

**Etablierung eines Tetrazyklin-induzierbaren
Genexpressionssystems und Analyse des White-
Opaque-Switchings in *Candida albicans***

Dissertation

**Zur Erlangen des naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Bayerischen Julius-Maximilians Universität Würzburg
Fakultät für Biologie**

**vorgelegt von
Yang-Nim Park
aus Südkorea**

Würzburg, 2006

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. M. J. Müller

Gutachter: Prof. Dr. J. Morschhäuser

Gutachter: Prof. Dr. J. Kreft

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehängt am:

**für
meine Mutter**

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von März 2002 bis Juli 2006 in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. J. Morschhäuser am Institut für Molekulare Infektionsbiologie der Universität Würzburg angefertigt.

Bei Prof. Dr. Dr. J. Hacker, Vorsitzender des Zentrums für Infektionsforschung bzw. Instituts für Molekulare Infektionsbiologie, möchte ich mich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes bedanken.

Bei Prof. Dr. Jürgen Kreft möchte ich mich für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens meiner Arbeit herzlich bedanken.

Mein ganz besonderes Dankschön gilt Prof. Dr. Joachim Morschhäuser für die wissenschaftliche Förderung und für die wertvolle Betreuung, sowie die stete Diskussionsbereitschaft, wodurch diese Arbeit ermöglicht wurde. Sein Enthusiasmus an den naturwissenschaftlichen Arbeiten, die zahlreichen wertvollen Ideen für die Forschungsarbeiten, sowie die große Geduld dafür, beeindruckten mich sehr.

Bei dieser Gelegenheit möchte ich auch bei allen vorherigen und jetzigen Mitarbeitern in unserer Arbeitsgruppe herzlich danken: Aditi Das, Davina Hiller, Julia Blaß-Warmut, Kajal Biswas, Manjitha Sengupta, Neelem Dabas, Oliver Reuß, Dr. Peter Staib, Sonja Michel, Teresa Bader und Ulrich Lermann. Alle waren sehr hilfsbereit und sorgten immer für eine gute Zusammenarbeit. Vor allem bei Dr. Peter Staib möchte ich für seine Hilfs- und Diskussionsbereitschaft danken. Bei Teresa Bader, die mir mit Rat und Tat zur Seite stand, und bei Kajal Biswas, mit dem ich wertvolle Diskussionen über meine Arbeit führen konnte, möchte ich mich für ihre Freundschaft herzlich bedanken. Daneben möchte ich mich auch bei allen anderen Mitarbeitern des Instituts bedanken. Bei Hilde Merkert möchte ich mich auch für die Hilfe bei mikroskopischen Aufnahmen bedanken.

Prof. Dr. Yoon aus Korea danke ich hiermit für seine Interesse an meiner Arbeit und seine Hilfsbereitschaft.

Meiner Familie, besonders meiner Mutter, die immer aus dem fernen Zuhause Liebe und Lebensmut schickte und die für immer in meinem Herz leben wird, danke ich hier herzlich.

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung.....	1
1	Summary	3
2	Einleitung	5
2.1	Allgemeine Einführung	5
2.2	Pathogenität und mögliche Virulenzfaktoren von <i>C. albicans</i>.....	7
	Adhärenz.....	8
	Sekretorische hydrolytische Enzyme.....	9
	Dimorphismus und die regulatorischen Signalwege.....	10
	“White-opaque”-phänotypisches Switching	14
2.3	<i>C. albicans</i>-Mating	17
2.4	Funktionelle Genanalyse in <i>C. albicans</i>	20
2.5	Tetrazyklin-regulierbares Genexpressionssystem	22
2.6	Zielsetzung dieser Arbeit.....	24
3	Material und Methoden	25
3.1	Bakterienstämme und Plasmide	25
3.1.1	<i>Escherichia coli</i> K12	25
3.1.2	Plasmide.....	25
3.2	<i>Candida albicans</i>-Stämme	29
3.3	Oligonukleotide	34
3.4	Laborgeräte und Chemikalien.....	36
3.5	Mikrobiologische Methoden	37
3.5.1	Anzucht von <i>Escherichia coli</i>	37
3.5.2	Anzucht von <i>C. albicans</i> in Hefeform	37
3.5.2.1	Vollmedium und SD-Medium	38
3.5.2.2	Induktion des Tetrazyklin-induzierbaren Genexpressionssystems.....	38
3.5.2.3	Induktion des <i>SAP2</i> -Promotors in YCB-BSA-Medium	39
3.5.3	Anzucht von <i>C. albicans</i> in white- und opaque-Form	39
3.5.4	Hypheninduktionsmedien für <i>C. albicans</i>	39
3.6	Molekularbiologische Methoden	40
3.6.1	Polymerasekettenreaktion (PCR) und Aufreinigung von PCR-Produkten	40

3.6.2	Spaltung von DNA mittels Restriktionsendonukleasen.....	41
3.6.3	Aufreinigung von DNA	41
3.6.3.1	Durch Phenolisierung und Ethanol-Fällung.....	42
3.6.3.2	Durch Agarose-Gelelektrophorese.....	42
3.6.3.3	Durch DNA-Reinigungskit.....	42
3.6.4	Ligation und Klonierung.....	43
3.6.4.1	Herstellung von kompetenten Zellen.....	43
3.6.4.2	Ligation und <i>E. coli</i> -Transformation	43
3.6.5	Plasmidisolierung aus <i>E. coli</i>	44
3.6.6	DNA-Sequenzierung.....	44
3.6.7	Genetische Transformation von <i>C. albicans</i> durch Elektroporation.....	45
3.6.8	Isolierung chromosomaler DNA aus <i>C. albicans</i> -Zellen.....	46
3.6.8.1	Glasbead-Methode.....	46
3.6.8.2	Enzymatische Methode.....	47
3.6.9	Southern-Hybridisierung	47
3.6.10	Isolierung von Gesamt-RNA aus <i>C. albicans</i> -Zellen	48
3.6.11	Northern-Hybridisierung	49
3.6.12	Isolierung des Gesamt-Proteinextraktes aus <i>C. albicans</i> -Zellen	50
3.6.13	Westernblot.....	51
3.7	Mikroskopie von <i>C. albicans</i>	52
3.7.1	Färbungen von <i>C. albicans</i> -Zellen.....	52
3.7.2	Licht-Mikroskopie	52
3.7.3	Konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM)	53
3.7.4	Rasterelektronenmikroskopie (REM).....	53
3.8	Bestimmung der Switching-Frequenz.....	54
3.8.1	Frequenz des white-opaque Switchings.....	54
3.8.2	Switching-Frequenz von <i>tup1Δ</i> -Mutanten zwischen vier verschiedenen Koloniephänotypen.....	54
3.9	Bestimmung des quantitativen Matings.....	54
3.10	Phänotypische Tests.....	56
3.10.1	Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK-Test).....	56
3.10.2	Sensibilitätstest auf Agarplatten (Spot-Test)	56
4	Ergebnisse	57
4.1	Etablierung eines Tetrazyklin-induzierbaren Genexpressionssystems in <i>C. albicans</i>.....	57
4.1.1	Prinzipieller Aufbau des Systems	57
4.1.2	Evaluierung verschiedener <i>C. albicans</i> -Promotoren zur Expression des <i>cartTA</i> -Gens.....	59
4.1.3	Tetrazyklin-induzierbare Expression des <i>GFP</i> -Reportergens in verschiedenen morphologischen Formen von <i>C. albicans</i>	60
4.1.3.1	Herstellung der <i>C. albicans</i> Stämme	60
4.1.3.2	Tetrazyklin-induzierbare Expression des <i>GFP</i> -Reportergens in Hefe- und Hyphenzellen von <i>C. albicans</i>	62
4.1.3.3	Tetrazyklin-induzierbare Expression des <i>GFP</i> -Reportergens in opaque-Zellen von <i>C. albicans</i>	63
4.1.4	Hemmung des Wachstums durch Tetrazyklin-induzierte Expression eines dominant-negativen <i>CDC42</i> -Allels.....	66
4.1.5	Inhibierung der Hyphenbildung durch Tetrazyklin-induzierte Expression des <i>NRG1</i> -Repressors.....	67
4.1.6	Tetrazyklin-induzierte Expression des <i>a</i> -spezifischen <i>MTLa1</i> -Gens in <i>MTLa</i> -opaque-Zellen.....	70

4.1.7	Tetrazyklin-induzierte Expression des a -spezifischen Transkriptionsfaktors <i>MTLa2</i> in <i>MTLα-opaque-Zellen</i>	72
4.1.7.1	Expression von <i>MTLa2</i> in <i>MTLα-opaque-Zellen</i> bewirkt Shmooing.....	72
4.1.7.2	Durch Tetrazyklin-induzierte <i>MTLa2</i> -Expression gebildete <i>MTLα-Shmoozellen</i> haben sowohl a - als auch α -Zelleigenschaften	74
4.1.7.3	Die Tetrazyklin-induzierte <i>MTLa2</i> -Expression in <i>MTLα-opaque-Zellen</i> bewirkt kein Selbst-Mating.....	76
4.1.8	Tetrazyklin-induzierbare Gendeletion in <i>C. albicans</i>	78
4.1.8.1	Prinzip des Tetrazyklin-induzierbaren Gendeletionssystems	78
4.1.8.2	Herstellung von konditional letalen <i>C. albicans</i> -Mutanten durch Tetrazyklin-induzierbare Gendeletion.....	79
4.1.9	Tetrazyklin-induzierbare Genexpression in <i>C. albicans</i> -Wildstämmen	81
4.1.10	Aktivität des <i>ADH1</i> -Promotors in den Stämmen SC5314 und CAI4	84
4.2	Analyse der Rolle des Tup1-Repressors im <i>C. albicans MTLα-Stamm WO-1</i>.....	86
4.2.1	Konstruktion von <i>tup1Δ</i> -Mutanten des <i>C. albicans</i> -Stammes WO-1	86
4.2.2	Zell- und Kolonimorphologie der <i>tup1Δ</i> -Mutanten	89
4.2.3	Analyse des phänotypischen Switching.....	92
4.2.4	Analyse der Expression white- und opaque-spezifischer Gene	94
4.2.5	Analyse des Paarungsverhaltens der <i>tup1Δ</i> -Mutanten.....	98
4.2.6	Genetische Analyse der Matingprodukte.....	100
4.3	Funktionelle Analyse der phasenspezifischen Gene <i>WH11</i> und <i>OP4</i>.....	103
4.3.1	Funktionelle Analyse des <i>WH11</i> -Gens	103
4.3.1.1	Konstruktion von <i>wh11Δ</i> -Mutanten des <i>C. albicans</i> -Stammes WO-1	103
4.3.1.2	<i>WH11</i> ist nicht essenziell für die phasenspezifische Zell- und Kolonie-Morphologie.....	105
4.3.1.3	<i>WH11</i> ist nicht notwendig für die phasenspezifische Genexpression.....	106
4.3.1.4	Die Deletion des <i>WH11</i> -Gens hat keinen Einfluss auf das white-opaque-Switching.....	110
4.3.2	Funktionelle Analyse des <i>OP4</i> -Gens	110
4.3.2.1	Konstruktion von <i>op4Δ</i> -Mutanten des <i>C. albicans</i> -Stammes WO-1	110
4.3.2.2	<i>OP4</i> ist nicht essenziell für die phasenspezifische Zell- und Kolonie-Morphologie.....	112
4.3.2.3	<i>OP4</i> ist wichtig für das normale Wachstum von opaque-Zellen	114
4.3.2.4	Versuch der Lokalisation von Op4	115
4.3.2.5	<i>OP4</i> ist nicht notwendig für die phasenspezifische Genexpression.....	119
4.3.2.6	Die Deletion von <i>OP4</i> hat keinen Einfluss auf das white-opaque-Switching	120
4.3.2.7	<i>OP4</i> ist nicht essentiell für das Mating von opaque-Zellen des <i>C. albicans</i> -Stammes WO-1	122

5 Diskussion..... 125

5.1	Etablierung eines Tetrazyklin-induzierbaren Genexpressionssystems in <i>Candida albicans</i>.....	126
5.1.1	Etablierung und Optimierung des Tetrazyklin-induzierbaren Genexpressionssystems....	126
5.1.2	Vorteile und Effizienz des Tetrazyklin-induzierbaren Genexpressionssystems.....	127
5.1.3	Problematik und Verbesserungsmöglichkeit des Tetrazyklin-induzierbaren Genexpressionssystems	128
5.1.4	Konstitutiv aktive Promotoren für die Expression von rtTA	130
5.1.5	Charakterisierung der durch <i>Mtla2</i> induzierten Shmoo-Zellen	131
5.1.6	Bewertung des Genexpressionssystems und Ausblick	132
5.2	Funktionelle Charakterisierung des globalen Transkriptionsrepressors Tup1 in <i>C. albicans MTLα-Stamm WO-1</i>.....	132
5.2.1	Zell- und Kolonimorphologie der <i>tup1Δ</i> -Mutanten	133
5.2.2	Expression der phasenspezifischen Gene in <i>tup1Δ</i> -Mutanten	133

5.2.3	Matingkompetenz der <i>tup1</i> Δ -Mutanten	134
5.3	Charakterisierung der phasenspezifischen Gene <i>WH11</i> und <i>OP4</i> im <i>MTL</i>α-homozygoten <i>C. albicans</i>-Stamm WO-1	137
5.3.1	Charakterisierung des white-phasenspezifischen Gens <i>WH11</i> im <i>C. albicans</i> -Stamm WO-1	137
5.3.2	Charakterisierung des white-phasenspezifischen Gens <i>WH11</i> im <i>C. albicans</i> -Stamm WO-1	138

6 Literaturverzeichnis..... 142

AnhangA-1

Erklärungen..... A-2

Publikationen..... A-3

Lebenslauf..... A-4

1 Zusammenfassung

Der Hefepilz *Candida albicans* kommt bei den meisten gesunden Menschen als harmloser Kommensale auf den Schleimhäuten des Verdauungs- und Urogenitaltraktes vor, kann aber insbesondere bei immunsupprimierten Patienten sowohl lokal beschränkte mukokutane als auch lebensbedrohliche systemische Infektionen verursachen. *C. albicans* zeichnet sich durch eine große morphologische Variabilität aus, die dazu beiträgt, dass der Pilz viele unterschiedliche Wirtsnischen erfolgreich besiedeln und infizieren kann. Neben dem durch Umweltsignale gesteuerten Wechsel zwischen Hefe- und Hyphenform kann *C. albicans* auch spontan und reversibel von der normalen Hefemorphologie (white) in eine sogenannte opaque-Zellform wechseln. Das white-opaque-Switching tritt nur bei Stämmen auf, die homozygot für den mating-type-Lokus (*MTLa* oder *MTL α*) geworden sind, und ermöglicht das Mating von opaque-Zellen komplementären Paarungstyps. Da white- und opaque-Zellen unterschiedlich gut an bestimmte Wirtsnischen angepasst sind, scheint das white-opaque-Switching auch eine Bedeutung in der Pathogenität des Pilzes zu haben, und es ist von großem Interesse herauszufinden, wie dieser komplexe Prozess gesteuert wird.

Die genetische Analyse von *C. albicans* ist durch das Fehlen einer haploiden Phase und durch eine Abweichung vom universalen Codon-Gebrauch in diesem Pilz erschwert. In den letzten Jahren wurden verschiedene Methoden zur gezielten Geninaktivierung und andere Werkzeuge für die funktionelle Genanalyse in *C. albicans* entwickelt. Die Möglichkeiten zur kontrollierten Genexpression sind jedoch noch begrenzt. In dieser Arbeit wurde deshalb ein System etabliert, das eine Tetrazyklin-induzierbare Expression von Genen in den verschiedenen morphologischen Formen von *C. albicans* und unabhängig von den Wachstumsbedingungen erlaubt. Zu diesem Zweck wurde eine Kassette konstruiert, die einen an *C. albicans* adaptierten, reversen Tetrazyklin-abhängigen Transaktivator (rtTA) enthält und in die Zielgene unter Kontrolle eines rtTA-abhängigen Promotors inseriert werden können. Nach Integration der Kassette ins *C. albicans*-Genom wird der Transaktivator konstitutiv exprimiert und ermöglicht die Induktion des Zielgens durch Zugabe von Doxyzyklin. Mit Hilfe des *GFP*-Reportergens wurde bestätigt, dass dieses Tet-On-System eine effiziente, Doxyzyklin-induzierbare Genexpression in Hefe-, Hyphen- und opaque-Zellen von *C. albicans* erlaubt. Die Tetrazyklin-induzierte Expression eines dominant-negativen *CDC42*-Allels blockierte in Hefezellen die Ausbildung von Knospen und resultierte in vergrößerten, mehrkernigen Zellen, während die Expression des *NRG1*-Repressors das filamentöse Wachstum unter allen getesteten Hypheninduktionsbedingungen effizient inhibierte. Eine

Expression des *MTLa1*-Gens unter Kontrolle des Tet-abhängigen Promotors in opaque-Zellen eines *MTLa*-Stammes führte zum Switching der Zellen in die white-Phase, was darauf hinwies, dass der nach dem Mating von *a*- und *α*-opaque-Zellen gebildete *a1/α2*-Repressorkomplex das Switching in die white-Phase bewirkt. Dagegen induzierte die Expression des *MTLa2*-Transkriptionsfaktors in *α*-opaque-Zellen das Shmooing, das normalerweise durch das Pheromon des Matingpartners ausgelöst wird. Die Expression der site-spezifischen FLP-Rekombinase unter Kontrolle des Tet-abhängigen Promotors ermöglichte eine Tetrazyklin-induzierbare Deletion von essentiellen Genen und damit die Herstellung von konditional letalen Mutanten. In Kombination mit dem dominanten *caSAT1*-Selektionsmarker konnte das Tet-On-System auch in *C. albicans*-Wildtypstämmen eingesetzt werden und stellt daher eine vielseitig verwendbare Methode zur funktionellen Genanalyse und zur Manipulation des zellulären Verhaltens von *C. albicans* dar.

In weiteren Experimenten wurde die Rolle des globalen Transkriptionsrepressors Tup1, der in heterozygoten *MTLa/α-C. albicans*-Stämmen das filamentöse Wachstum inhibiert, und der phasenspezifischen Gene *WH11* und *OP4* beim white-opaque-Switching untersucht. Die Deletion des *TUP1*-Gens im *MTLa*-Stamm WO-1 bewirkte, dass die Mutanten keine white- oder opaque-Zellen mehr bilden konnten. Stattdessen produzierten sie vier unterschiedliche Zell- und Koloniephänotypen, die ein verändertes Expressionsmuster von white- und opaque-spezifischen Genen zeigten und zwischen denen sie spontan und reversibel wechseln konnten. Interessanterweise waren drei der vier Varianten zum Mating mit *MTLa*-opaque-Zellen fähig und bildeten rekombinante Nachkommen. Diese Ergebnisse zeigten, dass Tup1 zwar auch in *MTLa*-Zellen für die Aufrechterhaltung der normalen Zellmorphologie und Genexpression wichtig ist, jedoch nicht für das Switching an sich. Die Deletion des white-spezifischen Gens *WH11* im Stamm WO-1 hatte keinen erkennbaren Effekt auf die Zell- und Koloniemorphologie von white- und opaque-Zellen, die phasenspezifische Genexpression oder die Frequenz des Switchings. Ein ähnliches Ergebnis wurde nach Inaktivierung des opaque-spezifischen *OP4*-Gens erhalten, und die Deletion von *OP4*-Gen hatte auch keinen Effekt auf das Mating der opaque-Zellen. Allerdings zeigten opaque-Zellen der *op4Δ*-Mutanten ein im Vergleich zum Wildtyp verlangsamtes Wachstum bei niedrigen Temperaturen und bildeten spontan einen weiteren Koloniephänotyp aus. Die phasenspezifischen Gene *WH11* und *OP4* sind daher nicht notwendig für das white-opaque-Switching und haben vermutlich spezifischere Funktionen in der Ausprägung des phasenspezifischen Phänotyps.

1 Summary

The yeast *Candida albicans* is a harmless commensal on mucosal surfaces of the gastrointestinal and urogenital tracts in most healthy people, but it can also cause local mucocutaneous as well as life-threatening systemic infections, especially in immunocompromised patients. *C. albicans* exhibits a high morphological variability, which contributes to the capacity of the fungus to colonize and infect many different host niches. In addition to the transition between growth in yeast and hyphal forms, which is regulated by environmental signals, *C. albicans* can also switch from the normal yeast cell morphology (white) to an elongated, so-called opaque cell type. This white-opaque switching occurs only in strains that have become homozygous for the mating type locus and allows mating between opaque cells of opposite mating types (*MTLa* or *MTL α*). As white and opaque cells differ in their adaptation to certain host niches, white-opaque switching also seems to have a role in the pathogenicity of *C. albicans*. Therefore, it is of great interest to elucidate how this complex morphogenetic process is controlled.

The genetic analysis of *C. albicans* is hampered by the absence of a haploid phase and the non-canonical codon usage of this fungus. In the past years, methods for targeted gene inactivation and other molecular tools for functional gene analysis in *C. albicans* have been developed. However, tools for controlled gene expression are still limited. In this work, a system for tetracycline-inducible expression of genes in the various morphological forms of *C. albicans* was established. For this purpose, a cassette was constructed which contains a *C. albicans*-adapted, reverse tetracycline-dependent transactivator (rtTA) and into which target genes can be inserted under the control of an rtTA-dependent promoter. After integration of the cassette into the *C. albicans* genome, the transactivator is constitutively expressed and allows the induction of the target gene by the addition of doxycycline. Using *GFP* as a reporter gene it was confirmed that this Tet-On system enables an efficient, doxycycline-inducible gene expression in yeast, hyphal, and opaque cells of *C. albicans*. Tetracycline-induced expression of a dominant-negative *CDC42* allele prevented the formation of buds in yeast cells and resulted in the production of large, multinucleate cells, whereas expression of the *NRG1* repressor efficiently inhibited filamentous growth under all tested hyphal inducing conditions. Expression of the *MTLa1* gene under control of the Tet-dependent promoter in opaque cells of an *MTL α* strain forced the cells to switch into the white phase, which indicated that the **a**1/ α 2 repressor complex formed after mating of **a** and α opaque cells induces switching to the white phase. In contrast, expression of the *MTLa2*

transcription factor in α opaque cells resulted in the formation of shmoo, which normally is induced by the pheromone of a mating partner. Expression of the site-specific FLP recombinase under control of the Tet-dependent promoter allowed tetracycline-inducible deletion of essential genes and thus the generation of conditional-lethal mutants. In combination with the dominant *caSAT1* selection marker the Tet-On system was also used in various *C. albicans* wild-type strains and, therefore, is an efficient and versatile tool to study gene function and manipulate cellular behaviour in this model pathogenic fungus.

In additional experiments, the role of the global transcriptional repressor Tup1, which in heterozygous *MTLa*/ α strains inhibits filamentous growth, and of the phase-specific *WH11* and *OP4* genes in white-opaque switching was investigated. Deletion of *TUP1* in the *MTLa* strain WO-1 abolished its ability to form white and opaque cells. Instead, the *tup1* Δ mutants spontaneously and reversibly switched between four different cell and colony phenotypes which exhibited an altered expression pattern of white- and opaque-specific genes. Interestingly, three of the four variants retained the capacity to mate with *MTLa* opaque cells and generate recombinant progeny. Therefore, Tup1 is required for normal cell morphology and gene expression also in *MTLa* cells, but not for switching. Deletion of the white-specific *WH11* gene in strain WO-1 did not have a detectable effect on the cell and colony morphology of white and opaque cells, phase-specific gene expression, or switching frequency. Similar results were obtained after inactivation of the opaque-specific *OP4* gene and deletion of *OP4* also did not affect mating of opaque cells. However, opaque cells of the *op4* Δ mutants exhibited reduced growth at temperatures below 25°C as compared with the wild type and they spontaneously generated an additional colony phenotype. Therefore, the phase-specific *WH11* and *OP4* genes are not required for white-opaque switching and presumably have more specific functions in the expression of the phase-specific phenotype.

2 Einleitung

2.1 Allgemeine Einführung

Die medizinische Mykologie gewinnt in der Infektionsforschung immer mehr an Bedeutung, da im letzten halben Jahrhundert eine deutliche Zunahme an Pilzinfektionen bei Menschen beobachtet wurde. Dieser Anstieg ist paradoxerweise zum Teil auf den medizinischen Fortschritt selbst zurückzuführen, der die Behandlung von Krebserkrankungen oder Organ- und Knochenmarkstransplantationen ermöglicht hat. Die dabei notwendigen immunsuppressiven Behandlungen führen gleichzeitig zu einer hohen Zahl an Risikopatienten, die wegen ihrer geschwächten Immunabwehr extrem anfällig für Infektionen sind. Zudem spielt noch die dramatische Zunahme der Immunschwäche AIDS innerhalb der letzten 20 Jahre eine Rolle.

Die Erreger von Pilzinfektionen sind meist opportunistische Pathogene, die für gesunde Menschen in der Regel ungefährlich sind, aber bei immunabwehrgeschwächten Patienten schwere mukokutane und systemische Infektionen verursachen können (Odds, 1994). Von den mehr als 100,000 Millionen Pilzarten sind nur ca. 150 klinisch relevant, darunter die Sprosspilze *Candida albicans* und *Cryptococcus neoformans*, der Schimmelpilz *Aspergillus fumigatus*, sowie eher selten vorkommende, dimorphe Pilze wie *Histoplasma capsulatum* und *Blastomyces dermatitidis* (Gow and Gadd, 1995; Odds, 2000; Staib *et al.*, 2000). Die sowohl bei mukokutanen als auch bei tief lokalisierten Infektionen am häufigsten isolierten humanpathogenen Pilze gehören zur Gattung *Candida* (*C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. lusitaniae*, *C. krusei* und *C. dubliniensis*). Sie besitzen kein bekanntes sexuelles Stadium und sind deswegen den „Fungi imperfecti“ (Deuteromycetes) zugeordnet. Von diesen ist *C. albicans* der wichtigste opportunistische humanpathogene Pilz, da er für über 60% aller *Candida*-Mykosen (Candidiasis) verantwortlich ist (Hazan, 1995; Donnelly *et al.*, 2003).

C. albicans ein Bestandteil der normalen Mikroflora auf den Schleimhäuten des Verdauungs- und Urogenitaltraktes und kann bei ca. 70% gesunder Menschen nachgewiesen werden (Odds, 1988; Ruhnke and Maschmeyer, 2002). Zum Pathogen wird dieser Kommensale gewöhnlich erst bei einem Auftreten einer Gleichgewichtstörung der normalen Mikroflora des Wirtes oder bei immunabwehrgeschwächten Individuen, wobei die Infektion lokal oder systemisch verlaufen kann. Die *Candida*-Infektionen werden daher endogen erworben, obwohl in letzter

Zeit auch über exogene, z.B. nosokomiale Übertragung berichtet worden ist (Doebbeling *et al.*, 1992; Robert *et al.*, 1995; D'Antonio *et al.*, 1998). Die lokalen und mukokutanen Infektionen an Schleimhäuten der Mundhöhle, des Ösophagus und der Vagina mit sichtbaren weißen *Candida*-Belägen als auftretendes Krankheitsbild werden durch Störung der normalen Mikroflora ausgelöst. Solche Störungen können z.B. als Folge einer Langzeitbehandlung mit Breitspektrum-Antibiotika oder mit Corticosteroiden auftreten. Bei fortgeschrittenen HIV-Infektionen oder bei Krebspatienten, die mit Chemotherapie behandelt werden, tritt Candidiasis des Mund- und Rachenraumes oft und auch immer wiederkehrend auf, ist aber nicht lebensbedrohlich, solange keine hämatogene Streuung der Erreger (Candidämie) eintritt. Wenn sich eine systemische *C. albicans*-Infektion entwickelt, bei der die *Candida*-Keime in innere Organe gelangen und schwere Gewebeschädigungen hervorrufen, wird es oft ernsthaft und lebensbedrohlich. Solche invasiven Organmykosen, die ein massenhaftes Wachstum des Pilzes in den Organen, wie z.B. Nieren, Herz, Leber, Lungen oder Nervensystem zur Folge haben, sind auch im Verlauf einer Immunsuppression bei Organtransplantationen gefürchtet (Shapperd *et al.*, 1985; Engelmann, 1999). Außerdem leiden mehr als drei Viertel der gesunden Frauen mindestens einmal in ihrem Leben unter einer Vaginitis. Davon leiden ca. 5% andauernd an rezidivierenden Infektionen (Sobel, 1992).

Die Effizienz der Therapie von systemischen Mykosen ist unbefriedigend. Darüber hinaus haben die antifungalen Medikamente (Antimykotika) häufig toxische Nebenwirkungen, da Pilze Eukaryonten wie ihr menschlicher Wirt sind. Aufgrund der zellbiologischen Gemeinsamkeiten gibt es in Pilzen nur eine beschränkte Zahl spezifischer Angriffspunkte für Medikamente. Azole (z.B. Fluconazol) und Allylamine (z.B. Terbinafin) hemmen die Biosynthese von Ergosterol, einem wichtigen Bestandteil der Pilz-Zellmembran. Die anderen Stoffklassen, die in der Therapie zum Einsatz kommen, sind Polyene (z.B. Amphotericin B), die an Ergosterol binden und die Membranfunktion stören, sowie die Fluoropyrimidine (z.B. 5-Fluorocytosin), die einen nicht-funktionellen RNA-Aufbau verursachen und in die DNA-Synthese eingreifen (Georgopapadakou, 1998). Die neuen Echinocandine, z.B. Caspofungin, wirken auf die β -(1,3)-Glukan-Synthese und inhibieren somit den Aufbau der Pilz-Zellwand (Maschmeyer and Ruhnke, 2004). Es treten allerdings immer wieder *Candida*-Keime auf, die resistent gegen diese wenigen verfügbaren Medikamente sind (Rex *et al.*, 1995; White, 1997; Cowen *et al.*, 2002), was für die Therapie der Pilzkrankungen ein ernsthaftes Problem darstellt. Zudem wirken viele Antimykotika, z.B. Azole, die für die Behandlung der Pilzinfektion zum Einsatz kommen, eher fungistatisch als fungizid.

Obwohl der Immunstatus des Wirtes für das Auftreten der Pilzkrankungen eine entscheidende Rolle spielt, ist immer noch unbekannt, wodurch der normalerweise harmlose Kommensale *C. albicans* zum aggressiven Krankheitserreger wird, der sogar zu einer Letalität von ca. 50% bei immungeschwächten Patienten führt (Nguyen, 1995). Deswegen ist es notwendig ein gutes Grundlagenwissen über die Beziehungen zwischen Erreger und Wirt zu haben und mögliche Virulenzeigenschaften dieses humanpathogenen Pilzes zu charakterisieren, um die Pilzinfektionen sowohl bei immunkompetenten als auch bei immungeschwächten Individuen effektiv zu therapieren oder sogar zu verhindern. Zu diesem Zweck sind in den letzten Jahren zahlreiche Techniken für das Studium von *C. albicans* auf molekularbiologischer Ebene eingeführt worden. Zudem wurde das *C. albicans* Genom an der Stanford-Universität (<http://www-sequence.stanford.edu/group/candida/>) komplett sequenziert, was genomweite funktionelle Genanalysen ermöglicht. Die entscheidenden Virulenzeigenschaften von *C. albicans* können dadurch festgestellt werden (Tzung *et al.*, 2001; Monod and Borg-von Zepelin, 2002), was zu einem verbesserten Verständnis der Biologie dieses opportunistischen Pathogens *C. albicans* führt.

