke, L. C., Carroll, A. S., Howson, R. W., Weissmann, J. S., O'Shea, E. K. (2003)** Global analysis of protein localization in budding yeast. *Nature* 425: 686-691.
- Hull, C. M., Raisner, R. M., Johnson, A. D. (2000)** Evidence for mating of the "asexual" yeast *Candida albicans*. *Science* 289: 307-310.
- Iwahara, J. and Clubb, R. T. (1999)** Solution structure of the DNA binding domain from Dead ringer, a sequence-specific AT-rich interaction domain (ARID). *EMBO J* 18: 6084-6094.
- Kadonaga, J. T. (1998)** Eukaryotic transcription: an interlaced network of transcription factors and chromatin-modifying machines. *Cell* 92: 307-313.
- Karkusiewicz, I., Rempola, B., Gromadka, R., Grynberg, M., Rytka, J. (2004)** Functional and physical interactions of Faf1p, a *Saccharomyces cerevisiae* nucleolar protein. *Biochem Biophys Res Commun* 319: 349-357.
- Kimura, L. H. and Pearsall, N. N. (1980)** Relationship between germination of *Candida albicans* and increased adherence to human buccal epithelial cells. *Infect Immun* 28: 464-468.
- Klee, C. B. and Krinks, M. H. (1978)** Purification of cyclic 3',5'-nucleotide phosphodiesterase inhibitory protein by affinity chromatography on activator protein coupled to Sepharose. *Biochemistry* 17: 120-126.
- Klee, C. B., Crouch, T. H., Krinks, M. H. (1979)** Calcineurin: a calcium- and calmodulin-binding protein of the nervous system. *Proc Natl Acad Sci* 76: 6270-6273.
- Köhler, G., White, T. C., Agabian, N. (1997)** Overexpression of a cloned IMP dehydrogenase gene of *Candida albicans* confers resistance to the specific inhibitor mycophenolic acid. *J Bacteriol* 179: 2331-2338.
- Kondoh, H., Yuasa, T., Yanagida, M. (2000)** Mis3 with a conserved RNA binding motif is essential for ribosome biogenesis and implicated in the start of cell growth and S phase checkpoint. *Genes Cells* 5: 525-541.
- Koyama, H., Nagao, T., Inai, T., Miyahara, K., Hayasida, Y., Shirahige, K., Tsuchiya, E. (2004)** RSC nucleosome-remodeling complex plays prominent roles in transcriptional regulation throughout budding yeast gametogenesis. *Biosci Biotechnol Biochem* 68: 909-919.
- Kressler, D., Linder, P., de la Cruz, J. (1999)** Protein *trans*-acting factors involved in ribosome biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 19: 7897-7912.
- Kressler, D., de la Cruz, J., Rojo, M., Linder, P. (1997)** Fallp is an essential DEAD-box protein involved in 40S-ribosomal-subunit biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 17: 7283-7294.