2.2 Pathogenität und mögliche Virulenzfaktoren von *C. albicans*

Wie alle anderen Pathogene scheint der opportunistische pathogene Pilz *C. albicans* eine Reihe von Virulenzfaktoren und spezifischen Strategien entwickelt zu haben, um sich in verschiedenen Wirtsnischen zu vermehren und sich von dort weiter ausbreiten zu können. Dieser Opportunist, der ein harmloser Kommensale bei gesunden Menschen ist, kann die leichten Veränderungen des Wirtsimmunstatus erkennen und dann als ein aggressiver Krankheitserreger standortspezifisch mit fein selektiv regulierten Virulenzfaktoren Infektionen verursachen (Odds, 2000). Die Pathogenität dieses Pilzes scheint daher offensichtlich durch das komplexe und koordinierte Zusammenspiel von verschiedenen Virulenzeigenschaften gelungen zu sein, und zwar abhängig von der Art der Infektion (z.B. mukokutan oder systemisch), Infektionsstadien/-orten und Wirtsabwehrreaktionen (Cutler, 1991; Odds, 1994; Navarro-García *et al.*, 2001). Zu den Virulenzfaktoren von *C. albicans* gehören die Fähigkeit der Adhärenz, die Sekretion von hydrolytischen Enzymen (Proteasen und Phospholipasen), der Dimorphismus und das phänotypische Switching („white-opaque“-Switching) (Ernst, 2000; Calderone and Fonzi, 2001; Whiteway and Oberholzer, 2004). Wie die komplexe Koordination der vielseitigen Pathogenitätsmerkmale spezifisch reguliert wird,

ist weitgehend unklar. Aber die optimale Infektions- und Besiedlungsfähigkeit wird durch das Fehlen spezifischer Virulenzfaktoren stark beeinflusst.

Adhärenz

Die Adhärenz der *C. albicans*-Zelle wird durch Oberflächenproteine (Adhäsine) der Zellwand vermittelt. Die Pilz-Zellwand ist eine essentielle und hoch dynamische Struktur, die nicht nur für den Erhalt der Zellmorphologie und -physiologie wichtig ist, sondern auch die verschiedenen Antigene präsentiert. Diese Antigene modulieren das Immunsystem des Wirts und spielen für die Kolonisation an Epithelzellen und die Invasion ins Wirtsgewebe eine wichtige Rolle (Navarro-García *et al.*, 2001). *C. albicans*-Adhäsine sind meist GPI (glycosyl phosphatidyl inositol)-verankerte Zellwandproteine, welche ähnliche Domänenstrukturen aufweisen. Deswegen wird diskutiert, dass durch genetische Rekombination endlos verschiedene Oberflächenstrukturen produziert werden können, was *in vitro* nachgewiesen wurde (Sheppard *et al.*, 2004). Außerdem verleihen die Adhäsine dem Erreger die Fähigkeit sich nicht nur an Epithelzellen des Wirtes, sondern auch an Plastikoberflächen und Materialien (z.B. Katheter) zu haften, die bei medizinischen Behandlungen zum Einsatz kommen. Dies scheint eine wichtige Rolle für die Ausbildung von Biofilmen zu spielen (Verstrepen *et al.*, 2004), wobei die Zellen des Biofilms eine starke Resistenz gegen Antimykotika aufweisen (Kumamoto and Vices, 2005). Zu den *C. albicans*-Adhäsinen gehören *ALS1*, *ALS5*, *HWPI* und *EAP1* (epithelial adhesin) (Sundstrom, 1999; Li and Palecek, 2003). Die *C. albicans*-ALS (agglutinin-like sequence)-Familie besteht aus acht glycosylierten Proteinen (Hoyer, 2001), die auf einen engen strukturellen Zusammenhang mit Immunoglobulin-Superfamilienproteine hinweisen, darunter Als1 und Als5, die während der Infektion die Fähigkeit zur Adhärenz und Invasion verleihen (Shappard *et al.*, 2004). Die Adhärenz der *C. albicans*-Hyphenzellen wird besonders von einem Oberflächen-Mannoprotein Hwp1 (hyphal wall protein) (Staab *et al.*, 1996) gefördert. Dessen N-Terminus dient als Substrat für Transglutaminase der Wirtszellen, wodurch *C. albicans*-Hyphenzellen an der Mundschleimhaut des Wirts stabil und kovalent gebunden werden können (Staab *et al.*, 1999; Sundstrom *et al.*, 2002). Anders als andere Adhäsine ist Int1 ein Transmembranprotein, das Homologie zu Säuger-Integrinen aufweist. Dieses Protein scheint für Adhärenz und zum Teil für das filamentöse Wachstum unter bestimmten Wachstumsbedingungen verantwortlich zu sein (Gale *et al.*, 1998). Es vermittelt die Bindung an Wirtsoberflächenmolekülen sowie an extrazelluläre-Matrix (ECM)-Proteine, Fibronectin, Laminin, Fibrinogen und Collagen Typ I und IV, aber auch an Komplementkomponenten wie das C3-Fragment iC3b (Hostetter, 1994). Es gibt noch weitere GPI-Zellwandproteine und andere Adhärenzfaktoren, die an der Virulenz

beteiligt sind und die noch nicht vollständig charakterisiert worden sind. Obwohl bereits so viele Adhärenzfaktoren identifiziert worden sind, ist immer noch kaum bekannt, was das entscheidende Signal für ihre Expression ist (Calderone and Fonzi, 2001).

Sekretorische hydrolytische Enzyme

Ein Faktor, der zur Virulenz von *C. albicans* beiträgt, ist die Produktion hydrolytischer Enzyme, wie z.B. die sekretorischen Aspartylproteinasen (SAPs), Phospholipase B Enzyme und Lipasen (Calderone and Fonzi, 2001; Naglik *et al.*, 2003a). Obwohl bei einer hohen Produktion von Phospholipasen eine erhöhte Adhärenz nachgewiesen wurde (Mayser *et al.*, 1996), scheint von den vier charakterisierten Phospholipasen nur die Phospholipase B1, die während der Gewebeinvasion im Spitzenbereich der Hyphenzellen exprimiert wird, notwendig für die Virulenz zu sein (Ghannoum, 2000). Die Sap-Proteine, die zu den gut charakterisierten Virulenzeigenschaften in *C. albicans* zählen, werden durch eine Familie von zehn *SAP*-Genen (*SAP1-SAP10*) codiert. Sap1 bis Sap8 werden extrazellulär sekretiert (Schaller *et al.*, 1999), während Sap9 und Sap10 über GPI an der Zellwand verankert bleiben (Monod *et al.*, 1998; Felk *et al.*, 2000). Diese extrazellulären hydrolytischen Enzyme spielen vermutlich nicht nur eine wichtige Rolle bei der Beschaffung von Nährstoffen und eigenen zellulären Prozessen, sondern auch bei den virulenten Funktionen von *C. albicans*. Hierzu zählen die Penetration und Invasion von Wirtsgeweben und die Beschädigung von Zellen und Molekülen des Immunsystems des Wirts (Colina *et al.*, 1996; Morschhauser *et al.*, 1997; Naglik *et al.*, 2004; Albrecht *et al.*, 2005). Obwohl die biochemischen und proteolytischen Eigenschaften von Saps, vor allem von Sap7 bis Sap10, noch nicht vollkommen charakterisiert sind, zeigen die näher untersuchten Sap1-Sap6 leicht unterschiedliche pH-Optima und Temperaturstabilitäten (Hube *et al.*, 1994). Darüber hinaus ist bekannt, dass die Expression der *SAP*-Gene, die Hyphenbildung, die Adhärenz und das phänotypische Switching co-reguliert werden (Naglik *et al.*, 2004). Zum Beispiel werden die Isoenzymen Sap4-Sap6, die ein neutrales pH-Optimum haben, vor allem in Hyphen exprimiert (Hube *et al.*, 1994), während die Expression von Sap1-Sap3 (saurer pH-Optima) überwiegend in der Hefeform induziert wurde. Außerdem wird im Stamm WO-1, der ein reversibles phänotypisches „white-opaque“-Switching ausüben kann, die Expression von Saps phasenabhängig reguliert (Morrow *et al.*, 1992; Morrow *et al.*, 1993; White and Agabian, 1995; Lan *et al.*, 2002). Um das Expressionsbild von *SAP*-Genen in allen Infektionstypen bei der menschlichen *C. albicans*-Infektion und im Tiermodell direkt detektieren zu können, wurde RT-PCR und IVET (*in vivo* expression technology) verwendet (Naglik *et al.*, 1999;

Staub *et al.*, 2000; Naglik *et al.*, 2003b; Naglik *et al.*, 2004; Tavanti *et al.*, 2004). Dabei wurde beobachtet, dass die Expression der *SAP*-Gene abhängig von den mukokutanen und systemischen Infektionsarten durch verschiedene regulatorische Signalwege sehr spezifisch und komplex reguliert wird. Trotz all dieser intensiven Studien von *C. albicans*-*SAP*-Genen bleibt immer noch die Frage, wie die *SAP*-Gene während des Infektionsprozess je nach dem standortspezifischen Infektionsverlauf differentiell und effektiv reguliert werden.

Dimorphismus und die regulatorischen Signalwege

Eine besondere biologische Eigenschaft von *C. albicans* ist das Wachstum in verschiedenen Zellmorphologien, wozu auch der Dimorphismus gehört, der die Fähigkeit des reversiblen Wechsels zwischen Hefeform und verschiedenen filamentösen Formen (echten Hyphen und Pseudohyphen) beschreibt. Dieses dimorphe Wachstum wird durch verschiedene Umweltsignale ausgelöst und ist mit erheblichen Veränderungen in der Genexpression verknüpft (Mitchell, 1998; Liu, 2002; Whiteway and Oberholzer, 2004). Das Wachstum in rund-ovaler Hefeform, die als Blastospore (Blastoconidia) bezeichnet wird und sich durch Knospung vermehrt, wird *in vitro* durch Inkubation bei niedrigeren Temperaturen (unter 30°C) und pH-Werten (ca. pH 4,0) in nahrhaften Medien begünstigt (Ernst, 2000). Bei Pseudohyphen bleiben die verlängerten Tochterzellen an den Mutterzellen in Kettenform aneinander gebunden und kommen durch das Einschnüren am Septumbereich vor. Im Vergleich dazu bestehen echte Hyphen aus langen Zellen mit parallelen Zellwänden, die durch Septen voneinander getrennt sind. Es ist aber oft schwierig zu unterscheiden, ob die Zellen Pseudohyphen oder echte Hyphen sind, da die Länge der Zellen zwischen Septen in Pseudohyphen sehr variabel ist, deswegen wird häufig der Begriff „filamentös“ für Hyphen und Pseudohyphen verwendet (Sudbery *et al.*, 2004). Zu den bekannten Umweltfaktoren, die den morphologischen Wechsel von Hefe zu Hyphenform beeinflussen, gehören Stickstoff- oder Kohlenstoffmangel, der Zusatz von Serum in Medien, erhöhte Temperatur (37°C), der Mangel an Sauerstoff (hypoxische Bedingungen), die Inkubation bei 5% CO₂, sowie ein neutraler pH-Wert (Gow, 1997; Ernst, 2000; Klengel *et al.*, 2005). Das Hyphenwachstum ist häufig bei der Gewebeinvasion während der Infektion beobachtet worden (Odds, 1988; Kobayashi and Cutler, 1998). Außerdem wurde beobachtet, dass Mutanten, die keine Hyphen ausbilden können, im Tiermodell avirulent waren (Lo *et al.*, 1997; Phan *et al.*, 2000). Allerdings sind auch Mutanten, die nur in filamentöser Form wachsen können, weniger virulent (Csank *et al.*, 1997; Braun *et al.*, 2000). Dies führte zu der Annahme, dass die Fähigkeit zum morphologischen Wechsel zwischen Hefe- und Hyphenform wichtig für die *C. albicans*-Virulenz zu sein scheint, obwohl bis jetzt noch kein direkter Zusammenhang

nachgewiesen worden ist (Gow *et al.*, 2002). Trotzdem gibt es zahlreiche Untersuchungen, die darauf hinweisen, dass sowohl die Hefen- als auch die Hyphen-Morphologie eine bestimmte Rolle beim Infektionsprozess spielen. Die filamentösen Hyphenzellen sind wahrscheinlich wichtig, um an Wirtszellen zu adhären und ins Gewebe invadieren zu können, während die Hefezellen für die Dissemination über die Blutbahn und für das rasche Wachstum entscheidend sind (Gow *et al.*, 2002).

Um den Dimorphismus als Virulenzfaktor von *C. albicans* besser verstehen zu können, wurden die regulatorische Signalwege und die Transkriptionsfaktoren, die an dem morphologischen Wechsel zwischen Hefe- und Hyphenzellen beteiligt sind, näher untersucht. Dies wurde durch die Identifizierung von *C. albicans*-Genen ermöglicht, die homolog zu Genen sind, die für das Pseudohyphen-Wachstum in *S. cerevisiae* verantwortlich sind (Gimeno *et al.*, 1992). Dadurch wurden zwei konservierte Signaltransduktionswege von *C. albicans* identifiziert: die Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK) Signalkaskade und der cAMP-abhängige Proteinkinase A (cAMP-PKA) Signalweg (Abb.1) (Brown and Gow, 1999; Ernst, 2000; Lengeler *et al.*, 2000). Zudem wurden Transkriptionsfaktoren gefunden, die das filamentöse Wachstum von *C. albicans* positiv (Tec1, Czf1, Rim101) bzw. negativ (Rfg1, Nrg1, Tup1, Rbf1) regulieren (Abb.1) (Brown and Gow, 1999; Ernst, 2000; Liu, 2001).

Für die MAP-Kinase-Signalkaskade, die in *S. cerevisiae* am filamentösen Wachstum und dem pheromoninduzierten Mating haploider Zellen beteiligt ist, wurde auch in *C. albicans* die gleichen Funktionen nachgewiesen (Lengeler *et al.*, 2000; Liu, 2002). Diese Signalkaskade in *C. albicans* besteht aus mehreren Kinasen: Cst20 (homolog zur p21-aktivierten Kinase [PAK]-Kinase Ste20), Hst7 (homolog zur MAP-Kinase-Kinase Ste7) und Cek1 (homolog zu Fus3 und Kss1 MAP-Kinasen)/Cek2. Über diese Reihe von Kinasen werden die Signale zum Transkriptionsfaktor Cph1, der homolog zum *S. cerevisiae* Transkriptionsfaktor Ste12 ist, übertragen, der die weitere Expression von Genen reguliert, die für das filamentöse Wachstum und den *C. albicans*-Matingprozess verantwortlich sind. Die Deletion von Genen in dieser Kaskade (*CST20*, *HST7*, *CEK1* und *CPH1*) führte zu einer deutlich verminderten Filamentbildung auf bestimmten hypheninduzierenden Festmedien, hatte jedoch keinen Einfluss auf die seruminduzierte Bildung echter Hyphen (Liu *et al.*, 1994; Köhler and Fink, 1996; Leberer *et al.*, 1996; Csank *et al.*, 1998). Trotzdem zeigten die Mutanten im Tiermodell leicht reduzierte Virulenz.

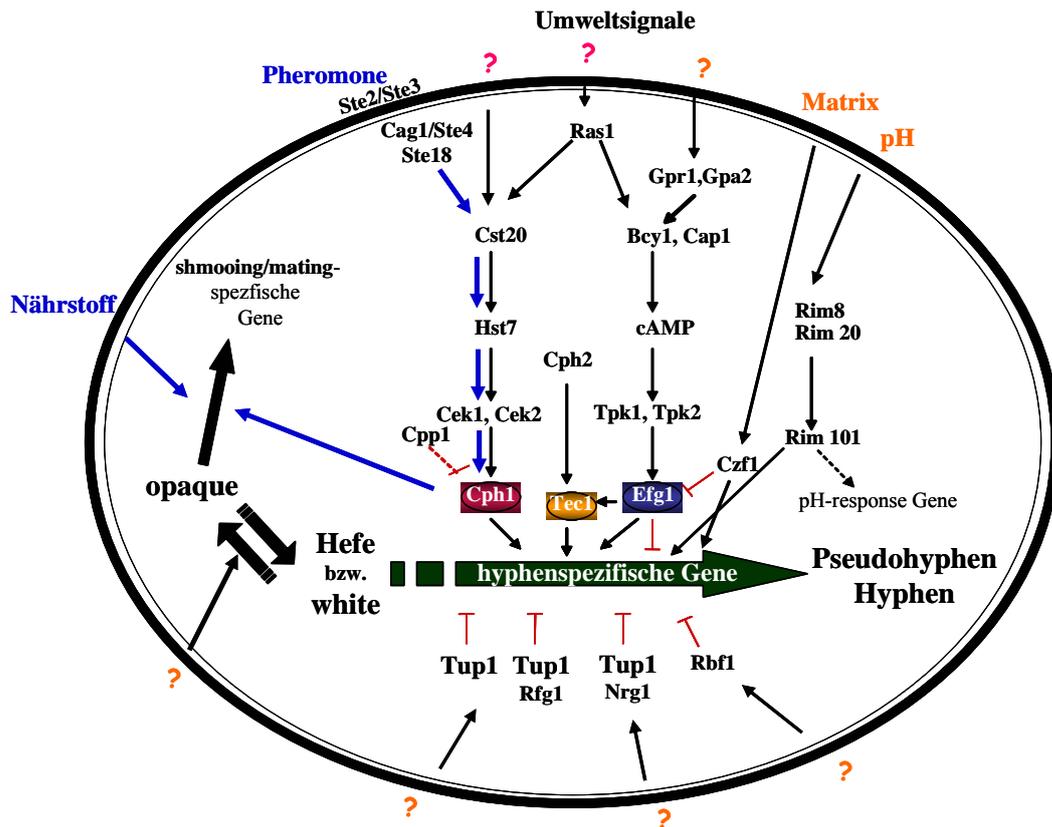


Abb. 1 Regulation des Dimorphismus, des phänotypischen Switchings und des Matings in *C. albicans* durch verschiedene Signalwege (adaptiert von Liu, 2001; Bennett und Johnson, 2005).

Ein anderer wichtiger Signalweg für die Regulation des Hyphenwachstums in *C. albicans* ist der cAMP-PKA-Signalweg, der in *S. cerevisiae* als Nährstoffsensorweg und für die Pseudohyphenbildung eine große Rolle spielt. Dieser Signalweg, der stark mit dem cAMP-Spiegel in den Zellen korreliert und über die Proteinkinase A (Tpk1 und Tpk2) aktiviert wird, endet in dem Transkriptionsfaktor Efg1, der ein konserviertes basisches Helix-Loop-Helix-Protein ist und eine consensus PKA-Phosphorylierungsstelle enthält (Stoldt *et al.*, 1997). *efg1Δ*-Mutanten zeigten einen stärkeren Defekt in der Hyphenbildung bei verschiedenen Hypheninduktionsbedingungen als *cph1Δ*-Mutanten. Der Defekt war aber nicht vollständig, da auch die *efg1Δ*-Mutanten in Anwesenheit von Serum noch als Pseudohyphen wuchsen. Zudem waren sie im Tiermodell nicht völlig avirulent (Liu *et al.*, 1994; Stoldt *et al.*, 1997). Im Gegensatz dazu war die Fähigkeit zur Hyphenbildung in *cph1Δ-efg1Δ*-Doppelmutanten unter diesen Bedingungen vollständig verloren und sie verhielten sich im Infektionsmodell avirulent (Lo *et al.*, 1997). Die Deletionsmutanten des Gens *RAS1*, das ein kleines G-Protein codiert und das upstream der beiden Signalwege liegt, verhielten sich gleich wie die *cph1Δ-efg1Δ*-Doppelmutanten (Feng *et al.*, 1999).

Neben diesen Signalwegen scheinen aber auch andere Faktoren an der Hyphenbildung beteiligt zu sein, da selbst in den *cph1Δ-efg1Δ*-Doppelmutanten und den *ras1Δ*-Mutanten das filamentöse Wachstum unter bestimmten *in vitro*-Bedingungen bzw. in anderen Tiermodellen nicht völlig unterbunden war (Riggle *et al.*, 1999). In der Tat wurden in letzter Zeit mehrere Transkriptionsfaktoren (z.B. *CPH2*, *TEC1*, *CFZI*) identifiziert, die an der Regulation des filamentösen Wachstums beteiligt sind, aber die durch noch unbekannte Signalwege aktiviert werden (Lengeler *et al.*, 2000; Schweizer *et al.*, 2000; Lane *et al.*, 2001). Außerdem wurde ein pH-induzierter Signalweg über *RIM101* nachgewiesen, der bestimmte Gene hefe- und hyphenspezifisch reguliert (El Barkani *et al.*, 2000).

Der konservierte Transkriptionsrepressor Tup1 fungiert in *C. albicans* wie ein negativer Regulator für das filamentöse Wachstum. *tup1Δ*-Mutanten wuchsen ausschließlich filamentös und zeigten eine stark reduzierte Virulenz (Braun and Johnson, 1997). In *S. cerevisiae* ist Tup1 an der Regulation von über 150 Genen beteiligt, die z.B. mit der Repression von a- und haploid-spezifischen Genen, der Glucose-Regulation, der Reaktion auf DNA-Schädigung, Stressreaktionen, der Sporenbildung und der Flokkulation zusammenhängen. Dabei bildet Tup1 einen Komplex mit dem Co-repressor Ssn6, der spezifisch durch die verschiedenen regulatorischen DNA-Bindungsproteine (Mcm1- α 2, a1- α 2, Mig1, Crt1, Rox1, Sok1, Nrg1, etc.) an Promotoren von Zielgenen transportiert wird (Keleher *et al.*, 1992; Komachi *et al.*, 1994; Tzamarias and Struhl, 1994; Edmondson *et al.*, 1996; DeRisi *et al.*, 1997; Smith and Johnson, 2000). Der globale Transkriptionsrepressor Tup1 funktioniert scheinbar in *C. albicans* ähnlich und reprimiert mit den Transkriptionsregulatoren Nrg1 (Braun *et al.*, 2000; Braun *et al.*, 2001; Murad *et al.*, 2001a; Murad *et al.*, 2001b) und Rfg1 (Kadosh and Johnson, 2001; Khalaf and Zitomer, 2001) die Expression von Genen, die für das filamentöse Wachstum benötigt und hyphenspezifisch exprimiert werden. Unter filamentöses Wachstum fördernden Bedingungen wird die Tup1-vermittelte Repression der hyphenspezifischen Gene durch die Downregulation der Expression von *NRG1* aufgehoben (Braun *et al.*, 2001). Rfg1 komplementiert die Deletion des hypoxischen Regulators Rox1 in *S. cerevisiae*, reguliert aber in *C. albicans* keine hypoxischen Gene, sondern reprimiert das filamentöse Wachstum (Kadosh and Johnson, 2001; Khalaf and Zitomer, 2001). Ein konstitutives filamentöses Wachstum wurde in Deletionsmutanten von *RBF1* beobachtet, wobei diese eine Temperatursensitivität und eine reduzierte Virulenz im Tiermodell zeigten.

Das dimorphe Wachstum von *C. albicans* wird also über ein komplexes Netzwerk verschiedener Signalwege durch Umweltbedingungen reguliert. Es ist weitgehend unklar und wie die verschiedenen Regulationswege untereinander verbunden sind und welche Signale für

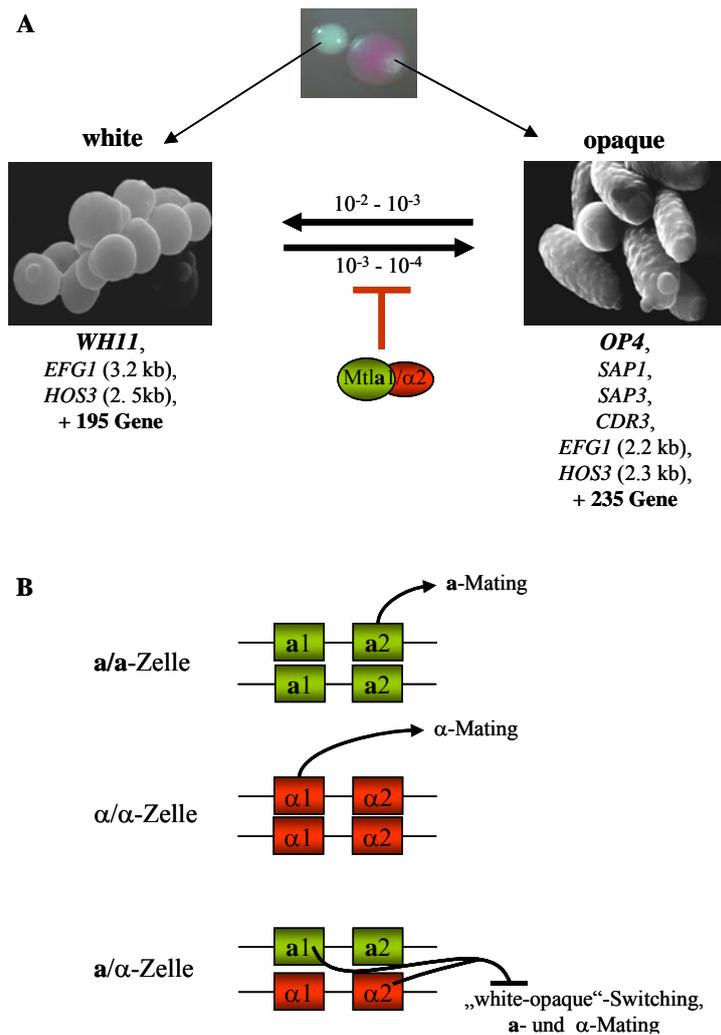
die Regulation des dimorphen Wachstums in den unterschiedlichen Wirtsnischen verantwortlich sind.

“White-opaque”-phänotypisches Switching

Manche *C. albicans*-Stämme können spontan und reversibel zwischen der normalen, rund-ovalen Hefezellform und einem ca. 2,5-fach verlängerten Zelltyp mit charakteristischen Auswölbungen auf der Zelloberfläche, die als „Pimples“ bezeichnet werden, wechseln. Dieses Phänomen wird als „white-opaque“-Switching bezeichnet (Abb. 2A), das nach dem Erscheinungsbild der halbkugelförmigen weißen (white) bzw. flachen, dunkleren (opaque) Kolonien auf Agarplatten benannt wurde, die durch die beiden Zelltypen hervorgerufen werden (Slutsky *et al.*, 1987). Das white-opaque-Switching wurde zuerst bei dem klinischen Isolat WO-1 beobachtet, der seitdem für die Erforschung dieses Phänomens als Modell verwendet wird. Das Switching zwischen white- und opaque-Phasen kommt in einer hohen Frequenz von etwa 10^{-3} vor. Dabei ändert sich nicht nur die Zellmorphologie, sondern es kommt auch zu einer koordinierten Aktivierung und Deaktivierung phasenspezifischer Gene (Morrow *et al.*, 1992; Morrow *et al.*, 1993; Srikantha and Soll, 1993; White *et al.*, 1993; Balan *et al.*, 1997; Sonneborn *et al.*, 1999; Lan *et al.*, 2002; Tsong *et al.*, 2003). Außerdem wurde beobachtet, dass durch die menschliche Körpertemperatur von 37°C der Stamm WO-1 zum Großteil von der opaque- zur white-Phase übergeht, was als ein massenhaftes Switching bezeichnet wurde (Slutsky *et al.*, 1987; Rikkerinke *et al.*, 1988). Dieses Switching wirkt sich auf viele morphologische und physiologische Parameter aus, z.B. die Morphologie der Zellwand, Organisation des Cytoskeletts, Antigenität, Adhärenz, Pathogenität, Empfänglichkeit für vitale Farbstoffe (z.B. Phloxin B), sowie Assimilationskapazität verschiedener Zuckerarten (Soll, 1992; Soll, 1996; Soll, 2003). Während im Mausmodell systemischer Candidiasis white-Zellen virulenter als opaque-Zellen waren, zeigten opaque-Zellen eine erhöhte Kolonisierungsfähigkeit auf der Haut und verursachten mukokutane Infektionen, was darauf hinweist, dass das white-opaque-Switching ein Mechanismus von *C. albicans* für die Adaptation an verschiedene Wirtsnischen ist (Kvaal *et al.*, 1997; Kvaal *et al.*, 1999). Um die unterschiedliche Virulenz von white- und opaque-Zellen besser zu verstehen, wurden in letzter Zeit die phasenspezifisch exprimierten Gene intensiv untersucht. Trotzdem bleibt die Funktion vieler phasenspezifischer Gene noch ungeklärt. Aber es ist anzunehmen, dass manche von ihnen eine Funktion bei der Aufrechterhaltung der unterschiedlichen Zellphänotypen haben.

Abb. 2 A: „White-opaque“-Switching des *MTLα*-Stammes WO-1. Die Abbildung zeigt die typische white- und opaque-Koloniemorphologie auf Lee’s Agarplatten mit dem lipophilen Farbstoff Phloxin B (oben) sowie rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der entsprechenden Zellen. Einige phasenspezifisch exprimierte Gene sind unter den jeweiligen Zelltypen genannt. Die Zahlen auf bzw. unter den Pfeilen zeigen die jeweilige Switching-Frequenz.

B: Matingtypen von *C. albicans* und Funktion regulatorischer Faktoren bei der Expression Zelltyp-spezifischer Gene (adaptiert von Tsung *et al.* 2003).



Das erste beschriebene white-phasenspezifische Gen war *WH11* (Srikantha and Soll, 1993). Wh11 ist homolog zu Glp1 (glucose lipid-regulated protein) von *S. cerevisiae*, das als das niedermolekulare Hitzeschock-Protein Hsp12 identifiziert wurde (Praekelt and Meacock, 1990; Stone *et al.*, 1990). Jedoch wird die Expression von *WH11* in *C. albicans* weder durch die Glucose- oder Lipid-Konzentration in Medien noch durch einen Hitzeschock beeinflusst (Srikantha and Soll, 1993). Die Expression von *WH11* wird nicht nur abhängig vom Switching zur opaque-Phase sondern auch während des Wechsels zum filamentösen Wachstum herabreguliert (Srikantha and Soll, 1993; Srikantha *et al.*, 1997). Zudem wird *WH11* durch Repressoren des filamentösen Wachstums, z.B. Rbf1 und Tup1, reguliert (Ernst, 2000; Zhao *et al.*, 2002; Garcia-Sanchez *et al.*, 2005). Des Weiteren wurden Wh11-ähnliche Antigene in einigen anderen *Candida*-relevanten Spezies, die in einer runden knospenden Hefeform wachsen, gefunden, aber nicht in anderen relevanten Spezies, die in elongierter

Zellform wachsen (Schröppel *et al.*, 1996). Da die Expression von *WH11* mit dem Wachstum in der white (Hefe)-Form korreliert, könnte das auf eine regulatorische oder strukturelle Funktion von Wh11 bei der Ausbildung einer rundlichen Zellmorphologie hinweisen (Kvaal *et al.*, 1997). Eine artifizielle Expression von *WH11* in der opaque-Phase des Stammes WO-1 inhibierte nicht die zellulären Eigenschaften der opaque-Zellen, wodurch gezeigt wurde, dass das Wachstum in verlängerter Form durch Wh11 nicht unterdrückt wird (Kvaal *et al.*, 1997). Jedoch bewirkte die künstliche *WH11*-Expression ein 300-fach erhöhtes Switching von der opaque- zur white-Phase, was darauf hinwies, dass das im Cytosol lokalisierte Wh11 (Schröppel *et al.*, 1996) notwendig für die Aufrechterhaltung der white-Phase ist. Ein anderes intensiv untersuchtes white-phasenspezifisches Gen ist *EFG1*, das einen Transkriptionsaktivator codiert, der essentiell für die Hyphenbildung ist. Efg1 ist offensichtlich auch bei der Regulation des white-opaque-Switchings beteiligt sein, da die Efg1-Expression im Stamm WO-1 mit dem Übergang von der opaque zur white-Phase während des temperaturinduzierten, massenhaften Switchings korrelierte (Sonneborn *et al.*, 1999). *efg1* Δ -Mutanten konnten aber keine normalen white-Zellen mehr bilden, sondern nur pimple-freie, längliche opaque-Zellen (Srikantha *et al.*, 2000).

Die ersten charakterisierten opaque-phasenspezifischen Gene waren *OP4* und *SAP1* (Morrow *et al.*, 1993). Das *OP4*-Gen codiert für ein Protein, das aus 402 Aminosäuren besteht. Die Funktion von Op4 ist bis jetzt unbekannt, obwohl die regulatorischen Sequenzen seines Promotors charakterisiert wurden (Lockhart *et al.*, 1998). Allerdings lassen sich in der Datenbank keine Homologien auf Basis der DNA- oder Aminosäuresequenz finden. Die sekretierten Aspartylproteasen (Saps), die während des Infektionsverlaufes als Virulenzfaktor eine Rolle spielen, scheinen auch im Stamm WO-1 white- und opaque-phasenspezifisch reguliert zu werden (Morrow *et al.*, 1993; White and Agabian, 1995), da nicht nur *SAP1*, sondern auch andere *SAP*-Gene in der opaque-Phase hochreguliert werden, während sie in der white-Phase unterdrückt bleiben (Lan *et al.*, 2002; Tsong *et al.*, 2003). Eine artifizielle Expression des opaque-spezifischen *SAP1*-Gens verlieh white-Zellen bestimmte opaque-Zelleigenschaften: erhöhte Adhärenz, Kolonisation der Haut und Fähigkeit zur Hautgewebeschädigung. Aber sie beeinflusste nicht die Morphologie der white-Zellen oder das Switching zwischen den beiden Zelltypen (Kvaal *et al.*, 1999).

Dieses reversible Switching-Phänomen wird vor allem bei manchen klinischen Isolaten beobachtet, die allgemein eine starke Pathogenität aufweisen (Soll, 1992; Jones *et al.*, 1994). Zudem ist klar, dass das Switching sehr präzise durch noch unbekannte regulatorische Wege koordiniert und gemeinsam mit anderen Virulenzfaktoren gesteuert wird. Mittlerweile ist aus

genomweiten Genexpressionsstudien bekannt, dass über 400 Gene phasenspezifisch reguliert werden. Davon ist ein Drittel mit dem Metabolismus verbunden, wobei die opaque-Zellen offensichtlich zum oxidativen Metabolismus tendieren, während white-Zellen eher einen fermentativen Metabolismus exprimieren. Die restlichen phasenspezifisch regulierten Gene haben mit anderen Prozessen, wie Adhärenz, Stressantwort, Resistenz gegen antifungale Wirkstoffe und Gewebeinvasion zu tun (Lan *et al.*, 2002; Tsong *et al.*, 2003). Trotzdem ist immer noch ungeklärt, wie dieses Phänomen ausgelöst wird und über welchen Mechanismus das Switching induziert wird.

2.3 *C. albicans*-Mating

Ein völlig neues Verständnis der biologischen Bedeutung des white-opaque-Switchings von *C. albicans* kam durch die Entdeckung des Matings in diesem Pilz, der bislang als asexuell galt. Im Jahr 1999 wurde ein mating type like-Lokus (*MTL*) im Genom von *C. albicans* identifiziert (Hull and Johnson, 1999). Dieser ist homolog zum *MAT*-Lokus von *S. cerevisiae*, der die Hauptregulatoren für das Mating (Paarung) codiert. Haploide **a**-Zellen von *S. cerevisiae* besitzen das *MATa*-Allel mit dem *MATa1*-Gen und exprimieren konstitutiv die **a**-spezifischen Gene. Haploide α -Zellen tragen das *MAT α* -Allel mit den *MAT α 1* und *MAT α 2*-Genen, wobei α 1 als Aktivator für α -spezifische Gene und α 2 als Repressor für **a**-spezifische Gene fungiert. Das Mating von **a**- und α -Zellen führt zu diploiden, heterozygoten **a**/ α -Zellen, die beide Allele besitzen und einen Repressorkomplex aus **a**1 und α 2 bilden, der die Expression der haploidspezifischen Gene und das Mating reprimiert. Auch in *C. albicans* gibt es zwei Allele des *MTL*-Lokus, *MTLa* und *MTL α* . Der *MTL α* -Lokus codiert für die Transkriptionsregulatoren Mtl α 1 und Mtl α 2, während der *MTLa*-Lokus für den Transkriptionsregulator Mtl α 1 und zusätzlich für den Transkriptionsaktivator Mtl α 2 codiert, der in *S. cerevisiae* während der Evolution verloren gegangen zu sein scheint (Tsong *et al.*, 2003). Die meisten *C. albicans*-Stämme sind heterozygot für den *MTL*-Lokus und verhalten sich entsprechend wie diploide *S. cerevisiae*, d.h. es findet kein Mating statt. Durch genetische Manipulation konnten jedoch künstlich Stämme hergestellt werden, in denen einer der beiden *MTL*-Loci bzw. die darauf codierten Transkriptionsregulatoren deletiert wurden und die dadurch hemi- bzw. homozygot für *MTLa* oder *MTL α* waren. Das Mating zwischen solchen künstlich hergestellten *MTLa*- oder *MTL α* -Stämmen, die komplementäre auxotrophe Marker trugen, führte zur Produktion von prototrophen Matingprodukten, wobei die Effizienz

des Matings mit einer Frequenz von ca. 10^{-7} jedoch sowohl *in vitro* als auch im Tiermodell sehr gering war (Hull *et al.*, 2000; Magee and Magee, 2000).

Diese niedrige Matingeffizienz wurde durch die vor kurzem gemachte Entdeckung erklärt, dass das Mating in *C. albicans* zusätzlich durch das white-opaque-Switching reguliert wird und opaque-Zellen die Mating-kompetente Form von *C. albicans* sind (Miller and Johnson, 2002). Wie oben erwähnt sind die meisten Stämme dieses diploiden Pilzes, einschließlich des Modellstammes SC5314 und dessen auxotrophen Derivaten, die weithin für genetische Manipulationen verwendet werden, heterozygot für den *MTL*-Lokus und enthalten *MTLa*- und *MTL α* -Allele. Zusätzlich zu den Transkriptionsaktivatoren (*Mtla2* und *Mtla1*) codieren die *MTLa*- und *MTL α* -Loci die Proteine *Mtla1* und *Mtla2*, die den heterodimeren Repressorkomplex bilden, der das Switching von white zu opaque unterdrückt (Abb. 2B) (Tsong *et al.*, 2003). 3-10% der klinisch isolierten Stämme sind jedoch *MTL*-homozygot, entweder durch Verlust des entsprechenden Chromosoms und Duplikation des verbliebenen homologen Chromosoms oder durch mitotische Rekombination (Lockhart *et al.*, 2002; Legrand *et al.*, 2004). Solche entweder für *MTLa*- oder *MTL α* -homozygoten Stämme können den Repressorkomplex nicht bilden und deshalb in die opaque-Phase switchen und dann als **a**- oder α -Zellen mit opaque-Zellen des alternativen Paarungstyps effizient maten (Lockhart *et al.*, 2002; Miller and Johnson, 2002; Wu *et al.*, 2005). Der Stamm WO-1 ist homozygot für den *MTL α* -Lokus, was die Fähigkeit dieses Modellstammes zum white-opaque-Switching erklärt (Lockhart *et al.*, 2002; Miller and Johnson, 2002). Die Matingeffizienz zwischen opaque-Zellen von *C. albicans* ist 10^6 -fach höher als die zwischen white-Zellen, was zeigt, dass opaque-Zellen die Mating-kompetente Form von *C. albicans* sind (Miller and Johnson, 2002). Die Transkriptionsaktivatoren *Mtla2* bzw. *Mtla1* regulieren in den entsprechenden homozygoten Zellen die Gene hoch, die spezifisch für den Matingtyp sind (Abb. 2B). Dies ist ein wichtiger Unterschied zur Regulation der Mating-spezifischen Gene in *S. cerevisiae*. Während die **a**-spezifischen Gene in **a**-Zellen von *C. albicans* spezifisch durch *Mtla2* aktiviert werden müssen, werden sie in **a**-Zellen von *S. cerevisiae*, die *Mtla2* nicht besitzen, konstitutiv exprimiert und in α -Zellen durch den α 2-Repressor reprimiert..

Seit der Entdeckung des Matings in *C. albicans* wurde die Rolle verschiedener Gene, deren Homologe beim Mating in *S. cerevisiae* beteiligt sind, untersucht. Dadurch konnten viele für das Mating in *C. albicans* notwendige Gene identifiziert und näher charakterisiert werden (Magee *et al.*, 2002). Die mikroskopische Beobachtung während des *C. albicans*-Matings wies darauf hin, dass die *MTLa*- und *MTL α* -Zellen miteinander durch ein Pheromonsignal kommunizieren. In der Mating-Mixtur bildeten die Zellen Auswüchse, die in *S. cerevisiae* als

Shmoos bezeichnet werden (Lockhart *et al.*, 2003). Das Pheromonsignal wird in *C. albicans* durch den konservierten MAPK-Signalweg von außen in das Zellinnere weitergeleitet (Abb. 1), was dadurch nachgewiesen wurde, dass die Matingeffizienz durch die Deletion von Genen der MAPK-Kaskade in *C. albicans* stark beeinflusst wird. Die Deletion der Gene *CST20*, *CEK1* und *CEK2* bewirkte eine reduzierte Effizienz bei Matingexperimenten, während das Mating in *hst7Δ*- und *cph1Δ*-Mutanten sowie in *cek1Δ-cek2Δ*-Doppelmutanten völlig blockiert war (Chen *et al.*, 2002). Die durch den MAPK-Signalweg aktivierten Transkriptionsaktivatoren regulieren während des Matings ca. 65 Gene hoch, einschließlich der hyphenspezifischen Gene *HWP1*, *RBT1*, *RBT4* und *SAP4-SAP6*, deren Produkte mit der Virulenz von *C. albicans* assoziiert sind (Bennett *et al.*, 2003; Panwar *et al.*, 2003).

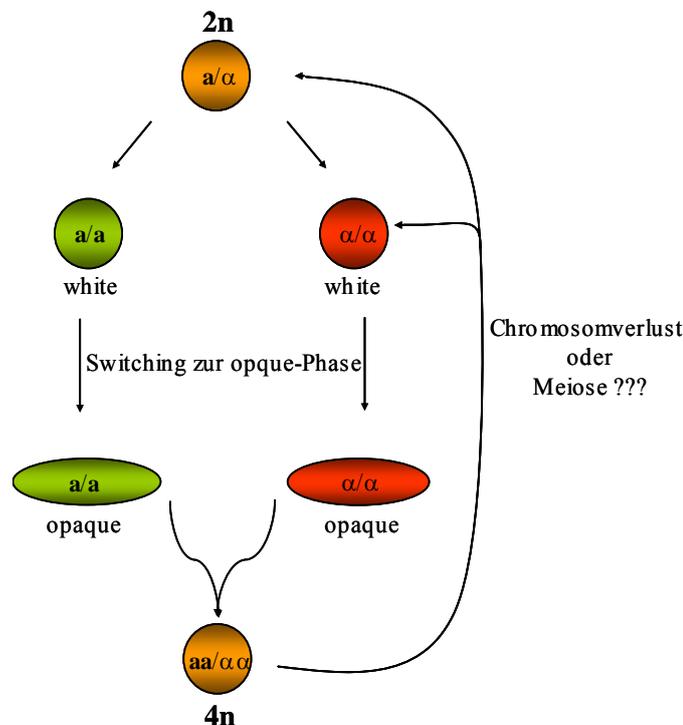


Abb. 3 Schematische Darstellung des Matingprozess von *C. albicans*.

Die tetraploiden Zygoten, die aus der Fusion von diploiden Partnerzellen resultieren, produzieren überwiegend diploide Tochterzellen. Dies wurde als parasexueller Zellzyklus von *C. albicans* beschrieben (Bennett and Johnson, 2005), wobei effizienter und kooperativer Chromosomenverlust wahrscheinlich eine Rolle spielt (Bennett and Johnson, 2003). Aber die Möglichkeit der regulierten Meiose darf nicht ausgeschlossen werden, da in *C. albicans* auch Gene identifiziert wurden, die an der Meiose in anderen Pilzen beteiligt sind, z.B. *DMC1*,

SPO11 und *HOP1* (Abb. 3). Während des Matings wurde außerdem eine effiziente Kernfusion (Karyogamie) beobachtet (Bennett *et al.*, 2005), aber dieses Phänomen ist weitgehend umstritten, da es an manchen klinisch isolierten Stämmen nur selten dokumentiert wurde (Lockhart *et al.*, 2003). Schließlich scheint es so, dass die Effizienz des Matings durch die Zusammensetzung des Wachstumsmediums beeinflusst wird (Chen *et al.*, 2002), was darauf hinweist, dass die Karyogamie in *C. albicans* durch externe Signale reguliert werden könnte, sowie durch den genetischen Hintergrund (Bennett *et al.*, 2005).

2.4 Funktionelle Genanalyse in *C. albicans*

Die molekulargenetische Analyse von *C. albicans* wird aufgrund der Eigenschaften dieses Pilzes erschwert. Da *C. albicans* obligat diploid und ein parasexueller Pilz ist, kann die gezielte Inaktivierung eines Gens nur durch eine schrittweise aufeinanderfolgende Deletion der beiden Allele erfolgen. Zudem hat *C. albicans* keinen universalen Codongebrauch und translatiert das CTG-Codon als Serin anstelle von Leucin translatiert wird (Santos and Tuite, 1995), was eine Adaptation heterologer Gene an den Codongebrauch von *C. albicans* nötig macht. Trotzdem wurden in den letzten Jahren zahlreiche Techniken für die effiziente genetische Manipulation in *C. albicans* entwickelt, was das Verständnis der Biologie und der Pathogenitätsmechanismen dieses Pilzes deutlich verbessert hat (De Backer *et al.*, 2000; De Barker *et al.*, 2000; Berman and Sudbery, 2002).

Zur Analyse der Genfunktion in *C. albicans* wird häufig reverse Genetik angewandt, indem in der Genomsequenz identifizierte Gene zunächst gezielt deletiert und dann die in den Mutanten auftretenden morphologischen und physiologischen Veränderungen analysiert werden. Die gezielte und schrittweise aufeinander folgende Gendeletion in *C. albicans* wurde meist mit Hilfe der „URA-Blaster“-Strategie im *ura3*-auxotrophen Stamm CAI4 durchgeführt (Fonzi and Irwin, 1993). Die URA-Blaster-Kassette besteht aus dem *URA3*-Selektionsmarker, der von „direct repeats“ einer Fremdsequenz (meist aus dem *hisG*-Gen von *Salmonella typhimurium*) flankiert ist, und wird zwischen upstream- und downstream-Sequenzen des Zielgens inseriert, die zur Integration in das Zielgen im *C. albicans*-Genom über homologe Rekombination dienen. Die Transformanten werden dadurch *URA3*-prototroph und können auf Minimalmedium ohne Uridin selektioniert werden. Durch Negativselektion mit FOA (fluoro-orotic acid) können wieder auxotrophe Derivate erhalten werden, in denen der *URA3*-Marker durch intrachromosomale Rekombination zwischen den „direct repeats“ deletiert ist und in denen das verbliebene Allel des Zielgens in einer zweiten Transformationsrunde

inaktiviert werden kann, um homozygote Mutanten zu erhalten. Eine alternative Methode, die keine Negativselektion zum Recycling des Markers braucht, ist die „URA3-Flipping“-Methode (Morschhäuser *et al.*, 1999). Sie beruht auf der Verwendung einer DNA-Kassette, die neben dem *URA3*-Selektionsmarker auch das an *C. albicans* angepasste *FLP*-Rekombinasegen aus dem *S. cerevisiae* 2 μ Plasmid (Sadowski, 1995) unter Kontrolle des induzierbaren *SAP2*-Promotors enthält und von den *FLP*-Zielsequenzen flankiert ist. Dadurch wird nach der Insertion in ein Allel des Zielgens eine effiziente Deletion der Kassette mit Hilfe der *FLP*-Rekombinase ermöglicht. Bei Verwendung der dominanten *MPA^R*- oder *caSAT1*-Selektionsmarker anstelle des *URA3*-Gens kann die Methode auch zur Herstellung von Deletionsmutanten direkt im prototrophen Wildtypstamm SC5314 bzw. in klinischen Isolaten eingesetzt werden (Wirsching *et al.*, 2000; Reuß *et al.*, 2004). Hier verleiht das *MPA^R*-Gen den Zellen Resistenz gegenüber Mycophenolsäure (MPA), und das an *C. albicans*-adaptierte *sat-1*-Gen aus *Escherichia coli* Resistenz gegenüber dem Antibiotikum Nourseothricin. Eine weitere häufig angewandte Methode für die Herstellung von Mutanten benutzt ein PCR-basiertes Protokoll (Wilson *et al.*, 1999; Wilson *et al.*, 2000). Auch der Ansatz, durch *in vitro* Transposon-Mutagenese heterozygote Mutanten zu erzeugen und auf Haploinsuffizienz-bedingte Defekte in der Hyphenausbildung zu überprüfen, war erfolgreich (Uhl *et al.*, 2003a).

Um die Expression von Genen in *C. albicans* sichtbar und detektierbar zu machen, werden an *C. albicans* adaptierte, heterologe Reportergene verwendet. Dazu gehören *LACZ* aus *Streptococcus thermophilus*, das für eine β -Galactosidase codiert (Uhl *et al.*, 2003b), *LUC* aus *Renilla reniformis*, das für eine Luciferase codiert (Srikantha *et al.*, 1996), *GFP* aus *Aequorea victoria*, das für das grün fluoreszierende Protein Gfp codiert (Cormack *et al.*, 1997; Morschhäuser *et al.*, 1998) bzw die Derivate *YFP* (yellow fluorescent protein) und *CFP* (cyan fluorescent protein) (Gerami-Nejad *et al.*, 2001). Auch Systeme, die eine kontrollierte Genexpression ermöglichen, sind sehr wertvoll für die funktionelle Genanalyse. In *C. albicans* werden einige regulierbare Promotoren zur Induktion oder Repression von Genen angewandt, z.B der *PCK1*- (Leuker *et al.*, 1997), *MAL2*- (Backen *et al.*, 2000), *GAL1*- (Gorman *et al.*, 1991), *MET3*- (Care *et al.*, 1999), sowie der *SAP2*-Promotor (Morschhäuser *et al.*, 1998). Der *PCK1*-Promotor wird durch Succinat, der *MAL2*-Promotor durch Maltose und Rohrzucker und der *GAL1*-Promotor durch Galaktose induziert, während alle drei Promotoren durch Glucose reprimiert werden. Der *MET3*-Promotor wird durch Methionin/Cystein reprimiert, während der *SAP2*-Promotor in Medien induziert wird, die Protein als einzige Stickstoffquelle enthalten. Andere Promotoren, die eine konstitutive Genexpression

ermöglichen und dafür öfters eingesetzt werden, sind der *ADHI*- (Bertram *et al.*, 1996), *ACT1*- (Delbruck and Ernst, 1993) sowie der *TEF3*-Promotor (Myers *et al.*, 1992). Die gut charakterisierten Promotoren der white- bzw. opaque-phasenspezifisch exprimierten *WHI1*-, *SAP1*- und *OP4*-Gene erlauben die konstitutive Expression von Genen in einer bestimmten Switchingphase (Kvaal *et al.*, 1997; Kvaal *et al.*, 1999; Strauß *et al.*, 2001). Die reprimierbaren Promotoren werden auch zur Herstellung von konditionalen Mutanten verwendet, z.B. bei der Untersuchung essentieller Gene, die nicht deletiert werden können und deren Expression mit Hilfe dieser Promotoren abgeschaltet werden kann. Eine basale Aktivität des Promotors kann hier allerdings zu Problemen führen. Um diese Problem zu umgehen, wurden einige Systeme für die Konstruktion von konditional letalen Mutanten entwickelt. Dazu gehören das Tetrazyklin (Tet)-regulierbare Genexpressionssystem (siehe Kapitel 2.5) (Nakayama *et al.*, 2000) und das induzierbare FLP-Rekombinase-vermittelte Gendeletionssystem (Michel *et al.*, 2002).

2.5 Tetrazyklin-regulierbares Genexpressionssystem

Wenn ein Zielgen unter die Kontrolle eines der oben genannten regulierbaren Promotoren gestellt wird, kann die Expression durch die Inkubation in dem entsprechenden induzierenden oder reprimierenden Wachstumsmedium aktiviert oder reprimiert werden. Aber für viele Forschungszwecke ist es nötig, die Expression von Genen ohne Wechseln des Wachstumsmediums kontrollieren zu können, z.B. einfach durch Zugabe einer induzierenden oder reprimierenden Substanz, die selbst keinen Einfluss auf den Metabolismus der Zellen ausübt.

Das Tetrazyklin-regulierbare Genexpressionssystem, das erfolgreich in vielen Eukaryonten für die Kontrolle der Genexpression eingesetzt wird (Gossen and Bujard, 1992; Baron *et al.*, 1997; Gari *et al.*, 1997; Hassan *et al.*, 2001), erlaubt die Kontrolle der Genexpression unabhängig vom Wachstumsmedium. Dies wird durch das kleine, neutrale Molekül Tetrazyklin und dessen Derivate (z.B. Doxyzyklin) ermöglicht, die frei in die Zellen diffundieren können. Dieses System beruht auf dem gut charakterisierten Tetrazyklin-Repressorprotein (TetR) aus dem Transposon *Tn10* von *Escherichia coli* (Hillen and Berens, 1994). TetR bindet als Dimer an seine Bindungssequenz, den *tet*-Operator (*tetO*), in der Promotorregion der Tetrazyklin-Resistenzgene (*TetR* und *TetA*), um deren Expression in Abwesenheit von Tetrazyklin zu reprimieren. Wenn Tetrazyklin anwesend ist, bindet die aktive Form von Tetrazyklin (Tetrazyklin-Mg²⁺) mit hoher Affinität an TetR, was die

Dissoziation des Repressors aus dem Promotor und die Expression der *tet*-Gene zur Folge hat (Hillen and Berens, 1994). Für die Anwendung in eukaryotischen Zellen wurde der TetR-Repressor mit der Aktivierungsdomäne eines Transkriptionsfaktors fusioniert und dadurch zu einem Tetrazyklin-regulierbaren Transaktivator (tTA) (Gossen and Bujard, 1992). In Abwesenheit von Tetrazyklin ermöglicht tTA die konstitutive Expression eines Gens, das unter Kontrolle eines tTA-regulierbaren Promotors steht. Letzterer ist ein Promotor, in dem alle Aktivierungssequenzen bis auf eine TATA-box deletiert und durch *tetO* ersetzt wurden, und an den tTA in Abwesenheit von Tetrazyklin binden kann und dadurch die Transkription ermöglicht. Die Zugabe von Tetrazyklin zu den Zellen führt zur Dissoziation des Aktivators vom Promotor und damit zum Abschalten der Genexpression. Dieses „Tet-Off“-System wurde schon in *C. albicans* etabliert und für die effiziente Kontrolle der Expression von spezifischen Genen *in vitro* aber auch im Tiermodell verwendet (Nakayama *et al.*, 2000; Roemer *et al.*, 2003; Saville *et al.*, 2003).

Alle oben erwähnten regulierbaren Promotoren werden gewöhnlich zum Abschalten der Genexpression verwendet, besonders von essentiellen Genen, die nicht aus dem Genom deletiert werden können. Eine ebenfalls wichtige Möglichkeit zur Untersuchung der Genfunktion ist die induzierte Expression spezifischer Gene unter Bedingungen, in denen sie normalerweise nicht oder nur gering exprimiert werden. Das Tet-Off-System ist nur wenig geeignet für diesen Zweck, da die Induktion von Genen ein effizientes Entfernen von Tetrazyklin aus Zellen, die in Anwesenheit dieses Molekulares inkubiert wurden, erfordert, was nicht immer durchführbar ist. Außerdem müsste bei einem Gen, dessen Produkt toxisch auf die Zellen wirkt, nach der Herstellung entsprechender Stämme Tetrazyklin immer in ausreichenden Konzentrationen vorhanden sein, um ein vorzeitige Genexpression zu verhindern. Bemerkenswerterweise führen bestimmte Aminosäureaustausche in TetR dazu, dass der Repressor nur noch in Anwesenheit von Tetrazyklin an *tetO* bindet, nicht aber in dessen Abwesenheit. Dieser reverse Tet-Repressor (rTetR) zeigte in *E. coli* bei Anwesenheit von Tetrazyklin eine 30-fach verbesserte Regulationsfähigkeit der Genexpression im Vergleich zu tetR. (Gossen *et al.*, 1995). Die Fusion von rTetR mit einer Transkriptionsaktivationsdomäne erzeugte einen reversen Tetrazyklin-kontrollierbaren Transaktivator (rtTA: reverse tetracycline-dependent transaktivator), der für die Induktion der Genexpression in verschiedenen, eukaryotischen Zellen durch Zugabe des Tetrazyklin-Derivats Doxyzyklin (Dox) mit einer 1000fach verbesserten kinetischen Effektivität verwendet werden kann (Degenkolb *et al.*, 1991; Gossen *et al.*, 1995). Seitdem wurde dieses „Tet-On“-System durch die Identifikation von neuen mutierten Derivaten mit reduzierter

basaler Aktivität und erhöhter Doxyzyklin-Sensitivität weiter verbessert (Urlinger *et al.*, 2000).

2.6 Zielsetzung dieser Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit war, ein Tetrazyklin-induzierbares Genexpressionssystem (Tet-On) in *C. albicans* zu etablieren. Dieses System sollte die Expression von Genen unabhängig vom Wachstumsmedium ermöglichen und somit als vielseitig verwendbares System zur Untersuchung der Funktion von Genen und zur Manipulation des zellulären Verhaltens eingesetzt werden. Idealerweise sollte ein solches System in den verschiedenen morphologischen Formen von *C. albicans*, Hefen und Hyphen sowie opaque-Zellen funktionieren. Das white-opaque-Switching ist wichtig für das Mating von *C. albicans* und auch für eine optimale Anpassung an unterschiedliche Wirtsnischen. Um Einblicke in die Regulation des phänotypischen Switchings zu erhalten, sollte außerdem die Rolle des globalen Repressors Tup1 sowie der phasenspezifischen Gene *WH11* und *OP4* beim white-opaque-Switching des *C. albicans* Stammes WO-1 durch Herstellung und phänotypische Analyse von Deletionsmutanten untersucht werden.

3 Material und Methoden

3.1 Bakterienstämme und Plasmide

3.1.1 *Escherichia coli* K12

Als Wirtsbakterium für alle Klonierungsarbeiten diene 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 diene das Plasmid pBluescript KS II (pKS II, Stratagene Heidelberg, Germany). Das Plasmid pBC SK+ (Stratagene Heidelberg, Germany) wurde als Kloningvektor nur für die Konstruktion der Plasmide pADH1G4 und pADH1E2 verwendet.

Im Folgenden (Tabelle 1) sind die in dieser Arbeit verwendeten und neu konstruierten Plasmide und deren relevante Eigenschaften aufgelistet. Für das Verständnis wichtige Abkürzungen werden nun vorab erklärt: 3' oder 5' vor dem Gen bezeichnet 3'- bzw. 5'-Bereich des Gens, P oder T vor dem Gen Promtor bzw. Terminator; *Cd* bezeichnet *Candida dubliniensis*; P_{ADH1} bezeichnet den konstitutiv aktiven Promotor des *ADH1* („alcoholdehydrogenase1“-Gens; *CBF1* steht für das Gen des „centromere binding factor 1“; Die *caFLP* bezeichnet die *C. albicans*-adaptierte *FLP*-Rekombinase (drei CTG Codons wurden gegen TTG ausgetauscht) und *ecaFLP* die „enhanced“, d.h. durch vier Aminosäureaustausche (P2S, L33S, Y108N, S294P) in ihrer Aktivität verbesserte, an *C. albicans*-adaptierte *FLP*-Rekombinase; Des Weiteren steht *caGFP* für das an *C. albicans*-adaptierte „green fluorescent protein; *MPA*^R steht für den Mycophenolsäure („mycophenolic acid“-Resistenzmarkergen; *caSAT1* bezeichnet das *C. albicans*-adaptierte Nourseothricin-Resistenzmarkergen; Bei *SAP* handelt es sich um die Gene für die sekretierte Aspartylprotease; *URA3* bezeichnet den *URA3*-Selektionsmarkergen (orotidine-5'phosphate decarboxylase); P_{TEF3} ist der konstitutiv aktive Promotor des *TEF3* („translation elongation factor 3“-Gens; *cartTA* ist das *C. albicans*-adaptierte Fusionsprotein „reverse tetracycline transactivator“ codierende Gen; *tetO* bezeichnet die Sequenz von „tetracycline operator“ bzw. P_{OP4min} die Sequenz des Minimal-Promotors (Core-Promotors) des Gens *OP4*; *MTL* „mating type like“; *CDC42*^{*} bezeichnet die dominant-negative Form des Gens *CDC42*, die die

Aminosäureaustausch D118A enthält; HAT steht für „HA (Hämagglutinin Epitop)-tag“.