- Kullberg, B. J. and Oude Lashof, A. M. (2002)** Epidemiology of opportunistic invasive mycoses. *Eur J Med Res* 7: 183-191.
- Lan, C. Y., Newport, G., Murillo, L. A., Jones, T., Scherer, S., Davis, R. W. (2002)** Metabolic specialization associated with phenotypic switching in *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci* 99: 14907-14912.
- Lay, J., Henry, L. K., Clifford, J., Koltin, Y., Bulawa, C. E., Becker, J. M. (1998)** Altered expression of selectable marker *URA3* in gene-disrupted *Candida albicans* strains complicates interpretation of virulence studies. *Infection and Immunity* 66: 5301-5306.
- Lee, K. L., Buckley, H. R., Campbell, C. C. (1975)** An amino acid liquid synthetic medium for the development of mycelial and yeast forms of *Candida albicans*. *Sabouraudia* 13: 148-153.
- Legrand, M., Lephart, P., Forche, A., Mueller, F. M., Walsh, T., Magee, P. T., Magee, B. B. (2004)** Homozygosity at the MTL locus in clinical strains of *Candida albicans*: karyotypic rearrangements and tetraploid formation. *Mol Microbiol* 52: 1451-1462.
- Leuker, C. E., Sonneborn, A., Delbruck, S., Ernst, J. F. (1997)** Sequence and promoter regulation of the *PCK1* gene encoding phosphoenolpyruvate carboxykinase of the fungal pathogen *Candida albicans*. *Gene* 192: 235-240.
- Liu, H., Köhler, J., Fink, G. R. (1994)** Suppression of hyphal formation in *Candida albicans* by mutation of a STE12 homolog. *Science* 266: 1723-1726.
- Liu, Y., Farmer, J. D., Jr., Lane, W. S., Friedman, J., Weissman, I., Schreiber, S. L. (1991a)** Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell* 66: 807-815.
- Liu, Y., Ishii, S., Tokai, M., Tsutsumi, H., Ohki, O., Akada, R., Tanaka, K., Tsuchiya, E., Fukui, S., Miyakawa, T. (1991b)** The *Saccharomyces cerevisiae* genes (*CMP1* and *CMP2*) encoding calmodulin-binding proteins homologous to the catalytic subunit of mammalian protein phosphatase 2B. *Mol Gen Genet* 227: 52-59.
- Lo, H. J., Kohler, J. R., DiDomenico, B., Loebenberg, D., Cacciapuoti, A., Fink, G. R. (1997)** Nonfilamentous *C. albicans* mutants are avirulent. *Cell* 90: 939-949.
- Lockhart, S. R., Pujol, C., Daniels, K. J., Miller, M. G., Johnson, A. D., Pfaller, M. A., Soll, D. R. (2002)** In *Candida albicans*, white-opaque switchers are homozygous for mating type. *Genetics* 162: 737-745.
- Longley, D. B., Harkin, D. P., Johnston, P. G. (2003)** 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nat Rev Cancer* 3: 330-338.
- Lum, P. Y., Armour, C. D., Stepaniants, S. B., Cavet, G., Wolf, M. K., Butler, J. S., Hinshaw, J. C., Garnier, P., Prestwich, G. D., Leonardson, A., et al. (2004)** Discovering modes of action for therapeutic compounds using a genome-wide screen of yeast heterozygotes. *Cell* 116: 121-137.
- Magee, B. B. and Magee, P. T. (2000)** Induction of mating in *Candida albicans* by construction of *MTLa* and *MTL α* strains. *Science* 289: 310-313.
- Magee, B. B., Legrand, M., Alarco, A. M., Raymond, M., Magee, P. T. (2002)** Many of the genes required for mating in *Saccharomyces cerevisiae* are also required for mating in *Candida albicans*. *Mol Microbiol* 46: 1345-1351.
- Maniatis, T., Fritsch, E. F., Sambrook, J. 1982.** Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