Tabelle 1 In dieser Arbeit verwendete Plasmide

Bezeichnung	Inserts der Plasmide	Referenz
pADH1E2	[P _{ADHI} -T _{ACTI} -caSAT1-3`ADHI]-Fragment	Labor Morschhäuser
pADH1G1	[P _{ADHI} -caGFP-T _{ACTI} -URA3-3`OP4]-Fragment	diese Arbeit
pADH1G2	[P _{ADHI} -caGFP-T _{ACTI} -URA3-3`ADHI]-Fragment	diese Arbeit
pADH1G4	[P _{ADHI} -caGFP-T _{ACTI} -caSAT1-3`ADHI]-Fragment	diese Arbeit
pCBF1M4	[5`CBF1-T _{ACTI} -URA3-3`CBF1]-Fragment	(Biswas <i>et al.</i> , 2003)
pCdMNRG12	[P _{CdNRGI} -NRGI-T _{ACTI} -URA3-3`CdNRGI]-Fragment	(Staub and Morschhäuser, 2005)
pGFP43	enthält [caGFP-ACT1]-Fragment	Labor Morschhäuser
pGFP61	[P _{SAP1} -caGFP-T _{ACTI} -URA3-3`SAP1]-Fragment	(Strauß <i>et al.</i> , 2001)
pGFP68	[P _{WHI1} -caGFP-T _{ACTI} -URA3-3`WHI1]-Fragment	(Strauß <i>et al.</i> , 2001)
pGFP70	[P _{OP4} -caGFP-T _{ACTI} -URA3-3`OP4]-Fragment	Labor Morschhäuser
pGFP72	[P _{HWP1} -caGFP-T _{ACTI} -caSAT1-3`HWP1]-Fragment	diese Arbeit
pHWP1LACZ2	[P _{HWP1} -LacZ-T _{ACTI} -URA3-3`HWP1]-Fragment	Labor Morschhäuser
pHWP1N	[HWP1-ACT1]-Fragment	diese Arbeit
pLACZ5	[P _{ACTI} -LacZ-T _{ACTI}]-Fragment	Labor Morschhäuser
pMATa1	[MTLa1]-Fragment	diese Arbeit
pMPG2	[3`ACTI-P _{MDRI} -caGFP-T _{ACTI} -URA3-P _{ACTI}]-Fragment	Labor Morschhäuser
pMTLα2M1	[5`MTLα2-URA3-3`TUP1]-Fragment	diese Arbeit
pMTLα2M2	[5`MTLα2-URA3-3`MTLα2]-Fragment	diese Arbeit
pNIM1	[P _{ADHI} -cartTA-T _{ACTI} -caSAT1-T _{ACTI} -caGFP-P _{OP4min} -7×tetO-3`ADHI]-Fragment	diese Arbeit
pNIM2	[P _{ADHI} -cartTA-T _{ACTI} -URA3-T _{ACTI} -caGFP-P _{OP4min} -7×tetO-3`ADHI]-Fragment	diese Arbeit

Bezeichnung	Inserts der Plasmide	Referenz
pOP4G1	[<i>OP4-caGFP-T_{ACT1}-URA3-3`OP4</i>]-Fragment	diese Arbeit
pOP4HAT1	[<i>OP4-3xHAT-T_{ACT1}-URA3-3`OP4</i>]-Fragment	diese Arbeit
pOP4K1	[<i>5`OP4-OP4-URA3-3`OP4</i>]-Fragment	(Park, 2002)
pOP4M2	[<i>5`OP4-FRT-URA3-T_{ACT1}-caFLP-P_{SAP2}-FRT-3`OP4</i>]-Fragment	(Park, 2002)
pOP4N	[<i>OP4-ACT1</i>]-Fragment	diese Arbeit
pSAP2-7	[<i>3`SAP2-I-T_{ACT1}</i>]-Fragment	Labor Morschhäuser
pSAP1ex4	[<i>P_{ADHI}-cartTA-T_{ACT1}-URA3-T_{ACT1}-SAP1-P_{OP4min}-7×tetO-3`ADHI</i>]-Fragment, enthält <i>SAP1</i> -codierende Region	Labor Morschhäuser
pSAT3	[<i>5`CBF1-T_{ACT1}-caSAT1-3`ADHI</i>]-Fragment	Labor Morschhäuser
pSFUC2	Quelle des <i>URA3</i> -Flipper : [<i>FRT-URA3-T_{ACT1}-caFLP-P_{SAP2}-FRT</i>]-Fragment	(Morschhäuser <i>et al.</i> , 1999)
pSPA2G1	[<i>P_{ADHI}-SPA2-caGFP-T_{ACT1}-caSAT1-3`ADHI</i>]-Fragment	Labor Morschhäuser
pTEF3E1	[<i>P_{TEF3}-T_{ACT1}-URA3-3`TEF3</i>]-Fragment	diese Arbeit
pTEF3G1	[<i>P_{TEF3}-caGFP-T_{ACT1}-URA3-5`ACT1</i>]-Fragment	diese Arbeit
pTEF3G2	[<i>P_{TEF3}-caGFP-T_{ACT1}-URA3-3`TEF3</i>]-Fragment	diese Arbeit
pTET23	[<i>P_{ADHI}-cartTA-T_{ACT1}-URA3-T_{ACT1}-ecaFLP-P_{OP4min}-7×tetO-3`ADHI</i>]-Fragment	(Park, 2002)
pTET25	[<i>P_{ADHI}-cartTA-T_{ACT1}-URA3-T_{ACT1}-caGFP-P_{OP4min}-7×tetO-3`ADHI</i>]-Fragment	(Park, 2002)
pTET26	[<i>P_{TEF3}-cartTA-T_{ACT1}-URA3-T_{ACT1}-ecaFLP-P_{OP4min}-7×tetO-3`ADHI</i>]-Fragment	diese Arbeit
pTET27	[<i>P_{TEF3}-cartTA-T_{ACT1}-URA3-T_{ACT1}-ecaFLP-P_{OP4min}-7×tetO-3`TEF3</i>]-Fragment	diese Arbeit
pTET28	[<i>P_{TEF3}-cartTA-T_{ACT1}-URA3-T_{ACT1}-caGFP-P_{OP4min}-7×tetO-3`TEF3</i>]-Fragment	diese Arbeit
pTET29	[<i>P_{TEF3}-cartTA-T_{ACT1}-URA3-T_{ACT1}-ecaFLP-P_{OP4min}-7×tetO-3`ACT1</i>]-Fragment	diese Arbeit
pTET30	[<i>P_{ACT1}-cartTA-T_{ACT1}-URA3-T_{ACT1}-ecaFLP-P_{OP4min}-7×tetO-3`ACT1</i>]-Fragment	diese Arbeit
pTET31	[<i>P_{ACT1}-cartTA-T_{ACT1}-URA3-T_{ACT1}-caGFP-P_{OP4min}-7×tetO-3`ACT1</i>]-Fragment	diese Arbeit
pTET32	[<i>P_{ADHI}-cartTA-T_{ACT1}-URA3-T_{ACT1}-MTLa1-P_{OP4min}-7×tetO-3`ADHI</i>]-Fragment	diese Arbeit

Bezeichnung	Inserts der Plasmide	Referenz
pTET36	[P _{ADHI} - <i>cartTA</i> -T _{ACT1} - <i>URA3</i> -T _{ACT1} - <i>CDC42</i> [*] -P _{OP4min} -7× <i>tetO</i> -3` <i>ADHI</i>]-Fragment	diese Arbeit
pTET38	[P _{OP4} - <i>cartTA</i> -T _{ACT1} - <i>URA3</i> -T _{ACT1} - <i>ecaFLP</i> -P _{OP4min} -7× <i>tetO</i> -3` <i>ACTI</i>]-Fragment	diese Arbeit
pTET39	[P _{OP4} - <i>cartTA</i> -T _{ACT1} - <i>URA3</i> -T _{ACT1} - <i>ecaFLP</i> - <i>OP4P</i> _{min} -7× <i>tetO</i> -3` <i>OP4</i>]-Fragment	diese Arbeit
pTET40	[P _{OP4} - <i>cartTA</i> -T _{ACT1} - <i>URA3</i> -T _{ACT1} - <i>caGFP</i> -P _{OP4min} -7× <i>tetO</i> -3` <i>OP4</i>]-Fragment	diese Arbeit
pTET41	[P _{OP4} - <i>cartTA</i> -T _{ACT1} - <i>URA3</i> -T _{ACT1} - <i>MTLa1</i> -P _{OP4min} -7× <i>tetO</i> -3` <i>OP4</i>]-Fragment	diese Arbeit
pTET42	[P _{ADHI} - <i>cartTA</i> -T _{ACT1} - <i>URA3</i> -T _{ACT1} - <i>NRG1</i> -P _{OP4min} -7× <i>tetO</i> -3` <i>ADHI</i>]-Fragment	diese Arbeit
pTET43	[P _{OP4} - <i>cartTA</i> -T _{ACT1} - <i>URA3</i> -T _{ACT1} - <i>MTLa2</i> -P _{OP4min} -7× <i>tetO</i> -3` <i>OP4</i>]-Fragment	diese Arbeit
pTET44	[P _{OP4} - <i>cartTA</i> -T _{ACT1} - <i>URA3</i> -T _{ACT1} - <i>ecaFLP</i> -P _{OP4min} -7× <i>tetO</i> -3` <i>OP4</i>]-Fragment	diese Arbeit
pTET45	[P _{ADHI} - <i>cartTA</i> -T _{ACT1} - <i>URA3</i> -T _{ACT1} -5` <i>MTLa1</i> -P _{OP4min} -7× <i>tetO</i> -3` <i>ADHI</i>]-Fragment	diese Arbeit
pTET46	[P _{ADHI} - <i>cartTA</i> -T _{ACT1} - <i>URA3</i> -T _{ACT1} - <i>MTLa2</i> -P _{OP4min} -7× <i>ca</i> × <i>tetO</i> -3` <i>ADHI</i>]-Fragment	diese Arbeit
pTET47	[P _{ADHI} - <i>cartTA</i> -T _{ACT1} - <i>caSAT1</i> -T _{ACT1} -5` <i>MTLa1</i> -P _{OP4min} -7× <i>tetO</i> -3` <i>ADHI</i>]-Fragment	diese Arbeit
pTET48	[P _{OP4} - <i>cartTA</i> -T _{ACT1} - <i>caSAT1</i> -T _{ACT1} - <i>MTLa2</i> -P _{OP4min} -7× <i>tetO</i> -3` <i>OP4</i>]-Fragment	diese Arbeit
pTUP1M2	[5` <i>TUP1</i> - <i>FRT</i> - <i>URA3</i> -T _{ACT1} - <i>caFLP</i> -P _{SAP2} - <i>FRT</i> -3` <i>TUP1</i>]-Fragment	(Park, 2002)
pTUP1M3	[5` <i>TUP</i> -T _{ACT1} - <i>URA3</i> -3` <i>TUP1</i>]-Fragment	diese Arbeit
pTUP1K2	[5` <i>TUP1</i> - <i>TUP1</i> -T _{ACT1} - <i>URA3</i> -3` <i>TUP1</i>]-Fragment	(Park, 2002)
pUHC13-3	enthält 7 Kopien von tet-operator-Sequenz (<i>tetO</i>)	(Gossen and Bujard, 1992)
pWH11K1	[5` <i>WH11</i> - <i>WH11</i> -T _{ACT1} - <i>URA3</i> -3` <i>WH11</i>]-Fragment	diese Arbeit
pWH11M2	[5` <i>WH11</i> - <i>FRT</i> - <i>URA3</i> -T _{ACT1} - <i>caFLP</i> -P _{SAP2} - <i>FRT</i> -3` <i>WH11</i>]-Fragment	Labor Morschhäuser
pWH11N	[<i>WH11</i> - <i>ACT1</i>]-Fragment	diese Arbeit
pYML127G3	[<i>YML127</i> - <i>caGFP</i> -T _{ACT1} - <i>URA3</i> - <i>FRT</i> -3` <i>YML127</i>]-Fragment	Labor Morschhäuser

Bezeichnung	Inserts der Plasmide	Referenz
pYML127HAT1	[<i>YML127-3xHAT-T_{ACT1}-URA3-FRT-3`YML127</i>]-Fragment	Labor Morschhäuser
pYPR127E1	[<i>P_{TEF3}-YPR127-T_{ACT1}-URA3-3`TEF3</i>]-Fragment	Labor Morschhäuser

3.2 *Candida albicans*-Stämme

Alle in dieser Arbeit verwendeten *Candida*-Stämme, Ausgangsstämme sowie Genotypen sind in Tabelle 2 angegeben. Die Abkürzung P_{tet} steht für den Fusionspromotor von P_{OP4min} und 7*x**tetO*.

Tabelle 2 In dieser Arbeit verwendete *C. albicans*-Stämme

Bezeichnung	Ausgangsstamm	Genotyp	Referenz
ADH1G1A/B	CAI4	<i>ADH1/adh1::P_{ADH1-caGFP-T_{ACT1}-URA3}</i>	diese Arbeit
ADH1G4A/B	CAI4	<i>ADH1/adh1::P_{ADH1-caGFP-T_{ACT1}-caSAT1}</i>	diese Arbeit
Bca2-10	CAI4	<i>tup1/tup1::URA3</i>	(Braun and Johnson, 1997)
Bca2-10A/B	Bca2-10	<i>tup1/tup1</i>	diese Arbeit
CAG31A	CAI4	<i>ACT1/act1::P_{ACT1}-caGFP-T_{ACT1}-URA3</i>	(Morschhäuser <i>et al.</i> , 1998)
CAI4	SC5314	<i>Δura3::imm434/Δura3::imm434</i>	(Fonzi and Irwin, 1993)
CAI8	SC5314	<i>Δade2::imm434/ Δade2::imm434 Δura3::imm434/Δura3::imm434</i>	(Fonzi and Irwin, 1993)
CFI1	CAI4	<i>ACT1/act1::FRT-MPA^R-FRT</i>	(Staib <i>et al.</i> , 1999)
CHY420a	CAI4	<i>MTLa/MTLa, Δmtlα</i>	(Miller and Johnson, 2002)
CHY247α	CAI4	<i>Δmtla, MTLα/MTLα</i>	(Miller and Johnson, 2002)
CMTLαM1A/B	CAI8	<i>Δade2::imm434/Δade2::imm434 Δmtlα1 und Δmtlα2, URA3</i>	diese Arbeit
CNIM1A/B	CAI4	<i>ADH1/adh1::P_{ADH1-carfTA-T_{ACT1}-caSAT1-T_{ACT1}-caGFP-P_{tet}}</i>	diese Arbeit

Bezeichnung	Ausgangsstamm	Genotyp	Referenz
CNIM2A/B	CAI4	<i>ADHI/adh1::P_{ADHI}-cartTA-T_{ACTI}-URA3- T_{ACTI}-caGFP-P_{tet}</i>	diese Arbeit
DSY294	-	klinisches Isolat, Fluconazol sensitiv	(Karababa <i>et al.</i> , 2004)
DSY294NIM1A/B	DSY294	<i>ADHI/adh1::P_{ADHI}-cartTA-T_{ACTI}-caSATI-T_{ACTI}-caGFP-P_{tet}</i>	diese Arbeit
DSY296	-	klinisches Isolat, Fluconazol resistent, <i>CDRI</i> und <i>CDR2</i> Überexpression	(Karababa <i>et al.</i> , 2004)
DSY296NIM1A/B	DSY296	<i>ADHI/adh1::P_{ADHI}-cartTA-T_{ACTI}-caSATI-T_{ACTI}-caGFP-P_{tet}</i>	diese Arbeit
F2 (Name in unserer Stammsammlung: F7)	-	klinisches Isolat, Fluconazol sensitiv	(Franz <i>et al.</i> , 1998)
F2NIM1A/B	F2	<i>ADHI/adh1::P_{ADHI}-cartTA-T_{ACTI}-caSATI-T_{ACTI}-caGFP-P_{tet}</i>	diese Arbeit
F5 (Name in unserer Stammsammlung: F13)	-	klinisches Isolat, , Fluconazol resistent, <i>MDRI</i> Überexpression	(Franz <i>et al.</i> , 1998)
F5NIM1A/B	F5	<i>ADHI/adh1::P_{ADHI}-cartTA-T_{ACTI}-caSATI-T_{ACTI}-caGFP-P_{tet}</i>	diese Arbeit
G2 (Name in unserer Stammsammlung: Gr10)	-	klinisches Isolat, Fluconazol sensitiv	(Franz <i>et al.</i> , 1998)
G2NIM1A/B	G2	<i>ADHI/adh1::P_{ADHI}-cartTA-T_{ACTI}-caSATI-T_{ACTI}-caGFP-P_{tet}</i>	diese Arbeit
G5 (Name in unserer Stammsammlung: Gr13)	-	klinisches Isolat, Fluconazol resistent, <i>MDRI</i> Überexpression	(Franz <i>et al.</i> , 1998)
G5NIM1A/B	G5	<i>ADHI/adh1::P_{ADHI}-cartTA-T_{ACTI}-caSATI-T_{ACTI}-caGFP-P_{tet}</i>	diese Arbeit
S2F11A ^S	CAI4	<i>ACT1/act1::FRT sap2-1::URA3/SAP2-2</i>	(Staib <i>et al.</i> , 1999)
S2U11A	CAI4	<i>ACT1/act1::P_{ACTI}-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)
SCADH1G4A/B	SC5314	<i>ADHI/adh1::P_{ADHI}-caGFP-T_{ACTI}- caSATI</i>	diese Arbeit
SCHATS22B	SCHATS21B	<i>SAP2-1/ sap2-2::P_{SAP2-2}-SAP2-3xHA</i>	Labor Morschhäuser
SCNIM1A/B	SC5314	<i>ADHI/adh1::P_{ADHI}-cartTA-T_{ACTI}-caSATI-T_{ACTI}-caGFP-P_{tet}</i>	diese Arbeit

Bezeichnung	Ausgangsstamm	Genotyp	Referenz
SMC4A	CAI4	<i>CDC42/cdc42::FRT</i> <i>ACT1/act1::FRT-CDC42-MPA^R-FRT</i>	(Michel <i>et al.</i> , 2002)
SMC6A/B	CAI4	<i>cdc42/cdc42::FRT</i> <i>ACT1/act1::FRT-CDC42-MPA^R-FRT</i>	(Michel <i>et al.</i> , 2002)
SMC4ATF23A/B	SMC4A	<i>ADH1/adh1::P_{ADH1}-cartTA-T_{ACT1}-URA3-T_{ACT1}-ecaFLP-P_{tet}</i>	diese Arbeit
SMC6ATF23 SMC6BTF23	SMC6A SMC6B	<i>ADH1/adh1::P_{ADH1}-cartTA-T_{ACT1}-URA3-T_{ACT1}-ecaFLP-P_{tet}</i>	diese Arbeit
TEF3G1A/B	CAI4	<i>TEF3/tef3::P_{TEF3}-caGFP-T_{ACT1}-URA3</i>	diese Arbeit
TETF23A/B	CFI1	<i>ADH1/adh1::P_{ADH1}-cartTA-T_{ACT1}-URA3-T_{ACT1}-ecaFLP-P_{tet}</i>	(Park, 2002)
TETF27A/B	CFI1	<i>TEF3/tef3::P_{TEF3}-cartTA-T_{ACT1}-URA3-T_{ACT1}-ecaFLP-P_{tet}</i>	diese Arbeit
TETG25A/B	CAI4	<i>ADH1/adh1::P_{ADH1}-cartTA-T_{ACT1}-URA3-T_{ACT1}-caGFP-P_{tet}</i>	diese Arbeit
TETG28A/B	CAI4	<i>TEF3/tef3::P_{TEF3}-cartTA-T_{ACT1}-URA3-T_{ACT1}-caGFP-P_{tet}</i>	diese Arbeit
TETG31A/B	CAI4	<i>ACT1/act1::P_{ACT1}-cartTA-T_{ACT1}-URA3-T_{ACT1}-caGFP-P_{tet}</i>	diese Arbeit
TETC34A/B	CAI4	<i>TEF3/tef3::P_{TEF3}-cartTA-T_{ACT1}-URA3-T_{ACT1}-CDC42⁻-P_{tet}</i>	diese Arbeit
TETC36A/B	CAI4	<i>ADH1/adh1::P_{ADH1}-cartTA-T_{ACT1}-URA3-T_{ACT1}-CDC42[*]-P_{tet}</i>	diese Arbeit
TETN42A/B	CAI4	<i>ADH1/adh1::P_{ADH1}-cartTA-T_{ACT1}-URA3-T_{ACT1}-NRG1-P_{tet}</i>	diese Arbeit
TETMa46A/B	CAI4	<i>ADH1/adh1::P_{ADH1}-cartTA-T_{ACT1}-URA3-T_{ACT1}-MTLa2-P_{tet}</i>	diese Arbeit
WADH1G1A/B	WUM5A	<i>ADH1/adh1::caGFP-T_{ACT1}-URA3</i>	diese Arbeit
WO-1	-	klinisches Isolat, <i>MTL</i> α -homozygot	(Slutsky <i>et al.</i> , 1985)
WOP4K1A/B	WOP4M4A/B	<i>op4::FRT/ op4::OP4-T_{ACT1}-URA3</i>	diese Arbeit
WOP4M1A/B	WUM5A	<i>OP4/ op4::FRT-P_{SAP2}-caFLP-T_{ACT1}-URA3-FRT</i>	diese Arbeit
WOP4M2A/B	WOP4M1A/B	<i>OP4/ op4::FRT</i>	diese Arbeit
WOP4M3A/B	WOP4M2A/B	<i>op4::FRT/ op4::FRT-P_{SAP2}-caFLP-T_{ACT1}-URA3-FRT</i>	diese Arbeit
WOP4M4A/B	WOP4M3A/B	<i>op4::FRT/ op4::FRT</i>	diese Arbeit
WOGO4A/B	WOP4M4A/B	<i>op4/op4::OP4P-caGFP-T_{ACT1}-URA3</i>	diese Arbeit

Bezeichnung	Ausgangsstamm	Genotyp	Referenz
WOGS1A	WOP4M4A	<i>op4::FRT/ op4::FRT</i> <i>SAP1-1/ sap1-2::P_{SAP1-2}-caGFP-T_{ACT1}-URA3</i>	diese Arbeit
WOGS1B	WOP4M4B	<i>op4::FRT/ op4::FRT</i> <i>sap1-1::P_{SAP1-1}-caGFP-T_{ACT1}-URA3/SAP1-2</i>	diese Arbeit
WOGW11A/B	WOP4M4A/B	<i>op4::FRT/ op4::FRT</i> <i>WH11/wh11::P_{WH11}-caGFP-URA3</i>	diese Arbeit
WOP4HAT1A/B	WOP4M2A/B	<i>OP4/ op4::OP4-3xHAT-T_{ACT1}-URA3</i>	diese Arbeit
WΔOP4HAT1A/B	WOP4M4A/B	<i>op4::FRT/ op4::OP4-3xHAT-T_{ACT1}-URA3</i>	diese Arbeit
WOP4G1A/B/C	WOP4M2A/B	<i>OP4/ op4::OP4-caGFP-T_{ACT1}-URA3</i>	diese Arbeit
WΔOP4G1A/B	WOP4M4A/B	<i>op4::FRT/ op4::OP4-caGFP-T_{ACT1}-URA3</i>	diese Arbeit
WTEF3G1A/B	WUM5A	<i>TEF3/tef3::P_{TEF3}-caGFP-T_{ACT1}-URA3</i>	diese Arbeit
WTETG25A/B	WUM5A	<i>ADH1/adh1::P_{ADH1}-T_{ACT1}-URA3-T_{ACT1}-caGFP-P_{tet}</i>	diese Arbeit
WTETG28A/B	WUM5A	<i>TEF3/tef3::P_{TEF3}-cartTA-T_{ACT1}-URA3-T_{ACT1}-caGFP-P_{tet}</i>	diese Arbeit
WTETMa33A/B	WUM5A	<i>TEF3/tef3::P_{TEF3}-cartTA-T_{ACT1}-URA3-T_{ACT1}-MTLa1-P_{tet}</i>	diese Arbeit
WTETG40A/B	WUM5A	<i>OP4/ op4::P_{OP4}-cartTA-T_{ACT1}-URA3-T_{ACT1}-caGFP-P_{tet}</i>	diese Arbeit
WTETMa41A/B	WUM5A	<i>OP4/ op4::P_{OP4}-cartTA-T_{ACT1}-URA3-T_{ACT1}-MTLa1-P_{tet}</i>	diese Arbeit
WTETMa43A/B	WUM5A	<i>OP4/ op4::P_{OP4}-cartTA-T_{ACT1}-URA3-T_{ACT1}-MTLa2-P_{tet}</i>	diese Arbeit
WTETMa48A/B	WUM5A	<i>OP4/ op4::P_{OP4}-cartTA-T_{ACT1}-caSAT1-T_{ACT1}-MTLa2-P_{tet}</i>	diese Arbeit
WTETG40A72 WTETG40B72	WTETG40A/B	<i>HWP1/hwp1::P_{HWP1}-caGFP-T_{ACT1}-caSAT1</i>	diese Arbeit
WTETMa43A72 WTETMa43B72	WTETMa43A/B	<i>HWP1/hwp1::P_{HWP1}-caGFP-T_{ACT1}-caSAT1</i>	diese Arbeit
ΔmtlαTETG40A/B	CHY420a	<i>OP4/ op4::P_{OP4}-cartTA-T_{ACT1}-URA3-T_{ACT1}-caGFP-P_{tet}</i>	diese Arbeit
ΔmtlαTETMa43A/B	CHY420a	<i>OP4/ op4::P_{OP4}-cartTA-T_{ACT1}-URA3-T_{ACT1}-MTLa2-P_{tet}</i>	diese Arbeit
ΔmtlαTETG40A72 ΔmtlαTETG40B72	ΔαTETG40A/B	<i>HWP1/hwp1::P_{HWP1}-caGFP-T_{ACT1}-caSAT1</i>	diese Arbeit
WTUP1K1A/B	WTUP1M4A/B	<i>tup1::FRT/ tup1::TUP1-T_{ACT1}-URA3</i>	diese Arbeit
WTUP1M1A/B	WUM5A	<i>TUP1/ tup1::FRT-P_{SAP2}-caFLP-T_{ACT1}-URA3-FRT</i>	diese Arbeit

Bezeichnung	Ausgangsstamm	Genotyp	Referenz
WTUP1M2A/B	WTUP1M1A/B	<i>TUP1/tup1::FRT</i>	diese Arbeit
WTUP1M3A/B	WTUP1M2A/B	<i>tup1::FRT/tup1::FRT-P_{SAP2}-caFLP-T_{ACT1}-URA3-FRT</i>	diese Arbeit
WTUP1M4A/B	WTUP1M3A/B	<i>tup1::FRT/tup1::FRT</i>	diese Arbeit
WTUP1M5A/B	WTUP1M4A/B	<i>tup1::FRT/tup1::T_{ACT1}-URA3</i>	diese Arbeit
WTGO4A/B	WTUP1M4A/B	<i>tup1::FRT/tup1::FRT OP4/op4::P_{OP4}-caGFP-T_{ACT1}-URA3</i>	diese Arbeit
WTGS1A	WTUP1M4A	<i>tup1::FRT/tup1::FRT SAP1-1/sap1-2::P_{SAP1-2}-caGFP-T_{ACT1}-URA3</i>	diese Arbeit
WTGS1B	WTUP1M4B	<i>tup1::FRT/tup1::FRT sap1-1::P_{SAP1-1}-caGFP-T_{ACT1}-URA3/SAP1-2</i>	diese Arbeit
WTGW11A/B	WTUP1M4A/B	<i>tup1::FRT/tup1::FRT WH11/wh11::P_{WH11}-caGFP-URA3</i>	diese Arbeit
WUM5A	WO-1	<i>ura3::FRT/ura3::FRT</i>	(Strauß <i>et al.</i> , 2001)
WUGO4A	WUM5A	<i>ura3::FRT/ura3::FRT OP4/op4::P_{OP4}-caGFP-T_{ACT1}-URA3</i>	(Park, 2002)
WUGS1A	WUM5A	<i>ura3::FRT/ura3::FRT sap1-1::P_{SAP1-1}-caGFP-T_{ACT1}-URA3/SAP1-2</i>	(Strauß <i>et al.</i> , 2001)
WUGW11A	WUM5A	<i>ura3::FRT/ura3::FRT WH11::FRT/wh11::P_{WH11}-caGFP-URA3</i>	(Strauß <i>et al.</i> , 2001)
WWH11K1A/B	WWH11M4A/B	<i>wh11::FRT/wh11::WH11-T_{ACT1}-URA3</i>	diese Arbeit
WWH11M1A/B	WUM5A	<i>WH11/wh11::FRT-P_{SAP2}-caFLP-T_{ACT1}-URA3-FRT</i>	diese Arbeit
WWH11M2A/B	WWH11M1A/B	<i>WH11/wh11::FRT</i>	diese Arbeit
WWH11M3A/B	WWH11M2A/B	<i>wh11::FRT/wh11::FRT-P_{SAP2}-caFLP-T_{ACT1}-URA3-FRT</i>	diese Arbeit
WWH11M4A/B	WWH11M3A/B	<i>wh11::FRT/wh11::FRT</i>	diese Arbeit
WWGO4A/B	WWH11M4A/B	<i>wh11::FRT/wh11::FRT OP4/op4::P_{OP4}-caGFP-T_{ACT1}-URA3</i>	diese Arbeit
WWGS1A	WWH11M4A	<i>wh11::FRT/wh11::FRT sap1-1::P_{SAP1-1}-caGFP-T_{ACT1}-URA3/SAP1-2</i>	diese Arbeit
WWGS1B	WWH11M4B	<i>wh11::FRT/wh11::FRT SAP1-1/sap1-2::P_{SAP1-2}-caGFP-T_{ACT1}-URA3</i>	diese Arbeit
WWGW11A/B	WWH11M4A/B	<i>wh11::FRT/wh11::P_{WH11}-caGFP-URA3</i>	diese Arbeit

3.3 Oligonukleotide

Die benutzten Oligonukleotide (Tabelle 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.

Tabelle 3 In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide

Bezeichnung	Länge (nt)	T_A (°C)	Sequenz (5'→3')
ACT1-seg	24	56	IRD 800-GGATGTTCTTCTGGAGCAACTCTC
ACT16	28	53	TTCTAAGATCTAAATTCGGAAATCTGG
ACT17	35	53	ATATACTGCAGACATTTTATGATGGAATGAATGGG
ACT18seq	22	55	IRD 800-GAATACAAAACCAGATTTCCAG
ACT21	36	53	ATATACTCGAGGACATTTTATGATGGAATGAATGGG
ACT24	27	53	CTTTAAACATGCCGCGGAAATATACAG
ACT26	31	53	CTAAAACATACCTCTAGATTTTGAATGAT
ACT29	34	53	CTAAGGATCCAATTCTGGAAATCTGGAAATCTGG
ADH4	37	50	TAATTGTCGACTGTATTTGTTGTTGTTGTTGATGA
ADH7	27	50	GGATTCAACGGTCTAGATGGAGCCGTC
ADH8	30	50	GGTGCTGAACCAAAGTGCAGTGAAGCTGAC
ADH9	30	50	CCATCAATTTGAAGAGCTCTGGCAAGTCAG
ADH11	27	50	CGGTTGAGATGGTACCGTCAAATATCC
ADH12	33	50	TTTGTTAGATCTAATTGTTTTTGTATTTGTTG
ADH15	39	50	ATATAGGTACCGGGCCCAGACAATCTTGATTGGGCATTG
CDC9	33	50	ATCCAGTCGACATGCAAACCTATAAAAATGTGTTG
CDC11	29	50	TGTCGGTACCCAAACTGCTTTACGAAACG
CDC12	28	48	CTTCTAGTATCGGGATCCTATAAAAATAG
CDC13	28	48	CTTCTAGTATCGTCGACCTATAAAAATAG
CDC14	39	50	TAATGGATCCATATATCATGCAAACCTATAAAAATGTGTTG
GFP4	19	50	TCTGGTAAAAGGACAGGGC
GFP16	35	50	GATGGGATCCAGTAAAGGAGAAGAAGACTTTTCACTG
GFP24	35	50	AGTCTAGATCTTTATTTGTATAGTTCATCCATGCC
GFP-seq1	21	55	IRD 800-GTGCCCATTAACATCACCATC
HAT6	110	50	TGCTAGGATCCATCCATACGATGTTCCGGATTACGCTTACCCA TACGATGTTCCGGATTACGCTTACCCATACGATGTTCCGGATTAC GCTTAAGAGTGAAATTCCTGGA

Bezeichnung	Länge (nt)	T _A (°C)	Sequenz (5'→3')
MATa1	35	52	CCTCGTTTTTTT <u>CGTCG</u> CAATGAACTCAGAAATAG
MATa2	27	52	ATTTCCAGT <u>GGATCC</u> ATTGTGGCTAGG
MATa3	28	52	<u>CTCGAG</u> TGTCGGGAGCATGTATACTCGC
MATa4	34	52	CAAAAATCATT <u>GGATCC</u> ATTGTCTAACCTGCCCCG
MATa5-seq	31	56	IRD 800-CTCAAACCTCAATCCAATATCTTCTACTAGG
MATa6-seq	30	56	IRD 800-CATTATCATCAGTCTAATTTATGGGCCAAC
MATα1	29	52	CTAATATTCGAAA <u>GGTACC</u> AGGGAGAAGC
MATα2	35	52	CCAGATGTGAATTCATG <u>TGACT</u> TATTGATGTGAG
MATα3	29	52	CTTTGTAAACC <u>TGCAG</u> ACATATTGATAGG
MATα4	32	52	ATTGGTACCAG <u>AGCTC</u> TAATAGTAGCATTAG
MTLα1-1	42	50	CGACTATGTGTAACAGAA <u>GTCGACC</u> ACTTCAACAGATATGGG
MTLα1-2	39	50	GGCGTCTGTAAT <u>GGATCC</u> AGTTAAATATATATTTAATG
MTLa2-2	30	52	CAGA <u>GGATCC</u> TATTGAAAAACGTCCTCAG
MTLa2-3	30	52	AAGAC <u>GTCGACC</u> CAATAATATGCCATATACC
OPS1	20	50	TGCAAGAG <u>CTCGCC</u> ACCACC
OPS1-seq	27	56	IRD 800-CTACTACGTAACTCCTACACACATAC
OPS2	29	50	GAAGAAGCAAAGAT <u>CTC</u> TAAGATGGTGGC
OPS3	31	50	CTTTAGTTAATG <u>CTCGAGG</u> TCAAGCTGCCTC
OPS4	31	50	CAACAAATTCAG <u>GTACC</u> TTGAAAGCTGCAAC
OPS5	26	50	CTGTTACTTGAT <u>CTAGA</u> ACCGTCCCC
OPS10	28	50	TCAATTAAGTG <u>GAGCTC</u> CATGTTTGTC
OPS11	30	50	ACATT <u>GTCGACA</u> ATTTGTGAACCTCTAGCC
OPS14	34	50	TAATC <u>GGATCC</u> ATAAAGTTTTCTTTTCTTCAATG
OPS15	28	50	CGCCACCACCTC <u>CGCGG</u> TTTATTGAGGG
OPS16	42	50	<u>TCTAGA</u> CATTGTAAATTATTTATATTTGTATGTGTGATAGGAG
OPS17	33	50	CTGCTTTGGTTT <u>CTGCAG</u> CTCCAGCCAACATTG
OPS18	33	50	GTTAACATCACTAG <u>AGGTACC</u> AGAAGTATCAAC
SAT2	28	52	CTAGTGATTT <u>CTGCAGG</u> ACCACCTTTG
SAT3	33	52	TTGTT <u>CTCGAG</u> ATAAATTTTCTCGTTTGGGATG
TEF1	31	52	GCAATAGCCATTT <u>CGCGG</u> ATTTGAGATTGC
TEF2	32	52	GGATTCACTAGCT <u>CTAGAC</u> ATTTCCAAAATG
TEF3	28	52	CGAAGAATTCAG <u>CTCGAG</u> AGCCATTGA
TEF4	29	52	TTTGTGGTTT <u>AGAGGTACC</u> TGGGTATTGG
TEF5	28	52	CTTGATAAGTAG <u>AGTACCA</u> ACCCAAGTG
TEF6	31	52	<u>TTTTGGATCC</u> TGTTGTTGATAAAAAGAAGAA
TEF7	31	52	CAACCACCATCAT <u>CTGCAG</u> ATGAAGAAGATG
TEF8	32	52	GTGGTTTAGAAGTACC <u>CGG</u> TATTGGAATGAC
TUP1	34	50	TTGGGCAGT <u>GAGCTC</u> TTTACTACTC
TUP2	31	50	ATACATGGAC <u>AGATCT</u> GTTGGGGATGG

Bezeichnung	Länge (nt)	T _A (°C)	Sequenz (5' → 3')
TUP3	30	50	GGCGATTGTAAC <u>CTCGAGA</u> ATTTGGAA
TUP4	33	50	AACTTTTCTCC <u>GGTAC</u> CTGCTAAAACACG
TUP5	34	52	GGCGATTGTAAC <u>CTGCAGA</u> ATTTGGAA
TUP6	34	52	AACTTTTCT <u>GAGCT</u> CCTGCTAAAACACG
TUP7	22	55	TAAGATCT <u>AGAG</u> CAGTGACAGCTTTACTACTC
TUP8	25	55	ATACT <u>GGATC</u> CTTATTTTTTGGTCCATTTC
URA16	21	55	TGTTTCCGCGGATACCATCCAAATCAATTCC
WHS1	33	52	TATTAG <u>AGCTC</u> TAAGGTGCTATATTGCGTCATC
WHS2	30	50	CTACCTAAGTCGG <u>AGATCT</u> TTAATTGTTCTGC
WHS3	31	50	GGTGACTC <u>GAG</u> AATAACAATGAGTGAG
WHS4	32	50	GCAATCATCTT <u>GGTACC</u> TAAAGCGTAGGATGC
WHS5	33	52	CTTGTTTCATCT <u>TCTAG</u> ACCCATAGC
WHS12	34	52	GTAA <u>AGATCT</u> CATTGTTTATTTGGAGTCACC
WHS13	35	52	CAAC <u>CTGCAGA</u> ACAATTAACATGTCCGACTTAGG
WHS14	32	52	TATTT <u>GGTACC</u> ACCAAAAATAGCATCAGAAGC
reverse-Primer	19	56,7	IRD 800-GGAAACAGCTATGACCATG zur Sequenzierung, bindet an die Sequenz von pBlueskript KSII
uni-Primer	17	56,8	IRD 800-GTAAAACGACGGCCAGT zur Sequenzierung, bindet an die Sequenz von pBlueskript KSII

3.4 Laborgeräte und Chemikalien

Die für diese Arbeit benötigten Laborgeräte und deren Hersteller sind in Tabelle 4 aufgelistet. Die Hersteller bzw. Anbieter der benutzten Chemikalien sind an geeigneter Stelle im Methodenteil angegeben. Das Antimykotikum Fluconazol wurde uns 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.

Tabelle 4 In dieser Arbeit benötigte Laborgeräte

Laborgerät	Firma
Balzer dryer (Baltec CPD030)	Zeiss
Binokular Nikon SMZ800	Nikon
Brutschrank 25°C/30°C	Memmert
Brutschrank 37°C kelvitron	Heraeus

Laborgerät	Firma
Digitalkamera Coolpix 4500	Nikon
Elektronenmikroskop	Zeiss
Elektrophosesezellschalen horizontal, vertikal	Bio-Rad
Elektroporationsgerät	Equibio
Farbvideokamera für mikroskopische Aufnahmen	Intas
Fluoreszenzmikroskop (Zeiss MC80, Axiolab Fluoreszenz, ausgestattet Quecksilber-Kurbogenlampe HB050 und Zeiss Fluorescein-spezifischem Filter-Set 09)	Zeiss
Geldokumentationsanlage	Bio-Rad
Heizblock	Liebich
Hybridisierungsöfen Shake 'n' Stack	Hybaid
Konfokal-Laser-Scanning-Mikroskop (Zeiss LSM510, ausgestattet Zeiss Axiovert 100)	Zeiss
PCR-Gerät (Progene)	Techne Ltd, Cambridge
Photometer Ultrospec 3100	Amersham
Lasterelektronenmikroskop (Zeiss DSM962)	Zeiss
Schüttelinkubator 25°C/30°C Certomat® BS1	B.Braun Biotech International
Schüttelinkubator 37°C, innova 4300	New Brunswick Scientific
Semidry-Blotgerät	OWL
Gold Sputter (Baltec SCD005)	Zeiss
Thermocycler Cyclone 25	Peqlab
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 [Gibco]) beimpfte *E. coli*-Zellen wurden über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Plasmid-tragende *E. coli*-Stämme wurden unter dem entsprechenden Selektionsdruck (entweder 100 µg/ml Ampicillin oder 30 µg/ml Chloramphenicol) kultiviert.

3.5.2 Anzucht von *C. 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. Die Agarkulturen wurden in der Regel bei 4°C gelagert.

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). Für die Selektion von Nourseothricin-resistenten (Nou^R) *C. albicans*-Transformanten wurden YPD-Agarplatten verwendet, die 200 µg/ml Nourseothricin (Nou) enthalten. Zur Selektion und Propagation von *URA3*-prototrophen *C. albicans*-Transformanten wurde SD-Medium (0,67% YNB [Yeast Nitrogen Base; BIO 101 Vista, Calif.], 2% Glucose) mit 100 ml URA-drop-out 10x (BIO101) eingesetzt. 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.

Für die Selektion der *ura3*-auxotrophen *C. albicans*-Mutante, die durch die Verwendung der *URA3*-blaster-Methode hergestellt worden waren und in denen die Excision des *URA3*-blasters stattgefunden hat, wurden SD-Agarplatten mit 100 µg/ml Uridin und 1 mg/ml FOA (5-fluor-orotic acid [Sigma], schwer löslich) eingesetzt.

3.5.2.2 Induktion des Tetrazyklin-induzierbaren Genexpressionssystems

Für die Induktion des Tet-Systems wurde Doxyzyklin (Dox) in der Konzentration von 50 µg/ml verwendet. Die Induktion des *ecaFLP*-Gens bzw. der sonstigen Markergene (*caGFP*, dominant-negativen *CDC42*^{D118A} und *NRG1*) unter dem Tet-System erfolgte in SD-Medium bzw. YPD-Medium. Das exprimierte *ecaFLP*-Gen schneidet den MPA^R-Marker bzw. das *CDC42*-Gen mit dem MPA^R-Marker, das mit *FRT*-sites flankiert ist, aus dem Genom heraus. Zur Unterscheidung von MPA-sensitiven Derivaten wurden entsprechende Verdünnungen von Dox-induzierten Kulturen auf mit 1,8 µg/ml MPA supplementierten SD-Agarplatten ausplattiert. Dort wuchsen die gewünschten MPA^S-Klone in kleineren Kolonien, im Vergleich zu den MPA-resistenten Ausgangsstämmen. Dabei diente die MPA-sensitive bzw. resistente Stämme, S2FI1A^S bzw. S2UI1A, als Kontrolle. Für die Induktion der Gene, die in der *C. albicans*-opaque-Form durch das Tet-On-System induziert wurden, wurde das flüssige oder feste Lee's Medium (Siehe in Absatz 3.5.3) mit 50 µg/ml Doxyzyklin verwendet.

3.5.2.3 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*-Marker aus dem *C. albicans*-Genom bewirkte. Zur Unterscheidung von *ura3*-negativen Derivaten wurden entsprechende Verdünnungen von YCB-BSA-Kulturen auf Minimalagarplatten ausplattiert, die 10 µg/ml Uridin enthielten. Dort wuchsen die gewünschten *ura3*-negativen Zellen in kleineren Kolonien als die *URA3*-positiven Ausgangsstämme. Zur Kontrolle wurden diese Derivate in der Regel nochmals auf 100 µg/ml Uridin-Minimalagarplatten und gleichzeitig auf Minimalagarplatten ohne Uridin überprüft.

3.5.3 Anzucht von *C. albicans* in white- und opaque-Form

Zur Kultivierung der white- und opaque-Zellen von *C. albicans* wurde das modifizierte 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-Arginin und 0,0001% d-Biotin), 100 µM ZnSO₄ sowie 0,81 mM MgSO₄. Der pH-Wert wird auf 6,8 eingestellt (Bedell and Soll, 1979). Zur Agarplatten-Herstellung von Lee's Medium wurden 2% Agar und 5 µg/ml Phloxin B, das die opaque-Kolonien pink färbt (Soll *et al.*, 1993), zugesetzt. Flüssigkulturen wurden bei 25°C unter Schütteln (250 rpm) inkubiert und die beimpften Agarplatten wurden bei Raumtemperatur (RT, 18°C-26°C) im Dunkeln inkubiert und dort weiter aufbewahrt. Denn es zeigte sich für die *MTL*-homozygoten *C. albicans*-Stämme und deren Derivate, dass sie für optimale Zellzustände bei Raumtemperatur aufbewahrt werden mussten, nicht wie üblich bei 4°C.

3.5.4 Hypheninduktionsmedien für *C. albicans*

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

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 in einer Konzentration von 10% als Festmedium mit

2%igem Agar benutzt.

Des Weiteren wurde SLAD (Synthetic Low Ammonium Dextrose)-Medium (0,17% YNB [Yeast Nitrogen Base; BIO 101 Vista, Calif.], 2% Glucose, 50 μM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) (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% K_2HPO_4 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) (Siehe in Absatz 3.5.3) verwendet.

3.6 Molekularbiologische Methoden

Sofern nicht genauer beschrieben, wurden molekularbiologische Methoden nach Standardprotokollen durchgeführt (Sambrook *et al.*, 1989). Dazu gehören 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) oder für die proof-reading-Aktivität die Pfu- DNA-Polymerase (Invitrogen oder Pormega), die Triple-Master-DNA-Polymerase (Eppendorf) bzw. Phusion-DNA-Polymerase (Finnzymes) 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 Tabelle 3) und 1 Minute (2 Minuten bei Pfu bzw. 30 Sekunde bei Phusion) Extensionszeit pro kb des zu amplifizierenden DNA-Fragmentes bei 68°C (72°C bei Pfu bzw. 70°C bei Phusion). Auf die Amplifikations-Zyklen folgte ein zusätzlicher Extensionsschritt von zehn Minuten. Als Template in einem 50 μl -PCR-Ansatz diente 1-2 ng Plasmid-DNA bzw. 0,1-1,0 μg chromosomale *C. albicans*-DNA. Weitere Bestandteile des PCR-Ansatzes waren jeweils 0,2 mM der Desoxyribonukleotiden dNTPs, 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 Fällern der DNA in Ethanol mit Natriumacetat oder mittels Säulchen des PCR-Purification-Kits (Quiagen) laut 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 (U) einer oder mehrerer Restriktionsendonukleasen (Amersham Pharmacia, New England Biolabs) eingesetzt. Pro Ansatz durfte das zugesetzte Volumen an Enzymen nicht 1/10 des Gesamtvolumens 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 3 µl (300-500 ng/µl) Plasmid-DNA in einem 20 µl-Reaktionsansatz und bei der präparativen Spaltung 10 bis 30 µl DNA in einem 50 µl-Ansatz verwendet wurden. Für eine Kontrollspaltung war die Inkubation während 1-2 h bei 37°C ausreichend, bei präparativen Spaltungen war eine längere Inkubation von 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 ca. 10 µg chromosomale DNA benutzt, die in einem 30 µl-Restriktionsansatz über Nacht bei 37°C inkubiert wurde. Schließlich wurde die Restriktion mit 5x DNA-Auftragspuffer (0,05% Bromphenolblau, 0,15 M EDTA, 25 mM Tris-HCl pH 7,0, 25% Glycerin) in einfacher Endkonzentration gemischt.

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

3.6.3 Aufreinigung von DNA

Um möglichst Protein-freie Plasmid-DNA, PCR-Produkte und Spaltansätze von PCR-Produkten für weitere Sequenzierungs- und Restriktions-Zwecke zu gewinnen, wurden die folgenden beiden DNA-Reinigungsmethoden verwendet.

3.6.3.1 Durch Phenolisierung und Ethanol-Fällung

Um DNA von Enzymen und anderen Proteinen aufzureinigen, wurde der 50 µl Ansatz mit PCR-Produkt bzw. Plasmid-DNA von der Minipreparation mit H₂O auf 300 µl aufgefüllt und dann je einmal mit 300 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) und 300 µl Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) extrahiert. Für die Ethanol-Fällung wurde das 2,5-fache Volumen an kaltem 100% Ethanol und 1/10 des Volumens an 3 M Natriumacetat (pH 4,8) zur DNA-Lösung zugegeben, danach wurde entweder eine Stunde bei -75°C oder über Nacht bei -20°C gefällt. Nach der Ethanol-Fällung mit Salz wurde die gefällte DNA mit 70% Ethanol gewaschen und dann in geeigneter Menge H₂O gelöst. Die so gereinigte DNA stand nun für weitere Restriktionsspaltungen oder für die Sequenzierreaktion zur Verfügung.

3.6.3.2 Durch Agarose-Gelelektrophorese

Die mit 1x Auftragspuffer versetzten präparativen Spaltansätze von Plasmid-DNA oder der durch PCR amplifizierten DNA wurden auf ein 1%iges Agarosegel in 1x TAE-Puffer (50x TAE-Stocklösung: 242 g Tris, 57,1 ml Eisessig, 100 ml 0,5 M EDTA, pH 8,0, ad H₂O 1 l) zusammen mit einem DNA-Größenstandard (1 kb DNA-Leiter [Invitrogen]) aufgetragen, worauf die DNA-Fragmente im elektrischen Feld mit einer gewählten Spannung zwischen 30-100 V nach Größe aufgetrennt wurden. Anschließend wurde das Gel im Ethidiumbromid-Bad (10 mg/ml in H₂O) gefärbt.

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 600 µl Natriumjodid bei 50°C gelöst, mit 8 µl Glasmilch versetzt, kurz mit Vortexer gemischt und für 5 min auf Eis inkubiert. Dabei band sich die DNA an die Glasmilch, welche dann je dreimal zentrifugiert (30 sec, 13000 rpm) und mit eiskalter 200 µl „New Wash“-Lösung gewaschen wurde. Anschließend nahm das Pellet in geeignetem Volumen bidest. H₂O (15 µl bei Fragmenten zur Klonierung bzw. 6 µl bei Fragmenten zur Hefe-Transformation) auf und wurde 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.

3.6.3.3 Durch DNA-Reinigungskit

Das Qiaquick-DNA-Reinigungskit (Quiagen) wurde hauptsächlich für eine schnelle Reinigung der PCR-amplifizierten DNA verwendet. Der Reinigungsvorgang wurde nach angegebener Vorschrift durchgeführt. Der 50 µl Ansatz mit PCR-Produkten wurde mit der 2,5-fachen PB-Lösung gemischt und in ein spezielles Filtercap überführt, dann 1 min bei

13000 rpm abzentrifugiert, wodurch die DNA an den Filter gebunden wurde. Die DNA am Filter wurde dann mit 700 µl PE-Lösung durch die Zentrifugation (1 min, 13000 rpm) gewaschen. Um die DNA vom Filter zu eluieren, wurden 20-40 µl H₂O in das Filtercap gegeben und bei RT 1 min inkubiert und anschließend zentrifugiert (1 min, 13000 rpm). Die DNA-haltige Lösung wurde entnommen und zur weiteren Verwendung bei -20°C aufbewahrt.

3.6.4 Ligation und Klonierung

3.6.4.1 Herstellung von kompetenten Zellen

Die Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen (DH5α) erfolgte nach der CaCl₂-Methode. Dazu wurden 50 ml LB-Medium 1:100 aus einer 10 ml Übernacht-Kultur inokuliert und bis zu einer OD₆₀₀ von etwa 0,5-1,0 (3-4 h) 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 sterilem, eiskaltem 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 das eiskalte sterile Glycerin (86%) dazugegeben, so dass die Endkonzentration an Glycerin 15% (v/v) betrug. Diese Suspension wurde in Eppendorf-Caps zu je 200 µl aliquotiert und bis zur Verwendung bei -75°C aufbewahrt.

3.6.4.2 Ligation und *E. coli*-Transformation

Zur Ligation wurden die gespaltenen und gelaufgereinigten DNA-Fragmente verwendet. Ein 15 µl Ligationsansatz bestand aus 1 µl Vektor-DNA, einer oder mehreren Inserts-DNA (je 3 bis 5 µl) (das Verhältnis des verwendeten Vektors und Inserts war in der Regel 1:3), sowie 1x T4-DNA-Ligationspuffer (5x, Gibco bzw. 10x, New England Biolabs) und 1 µl T4-DNA-Ligase (1 U/µl, Gibco bzw. 400 U/µl, New England Biolabs). Die Reaktion erfolgte für 2-3 h bzw. 10-15 min bei Raumtemperatur.

Die anschließende *E. coli*-Transformation wurde mit der Hitzeschock-Methode durchgeführt. Dafür wurden 15 µl des Ligationsansatzes mit 200 µl kompetenten *E. coli*-Zellen gemischt und 15-30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock für 90 sec bei 42°C folgte das Abkühlen auf Eis für 1 min. Danach wurde 1 ml LB-Medium zugegeben und zur Expression des transformierten Ampicillin-Resistenzmarkers bzw. Chloramphenicol für 1 h bei 37°C inkubiert, bevor die Zellen auf Ampicillin bzw. Chloramphenicol-haltigen Selektions-LB-Agarplatten ausplattiert wurden. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert.

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*-Übernacht-Kultur in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß abzentrifugiert (2 min, 13000 rpm) und das Zell-Pellet für 5 min bei Raumtemperatur in 100 µl Lösung I (50 mM Glucose, 10 mM EDTA pH 8,0, 25 mM Tris-HCl pH 7,5) inkubiert. Nach dem Abkühlen der Suspension auf Eis wurde zunächst 200 µl Lösung II (200 mM NaOH, 1% SDS) zugegeben, kurz gemischt und 150 µl Lösung III (3 M Natriumacetat, pH 4,8) zugesetzt, erneut gemischt, und für die Lyse der Ansatz für 5 min auf Eis inkubiert. Nach der Zentrifugation (5 min, 13000 rpm) wurde der wässrige Überstand abgenommen, um die DNA in 200 µl 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 µl bidest. H₂O gelöst (100-200 ng/µl DNA). Für den Abbau der RNA wurde die gelöste Plasmid-DNA für 10 min bei 37°C mit 1 µl RNaseA (10 mg/ml gelöst in 10mM Tris-HCl pH 7,5, 15 mM NaCl) behandelt.

3.6.6 DNA-Sequenzierung

Das verwendete Protokoll basierte auf der Kettenabbruch-Methode verursacht durch Didesoxynukleotide (Sanger *et al.*, 1977). Die Sequenzierungs-PCR wurde mit dem „Thermo-Sequenase fluorescent labeled primer cycle sequencing kit with 7-deaza-dGTP (RPN 2438)“ von Amersham Pharmacia nach deren Angaben durchgeführt. Für einen Sequenzierungsansatz wurden erst 6 µl der gereinigten Plasmid-DNA (entspricht ca. 500 ng) mit 1 µl (1 pmol) des IRD-800-fluoreszenzmarkierten Sequenzier-Primers (MWG) und 7 µl H₂O gemischt, dann je 3 µl von diesem Vormix mit je 1 µl des A-, C-, G- oder T-Terminationsmixes in 0,5 ml PCR-Caps versetzt und mit Paraffinöl bedeckt. Die Sequenzierreaktionen erfolgten im Thermocycler, wobei 30 Zyklen der Schritte Denaturierung (30 sec, 95°C), Primer-Annealing (30 sec, Primer-abhängige Temperatur) und DNA-Polymerisierung (30 sec, 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. Als eine Alternative wurde die DNA-Sequenzierung von der Firma SeqLab (Göttingen) durchgeführt.

3.6.7 Genetische Transformation von *C. albicans* durch Elektroporation

In dieser Arbeit wurden generell für die Transformation *ura3*-auxotrophe *C. albicans*-Stämme eingesetzt. Für die Transformation, wobei das Nourseothricin (Nou)-resistente Markergen (*caSAT1*) für die Selektion von Transformanten eingesetzt wurde, wurden entweder klinische Isolate oder die Stämme unabhängig vom genetischen Hintergrund verwendet. Nun wird bei der Transformation ein DNA-Fragment, das als Selektionsmarker ein intaktes *URA3*- bzw. *caSAT1*-Gen enthält, in die Hefezelle aufgenommen und in das Genom integriert. So lassen sich prototrophe oder Nourseothricin-resistente Transformanten auf Minimalagarplatten ohne Uridin oder Nou (200 µg/ml)-haltigen Agarplatten vom Ausgangsstamm selektieren. Bei der zu transformierenden DNA handelte es sich ausschließlich um aus Plasmiden durch Restriktion herausgespaltene lineare DNA-Fragmente, die vorab durch Gelelektion aufgereinigt wurden und in einer Konzentration von etwa 0,5 µg/µl gelöst in 5 µl H₂O vorlagen. Für die Integration an die gewünschte Stelle des Hefegenoms 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 100µg/ml Uridin) etwa 1:20000 angeimpft und ca. 16 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-HCl pH 7,5, 10 mM EDTA pH 7,5) und 1 M Lithiumacetat pH 7,5 (mit Essigsäure eingestellt) versetzt und 45-60 min unter Schütteln bei 30°C inkubiert. Nach der Zugabe von 250 µl 1 M DTT erfolgte weitere 20-30 min Schüttelinkubation bei 30°C. Beginnend mit der anschließenden Zugabe von 25 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 ca. 100 µl 1 M Sorbitol aufgenommen.

Für die Transformation der kompetenten *C. albicans*-Zellen durch Elektroporation wurden 45 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 dann in ein Eppendorf-Cap überführt und 100 µl schließlich auf den entsprechenden Selektionsagarplatten ausplattiert. Der Rest der Suspension wurde konzentriert und ebenfalls ausplattiert. Im Transformationsfall mit dem Nourseothricin-Selektionsmarker wurden die Zellen nach der Elektroporation in 1 ml YPD suspendiert und zur Expression des transformierten Nourseothricin-Resistenzmarkers für mindestens 3 Stunden bei 30°C inkubiert, bevor sie auf den Selektionsplatten ausplattiert wurden. Nach 2-3 Tagen Inkubation bei 30°C bei der Selektion *URA3*-positiver Klone bzw. nach 1-2 Tagen bei der Selektion Nourseothricin-resistenter Klone konnten Transformanten herausgepickt und auf Selektionsagarplatten gestrichen werden.

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

Zur Isolierung chromosomaler DNA aus *C. albicans*-Zellen wurde alternativ nach zwei Protokollen (der Glasbead-Methode und der enzymatischen Methode) gearbeitet. Die mechanische Aufschlussmethode (Glasbead-Methode) liefert die DNA schneller gegenüber der enzymatischen Methode, wobei die Ausbeute geringer und die Qualität schlechter ist, aber sich dennoch gut zum schnellen Southernblot-Screening von vielen Transformanten eignet. Zur qualitativ guten Darstellung von Stammserien im Southernblot wurde die etwas aufwändigere enzymatische Isolierung gewählt.

3.6.8.1 Glasbead-Methode

Die *C. albicans*-Zellkultur, die in 10 ml YPD-Medium bei 30°C über Nacht unter Schütteln herangezüchtet wurde, wurde in ein Greiner-Röhrchen überführt und abzentrifugiert (5 min, 4000 rpm). Das Pellet wurde in 1 ml bidest. H₂O suspendiert, in ein 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und abzentrifugiert (1 min, 13000 rpm). Nun wurde dem Pellet 200 µl Breaking-Puffer (2% Triton X-100, 1% SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA), etwa 0,3 g Glasperlen (0,25-0,50 mm Durchmesser, Roth), sowie 200 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) zugegeben und 3-4 min mit höchster Geschwindigkeit gevortext. Nach Zugabe von 200 µl 1x TE-Puffer (100 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA) wurde nochmals 30 sec schonend gevortext, bevor die DNA durch Zentrifugieren (5 min, 13000 rpm) in eine wässrige Phase extrahiert und in ein neues Cap überführt wurde. Auf die Fällung der DNA durch Zugabe von 1 ml eiskaltem, 100% Ethanol

und Abzentrifugieren des Pellets folgte ein Waschschrift in 70% Ethanol. Das luftgetrocknete DNA-Pellet wurde in 200 µl 1x TE-Puffer gelöst und schließlich noch mit 3 µl RNaseA (10 mg/ml) für 15 min bei 37°C behandelt. Für die Fällung von DNA wurde dann 1 ml eiskaltes, 100% Ethanol zugegeben, anschließend für 5 min bei 13000 rpm abzentrifugiert. Das Pellet wurde mit 70% Ethanol gewaschen, luftgetrocknet, und schließlich in 20 bis 50 µl H₂O gelöst.

3.6.8.2 Enzymatische Methode

Für die enzymatische Methode der chromosomalen DNA-Isolierung wurde das Zellpellet aus der Übernacht-Kultur nach dem Abzentrifugieren in 1 ml 1 M Sorbitol gewaschen, in ein 2 ml Eppendorf-Cap überführt und erneut zentrifugiert (1 min, 13000 rpm). Die Zellen wurden in 1 ml Lyticase-Puffer (1 M Sorbitol, 100 mM Natriumcitrat pH 5,8, 50 mM EDTA pH 8,0, 2% β-Mercaptoethanol, 500 U/ml Lyticase [Sigma]) resuspendiert und für 45-60 min bei 37°C inkubiert. Daraufhin folgte ein Zentrifugationsschritt (5 min, 13000 rpm) zum Abtrennen der Zellen aus der Lösung und ein Wechsel in 800 µl Proteinase-Puffer (10 mM Tris-HCl pH 7,5, 50 mM EDTA pH 7,5, 0.5% SDS, 1 mg/ml Proteinase K [Sigma]). Danach wurde die Inkubation für ca. 30 min bei 60°C durchgeführt. Die Extraktion der DNA erfolgte nun durch Zugabe des gleichen Volumens an Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1), Vortexen für 5 min und Trennung der Phasen durch Zentrifugation (5 min, 13000 rpm). Die ca. 800 µl DNA-haltige, wässrige Phase wurde in ein neues Cap überführt und mit 800 µl eiskaltem Isopropanol ausgefällt. Nach der Zentrifugation (5 min, 13000 rpm) wurde das Pellet in 70% Ethanol gewaschen, kurz luftgetrocknet und in 200 µl 1x TE-Puffer (10 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 mM EDTA) gelöst. Anschließend wurde die DNA mit 3 µl RNaseA (10 mg/ml) für 30 min bei 37°C behandelt. Die DNA wurde nochmals durch einen Phenolisierungsschritt extrahiert, durch einen Reinigungsschritt mit Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) vom restlichen Phenol abgetrennt und in 200 µl Isopropanol gefällt. Nach Waschen des Pellets mit 70% Ethanol und Lufttrocknen wurde die chromosomale DNA in 80-100 µl bidest. H₂O gelöst und die Konzentration unter der Annahme, dass eine OD₂₆₀ von 1,0 50 µg/ml DNA entspricht, photometrisch bestimmt.

3.6.9 Southern-Hybridisierung

Bei der Southern-Hybridisierung (Southernblot) wird auf einem Gel aufgetrennte DNA auf eine Nylon-Membran transferiert, um darauf mit einer markierten Sonden-DNA das entsprechende komplementäre DNA-Fragment zu detektieren (Southern, 1975). Zu diesem Zweck wurde zunächst in einem 30 µl Restriktionsansatz ca. 10 µg chromosomale

C. albicans-DNA über Nacht bei 37°C mit einer geeigneten Restriktionsendonuklease verdaut und zusammen mit einem DNA-Größenstandard (1 kb DNA-Leiter [Invitrogen]) mittels Agarose-Gelelektrophorese über Nacht (1% Agarose, 1x TAE, 36 V) aufgetrennt. Nach dem Färben des Gels mit Ethidiumbromid, 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) aufgelegt. Nach Anlegen des Vakuums von ca. 50 mbar wurde das Gel mit 3 verschiedenen Lösungen jeweils 15 min behandelt. Lösung A (250 mM HCl) diente 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-HCl pH 7,5) zur Neutralisierung. Anschließend erfolgte der eigentliche Transfer der DNA auf die Nylon-Membran durch Beschichten des Gels mit 20x SSC für 90 min. Um die nach dem Transfer auf die Membran immer noch doppelsträngig gebliebene DNA zu denaturieren, wurde dann die Nylon-Membran für 30 sec mit 0,4 N NaOH und anschließend mit 0,2 M Tris-HCl pH 7,5 für 30 sec zur Neutralisierung behandelt, 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 (Enhanced Chemoluminescence Labelling)-labelling and detection-Kit“ (Amersham) durchgeführt. Die mit 5x SSC befeuchtete Membran wurde mit 15 ml Hybridisierungslösung (500 ml ECL™ Gold Hybridization Buffer, 0,5 M NaCl, 5% Blocking Reagent) in einem Rotationsofen bei 42°C für 1-2 h vorhybridisiert. Währenddessen wurde die DNA-Sonde (gelgereinigtes Fragment von 0,3-1,5 kb Länge, ca. 100 ng und 2 ng 1kb DNA-Leiter) für die Detektion mit Peroxidase gekoppelt und in die Vorhybridisierungslösung gegeben. Nach der Hybridisierung über Nacht wurde die Membran bei 42°C im Röhrchen 1x für 20 min und 2x für 10 min mit Waschpuffer I (6 M Harnstoff, 0,4% SDS, 0,5x SSC), sowie 2x für 5 min bei Raumtemperatur in einer Schale mit Waschpuffer II (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 (Hyperfilm ECL, Amersham) aufgelegt wurde. Je nach Signalstärke wurde zwischen 2 und 90 min lang exponiert. Der Film wurde dann mit dem Curix60-Gerät automatisch entwickelt. Für eine eventuelle Rehybridisierung mit einer anderen Sonde musste das Signal einen Tag lang abklingen. 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 angesetzt oder nach dem Ansetzen mit DEPC behandelt. Dafür wurde 0,1% DEPC (v/v) zugegeben, über Nacht bei 37°C inkubiert und dann schließlich autoklaviert.