- Mantel, N. and Haenszel, W. (1958)** Statistical aspects of the analysis of data from retrospective studies of disease. *J Natl Cancer Inst* 22: 719-748.
- Marchetti, O., Moreillon, P., Glauser, M. P., Bille, J., Sanglard, D. (2000a)** Potent synergism of the combination of fluconazole and cyclosporine in *Candida albicans*. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 44: 2373-2381.
- Marchetti, O., Entenza, J. M., Sanglard, D., Bille, J., Glauser, M. P., Moreillon, P. (2000b)** Fluconazol plus cyclosporine: a fungicidal combination effective against experimental endocarditis due to *Candida albicans*. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 44: 2932-2938.
- Martin, G. S., Mannino, D. M., Eaton, S., Moss, M. (2003)** The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med* 348: 1546-1554.
- Maschmeyer, G. and Ruhnke, M. (2004)** Update on antifungal treatment of invasive *Candida* and *Aspergillus* infections. *Mycoses* 47: 263-276.
- Matheos, D. P., Kingsbury, T. J., Ahsan, U. S., Cunningham, K. W. (1997)** Tcn1p/Crz1p, a calcineurin-dependent transcription factor that differentially regulates gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev* 11: 3445-3458.
- Mazur, P., Morin, N., Baginsky, W., el-Sherbeini, M., Cemas, J. A., Nielsen, J. B., Foor, F. (1995)** Differential expression and function of two homologous subunits of yeast 1,3- β -D-glucan synthase. *Mol Cell Biol* 15: 5671-5681.
- Mendoza, I., Rubio, F., Rodriguez-Navarro, A., Pardo, J. M. (1994)** The protein phosphatase calcineurin is essential for NaCl tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 269: 8792-8796.
- Michel, S., Ushinsky, S., Klebl, B., Leberer, E., Thomas, D., Whiteway, M., Morschhäuser, J. (2002)** Generation of conditional lethal *Candida albicans* mutants by inducible deletion of essential genes. *Mol Microbiol* 46: 269-280.
- Miller, M. G. and Johnson, A. D. (2002)** White-opaque switching in *Candida albicans* is controlled by mating-type locus homeodomain proteins and allows efficient mating. *Cell* 110: 293-302.
- Mitchell, P., Petfalski, E., Shevchenko, A., Mann, M., Tollervey, D. (1997)** The exosome: a conserved eukaryotic RNA processing complex containing multiple 3'->5' exoribonucleases. *Cell* 91: 457-466.
- Morschhäuser, J., Michel, S., Hacker, J. (1998)** Expression of a chromosomally integrated, single-copy *GFP* gene in *Candida albicans*, and its use as a reporter of gene regulation. *Mol Gen Genet* 257: 412-420.
- Morschhäuser, J., Michel, S., Staib, P. (1999)** Sequential gene disruption in *Candida albicans* by FLP-mediated site-specific recombination. *Mol Microbiol* 32: 547-556.
- Moser, M. J., Geiser, J. R., Davis, T. N. (1996)** Ca²⁺-calmodulin promotes survival of pheromone-induced growth arrest by activation of calcineurin and Ca²⁺-calmodulin-dependent protein kinase. *Mol Cell Biol* 16: 4824-4831.
- Nagahashi, S., Mio, T., Ono, N., Yamada-Okabe, T., Arisawa, M., Bussey, H., Yamada-Okabe, H. (1998)** Isolation of *CaSLN1* and *CaNIK1*, the genes for osmosensing histidine kinase homologues, from the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Microbiology* 144 (Pt 2): 425-432.
- Naglik, J., Albrecht, A., Bader, O., Hube, B. (2004)** *Candida albicans* proteinases and host/pathogen interactions. *Cellular Microbiology* 6: 915-926.