Eine *C. albicans* YPD- bzw. Lee's Kultur wurde aus einer Vorkultur in geeigneter Verdünnung (1:100-1:50000) inokuliert und bis zur Log-Phase (zu einer OD₆₀₀ von ca. 1,0) bei 30°C bzw. 25°C (WO-1 Stamm und dessen Derivate) 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, wobei 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 Zugabe von 600 µl saurem Phenol wurde die Suspension sofort durch Vortexen gemischt und für 60 min bei 65°C inkubiert, wobei die Proben alle 10 min erneut gemischt wurden. Nach Abkühlen für 5 sec im Ethanol-Trockeneis-Bad wurde der Ansatz abzentrifugiert (5 min, 13000 rpm), 600 µl der wässrigen Phase in ein neues Eppendorf-Cap 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. Diese Abfolge wurde noch vierfach wiederholt. 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, für 10 min bei 13000 rpm abzentrifugiert und dann mit 70% Ethanol (hergestellt mit DEPC-H₂O) gewaschen. Das RNA-Pellet wurde luftgetrocknet und in 20-100 µl DEPC-H₂O gelöst. Die RNA-Konzentrationsbestimmung erfolgte photometrisch unter der 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 1,2% 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 Natrium-Acetat pH 5,2, 10 mM EDTA pH 8,0, ad DEPC-H₂O 1 l) mittels Gelelektrophorese aufgetrennt. In der Regel wurden 11,25 µl RNA (20-40 µg) mit 5,0 µl 10x MOPS (0,2 M MOPS pH 7,0, 20mM Natrium-Acetat, 10 mM EDTA), 25 µl Formamid, und 8,75 µl deionisiertes Formamid vermischt. Nach 15-minütiger Inkubation bei 55°C wurde 10 µl 5x RNA-Ladepuffer (1 mM EDTA pH 8,0, 0,25% Bromphenolblau, 0,25% Xylencyanol, 50% Glycerin) zugegeben und aufgetragen. Nach dem Gellauf für ca. 3 h bei 150 V wurde das Gel 2x je 30 min bei RT 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 der Kapillarblotmethode innerhalb von ca. 18 h auf eine Nylon-Membran. Die RNA wurde danach über UV-Crosslinking auf der Membran fixiert.

Für die Northern-Hybridisierungen wurde erst die mit 6x SSC befeuchtete Membran für 4 h mindestens 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 bidest. H₂O 100 ml], 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 100 µg/ml denaturierte Heringssperma-DNA) im Rotationsofen bei 42°C vorhybridisiert. Für die Sondenherstellung wurde eine Sondenmarkierungsmethode mit der Klenow-Polymerase angewandt. Dabei wurden in einer Klenow-Polymerase-Reaktion die radioaktiv markierten α -³²P-dATPs in neu synthetisierte DNA-Stränge eingebaut, wobei die Zielsequenz als Template diente. Der „Random primed DNA labeling kit“ (Invitrogen oder Gibco) wurde hierbei nach Vorschrift verwendet. Als Template für die Sondenherstellungsreaktion dienten 200-400 ng eines gelgereinigten DNA-Fragments in 23 µl DEPC-H₂O, das vorab für 10 min bei 100°C denaturiert wurde und dem dann je 2 µl dCTP, dGTP, dTTP, 15 µl Random-Primers-Buffer-Mixture, 5 µl (ca. 50 µCi) α -³²P-dATP und 1 µl Klenow-Polymerase zugegeben wurden. Die Polymerisation erfolgte bei 26°C für 1 h. Nach Zugabe des Stop-Puffers wurde die DNA 10 min bei 100°C denaturiert und zum Vorhybridisierungspuffer gegeben.

Die Hybridisierung der Nylonmembran erfolgte über Nacht (ca. 18 h) im Rotationsofen bei 42°C, ebenso 2x Waschen mit Waschlösung I (2x SSC, 0,1% SDS) für 15 min. Anschließend wurde dann die Membran bei 56°C im Rotationsofen für 15 min mit Waschlösung II (0,1x SSC, 0,1% SDS) gewaschen. Ein Röntgenfilm (Kodak X-Omat™) wurde aufgelegt und für 16 h oder zwei Tage je nach Signalstärke 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 Übernacht-Vorkultur angeimpft und bis zur log-Phase (ca. OD₆₀₀ 1,0) bei 30°C unter Schütteln inkubiert. 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 0,3 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 100% Ethanol] und 0,5 mM Benzamidin [0,5 M in H₂O]) resuspendiert und nach Zugabe von

ca. 0,3 ml Glasperlen zugegeben und 4x für 45 sec auf höchster Stufe gevortext unter je 30 sec Abkühlen der Probe auf Eis zwischen den einzelnen Mixschritten. Die Proben wurden anschließend für 5 min bei 4000 rpm und 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Cap überführt und bis zur Verwendung, in 50 µl aliquotiert, bei -20°C aufbewahrt.

3.6.13 Westernblot

Zum Nachweis der Expression des *OP4*-Fusionsproteins, Op4 mit drei Tandem-Repeats des HA-Epitops (Epitop aus dem Hämagglutinin des humanen Influenzavirus) bzw. Gfp (Wilson *et al.*, 1984), 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 Polyacrylamid-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-HCl pH 8,8, 0,4% SDS), 3,4 ml Gelstock (30%, 49:1 [Appllichem]), 50 µl 10% APS, 5 µl Temed, ad bidest. H₂O 10 ml; Sammelgel: 1,25 ml Lösung C (0,5 M Tris-HCl 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 dest. H₂O 1 l) 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 equilibriert, ebenso die passend zugeschnittene Nitrozellulose-Membran. Der Transfer der Proteine auf die Membran wurde dann mittels des Semi-Dry-Blots 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 1x TBS (8 g NaCl, 0,2 g KCl, 3 g Tris, pH 7,4, ad dest. H₂O 1 l) zunächst für 1 h abgeblockt werden, bevor 20 µl Peroxidase-gekoppelter anti-HA-Antikörper (monoklonal aus Ratte, 25 U/ml, High Affinity [3F10], Roche) im Verhältnis 1:500 in 5% Milchpulver in 1x TBS zugegeben und für 1 h bei RT unter leichtem Schütteln inkubiert wurde. Nach dreimal Waschen der Membran für 5 min in 1x TBS, erfolgte die Detektion mit ECL (siehe 3.7.6.3 Southern-Hybridisierung).

Für den Fall zur Gfp-Detektion wurde die Membran erst mit 16 µl anti-Gfp-Antikörper (aus Kaninchen, 100 µg/ml, Clontech) im Verhältnis 1:500 in 5% Milchpulver in 1x TBS nach der Vorhybridisierung für 1 h bei RT inkubiert. Nach 3x Waschen mit 1x TBS bei RT wurde diese weiter bei RT für 1 h mit 2 µl zweiten Peroxidase-gekoppelten Antirabbit-Antikörpern (anti-Kaninchen aus Ziege, Clontech) im Verhältnis 1:10000 in 5% Milchpulver in 1x TBS inkubiert. Dann folgten drei Waschschritte mit 1x TBS und die ECL-Detektion.

3.7 Mikroskopie von *C. albicans*

3.7.1 Färbungen von *C. albicans*-Zellen

Die Fixierung von *C. albicans*-Zellen war nötig, um den gewünschten Zustand von Zellen zu erhalten oder weitere Färbungen von Zellen durchzuführen. Für die Fixierung wurden die Zellen von einer geeigneten Kultur mit 1 ml 1x PBS (pH 7,0) gewaschen. Anschließend wurde das Pellet in 500 µl 4% Formaldehyd (FA) oder Paraformaldehyd (PFA) über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach dem Waschen mit 1 ml 1x PBS folgte die Permeabilisierungs- und die Entwässerungsphase, wobei das Zellpellet in 1 ml 70% Ethanol für 30-60 min versetzt wurde, anschließend für 5 min in 500 µl 100% Ethanol. Schließlich wurden die Zellen in 200 µl 1x PBS resuspendiert und zur weiteren Verwendung bei 4°C aufbewahrt.

Für die Kernfärbung wurden 100 µl fixierte Zellen mit 150 µl 1:1000 verdünnter Höchst 33258 vermischt und bei RT für 30-60 min inkubiert.

Um die Zellwand von *C. albicans* Zellen zu färben, wurden 100 µl fixierte Zellen mit 10 µl Calcufluor (1 mg/ml H₂O, Sigma) bei RT im Dunkeln für 1 h inkubiert. Vor der Betrachtung unter dem Mikroskop wurden die Zellen mit 1x PBS mindestens 5x gewaschen.

Die Vakuolen von *C. albicans*-Zellen wurden mit dem lipophilen Farbstoff FM4-64 (Invitrogen) gefärbt. Die opaque-Zellen von 1 ml Log-Phase-Kultur wurden für 2 min bei niedrigerem 2000 rpm abzentrifugiert, um möglichst die morphologische Veränderung von Vakuolen zu vermeiden. Nach Resuspension von Zellen in 1 ml Lee's Medium mit 20-60 µM Farbstoff FM4-64, der selektiv die Vakuolen-Membran von Hefezellen anfärbt und bei 543 nm Licht die rote Fluoreszenz zeigt, wurden diese für 1 h bei 25°C unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 2 min mit 2000 rpm bei 4°C abzentrifugiert und mit 1 ml Lee's Medium gewaschen. Noch dazu wurde die alternative Kernfärbung durchgeführt, dafür wurden die Zellen für 1 h bei 25°C mit Höchst inkubiert und es folgten drei Waschgänge mit 1 ml 1x PBS.

3.7.2 Licht-Mikroskopie

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. Durch UV-Anregung und entsprechende Filterung am Fluoreszenzmikroskop (Zeiss MC80, Axiolab Fluoreszenz, ausgestattet mit der Quecksilber-Kurzbogenlampe HB050 und Zeiss Fluoresceinspezifischem Filter-Set 09) erfolgte die Aufnahme von Zellen, die sich durch die Kernfärbung

bzw. durch die Zellwandfärbung erkennen lassen.

3.7.3 Konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM)

Die Zellen von Stämmen, in denen das *caGFP* exprimiert oder bei denen gleichzeitig die Vakuolen- und die Kernfärbung durchgeführt wurde, wurden von der entsprechenden Wachstumskultur aliquotiert und auf einem Objektträger präpariert. Der Objektträger wurde mit einem 63x Ölimmersion-Objektiv betrachtet. Fluoreszenz von Zellen und deren Transmission wurden mit dem Konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (Zeiss LSM 510 inverted confocal laser scanning microscope equipped with a ZEISS Axiovert 100 microscope) detektiert. Für das Scanning der Bilder wurden ein Argon-Laser (488 nm), die entsprechende Filterung für Gfp (green fluorescent protein) und gleichzeitig die Transmission-Images benötigt. Beim Scanning der roten bzw. blauen Fluoreszenz, die durch die Färbung mittels des Farbstoffs FM4-64 bzw. Höchst 33258 hervorgeht, wurde die He/Ne-Laser (543 nm) bzw. die Diode-Laser (405 nm) und die entsprechende Filtrierung verwendet.

3.7.4 Rasterelektronenmikroskopie (REM)

Um die feine Veränderung der white- und opaque-Zelloberfläche der Stämme, in denen die phasenspezifischen Gene deletiert wurden, zu sehen, wurden die Zellen aus der bei 25°C in flüssigem Lee's Medium über Nacht inkubierten Kultur abzentrifugiert und 3x jeweils für 5 min in 1 ml 1x PBS gewaschen. Dann wurden die Zellen über Nacht bei 4°C in 200 µl 6,25% Glutaraldehyd in 0,2 M Cacodylatpuffer pH 7,2 (Roth, Karlsruhe, Germany) fixiert. Die Zellen wurden 3x jeweils für 5 min mit 500 µl Cacodylatpuffer und 3x mit bidest. H₂O gewaschen, wobei die Zellen auf keinen Fall trocken werden durften. Dann folgte die Entwässerung durch die jeweils 20-minütige Versetzung der Zellen mit zunehmenden Aceton-Konzentrationen (50%, 70%, 90%, 96% [v/v, vorbereitet mit H₂O], 100%) bei RT. Die Zellpellets in 100% Aceton wurden in die Teflon-Kammern überführt, die vorher in eine mit 100%igem Aceton-gefüllte Schale gestellt wurden. Anschließend erfolgte die kritische Punkt-Trocknung in einem Balzers-dryer (Baltec CPD030), in dem der Austausch erst von Aceton mit flüssigem CO₂ und dann 7-8x Austausch von flüssigem CO₂ zur Gasform durch abwechselndes Kühlen und Heizen wiederholt wurden. Die getrockneten Zellen wurden auf selbst-adhäsiven Kohlefilm geklebt, vorsichtig auf dem Specimen-Trägertischchen montiert und mit dem Gold-Palladium im Baltec-Goldsputter (Baltec SDC 005) bedämpft. Die Zellen auf dem Specimen-Trägertischchen wurden entweder mit dem ZEISS DSM92 Lasterelektronenmikroskop als Bild gescannt oder in einem Exsiccator, gefüllt mit CaCl₂, zur weiteren Mikroskopie aufbewahrt.

3.8 Bestimmung der Switching-Frequenz

3.8.1 Frequenz des white-opaque Switchings

Für die Bestimmung der Switching-Frequenz zwischen white- und opaque-Formen von den *MTLα*-homozygoten Stämmen wurden zuerst Zellen in beiden Formen auf Lee's Agarplatten mit Phloxin B (5 µg/ml) ausplattiert, um getrennt 7 Tage alte white- und opaque-Kolonien zu gewinnen. Die white- bzw. opaque-Einzelkolonie wurde in 100 µl H₂O suspendiert, daraus die optimale Verdünnung (10⁻³) hergestellt und 50-100 µl davon auf 3 Lee's Agarplatten (Durchmesser 13,5 cm) mit Phloxin B ausplattiert. Nach 5-7 Tagen Inkubation bei RT wurde die white- bzw. opaque-Kolonienzahl in Ausgangsform bzw. auch die Kolonienzahl in geswitchter Form, sowie die Zahl des Sektors gezählt. Die Frequenz resultierte daraus, dass man die Zahl von geswitchten Kolonien mit der Kolonienzahl der Ausgangsform teilte.

3.8.2 Switching-Frequenz von *tup1Δ*-Mutanten zwischen vier verschiedenen Koloniephänotypen

Drei 7 Tage alte Kolonien jeder Phasenvariante von *ura3*-auxotrophen und *URA3*-prototrophen *tup1Δ*-Mutanten wurden individuell in 100 µl sterilem Wasser suspendiert und daraus 10⁻³ Verdünnung hergestellt. Die Aliquote je Suspension, ca. 60-100 µl, wurden auf 3-4 Lee's Agarplatten von 13,5 cm Durchmesser mit Phloxin B ausplattiert. Nach ca. 7-8 Tagen Inkubation bei RT wurden die Zahl der Kolonien des Ausgangsphänotyps, die geswitchten, unterschiedlichen Phasenvarianten, sowie die Kolonien mit unterschiedlichen Phänotyp-Sektoren bestimmt. Für jeden Stamm und die Phasenvarianten wurde das Experiment separat zwei bis viermal wiederholt und die Ergebnisse wurden miteinander kombiniert. Die Switching-Frequenzen wurde wie folgt berechnet: Die Zahl der Kolonien der geswitchten Kolonienphänotypvariante (ausgeschlossen die Zahl der Sektor-enthaltenden Kolonien) geteilt durch die gesamte Kolonienzahl.

3.9 Bestimmung des quantitativen Matings

Um die Matingfrequenz zwischen *C. albicans MTLα*- (Adenin-auxotroph) und *MTLα*-Zellen (Uridin-auxotroph) in verschiedener Morphologie zu bestimmen, wurden erst die Zellen auf Lee's Agarplatten für die Gewinnung der benötigten Zellformen (white-, opaque-Form und die vier verschiedenen Formen der *tup1Δ*-Mutanten) ausplattiert und dann in der Regel für 7 Tage bei RT inkubiert. Die filamentösen Zellen, die für Matingexperimente von white-Zellen

durch die Übernachts-Inkubation in 50 ml RPMI mit 10% FCS bei 37°C und 180 rpm induziert wurden, wurden in 500 µl Lee's Medium konzentriert und davon 100 µl für weitere Matingexperimente verwendet.

Eine 7 Tage alte Kolonie der *MTLa*- und *MTLα*-Stämme in gewünschter Form wurden zusammen in 100 µl sterilem H₂O suspendiert und auf Lee's Agarplatten mit Phloxin B, ergänzt durch 75 µg/ml Adenin und 100 µg/ml Uridin, ausplattiert, dann 5 Tage lang bei RT (23°C-25°C) inkubiert, um das Mating zu erlauben. Danach wurden die Zellen in 3 ml sterilem H₂O suspendiert und eine 10-fache Verdünnungsreihe bis zu 10⁻⁶ hergestellt. 100 µl von den Verdünnungen 10⁰ bis 10⁻⁴ wurde auf SD-Platten ohne CSM ausplattiert, um die Matingprodukte zu selektieren. Außerdem wurde noch für die Bestimmung der gesamten Zellenzahl in der Matingpopulation 100 µl von den 10⁻⁵ und 10⁻⁶ Verdünnungen auf durch 75 µg/ml Adenin und 100 µg/ml Uridin ergänzten YPD-Agarplatten ausplattiert, wodurch die Kolonien des *URA3*-Elternstammes oder der Matingprodukte von den rötlichen Kolonien des *ade2*-Elternstammes auch unterschieden werden können. Die Platten wurden dann 2-3 Tagen bei 30°C inkubiert. Die Zahl der beiden Matingpartner, die auf den Platten Farbunterschiede aufwiesen, war ungefähr gleich. Zur Matingeffizienz wurde das Verhältnis der prototrophen Zellenzahl zur Hälfte der gesamten Zellenzahl gerechnet, da die Effizienz abhängig von beiden Partnern war.

Für die Matinganalyse in Flüssigkulturen wurden die *MTLa*- und *MTLα*-Zellen erst über Nacht in 10 ml flüssigem Lee's Medium bebrütet, dann wurden die Zellen in 2 ml frischem Lee's Medium konzentriert. Jeweils 50 µl von *MTLa*- und *MTLα*-Zellsuspension wurden mit 900 µl flüssigem Lee's Medium in das 1,5 ml Eppendorf-Cap überführt, dann entweder mit (80 rpm) oder ohne Schütteln bei 25°C für die gewünschte Experimentzeit inkubiert. Schließlich wurden die Zellen unter dem Mikroskop betrachtet.

Für das Selbst-Matingexperiment der Tetrazyklin-induzierbaren *MTLα*-Shmoo-Zellen wurden opaque-Kolonien des Stammes WTETMa43A oder B (Uridin-prototroph, Nourseothricin-sensitive und sie enthalten die P_{tet}-*MTLa2*-Fusion im Genom) und des Stammes WTETMa48A oder B (Uridin-auxotroph, Nourseothricin-resistent und sie enthalten die P_{tet}-*MTLa2*-Fusion im Genom) zusammen in 100 µl H₂O suspendiert und dann auf mit 100 µg/ml Uridin und 50 µg/ml Doxyzyklin supplementierten Lee's Agarplatten ausplattiert. Um sie maten zu lassen, wurde dann 5 Tage lang bei RT (23°C-25°C) inkubiert. Danach wurden die Zellen in 3 ml sterilem H₂O suspendiert und eine 10-fache Verdünnungsreihe bis zu 10⁻⁶ hergestellt. Für die Selektion der Matingprodukte wurde 100 µl von den Verdünnungen 10⁰ bis 10⁻⁴ auf mit 200 µg/ml Nourseothricin ergänzten SD-Platten ohne CSM ausplattiert. Für

die Bestimmung der Zellzahl des *MTL α* -Stammes WTETMa48A bzw. B in der Matingpopulation wurde noch 100 μ l von den 10^{-5} und 10^{-6} Verdünnungen auf durch 100 μ g/ml Uridin und 200 μ g/ml Nourseothricin ergänzten YPD-Agarplatten ausplattiert. Schließlich wurden sie für 2-3 Tagen bei 30°C inkubiert.

3.10 Phänotypische Tests

3.10.1 Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK-Test)

Zur Bestimmung der Sensitivität der *op4 Δ* -Mutanten von *C. albicans* gegenüber dem Inhibitor der Ergosterolsynthese Fluconazol (Sigma) und dem Farbstoff Phloxin B (Sigma) wurden MHK-Tests in „high resolution“ Medium (14,67 g HR-Medium [Oxoid], 1,0 g NaHCO₃, 0,2 M Phosphatpuffer, pH 7,2, ad H₂O 1 l) nach Ruhnke *et al.* durchgeführt (Ruhnke *et al.*, 1994). Dazu wurden 5 Tage alte white- und opaque-Kolonien, die bei RT bebrütet worden waren, in 2 ml 0,9% NaCl suspendiert, davon 4 μ l in 2 ml HR-Medium verdünnt und je 100 μ l davon in eine Reihe einer 96-Napf-Platte vorgelegt. Von den Testsubstanzen (400 μ g/ml Fluconazol bzw. 50 mg/ml Phloxin B) wurden ebenfalls in HR-Medium Verdünnungsreihen im Verhältnis 1:2 hergestellt, von denen je 100 μ l 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 Nöpfe 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.

3.10.2 Sensibilitätstest auf Agarplatten (Spot-Test)

Der Spot-Test wurde zur Bestimmung der Sensitivität gegenüber SDS der *op4 Δ* -Mutanten herangezogen. Dabei wurden Übernacht-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 5 μ l auf Minimalagarplatten aufgetropft, die Konzentrationen 0,01% und 0,1% SDS enthielten. Für einen anderen Sensibilitätstest wurden die Übernacht-Kulturen der Stämme erst auf Minimalagarplatten ausplattiert und anschließend 15 μ l von 10% SDS in die Mitte der Platten getropft. Nach 3 Tagen Inkubation bei 30°C wurde die Größe der Wachstumshemmhöfe gemessen.

4 Ergebnisse

4.1 Etablierung eines Tetrazyklin-induzierbaren Genexpressionssystems in *C. albicans*

Ein Tetrazyklin-induzierbares Genexpressionssystem (Tet-On), das ursprünglich von Urlinger *et al.* beschrieben wurde (Urlinger *et al.*, 2000), wurde bereits im Rahmen meiner Diplomarbeit für *C. albicans* adaptiert und in der vorliegenden Arbeit weiter verfeinert. So wurde die Anwendbarkeit dieses Systems in den verschiedenen morphologischen Formen von *C. albicans* und bei unterschiedlichen Wachstumsbedingungen getestet und optimiert. Außerdem wurde untersucht, ob es möglich ist, durch Expression spezifischer Gene unter Kontrolle des Tetrazyklin-induzierbaren Promotors morphogenetische Entwicklungsprozesse von *C. albicans* gezielt zu manipulieren.

4.1.1 Prinzipieller Aufbau des Systems

Um eine Induktion von Zielgenen in *C. albicans* unabhängig von Wachstumsmedien durch die Zugabe von Tetrazyklin zu ermöglichen, wurde eine Genexpressionskassette (Abb. 4) entwickelt, die zwei Komponenten enthält. Die Komponenten für dieses System sind zum einen ein Gen, das für einen reversen Tetrazyklin-abhängigen Transaktivator (rtTA) codiert und das durch einen konstitutiven Promotor in *C. albicans* exprimiert werden kann, und zum anderen ein rtTA-abhängiger Promotor, der die Expression von Zielgenen kontrolliert. Der *C. albicans*-adaptierte rtTA ist ein Fusionsprotein, das aus dem reversen Tet-Repressor von *E. coli* und der Transkriptionsaktivierungsdomäne des *S. cerevisiae* Gal4-Proteins (GAL4AD) besteht. Der reverse Tet-Repressor (rtetR) enthält fünf Aminosäureaustausche (S12G, E19G, A56P, D148E und H179R), wodurch der ursprüngliche Tet-Repressor, der nur in Abwesenheit von Tetrazyklin an seine Zielsequenz *tetO* (tetracycline operator) bindet, in den reversen Tet-Repressor umgewandelt wurde, der nur in Anwesenheit von Doxyzyklin (ein Derivat von Tetrazyklin) an *tetO* bindet (Urlinger *et al.*, 2000). Außerdem wurden im *cartTA*-Gen alle CTG-Codons, welche in *C. albicans* als Serin anstelle von Leucin translatiert werden, gegen das Leucin-Codon TTG ausgetauscht. Das *cartTA*-Gen wurde mit der Transkriptionsterminationssequenz von *ACT1* fusioniert und unter die Kontrolle des konstitutiv aktiven *ADHI*-Promotors gestellt, da dieser sich im Vergleich zu anderen getesteten Promotoren hierfür als am geeignetsten erwies (siehe folgenden Abschnitt 4.1.2).

Der rtTA-abhängige Promotor (P_{tet}) ist zusammengesetzt aus dem ca. 200 bp langen Minimal-Promotor des *C. albicans* *OP4*-Gens und sieben Kopien der *tet*-Operator-Sequenz (*tetO*). Der *OP4*-Minimal-Promotor enthält die für die Bindung der RNA-Polymerase II notwendige TATA-Box, während die von Lockhart *et al.* (1998) beschriebenen upstream-Aktivierungssequenzen deletiert wurden. Die flankierenden *ADHI*-Sequenzen erlaubten die Integration der gesamten Kasette in eines der *ADHI*-Allele von *C. albicans*. Als Selektionsmarker für die Transformanten diente entweder das *URA3*-Gen (in *ura3*-negativen Wirtstämmen) oder das *caSAT1*-Resistenzgen (für prototrophe Wildstämmen). Nach der Integration sollte das *cartTA*-Gen konstitutiv vom *ADHI*-Promotor exprimiert werden. Die Expression des Zielgens sollte dagegen nur in Anwesenheit von Doxyzyklin stattfinden, da für die Bindung von rtTA an den *tet*-Operator Doxyzyklin benötigt wird. Der Aufbau und die Funktionsweise dieses Systems sind schematisch in der Abb. 4 dargestellt.

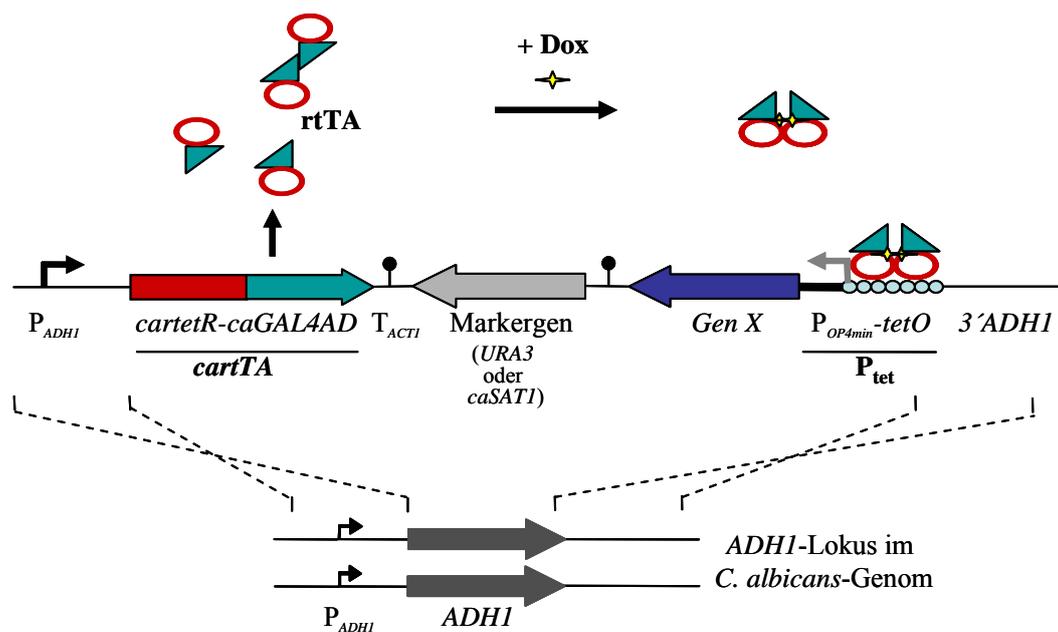


Abb. 4 Schematische Darstellung des Tetrazyklin-induzierbaren Genexpressionssystems. Das an *C. albicans*-adaptierte *cartTA*-Gen besteht aus dem reversen Tetrazyklin-Repressor (*cartetR*) und der *GAL4*-Aktivierungsdomäne (*caGAL4AD*) und steht unter Kontrolle des *ADHI*-Promotors (P_{ADHI} , abgewinkelter schwarzer Pfeil), der eine konstitutive Expression des rtTA erlaubt. Bei Anwesenheit von Doxyzyklin (Dox) wird die rtTA-Konformation so verändert, dass er optimal an *tetO* binden kann. Durch diese Induktion kann das Zielgen (*Gen X*) exprimiert werden, das unter die Kontrolle des rtTA-abhängigen Promotors (P_{tet} , abgewinkelter grauer Pfeil) gestellt wurde. Für weitere Erläuterungen siehe Text.

4.1.2 Evaluierung verschiedener *C. albicans*-Promotoren zur Expression des *cartTA*-Gens

Um zu entscheiden, welcher Promotor für die Expression des *cartTA*-Gens in *C. albicans* am besten geeignet ist, wurden die als stark und konstitutiv beschriebenen Promotoren der *ACT1*-, *ADH1*- und *TEF3*-Gene getestet (Myers *et al.*, 1992; Delbruck and Ernst, 1993; Bertram *et al.*, 1996; Morschhäuser *et al.*, 1998). Zu diesem Zweck wurde zunächst mit Hilfe des *caGFP*-Reportergens überprüft, ob diese Promotoren eine starke und gleichmäßige Genexpression in allen *C. albicans*-Zellen erlauben.

Um das *caGFP*-Gen unter Kontrolle des *ADH1*-Promotors zu exprimieren, wurde das Plasmid pADH1G2 konstruiert. Dafür wurde zunächst ein *ADH1*-Promotorfragment von Position -862 bis -10 in Bezug auf das *ADH1*-Startcodon mit dem Primerpaar ADH4 und ADH7 amplifiziert, an den eingeführten *Xba*I- und *Sal*I-Schnittstellen gespalten und anstelle der *OP4* upstream-Region in das Plasmid pGFP70 kloniert, wobei pADH1G1 entstand. Anschließend wurde ein Fragment aus der codierenden Region des *ADH1*-Gens (+344 bis +989) mit den Primern ADH8 und ADH9 amplifiziert, an den eingeführten *Pst*I- und *Sac*I-Schnittstellen gespalten und anstelle der *OP4* downstream-Region in pADH1G1 kloniert, um pADH1G2 zu erhalten (siehe auch Abb. 18A). Das *Xba*I-*Sac*I-Fragment aus pADH1G2 mit der P_{ADH1}-*caGFP*-Fusion und dem *URA3*-Selektionsmarker wurde in eines der beiden *ADH1*-Allele des *ura3*-auxotrophen *C. albicans*-Stammes CAI4 integriert, wobei die Stämme ADH1G1A und B entstanden.

Zur Herstellung einer P_{TEF3}-*caGFP*-Fusion wurde zunächst ein *TEF3*-Promotorfragment (-563 bis -10) mit den Primern TEF5 und TEF6 amplifiziert, an den eingeführten *Kpn*I- und *Bam*HI-Schnittstellen gespalten und in das *Kpn*I/*Bam*HI-gespaltene pMPG2 kloniert, wobei pTEF3G1 entstand. Anschließend wurde ein Fragment aus der codierenden Region des *TEF3*-Gens (+1275 bis +2044) mit den Primern TEF7 und TEF8 amplifiziert, an den eingeführten *Pst*I- und *Sac*II-Schnittstellen gespalten und in das *Pst*I/*Sac*II-gespaltene pTEF3G1 kloniert, um pTEF3G2 zu erhalten. Das *Kpn*I-*Sac*II-Fragment aus pTEF3G2 wurde in eines der beiden *TEF3*-Allele des Stammes CAI4 integriert, wobei die Stämme TEF3G1A und B entstanden.

Die Reporterstämme ADH1G1A/B mit der P_{ADH1}-*caGFP*-Fusion, TEF3G1A/B mit der P_{TEF3}-*caGFP*-Fusion, sowie der Stamm CAG31A, der eine P_{ACT1}-*caGFP*-Fusion in einem der beiden *ACT1*-Allele enthält (Morschhäuser *et al.*, 1998), wurden in YPD-Medium bei 30°C und in RPMI-Medium mit 10% FCS bei 37°C inkubiert, um das Wachstum in Hefe- bzw. Hyphenform zu induzieren, und die Fluoreszenz der Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten unter dem Mikroskop beobachtet. Dabei zeigte sich die stärkste Fluoreszenz in den Stämmen

ADH1G1A/B, in denen das *caGFP*-Gen vom *ADHI*-Promotor aus transkribiert wird, wobei Hyphenzellen noch etwas mehr leuchteten als Hefezellen. Die Fluoreszenz in den Stämmen TEF3G1A/B und CAG31A war zwar ebenfalls stark und konstitutiv, aber im Vergleich zu der in den Stämmen ADH1G1A/B merklich reduziert, wobei die niedrigste Gfp-Expression im Stamm CAG31A beobachtet wurde (Daten nicht gezeigt). Diese Ergebnisse ließen vermuten, dass der *ADHI*-Promotor am besten für eine starke und konstitutive Expression des *cartTA*-Gens geeignet war.

Um die Effizienz der Tetrazyklin-induzierbaren Genexpression bei Verwendung des *ADHI*-, *TEF3*- oder *ACT1*-Promotors dennoch direkt zu vergleichen, wurden die flankierenden *ADHI*-Sequenzen im Plasmid pTET25 (Park, 2002; siehe auch folgenden Abschnitt 4.1.3.1) durch entsprechende Sequenzen des *TEF3*- bzw. *ACT1*-Gens ersetzt. Ein *TEF3*-Promotorfragment (-972 bis +6) wurde mit den Primern TEF1 und TEF2 amplifiziert und ein Fragment aus der codierenden Region des *TEF3*-Gens (+1236 bis +2051) mit den Primern TEF3 und TEF4. Die PCR-Produkte wurden an den eingeführten *SacII*- und *XbaI*- bzw. *XhoI*- und *KpnI*-Schnittstellen gespalten und anstelle der *ADHI*-Fragmente in pTET25 kloniert, wobei das Plasmid pTET28 entstand. In analoger Weise wurden ein *ACT1*-Promotorfragment (-762 bis +3), das mit den Primern ACT24 und ACT26 amplifiziert wurde, und ein Fragment aus der codierenden Region des *ACT1*-Gens (+862 bis +1547) aus dem Plasmid pMPG2 anstelle der *ADHI*-Fragmente in pTET25 kloniert, wobei das Plasmid pTET31 entstand. Die Tetrazyklin-induzierbaren Genexpressionskassetten aus pTET25, pTET28 und pTET31 wurden, wie im nächsten Abschnitt für pTET25 beschrieben, in eines der *ADHI*-Allele des Stammes CAI4 integriert. Beim Vergleich der dabei erhaltenen Stämme TETG25A/B, TETG28A/B und TETG31A/B zeigte sich, dass die Kasette, in der das *cartTA*-Gen unter Kontrolle des *ADHI*-Promotors exprimiert wurde, die beste Induktionseffizienz in Anwesenheit von Doxyzyklin ermöglichte. Diese Kasette diente daher als Basis für die Tetrazyklin-induzierbare Expression verschiedener Zielgene in *C. albicans*.

4.1.3 Tetrazyklin-induzierbare Expression des *GFP*-Reportergens in verschiedenen morphologischen Formen von *C. albicans*

4.1.3.1 Herstellung der *C. albicans* Stämme

Um die Tetrazyklin-induzierbare Expression von Genen in *C. albicans*-Zellen zu überprüfen, wurde das *C. albicans*-adaptierte *caGFP*-Reporter-gen unter die Kontrolle des rtTA-abhängigen Promotors gestellt. Zu diesem Zweck wurde das *SacII*-*KpnI*-Fragment aus dem in meiner Diplomarbeit hergestellten Plasmid pTET25 (Abb. 5A) in eines der *ADHI*-Allele des

C. albicans Stammes CAI4 integriert. Zwei unabhängige Transformanten, die Stämme TETG25A und B, wurden aufbewahrt und für die weitere Analyse verwendet.

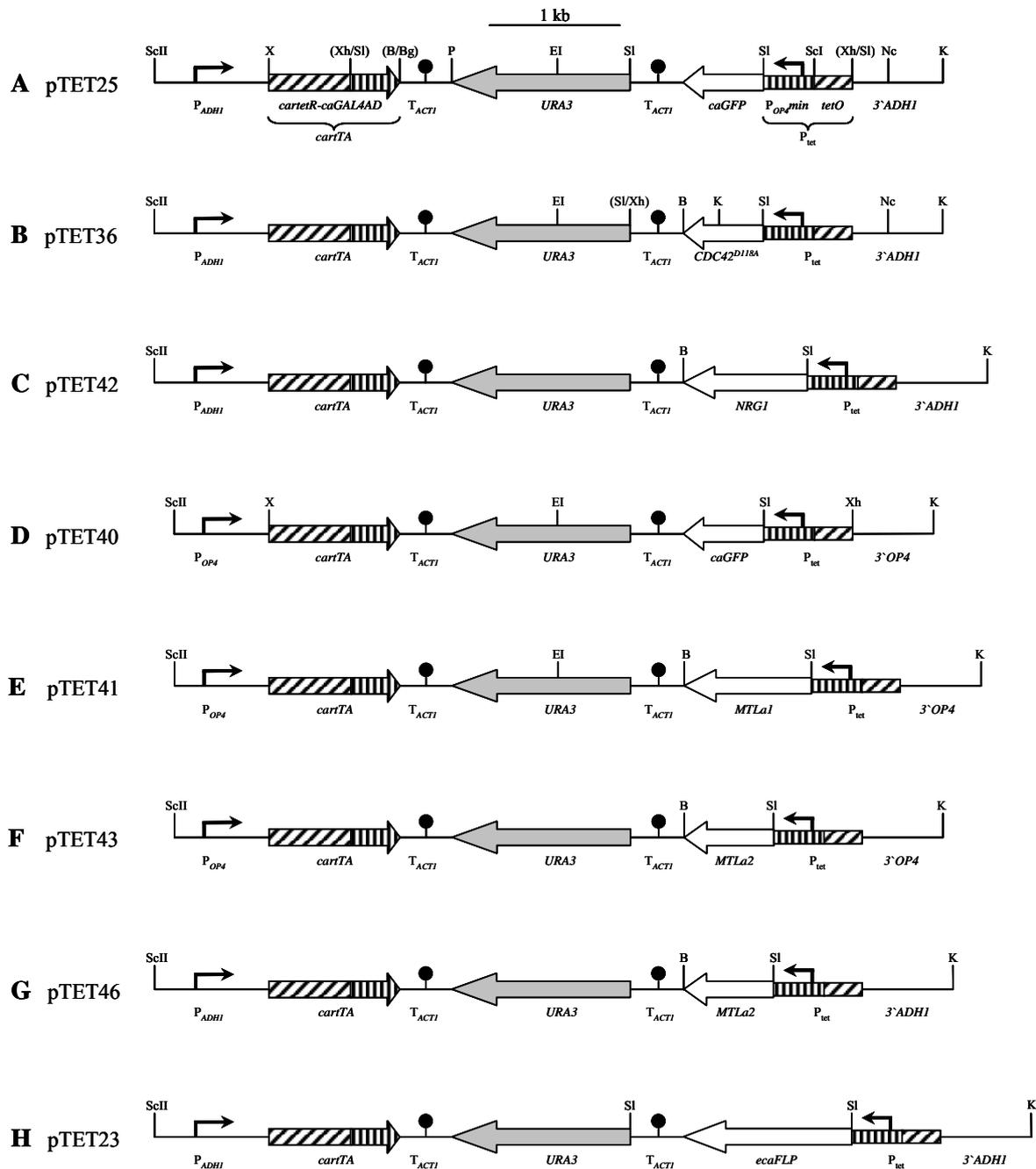


Abb. 5 Strukturen der DNA-Kassetten, die für die Integration der Tetrazyklin-induzierbaren Gene in den *ADHI*- oder *OP4*-Lokus im *C. albicans*-Genom verwendet wurden. Die abgewinkelten Pfeile symbolisieren Promotoren und der schwarze Kreis die Transkriptionsterminationssequenz von *ACT1* (T_{ACT1}). Der *URA3*-Selektionsmarker enthält seinen eigenen Promotor und Terminator. Das Präfix *ca* weist auf die *C. albicans*-adaptierten Versionen der heterologen Gene hin. Nur relevante Schnittstellen, die zur Konstruktion der Plasmide und zum Ausschneiden der Kassetten verwendet wurden, sind angegeben: B, *Bam*HI; Bg, *Bgl*II; EI, *Eco*RI; K, *Kpn*I; Nc, *Nco*I; P, *Pst*I; ScI, *Sac*I; ScII, *Sac*II; SI, *Sal*I; X, *Xba*I; Xh, *Xho*I. Die Schnittstellen in Klammern wurden bei der Klonierung zerstört.

4.1.3.2 Tetrazyklin-induzierbare Expression des *GFP*-Reportergens in Hefe- und Hyphenzellen von *C. albicans*

Um zu testen, ob die Expression des *caGFP*-Reportergens in den Stämmen TETG25A und B durch Doxyzyklin induziert werden kann, wurden die beiden Reporterstämme und der Kontrollstamm SC5314, der das *caGFP*-Gen nicht besitzt, in YPD-Medium bei 30°C bis zur log-Phase inkubiert und anschließend wurde Doxyzyklin ins Medium zugegeben. Zunächst wurde die optimale Konzentration von Doxyzyklin für die Induktion der Gfp-Expression bestimmt, indem die Stämme mit unterschiedlichen Doxyzyklinkonzentrationen (10, 30, 50, 75 und 100 µg/ml) inkubiert wurden. Dabei zeigte sich, dass die Fluoreszenz der Zellen mit der Doxyzyklinkonzentration anstieg, ab 50 µg/ml jedoch nicht weiter gesteigert werden konnte (Daten nicht gezeigt). Deshalb wurde in den weiteren Experimenten 50 µg/ml Doxyzyklin als optimale Konzentration für die effiziente Induktion des Tet-abhängigen Promotors (P_{tet}) eingesetzt.

Viele Zellen der Reporterstämme zeigten bereits zwei Stunden nach der Zugabe von 50 µg/ml Doxyzyklin eine sichtbare Fluoreszenz, und die Fluoreszenzintensität sowie die Anzahl der fluoreszierenden Zellen stieg mit der Dauer der Inkubationszeit mit Doxyzyklin an (Abb. 6A). Nach acht Stunden Inkubation mit Doxyzyklin konnte eine gleichmäßige Fluoreszenz in den meisten Zellen beobachtet werden. Keine Fluoreszenz wurde in den Zellen der Reporterstämme ohne Doxyzyklin bzw. im Wildstamm SC5314 mit oder ohne Doxyzyklin beobachtet, und das Doxyzyklin hatte keinen sichtbaren Effekt auf das Wachstum der Stämme.

Ein Vorteil dieses Tetrazyklin-induzierbaren Genexpressionssystems ist, dass der Tet-abhängige Promotor durch Zugabe von Doxyzyklin unabhängig vom Medium aktiviert werden kann. Unter verschiedenen Umweltbedingungen wechselt *C. albicans* vom Wachstum als sprossende Hefe zur Hyphenform (Ernst, 2000; Liu, 2001). Um zu überprüfen, ob Doxyzyklin die Expression von Genen auch in *C. albicans*-Hyphenzellen induzieren kann, wurden die Stämme TETG25A und B in RPMI-Medium mit 10% Serum, was das Hyphenwachstum stark induziert, mit oder ohne 50 µg/ml Doxyzyklin inkubiert. Zusätzlich wurden die Zellen erst für vier Stunden in RPMI plus Serum inkubiert, um das Hyphenwachstum vor Doxyzyklinzugabe zu induzieren. Wie in Abb. 6B zu sehen ist, konnte die Gfp-Expression durch Doxyzyklin auch in Hyphenzellen von *C. albicans* gut induziert werden. In Abwesenheit von Doxyzyklin wurde keine Fluoreszenz der Hyphenzellen beobachtet und Doxyzyklin zeigte in diesen Experimenten auch keinen Effekt auf das Hyphenwachstum der Stämme.

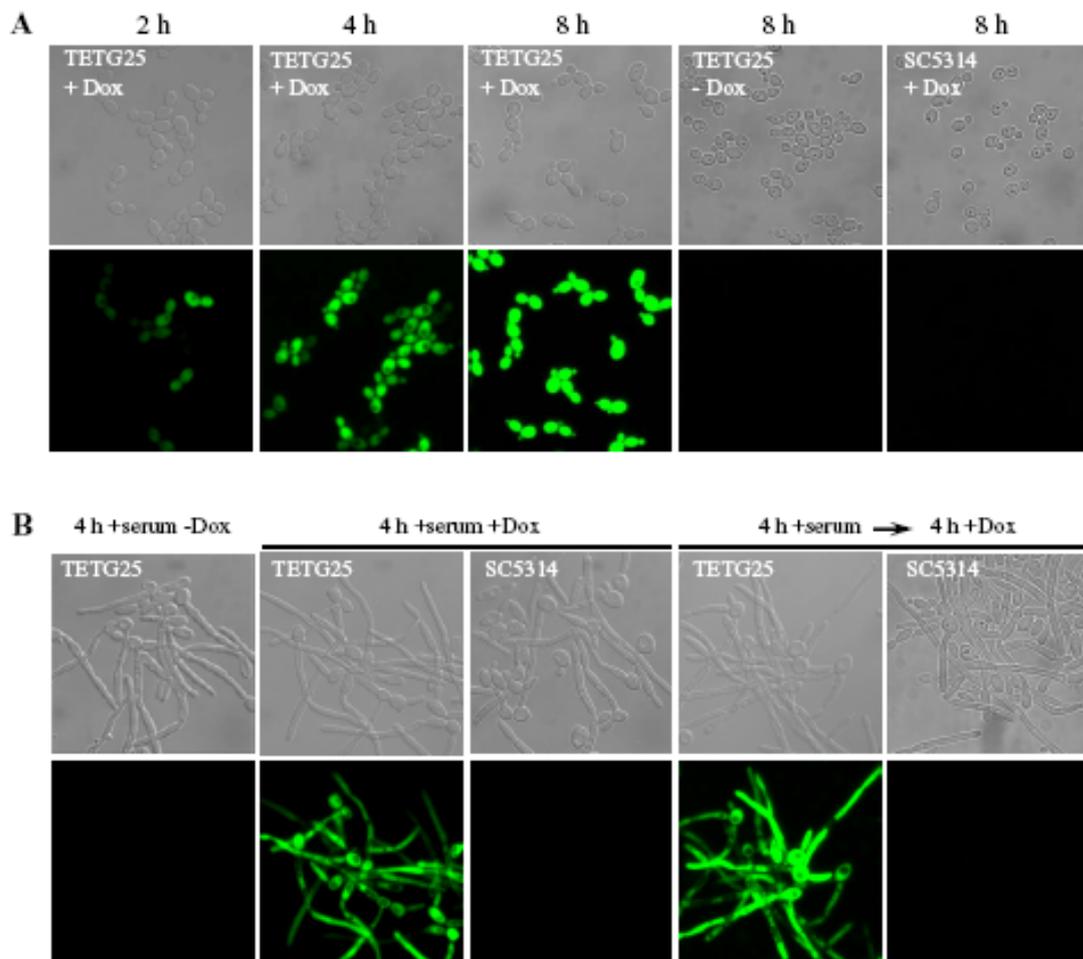


Abb. 6 Verwendung des *caGFP*-Reportergens für das Monitoring der Tetrazyklin-induzierbaren Genexpression in Hefe- und Hyphenzellen. Die Abbildung zeigt jeweils die Phasenkontrast- und die entsprechenden Fluoreszenzbilder der Zellen. In allen Testbedingungen verhielten sich die beiden unabhängigen Reporterstämme A und B gleich, so dass hier nur einer gezeigt ist. **A**: Die Teststämme TETG25A und B und der Kontrollstamm SC5314 wurden bei 30°C in YPD mit oder ohne 50 µg/ml Doxyzyklin (Dox) inkubiert. Die Photos wurden zum angegebenen Zeitpunkt aufgenommen. **B**: Das Hyphenwachstum der Stämme wurde durch Inkubation in RPMI mit 10% FCS bei 37°C mit oder ohne 50 µg/ml Doxyzyklin induziert.

4.1.3.3 Tetrazyklin-induzierbare Expression des *GFP*-Reportergens in opaque-Zellen von *C. albicans*

Neben der Hefe-Hyphen-Transition, die durch Umweltbedingungen kontrolliert wird, kann *C. albicans* auch spontan von der normalen rundlich-ovalen Hefeform in eine verlängerte, sogenannten opaque-Zellform wechseln. Dieses phänotypische Switching wurde ursprünglich im Stamm WO-1 beschrieben und aufgrund des Phänotyps der von den beiden Zellformen auf Agarplatten gebildeten Kolonien als white-opaque Switching bezeichnet (Slutsky *et al.*, 1987). Später wurde nachgewiesen, dass opaque-Zellen die Mating-kompetente (zur Paarung

befähigte) Form von *C. albicans* darstellen und nur Stämme, die homozygot für den mating type like locus (*MTL*) sind, in die opaque-Form switchen und sich dann mit opaque-Zellen des alternativen Paarungstyps (*MTLa* oder *MTL α*) paaren können (Lockhart *et al.*, 2002; Miller and Johnson, 2002). Der opaque-Zellphänotyp ist bei niedrigen Temperaturen von ca. 16°C bis 30°C stabil, aber bei 37°C, der menschlichen Körpertemperatur, switchen die opaque-Zellen in die white-Phase zurück (Slutsky *et al.*, 1987). Aufgrund der zentralen Rolle der opaque-Zellen für das Mating stellt die induzierbare Expression von Genen in opaque-Zellen eine wichtige Möglichkeit dar, dieses Entwicklungsprogramm in *C. albicans* zu analysieren und zu manipulieren.

Um die Anwendbarkeit des Tet-On-Systems in opaque-Zellen zu testen, wurde die Kasette aus dem Plasmid pTET25 in eines der *ADHI*-Allele des Stammes WUM5A integriert, einer *ura3 Δ* -Mutante des *MTL α* -Stammes WO-1. Opaque-Zellen der beiden unabhängigen Transformanten WTETG25A und B zeigten zwar eine Fluoreszenz in Anwesenheit von Doxyzyklin, aber die *caGFP*-Expression war sehr stark reduziert im Vergleich zur induzierten Fluoreszenz der Stämme TETG25A und B bzw. von white-Zellen der Stämme WTETG25A und B (Daten nicht gezeigt). Eine mögliche Ursache hierfür war, dass der *ADHI*-Promotor in opaque-Zellen weniger aktiv ist und rtTA deshalb schlechter exprimiert wird. Um dies zu überprüfen, wurde die Aktivität des *ADHI*-Promotors in white- und opaque-Zellen mit Hilfe des *caGFP*-Reportergens direkt verglichen. Die *P_{ADHI}-caGFP*-Fusion aus pADH1G2 wurde in eines der *ADHI*-Allele des Stammes WUM5A integriert, wobei die Stämme WADH1G1A und B entstanden. Die Fluoreszenz von opaque-Zellen dieser Stämme war tatsächlich stark reduziert, im Gegenteil zu der in white-Zellen, bei denen sie gleich stark wie in Hefezellen der Stämme ADH1G1A und B war (Daten nicht gezeigt). Die Herabregulierung des *ADHI*-Gens in opaque-Zellen des Stammes WO-1 wurde auch in einer anderen Studie durch Microarray-Analyse festgestellt (Lan *et al.*, 2002).

Für die Tetrazyklin-induzierbare Genexpression in opaque-Zellen wurde das System deshalb so modifiziert, dass das *cartTA*-Gen unter Kontrolle des opaque-spezifischen *OP4*-Promotors exprimiert wurde (Morrow *et al.*, 1993; Strauß *et al.*, 2001). Dazu wurde aus dem Stamm WO-1 ein Fragment mit der *OP4* upstream-Region (-717 bis +3) mit den Primern OPS15 und OPS16, sowie ein Fragment aus dem *OP4* downstream-Bereich (+1171 bis +1772) mit den Primern OPS3 und OPS4 amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden an den eingeführten *SacII*- und *XbaI*- bzw. *XhoI*- und *KpnI*-Schnittstellen gespalten und anstelle der flankierenden *ADHI*-Sequenzen in pTET25 inseriert, wobei das Plasmid pTET40 entstand (Abb. 5D). Die Kasette aus pTET40 wurde in eines der *OP4*-Allele des Stammes WUM5A integriert, und

zwei unabhängige Transformanten, WTETG40A und B, wurden für die weitere Analyse aufbewahrt. Nach Isolierung von opaque-Zellen wurde die Induktion der *caGFP*-Expression durch Zugabe von Doxyzyklin während des Wachstums in Lee's Medium bei 25°C getestet. Wie in Abb. 7 zu sehen ist, war die Expression des *caGFP*-Reportergens in den opaque-Zellen dieser Stämme durch Zugabe von Doxyzyklin gut induzierbar. Keine Fluoreszenz wurde in den opaque-Zellen des Kontrollstammes WO-1 weder bei Anwesenheit noch Abwesenheit von Doxyzyklin beobachtet und das Doxyzyklin hatte auch keinen Einfluss auf das Wachstum der opaque-Zellen.

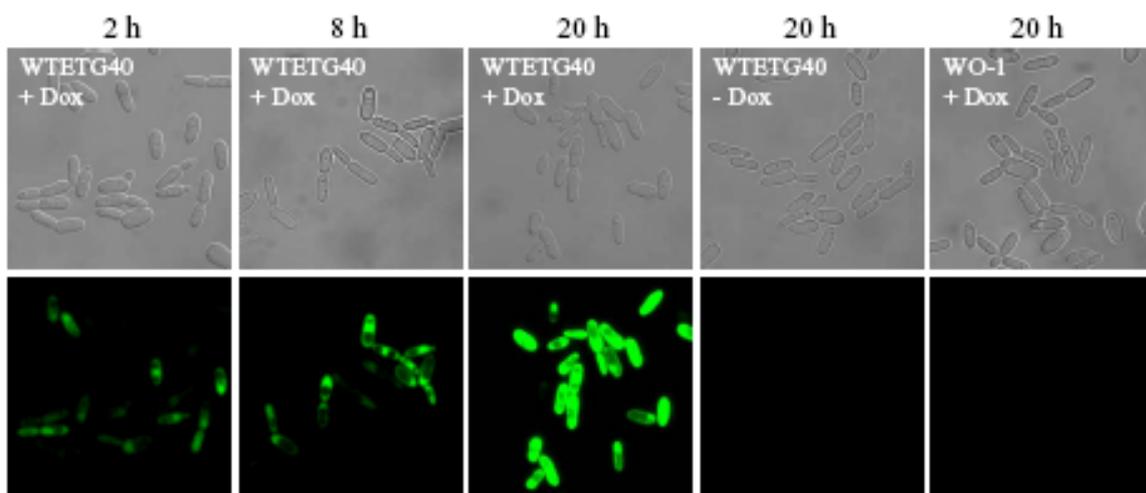


Abb. 7 Verwendung des Reportergens *caGFP* für das Monitoring der Tetrazyklin-induzierbaren Genexpression in opaque-Zellen. Die Abbildung zeigt jeweils die Phasenkontrast- und die entsprechenden Fluoreszenzbilder der Zellen. Die opaque-Zellen der Stämme WTETG40A und B und der Kontrollstamm WO-1 wurden in Lee's Medium mit oder ohne 50 µg/ml Doxyzyklin bei 25°C inkubiert. Photos wurden den angegebenen Zeitpunkten aufgenommen. Die beiden unabhängig konstruierten Reporterstämme WTETG40A und B verhielten sich gleich, so dass hier nur einer gezeigt ist.

Um zu überprüfen, ob eine Tetrazyklin-induzierbare Genexpression auch in opaque-Zellen eines *MTLa*-Stammes möglich war, wurde die Kasette aus pTET40 zusätzlich in den Stamm CHY420 a (*MTLa/Δmtlα*) integriert. In den so hergestellten Stämmen $\Delta mtl\alpha$ TETG40A und B wurde eine ebenso effiziente Doxyzyklin-induzierbare Gfp-Expression beobachtet, d.h. das modifizierte Tet-On-System funktionierte in opaque-Zellen unabhängig vom Matingtyp (Daten nicht gezeigt).

Zusammengefasst demonstrieren diese Ergebnisse, dass das in dieser Arbeit entwickelte System eine effektive Induktion der Genexpression durch die Zugabe von Doxyzyklin in Hefe-, Hyphen- und opaque-Zellen von *C. albicans* unabhängig von den getesteten

Wachstumsmedien erlaubt. Im Folgenden wurde deshalb untersucht, ob durch eine Doxyzyklin-induzierte Expression spezifischer Gene Wachstum und Morphogenese in *C. albicans* beeinflusst werden können.

4.1.4 Hemmung des Wachstums durch Tetrazyklin-induzierte Expression eines dominant-negativen CDC42-Allels

Die Möglichkeit einer kontrollierten, induzierbaren Genexpression ist besonders wichtig, wenn man die Effekte eines toxisch wirkenden Genproduktes auf Zellen untersucht. Das dominant-negative *CDC42^{D118A}*-Allel codiert für eine mutierte Form der kleinen GTPase Cdc42, die in der inaktiven GDP-gebundenen Form arretiert ist. Eine Überexpression des *CDC42^{D118A}*-Allels in *C. albicans* führt zur Blockierung des apikalen Zellwachstums, wodurch die Zellen eine stark vergrößerte, runde Form mit mehreren Kernen ausprägen (Ushinsky *et al.*, 2002). Um zu testen, ob dieser Phänotyp auch durch die Tetrazyklin-induzierbare Expression des *CDC42^{D118A}*-Allels erreicht wird, wurde die D118A-Mutation in den *CDC42*-ORF (open reading frame) eingeführt und das *CDC42^{D118A}*-Allel unter die Kontrolle des Tetrazyklin-abhängigen Promotors gestellt. Dafür wurde zunächst die codierende Region des *CDC42*-Gens aus dem Stamm CAI4 mit dem Primerpaar CDC9 und CDC12 amplifiziert, und das PCR-Produkt an der vor dem Startcodon eingeführten *Sall*-Schnittstelle sowie an einer internen *KpnI*-Schnittstelle an Position +344 gespalten. Der C-Terminus von *CDC42* wurde mit den Primern CDC11 und CDC12 amplifiziert, wobei der D118A-Austausch hinter der *KpnI*-Schnittstelle sowie eine *BamHI*-Schnittstelle hinter dem Stopcodon eingeführt wurden, und das PCR-Produkt mit *KpnI* und *BamHI* gespalten. Die beiden Fragmente wurden ligiert und anstelle des *caGFP*-Gens in die Tet-On-Kassette inseriert.

Um eine einfachere Klonierung des *CDC42^{D118A}*-Allels und anderer ORFs zu ermöglichen, wurde zunächst eine *BamHI*-Schnittstelle vor die *ACT1*-Transkriptionsterminationssequenz eingeführt und die *Sall*-Schnittstelle vor dem *URA3*-Marker entfernt. Zu diesem Zweck wurde die *ACT1*-Transkriptionsterminationssequenz (+1796 bis +2180) mit den Primern ACT29 und ACT21 amplifiziert, das PCR-Produkt an den eingeführten *BamHI*- und *XhoI*-Schnittstellen gespalten und mit einem *Sall-EcoRI*-Fragment fusioniert, das den 5'-Bereich des *URA3*-Markers enthielt. Das daraus entstandene *BamHI-EcoRI*-Fragment wurde dann zusammen mit dem *Sall-BamHI*-Fragment mit dem *CDC42^{D118A}*-Allel zwischen die *Sall*- und *EcoRI*-Schnittstellen von pTET25 kloniert, wobei das Plasmid pTET36 entstand (Abb. 5B).

Zwei unabhängige Transformanten, TETC36A und B, in denen die Kasette aus pTET36 in eines der *ADHI*-Allele des Stammes CAI4 integriert worden war, wurden in YPD-Medium mit oder ohne Doxyzyklin inkubiert. Wie in Abb. 8 gezeigt, verursachte die Doxyzyklin-induzierte Expression des *CDC42^{D118A}*-Allels die Bildung von vergrößerten runden Zellen, in denen oft zwei oder mehr Zellkerne vorhanden waren. Dies wurde in den meisten Zellen aber erst nach acht Stunden Inkubation mit Doxyzyklin deutlich erkennbar. In Abwesenheit von Doxyzyklin wuchsen die Zellen der Stämme TETC36A und B als normale, knospende Hefen, genauso wie die Zellen des Wildstammes SC5314, die entweder mit oder ohne Doxyzyklin inkubiert worden waren. Diese Ergebnisse demonstrieren, dass das Tetrazyklin-induzierbare Genexpressionssystem für die kontrollierte Expression dieses toxischen Gens und für die Analyse seiner Effekte auf die Zellmorphologie eingesetzt werden kann.

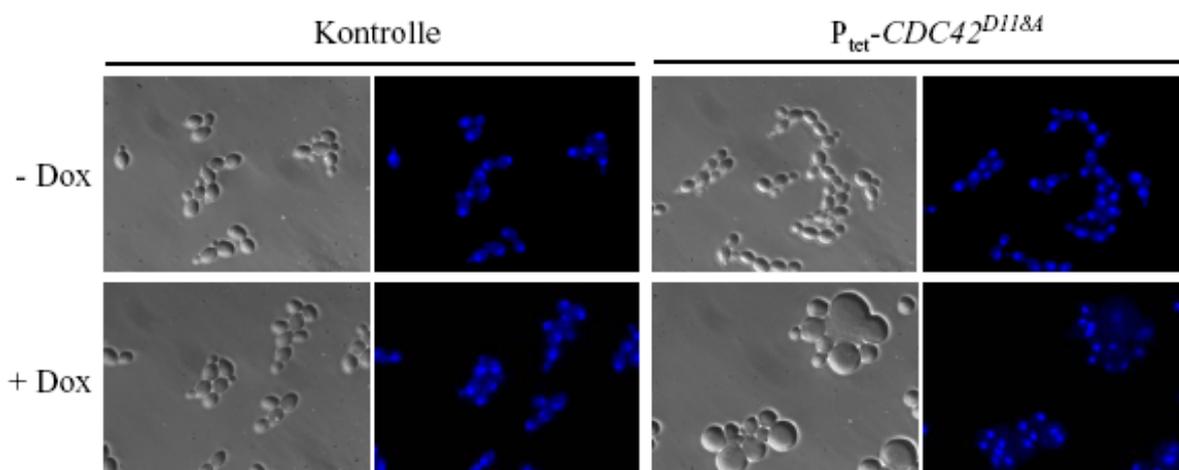


Abb. 8 Tetrazyklin-induzierte Expression des dominant-negativen *CDC42^{D118A}*-Allels erzeugt vergrößerte Zellen mit mehreren Kernen. Der Kontrollstamm SC5314 und die Stämme TETC36A und B, die das *CDC42^{D118A}*-Allel unter der Kontrolle des Tet-abhängigen Promotors exprimieren, wurden für acht Stunden bei 30°C in YPD-Medium ohne (-Dox) oder mit 50 µg/ml Doxyzyklin (+Dox) inkubiert. Die Abbildung zeigt Phasenkontrast- (links) und Fluoreszenzaufnahmen (rechts) von Zellen, deren Kerne mit Höchst-Farbstoff angefärbt wurden.

4.1.5 Inhibierung der Hyphenbildung durch Tetrazyklin-induzierte Expression des *NRG1*-Repressors

Das Gen *NRG1* codiert für einen Repressor, der das Hyphenwachstum von *C. albicans* unterdrückt. Unter Hypheninduktionsbedingungen wird die *NRG1*-Expression herunterreguliert, wodurch der Wechsel vom Hefe- zum Hyphenwachstum ermöglicht wird (Braun *et al.*, 2001; Murad *et al.*, 2001). Eine konstitutive Expression von *NRG1* unter Kontrolle des *ACT1*-Promotors (Braun *et al.*, 2001) oder eines Tetrazyklin-reprimierbaren

Promotors (Saville *et al.*, 2003) führte zur Inhibition der Hyphenbildung und Arretierung der Zellen in der Hefeform. Im folgenden Experiment wurde getestet, ob eine Doxyzyklin-induzierte Expression des *NRG1*-Repressors ausreicht, um das filamentöse Wachstum zu unterdrücken.