- Nakamura, T., Liu, Y., Hirata, D., Namba, H., Harada, S., Hirokawa, T., Miyakawa, T. (1993)** Protein phosphatase type 2B (calcineurin)-mediated, FK506-sensitive regulation of intracellular ions in yeast is an important determinant for adaptation to high salt stress conditions. *EMBO J* 12: 4063-4071.
- Nakayama, H., Mio, T., Nagahashi, S., Kokado, M., Arisawa, M., Aoki, Y. (2000)** Tetracycline-regulatable system to tightly control gene expression in the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Infect Immun* 68: 6712-6719.
- Narlikar, G. J., Fan, H.-Y., Kingston, R. E. (2002)** Cooperation between complexes that regulate chromatin structure and transcription. *Cell* 108: 475-487.
- Navarro-García, F., Sánchez, M., Nombela, C., Pla, J. (2001)** Virulence genes in the pathogenic yeast *Candida albicans*. *FEMS Microbiol Rev* 25: 245-268.
- Nishikawa, A., Poster, J. B., Jigami, Y., Dean, N. (2002)** Molecular and phenotypic analysis of *CaVRG4*, encoding an essential golgi apparatus GDP-mannose transporter. *J Bacteriol* 184: 29-42.
- Nissan, T. A., Bassler, J., Petfalski, E., Tollervey, D., Hurt, E. (2002)** 60S pre-ribosome formation viewed from assembly in the nucleolus until export to the cytoplasm. *EMBO J* 21: 5539-5547.
- Nucci, M. and Anaissie, E. (2001)** Revisiting the source of candidemia: skin or gut? *Clin Infect Dis* 33: 1959-1967.
- Odom, A., Muir, S., Lim, E., Toffaletti, D. L., Perfect, J., Heitman, J. (1997)** Calcineurin is required for virulence of *Cryptococcus neoformans*. *EMBO J* 16: 2576-2589.
- Oeffinger, M. and Tollervey, D. (2003)** Yeast Nop15p is an RNA-binding protein required for pre-rRNA processing and cytokinesis. *EMBO J* 22: 6573-6583.
- Onyewu, C., Blankenship, J. R., Del Poeta, M., Heitman, J. (2003)** Ergosterol biosynthesis inhibitors become fungicidal when combined with Calcineurin inhibitors against *Candida albicans*, *Candida glabrata* and *Candida krusei*. *Antimicrob Agents Chemother* 47: 956-964.
- Onyewu, C., Wormley, F. L., Perfect, J., Heitman, J. (2004)** The calcineurin target, *CRZ1*, functions in azole tolerance, but is not required for virulence of *Candida albicans*. *Infect Immun* 72: 7330-7333.
- Panwar, S. L., Legrand, M., Dignard, D., Whiteway, M., Magee, P. T. (2003)** *MF α 1*, the gene encoding the α mating pheromone of *Candida albicans*. *Eukaryotic Cell* 2: 1350-1360.
- Perrino, B. A., Ng, L. Y., Sonderling, T. R. (1995)** Calcium regulation of calcineurin phosphatase activity by its B subunit and calmodulin. Role of the autoinhibitory domain. *J Biol Chem* 270: 340-346.
- Pertschy, B., Zissler, G., Schein, H., Köffel, R., Rauch, G., Grillitsch, K., Morgenstern, C., Durchschlag, M., Högenauer, G., Bergler, H. (2004)** Diazaborine treatment of yeast cells inhibits maturation of the 60S ribosomal subunit. *Mol Cell Biol* 24: 6476-6487.
- Pestov, D. G., Strezoska, Z., Lau, L. F. (2001)** Evidence of p53-dependent cross-talk between ribosome biogenesis and cell cycle: Effects of nucleolar protein Bop1 on G(1)/S transition. *Mol Cell Biol* 21: 4246-4255.

- Poveda, A., Pamblanco, M., Tafrov, S., Tordera, V., Sternglanz, R., Sendra, R. (2004)** Hif1 is a component of yeast histone acetyltransferase B, a complex mainly localized in the nucleus. *J Biol Chem* 279: 16033-16043.
- Prokisch, H., Yarden, O., Dieminger, M., Tropschug, M., Barthelmess, I. B. (1997)** Impairment of calcineurin function in *Neurospora crassa* reveals its essential role in hyphal growth, morphology and maintenance of the apical Ca²⁺ gradient. *Mol Gen Genet* 256: 104-114.
- 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.
- Roemer, T., Jiang, B., Davison, J., Ketela, T., Veillette, K., Breton, A., Tandia, F., Linteau, A., Sillaots, S., Marta, S., et al. (2003)** Large-scale essential gene identification in *Candida albicans* and applications to antifungal drug discovery. *Mol Microbiol* 50: 167-181.
- Rosado, I. V. and de la Cruz, J. (2004)** Npa1p is an essential trans-acting factor required for an early step in the assembly of 60S ribosomal subunits in *Saccharomyces cerevisiae*. *RNA* 10: 1073-1083.
- Ruggero, D. and Pandolfi, P. P. (2003)** Does the ribosome translate cancer? *Nat Rev Cancer* 3: 179-192.
- Ruhnke, M., Eigler, A., Tennagen, I., Geiseler, B., Engelmann, E., Trautmann, M. (1994)** Emergence of fluconazole-resistant strains of *Candida albicans* in patients with recurrent oropharyngeal candidosis and human immunodeficiency virus infection. *J Clin Microbiol* 32: 2092-2098.
- Rusnak, F. and Mertz, P. (2000)** Calcineurin: form and function. *Physiological Reviews* 80: 1483-1521.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., Erlich, H. A. (1988)** Primer directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA-Polymerase. *Science* 239: 487-491.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. 1989.** *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A. R. (1977)** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 5463-5467.
- Sanglard, D., Ischer, F., Marchetti, O., Entenza, J., Bille, J. (2003)** Calcineurin A of *Candida albicans*: involvement in antifungal tolerance, cell morphogenesis and virulence. *Mol Microbiol* 48: 959-976.
- Santos, M. A. and Tuite, M. F. (1995)** The CUG codon is decoded *in vivo* as serine and not leucine in *Candida albicans*. *Nucleic Acids Res* 23: 1481-1486.
- Schaller, M., Hube, B., Ollert, M. W., Schäfer, W., Borg-von Zepelin, M., Thoma-Greber, E., Korting, H. C. (1999)** *In vivo* expression and localization of *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases during oral candidiasis in HIV-injected patients. *J Invest Dermatol* 112: 383-386.
- Schreiber, R. D., Morrisson, D. C., Podack, E. R., Müller-Eberhard, H. J. (1979)** Bactericidal activity of the alternative complement pathway generated from 11 isolated plasma proteins. *J Exp Med* 149: 870-882.

- Schweizer, A., Rupp, S., Taylor, B. N., Rollinghoff, M., Schroppel, K. (2000)** The TEA/ATTS transcription factor CaTec1p regulates hyphal development and virulence in *Candida albicans*. *Mol Microbiol* 38: 435-445.
- Serrano, R., Ruiz, A., Bernal, D., Chambers, J. R., Arino, J. (2002)** The transcriptional response to alkaline pH in *Saccharomyces cerevisiae*: evidence for calcium-mediated signalling. *Mol Microbiol* 46: 1319-1333.
- Shou, W., Seol, J. H., Shevchenko, A., Baskerville, C., Moazed, D., Chen, Z. W., Jang, J., Charbonneau, H., Deshaies, R. J. (1999)** Exit from mitosis is triggered by Tem1-dependent release of the protein phosphatase Cdc14 from nucleolar RENT complex. *Cell* 97: 233-244.
- 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: 189-197.
- Southern, E. M. (1975)** Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 98: 503-517.
- Staab, J. F. and Sundstrom, P. (2003)** *URA3* as a selectable marker for disruption and virulence assessment of *Candida albicans* genes. *Trends Microbiol* 11: 69-73.
- Staab, J. F., Bradway, S. D., Fidel, P. L., Sundstrom, P. (1999)** Adhesive and mammalian transglutaminase substrate properties of *Candida albicans*. *Science* 283: 1535-1538.
- Staub, P. 2001.** Dissertation. Analyse der Expression einer Virulenzgenfamilie von *Candida albicans* während der Infektion. Institut für Molekulare Infektionsbiologie, Bayerische Julius-Maximilians-Universität, Würzburg.
- Staub, P., Morschhäuser, J., Hacker, J. 2000a.** Pilze: Erreger-Wirtsbeziehung, Allgemeine Pathogenese, pp. 28-33. In R. Marre, T. Mertens, M. Trautmann, E. Vanek [eds.], *Klinische Infektiologie*. Urban & Fischer Verlag, München, Jena.
- Staub, P., Michel, S., Köhler, G., Morschhäuser, J. (2000b)** A molecular genetic system for the pathogenic yeast *Candida dubliniensis*. *Gene* 242: 393-398.
- Staub, P., Kretschmar, M., Nichterlein, T., Hof, H., Morschhäuser, J. (2000c)** Differential activation of a *Candida albicans* virulence gene family during infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 6102-6107.
- Staub, P., Kretschmar, M., Nichterlein, T., Köhler, G., Michel, S., Hof, H., Hacker, J., Morschhäuser, J. (1999)** Host-induced, stage-specific virulence gene activation in *Candida albicans* during infection. *Mol Microbiol* 32: 533-546.
- Stathopoulos, A. M. and Cyert, M. S. (1997)** Calcineurin acts through the *CRZ1/TCN1*-encoded transcription factor to regulate gene expression in yeast. *Genes Dev* 11: 3432-3444.
- Stathopoulos-Gerontides, A., Guo, J. J., Cyert, M. S. (1999)** Yest calcineurin regulates nuclear localization of the Crz1p transcription factor through dephosphorylation. *Genes Dev* 13: 798-803.
- Stocklein, W. and Piepersberg, W. (1980)** Binding of cycloheximide to ribosomes from wild-type and mutant strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Antimicrob Agents Chemother* 18: 863-867.

- Stoldt, V. R., Sonneborn, A., Leuker, C. E., Ernst, J. F. (1997)** Efg1p, an essential regulator of morphogenesis of the human pathogen *Candida albicans*, is a member of a conserved class of bHLH proteins regulating morphogenesis processes in fungi. *EMBO J* 16: 1982-1991.
- Strahl, B. D. and Allis, C. D. (2000)** The language of covalent histone modifications. *Nature* 403: 41-45.
- Sun, C. and Woolford, J. L., Jr. (1994)** The yeast *NOP4* gene product is an essential nucleolar protein required for pre-rRNA processing and accumulation of 60S ribosomal subunits. *EMBO J* 13: 3127-3135.
- Sundarsanam, P., Iyer, V. R., Brown, P. O., Winston, F. (2000)** Whole-genome expression analysis of *snf/swi* mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci* 97: 3364-3369.
- Sundstrom, P., Cutler, J. E., Staab, J. F. (2002)** Reevaluation of the role of *HWPI* in systemic candidiasis by use of *Candida albicans* strains with selectable marker *URA3* targeted to the *ENO1* locus. *Infection and Immunity* 70: 3281-3283.
- Taneda, T. and Kikuchi, A. (2004)** Genetic analysis of *RSC58*, which encodes a component of a yeast chromatin remodeling complex, and interacts with the transcription factor Swi6. *Mol Gen Genomics* 271: 479-489.
- Thompson, H. L. and Wilton, J. M. (1992)** Interaction and intracellular killing of *Candida albicans* blastospores by human polymorphonuclear leucocytes, monocytes and monocyte-derived macrophages in aerobic and anaerobic conditions. *Clin Exp Immunol* 87: 316-321.
- Timpel, C., Strahl-Bolsinger, S., Ziegelbauer, K., Ernst, J. F. (1998)** Multiple functions of Pmt1p-mediated protein O-mannosylation in the fungal pathogen *Candida albicans*. *J Biol Chem* 273: 20837-20846.
- Timpel, C., Zink, S., Strahl-Bolsinger, S., Schröppel, K., Ernst, J. F. (2000)** Morphogenesis, adhesive properties, and antifungal resistance depend on the Pmt6 protein mannosyltransferase in the fungal pathogen *Candida albicans*. *J Bacteriol* 182: 3063-3071.
- Titus, J. A., Haugland, R., Sharrow, S. O., Segal, D. M. (1982)** Texas Red, a hydrophilic, red-emitting fluorophore for use with fluorescein in dual parameter flow microfluorometric and fluorescence microscopic studies. *J Immunol Methods* 50: 193-204.
- Tse, C., Sera, T., Wolffe, A. P., Hansen, J. C. (1998)** Disruption of higher-order folding by core histone acetylation dramatically enhances transcription of nucleosomal arrays by RNA polymerase III. *Mol Cell Biol* 18: 4629-2638.
- Tsuchiya, E., Uno, M., Kiguchi, A., Masuoka, K., Kanemori, Y., Okabe, S., Mikayawa, T. (1992)** The *Saccharomyces cerevisiae* NPS1 gene, a novel CDC gene which encodes a 160 kDa nuclear protein involved in G2 phase control. *EMBO J* 11: 4017-4026.
- Tufano, R. (2002)** Focus on risk factors for fungal infections in ICU patients. *Minerva Anesthesiol* 68: 269-272.
- Uetz, P., Giot, L., Cagney, G., Mansfield, T. A., Judson, R. S., Knight, J. R., Lockshon, D., Narayan, V., Srinivasan, M., Pochart, P., et al. (2000)** A comprehensive analysis of protein-protein interactions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* 403: 623-627.

- Uhl, M. A., Biery, M., Craig, N., Johnson, A. D. (2003)** Haploinsufficiency-based large-scale forward genetic analysis of filamentous growth in the diploid human fungal pathogen *C.albicans*. *EMBO J* 22: 2668-2678.
- Velasco, E., Thuler, L. C., Martins, C. A., Nucci, M., Dias, L. M., Goncalves, V. M. (2000)** Epidemiology of bloodstream infections at a cancer center. *Sao Paulo Med J* 118: 131-138.
- Venema, J. and Tollervey, D. (1999)** Ribosome synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu. Rev. Genet.* 33: 261-311.
- Venema, J., Planta, R. J., Raué, H. A. 1998.** *In vivo* mutational analysis of ribosomal RNA in *Saccharomyces cerevisiae*, pp. 257-270. In R. Martin [ed.], *Protein Synthesis: Methods and Protocols*. Humana Press, Totowa, NJ.
- Warner, J. R. (1999)** The economics of ribosome biosynthesis in yeast. *Trends Biochem Sci* 24: 437-440.
- Weinberg, R. A., McWherter, C. A., Freeman, S. K., Wood, D. C., Gordon, J. I. (1995)** Genetic studies reveal that myristoyl-CoA:protein N-myristoyltransferase is an essential enzyme in *Candida albicans*. *Mol Microbiol* 16: 241-250.
- Wilson, I. A., Niman, H. L., Houghten, R. A., Cherenon, A. R., Connolly, M. L., Lerner, R. A. (1984)** The structure of an antigenic determinant in a protein. *Cell* 37: 767-778.
- Wilson, R. B., Davis, D., Mitchell, A. P. (1999)** Rapid hypothesis testing with *Candida albicans* through gene disruption with short homology regions. *J Bacteriol* 181: 1868-1874.
- Wilson, R. B., Davis, D., Enloe, B. M., Mitchell, A. P. (2000)** A recyclable *Candida albicans* URA3 cassette for RCR product-directed gene disruptions. *Yeast* 16: 65-70.
- Wirsching, S., Michel, S., Morschhäuser, J. (2000)** Targeted gene disruption in *Candida albicans* wild-type strains: the role of the *MDR1* gene in fluconazole resistance of clinical *Candida albicans* isolates. *Mol Microbiol* 36: 856-865.
- Xue, Y., Canman, J. C., Lee, C. S., Nie, Z., Yang, D., Moreno, G. T., Young, M. K., Salmon, E. D., Wang, W. (2000)** The human SWI/SNF-B chromatin-remodeling complex is related to yeast RSC and localizes at kinetochores of mitotic chromosomes. *Proc Natl Acad Sci* 97: 13015-13020.
- Yeaman, M. R., Ibrahim, A. S., Edwards, J. E., Bayer, A. S., Ghannoum, M. A. (1993)** Thrombin-induced rabbit platelet microbicidal protein is fungicidal *in vitro*. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 37: 546-553.
- Yoshimoto, H., Saltsman, K., Gasch, A. P., Li, H. X., Ogawa, N., Botstein, D., Brown, P. O., Cyert, M. S. (2002)** Genome-wide analysis of gene expression regulated by the calcineurin-Crz1p signaling pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 277: 31079-31088.
- Zanchin, N. I. T. and Goldfarb, D. S. (1999)** The exosome subunit Rrp43p is required for the efficient maturation of 5.8S, 18S and 25S rRNA. *Nucleic Acids Res* 27: 1283-1288.
- Zhao, X., Oh, S. H., Cheng, G., Green, C. B., Nuessen, J. A., Yeater, K., Leng, R. P., Brown, A. J., Hoyer, L. L. (2004)** *ALS3* and *ALS8* represent a single locus that encodes a *Candida albicans* adhesin; functional comparisons between Als3p and Als1p. *Microbiology* 150: 2415-2428.

A. ANHANG

Erklärungen

Ich versichere, daß ich diese Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe.

Weiterhin versichere ich, daß die Dissertation bisher nicht in gleicher oder ähnlicher Form in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat, und ich bisher keine akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht habe.

Würzburg, Februar 2005

Teresa Bader

Publikationen und Präsentationen

Publikationen:

Bader, T., Bodendorfer, B., Schröppel, K., Morschhäuser, J. (2003) Calcineurin is essential for virulence in *Candida albicans*. *Infection and Immunity* 71: 5344-5354

Bader, T., Schröppel, K., Köhler, G., Morschhäuser, J. (2005) The role of calcineurin in stress resistance, morphogenesis, and virulence of a *Candida albicans* wild-type strain (in preparation)

Posterpräsentationen:

Hauser, N. C., Fellenberg, K., Haas, S., Selle, K., Bader, T., Morschhäuser, J., Brunner, J., Rupp, S. DNA-microarrays for the identification of virulence and resistance factors in *Candida albicans*. ASM Conference, *Candida and Candidiasis* (6th), January 13-17 2002, Tampa, Florida

Bader, T., Schröppel, K., Morschhäuser, J. Calcineurin signaling is essential for virulence in *Candida albicans*. Jahrestagung VAAM, 23.-26. März 2003, Berlin

Sohn, K., Hauser, N., Fellenberg, K., Haas, S., Urban, C., Selle, K., Bader, T., Morschhäuser, J., Rupp, S. DNA-microarrays to identify virulence factors in *Candida albicans*. Jahrestagung VAAM, 23.-26. März 2003, Berlin

Kurzvortrag:

Bader, T., Bodendorfer, B., Schröppel, K., Morschhäuser, J. Calcineurin signaling is essential for virulence in *Candida albicans*. DGHM Fachgruppe Eukaryontische Krankheitserreger, Statusworkshop 2003, 14./15. Februar, Erlangen

Lebenslauf

PERSÖNLICHE DATEN:

Name: Teresa Anna Bader
Geburtsdatum: 23. Mai 1976
Geburtsort: Günzburg, Bayern

SCHULAUSBILDUNG

1982 - 1986 Grundschule Dürrlauingen
1986 - 1995 Dossenberger-Gymnasium Günzburg
1995 Abitur

STUDIUM

1995 - 2000 Biologie an der Universität Ulm
Abschluß Diplom im September 2000
Hauptfach Mikrobiologie, Nebenfächer Genetik, Pflanzenphysiologie und Analytische Chemie, experimentelle Diplomarbeit am Lehrstuhl für Humangenetik mit dem Thema „Funktionelle Analysen der 3`nicht translatierten Region der Neurofibromin mRNA“

WISSENSCHAFTLICHE ANSTELLUNG

Januar 2001 - Februar 2005 am Zentrum für Infektionsforschung und am Institut für Molekulare Infektionsbiologie an der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg
Während dieser Zeit Anfertigung der Dissertation in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. J. Morschhäuser

Würzburg, Februar 2005