Um *NRG1* unter Kontrolle des Tetrazyklin-induzierbaren Promotors zu exprimieren, wurde ein *SalI*-*Bam*HI-Fragment aus dem Plasmid pCdNRG12, das die codierende Region von *NRG1* enthielt (Staib and Morschhäuser, 2005), zwischen die *SalI*- und *Bam*HI-Schnittstellen von pTET36 kloniert. Das so hergestellte Plasmid pTET42 enthielt das *NRG1*-Gen anstelle von *caGFP* bzw. *CDC42^{D118A}* (Abb. 5C).

Die Expressionskassette aus pTET42 wurde in eines der *ADHI*-Allele des Stammes CAI4 integriert. Zwei unabhängige Transformanten, TETN42A und B, wurden verwendet, um die Auswirkung der Doxyzyklin-induzierten *NRG1*-Expression auf die Morphogenese in verschiedenen Hyphen induzierenden Flüssig- und Fest-Medien (RPMI mit Serum, SLAD, und Lee's Medium) bei 37°C zu analysieren. Wie in Abb. 9 zu sehen ist, bildeten die Teststämme TETN42A und B in Abwesenheit von Doxyzyklin ebenso effizient Hyphen wie der Wildstamm SC5314 und die Kontrollstämme TETG25A und B mit der P_{tet}-*caGFP*-Fusion. Unter allen getesteten Bedingungen konnte Doxyzyklin effizient das Hyphenwachstum der Stämme TETN42A und B unterdrücken. In Flüssigkultur hatte das Doxyzyklin keinen Einfluss auf die Morphogenese der Kontrollstämme, was beweist, dass die Inhibition des Hyphenwachstums durch die Induktion der *NRG1*-Expression verursacht wurde. Dagegen wurde auf den getesteten Festmedien eine teilweise Inhibierung des filamentösen Wachstums durch 50 µg/ml Doxyzyklin auch bei den Kontrollstämmen beobachtet. Doxyzyklinkonzentrationen bis 30 µg/ml hatten dagegen keinen Effekt auf das filamentöse Wachstum der Kontrollstämme. Allerdings konnten diese niedrigeren Doxyzyklinkonzentrationen auch bei den Stämmen TETN42A und B, die das Doxyzyklin-induzierbare *NRG1*-Gen enthielten, die Hyphenbildung nicht vollständig unterdrücken, wie an dem leichten filamentösen Wachstum am Rand der Kolonien zu erkennen war (Daten nicht gezeigt).

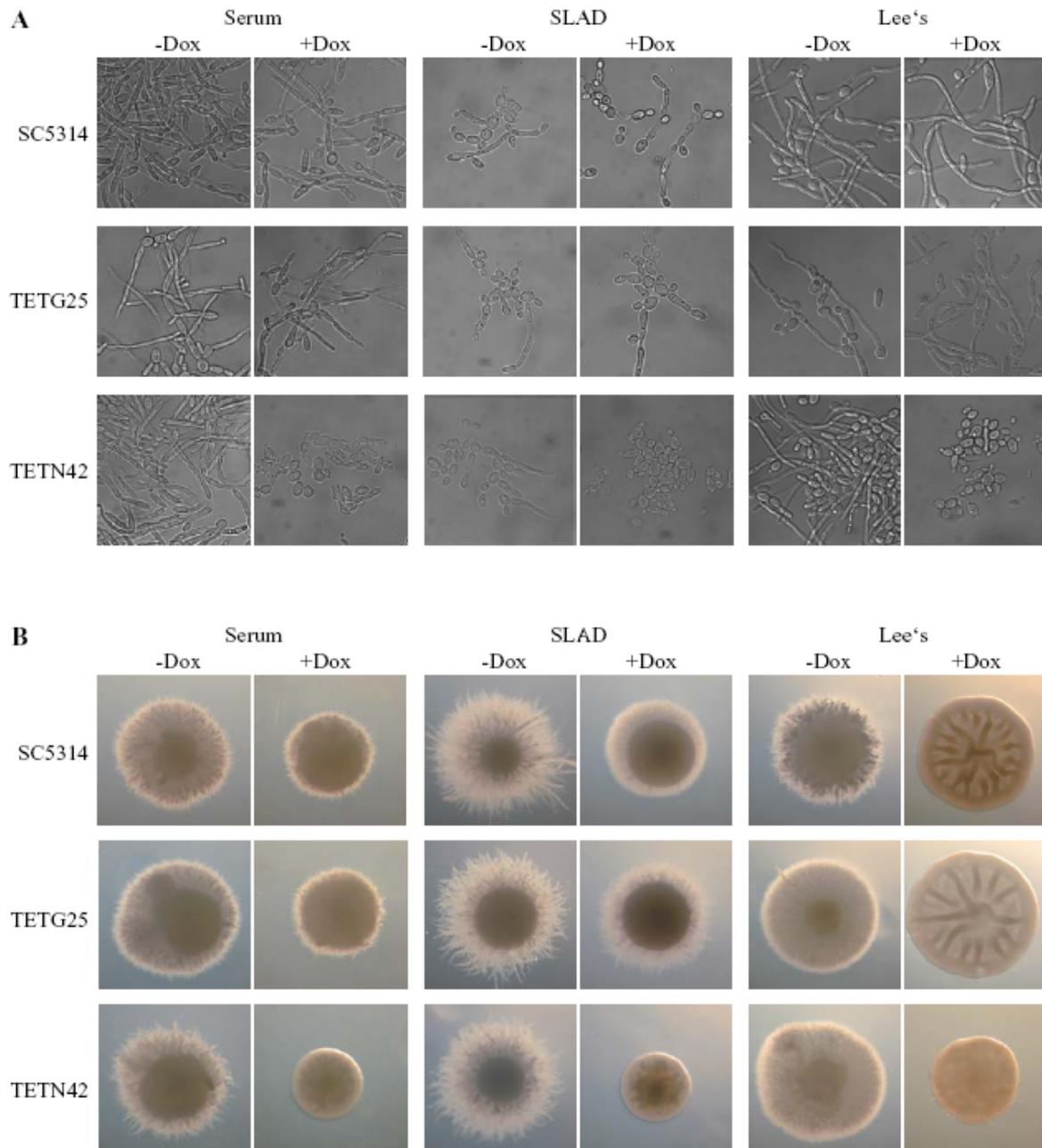


Abb. 9 Tetrazyklin-induzierte Expression von *NRG1* inhibiert das Hyphenwachstum in *C. albicans*. **A:** Die Stämme TETN42A und B, die das Tetrazyklin-induzierbare *NRG1*-Gen enthalten, die Kontrollstämme TETG25A und B, die die P_{tet} -*caGFP*-Fusion im Genom tragen, und der Wildstamm SC5314 wurden für acht Stunden bei 37°C in den verschiedenen flüssigen Hypheninduktionsmedien (Serum, SLAD, Lee's Medium) ohne oder mit 50 µg/ml Doxyzyklin inkubiert und anschließend mit dem CLSM (confokal Laser scanning microscope) mikroskopiert. **B:** Die gleichen Stämme wurden auf Serum-Agarplatten für drei Tage oder auf SLAD- bzw. Lee's Agarplatten für fünf Tage bei 37°C ohne oder mit 50 µg/ml Doxyzyklin inkubiert und anschließend wurden repräsentative Kolonien fotografiert.

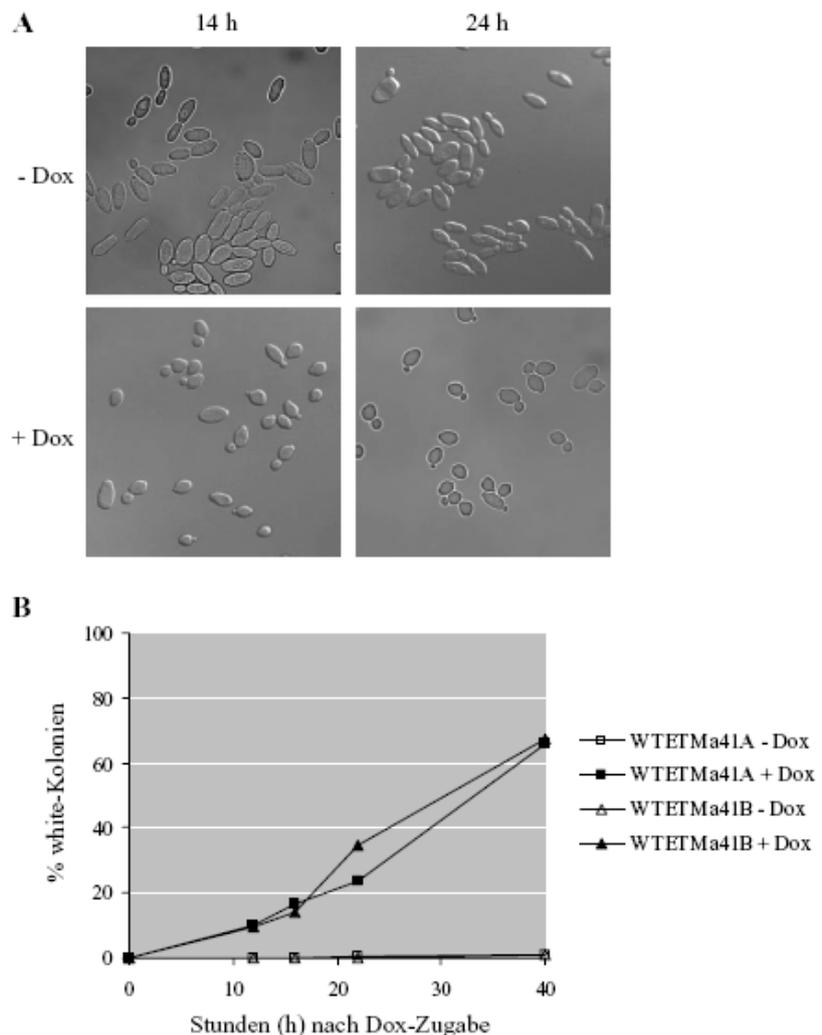
4.1.6 Tetrazyklin-induzierte Expression des α -spezifischen *MTLa1*-Gens in *MTL α -opaque-Zellen*

Wie in der allgemeinen Einführung erwähnt, können heterozygote *MTLa*/ α -*C. albicans*-Stämme nicht von der white- zur opaque-Phase switchen, da der heterodimere *Mtla1*/*Mtla2*-Repressor das Switching unterdrückt (Abb. 2) (Miller and Johnson, 2002). Homozygote *MTLa*-Stämme wie WO-1 können in die Mating-kompetente opaque-Form switchen, da sie kein *MTLa1*-Gen haben und deshalb den Repressorkomplex nicht bilden können. Deshalb war es interessant zu untersuchen, welche Auswirkung eine Expression von *MTLa1* in opaque-Zellen des *MTLa*-Stammes WO-1 hat. Um das *MTLa1*-Gen unter der Kontrolle des Tetrazyklin-induzierbaren Promotors zu exprimieren, wurde die codierende Region des *MTLa1*-Gens aus dem Stamm CAI4 mit dem Primerpaar MATa1 und MATa2 amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde an den vor dem Start- bzw. hinter dem Stopcodon eingeführten *Sall*- und *Bam*HI-Schnittstellen gespalten und zusammen mit dem *Bam*HI-*Eco*RI-Fragment mit dem *ACT1*-Terminator und der 5' *URA3*-Sequenz in das *Sall*/*Eco*RI-gespaltene pTET40 kloniert, woraus pTET41 resultierte (Abb. 5E).

Die Expressionskassette aus dem Plasmid pTET41 wurde in eines der *OP4*-Allele des Stammes WUM5A integriert und zwei unabhängige Transformanten, WTETMa41A und B, aufbewahrt. Opaque-Zellen dieser Stämme und der Kontrollstämme WTETG40A/B mit der P_{tet} -*caGFP*-Fusion wurden bei 25°C mit oder ohne Doxyzyklin inkubiert, um die Effekte auf die Zellmorphogenese zu untersuchen, wenn *MTLa1* künstlich in *MTLa*-opaque-Zellen exprimiert wird. Bei Anwesenheit von Doxyzyklin konnten die meisten opaque-Zellen der Stämme WTETMa41A/B die verlängerte Zellform nicht beibehalten und wechselten innerhalb von zwölf Stunden in die rundlich-ovale Hefeform, wie unter dem Mikroskop zu beobachten war (Abb. 10A). Mit zunehmender Dauer der Inkubationszeit mit Doxyzyklin nahm die Anzahl der länglichen opaque-Zellen ab, während die Kontrollstämme die opaque-Morphologie beibehielten. Dies deutete darauf hin, dass die Expression von *MTLa1* in opaque-Zellen eines *MTLa*-Stammes bewirkt, dass diese in die white-Phase switchen. Um diese Hypothese zu bestätigen, wurden die Zellen aus den Kulturen auf Lee's Agarplatten mit dem lipophilen Farbstoff Phloxin B ausplattiert, der die opaque-Kolonien pink färbt, wodurch sich die zwei Typen von Zellen leicht unterscheiden lassen. Die opaque-Zellen, die ohne Doxyzyklin inkubiert worden waren, behielten ihre charakteristische Morphologie auch nach der Inkubation bei und produzierten keine oder nur wenige white-Kolonien, was der normalen Switchingfrequenz entsprach. Im Gegensatz dazu produzierten die Zellen die mit Doxyzyklin inkubiert wurden, verstärkt white-Kolonien. Der Anteil von white-Kolonien stieg mit der

Dauer der Doxyzyklinbehandlung an (Abb. 10B), aber auch nach längerer Inkubation mit Doxyzyklin bildeten viele Zellen (die Ergebnisse der einzelnen Experimente variierten von ca. 40-60% der Zellen) immer noch opaque-Kolonien, obwohl zu den späteren Zeitpunkten (>12 h) fast alle Zellen mikroskopisch betrachtet die white-Zellform aufwiesen. Dies deutet darauf hin, dass viele Zellen, die äußerlich white-Zellen entsprachen, nicht stabil in die white-Form übergegangen waren und deswegen wieder in die opaque-Morphologie zurückswitchen konnten, nachdem die *MTLa1*-Expression während des darauf folgenden Wachstums auf den Agarplatten ohne Doxyzyklin nicht mehr induziert war. Der Wildstamm WO-1 und die Kontrollstämme WTETG40A/B mit der P_{tet} -*caGFP*-Fusion zeigten nur die niedrige spontane Switchingfrequenz von der opaque- zur white-Phase, unabhängig von An- oder Abwesenheit von Doxyzyklin (Daten nicht gezeigt). Diese Ergebnisse demonstrieren, dass der *Mtla1*/*Mtla2*-Repressorkomplex nicht nur das Switching von white zu opaque inhibieren kann, sondern dass auch bei einer künstlichen Expression des Repressors in opaque-Zellen diese in die white-Phase switchen.

Abb. 10 Tetrazyklin-induzierte Expression des *MTLa1*-Gens in *MTLa*-opaque-Zellen führt zum Switching von der opaque- zur white-Phase. Opaque-Zellen der Stämme WTETMa41A und B, die die P_{tet} -*MTLa1*-Fusion tragen, wurden in Lee's Medium bei 25°C mit oder ohne 50 µg/ml Doxyzyklin inkubiert. **A:** Phasenkontrastbilder von Zellen, die für die angegebene Zeit mit 50 µg/ml Doxyzyklin inkubiert worden waren. **B:** Anteil der white-Kolonien, die nach Ausplattieren auf Lee's Agarplatten mit Phloxin B zum angegebenen Zeitpunkt gebildet wurden. Ähnliche Ergebnisse wurden in Wiederholungsversuchen erhalten, obwohl der Anteil an white-Kolonien sehr variabel war.



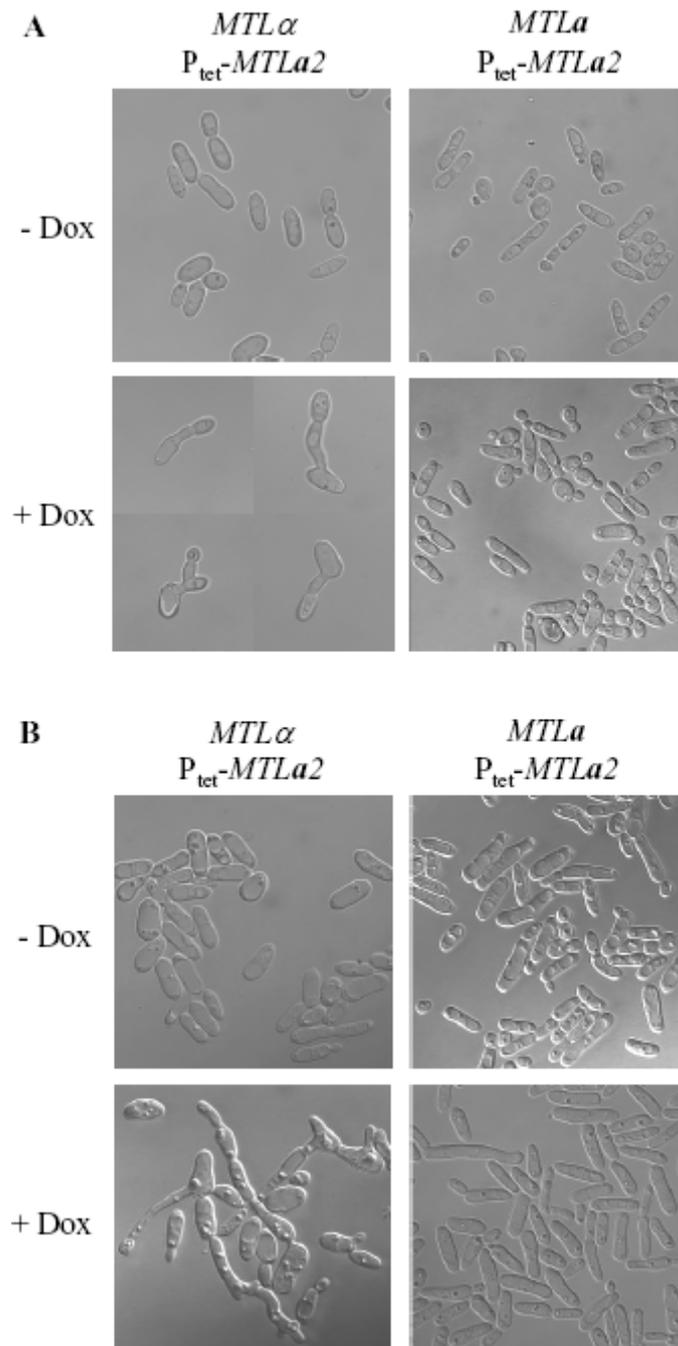
4.1.7 Tetrazyklin-induzierte Expression des a-spezifischen Transkriptionsfaktors *MTLa2* in *MTL α -opaque-Zellen*

4.1.7.1 Expression von *MTLa2* in *MTL α -opaque-Zellen* bewirkt Shmooing

Im Gegensatz zu *S. cerevisiae*, wo die Aufhebung der durch *Mtl α 2*-vermittelten Repression in *MTLa*-Zellen ausreichend für die Expression von a-spezifischen Genen ist, benötigt *C. albicans* den Transkriptionsaktivator *MTLa2* für die Expression von a-spezifischen Genen in *MTLa*-Zellen (Tsong *et al.*, 2003). Um die Auswirkungen einer künstlichen *MTLa2*-Expression auf das Verhalten von *MTL α -Zellen* zu untersuchen, wurde das *MTLa2*-Gen unter die Kontrolle des Tetrazyklin-induzierbaren Promotors gestellt. Dazu wurde ein Fragment mit der codierenden Region von *MTLa2* (-9 bis +661) aus dem Stamm CAI4 mit den Primern *MTLa2*-3 und *MTLa2*-2 amplifiziert, an den vor dem Start- bzw. hinter dem Stopcodon eingeführten *Sall*- und *Bam*HI-Schnittstellen gespalten und anstelle des *MTLa1*-Gens in pTET41 integriert. Die Expressionskassette aus dem dabei hergestellten Plasmid pTET43 (Abb. 5F) wurde ins Genom des Stammes WUM5A integriert und zwei unabhängige Transformanten, WTETMa43A und B, zur weiteren Analyse aufbewahrt. Opaque-Zellen dieser Stämme wurden in flüssigem Lee's Medium mit Doxyzyklin inkubiert, um die Expression von *MTLa2* zu induzieren. Wie in Abb. 11A (links) zu sehen ist, blieben die Zellen in der opaque-Morphologie, jedoch bildeten nach 24 h Inkubation mit Doxyzyklin viele Zellen Auswüchse ähnlich den sogenannten Shmoos, die normalerweise von *MTLa*- oder *MTL α -Zellen* in Gegenwart eines Matingpartners oder als Reaktion auf das entsprechende Matingpheromon gebildet werden (Miller and Johnson, 2002; Bennett *et al.*, 2003; Lockhart *et al.*, 2003a; Lockhart *et al.*, 2003b; Panwar *et al.*, 2003). In Abwesenheit von Doxyzyklin fand keine Shmoo-Bildung statt, was zeigte, dass diese durch die *MTLa2*-Expression verursacht wurde. Eine Bildung von sehr langen Shmoos der meisten opaque-Zellen wurde beobachtet, wenn die Zellen auf Lee's Agarplatten mit Doxyzyklin für zwei bis drei Tage inkubiert wurden (Abb. 11B, links). Im Gegensatz dazu hatte die Tetrazyklin-induzierte *MTLa2*-Expression in den *MTLa*-Stämmen $\Delta mtl\alpha$ TETMa43A und B, die durch die Integration des gleichen Konstrukts aus dem Plasmid pTET43 in den *MTLa*-Stamm CHY420 a hergestellt wurden, keine Shmoo-Bildung zur Folge (Abb. 11A und B, rechts). Zusätzlich wurde das Konstrukt aus dem Plasmid pTET46 (Abb. 5G), in dem *MTLa2* ebenfalls unter Kontrolle des Tetrazyklin-induzierbaren Promotor steht, in den *ADHI*-Locus des Stammes CAI4 integriert, um eine Tetrazyklin-induzierbare Expression von *MTLa2* in heterozygoten *MTLa/ α -Zellen* zu ermöglichen. Auch in den so hergestellten Stämmen

TETMa46A und B bewirkte die *MTLa2*-Expression keine Shmoo-Bildung. Vielmehr zeigten die Zellen, nachdem sie auf Lee's Agarplatten mit Doxyzyklin für paar Tage inkubiert worden waren, eine runde, vergrößerte Zellform mit einem Zellkern (Daten nicht gezeigt).

Abb. 11 Die Tetrazyklin-induzierte Expression des *MTLa2*-Gens in *MTLa* opaque-Zellen induziert die Bildung von Shmoos. **A:** Opaque-Zellen der Stämme WTETMa43A/B (*MTLa*, links) und $\Delta mtl\alpha$ TETMa43A/B (*MTLa*, rechts), die die P_{tet} -*MTLa2*-Fusion in ihrem Genom tragen, wurden für 24 h in Lee's Medium bei 25°C mit oder ohne 50 µg/ml Doxyzyklin inkubiert. Die Zellen des Stammes WTETMa43, die mit Doxyzyklin inkubiert wurden, bildeten Shmoos, die an ihrem apikalen Ende später wieder Knospen ausbildeten (links unten). **B:** Die gleichen Stämme wurden für drei Tage bei RT auf Lee's Agarplatten mit oder ohne 50 µg/ml Doxyzyklin inkubiert. Die Abbildungen zeigen Phasenkontrastaufnahmen von Zellen aus den entsprechenden Kolonien.



Eine mögliche Ursache der Induktion von Shmoos in *MTLα*-Zellen durch die Tetrazyklin-induzierte *MTLa2*-Expression wäre, dass diese Zellen sowohl α -spezifische als auch α -spezifische Gene exprimieren, da sie die Transkriptionsaktivatoren *Mtlα1* und *Mtlα2*

besitzen, nicht aber den *Mtla1/Mtl α 2*-Repressor. Eine Expression beider Pheromone und der dazugehörigen Rezeptoren auf der Zelloberfläche könnte dann die Bildung von Shmoos durch eine autokrine Stimulation induzieren.

4.1.7.2 Durch Tetrazyklin-induzierte *MTLa2*-Expression gebildete *MTL α* -Shmoozellen haben sowohl a- als auch α -Zelleigenschaften

Vor kurzem wurde gezeigt, dass das hyphenspezifische Zellwandprotein *Hwp1* auch während des Mating-Prozesses exprimiert wird, allerdings nur in *MTLa*-Zellen und nur in den Shmoos (Daniels *et al.*, 2003). Falls die Shmoo-Bildung der *MTL α* -Stämme WTETMa43A und B durch autokrine Stimulation ausgelöst wurde, als Folge der *MTLa2*-Expression in Anwesenheit von Doxyzyklin, dann müssten die Zellen sowohl a- als auch α -spezifische Eigenschaften besitzen und sich möglicherweise sowohl mit *MTLa*- als auch mit *MTL α* -Zellen paaren können, wobei auch die Möglichkeit des Selbst-Matings dieser Zellen besteht.

Um diese Hypothese zu testen, wurde der Versuch unternommen, die durch *MTLa2*-Expression induzierten Shmoozellen zu charakterisieren. Zunächst wurde überprüft, ob die Shmoo bildenden Zellen das *HWPI*-Gen exprimieren. Zu diesem Zweck wurde das *caGFP*-Reportergen unter die Kontrolle des *HWPI*-Promotors gestellt. Für die Konstruktion des entsprechenden Plasmids pGFP72 wurde ein *HWPI*-Promotorfragment (-399 bis -6) mit den Primern HWP5 und HWP6 aus dem Stamm SC5314 amplifiziert, an den eingeführten *KpnI*- und *SalI*-Schnittstellen gespalten und zusammen mit einem *SalI-NcoI*-Fragment aus dem Plasmid pGFP68, das den N-terminalen Bereich des *caGFP*-Gens enthält, und einem *NcoI-PstI*-Fragment aus pSPA2G1, welches den restlichen C-terminalen Bereich des *caGFP*-Gens, den *ACT1*-Terminator und den dominanten *caSAT1*-Selektionsmarker enthält, in das *KpnI/PstI*-gespaltene Plasmid pHWP1LACZ2 kloniert.

Das Fragment mit der P_{HWPI} -*caGFP*-Reporterfusion aus pGFP72 wurde mit Hilfe des *caSAT1*-Selektionsmarkers in eines der *HWPI*-Allele der Uridin-prototrophen *MTLa*-Stämme $\Delta mtl\alpha$ TETG40A/B und der Uridin-prototrophen *MTL α* -Stämme WTETG40A/B und WTETMa43A/B integriert. Dadurch wurden die *MTLa*- bzw. *MTL α* -Kontrollstämme $\Delta mtl\alpha$ TETG40A72 und $\Delta mtl\alpha$ TETG40B72 bzw. WTETG40A72 und WTETG40B72, sowie die Teststämme WTETMa43A72 und WTETMa43B72 erhalten, die für die folgenden Experimente verwendet wurden. Wie in Abb. 12 zu sehen ist, wurde der *HWPI*-Promotor in Hyphenzellen der *MTLa*- und *MTL α* -Kontroll- und Teststämme wie erwartet stark induziert, während im Kontrollstamm WO-1, der das *caGFP*-Gen nicht besitzt, keine Fluoreszenz zu beobachten war.

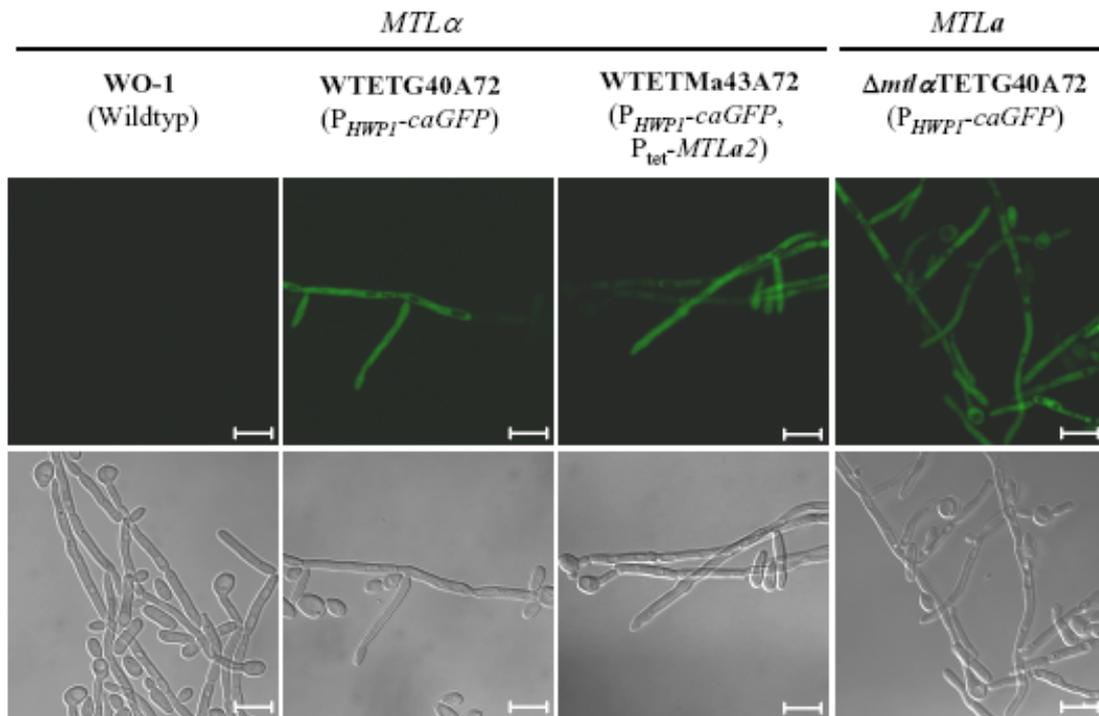


Abb. 12 Analyse der Expression des hyphenspezifischen *HWPI*-Gens in Hyphenzellen von *MTLa*- und *MTL α* -Stämmen. Für die Hyphenbildung wurden die white-Zellen des Wildstammes WO-1 und der Stämme Δ *mtl α* TETG40A72, WTETG40A72 und WTETMa43A72, die die P_{HWPI} -*caGFP*-Fusion im Genom trugen, für sechs Stunden im RPMI mit 10% FCS bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden mittels CLSM mikroskopiert. Die Linien auf den Bildern entsprechen 10 μ m.

Um zu testen, ob eine Expression des *HWPI*-Gens während des Matings mit Hilfe des *caGFP*-Reportergens detektiert werden kann, wurden Matingexperimente in verschiedenen Kombinationen in Lee's Medium durchgeführt. Dafür wurden opaque-Zellen der *MTL α* -Stämme WTETG40A72 und WTETG40B72 bzw. WTETMa43A72 und WTETMa43B72, welche die P_{HWPI} -*caGFP*-Fusion im Genom tragen, jeweils mit opaque-Zellen der *MTLa*-Stämme Δ *mtl α* TETG40A und B gemischt. Die daraus resultierten Shmoozellen oder Matingprodukte zeigten keine Fluoreszenz, da das *HWPI*-Gen in *MTL α* -Zellen während des Matings nicht exprimiert wird (Abb. 13A und B). Im Gegensatz dazu leuchteten viele Zellen während des Matings der *MTLa*-Stämme Δ *mtl α* TETG40A72 und Δ *mtl α* TETG40B72 mit den *MTL α* -Stämmen WTETMa43A72 oder WTETMa43B72 (Abb. 13C). Dadurch wurde bestätigt, dass der *HWPI*-Promotor nur in *MTLa*-Zellen während des Matings aktiviert wird. Opaque-Zellen der Stämme WTETMa43A72 und WTETMa43B72, in denen die Shmoo-Bildung durch Doxyzyklin-induzierte *MTLa2*-Expression ausgelöst wurde, zeigten ebenfalls eine Fluoreszenz, allerdings war diese schwächer als die von Zellen der *MTLa*-Stämme

$\Delta mtl\alpha$ TETG40A72 und $\Delta mtl\alpha$ TETG40B72 während des Matings (Abb. 13D). Dieses Ergebnis wies darauf hin, dass *MTL α* -Zellen, die das *MTLa2*-Gen unter Kontrolle des Tet-abhängigen Promotors exprimieren, tatsächlich Eigenschaften sowohl von α -Zellen als auch von **a**-Zellen besitzen.

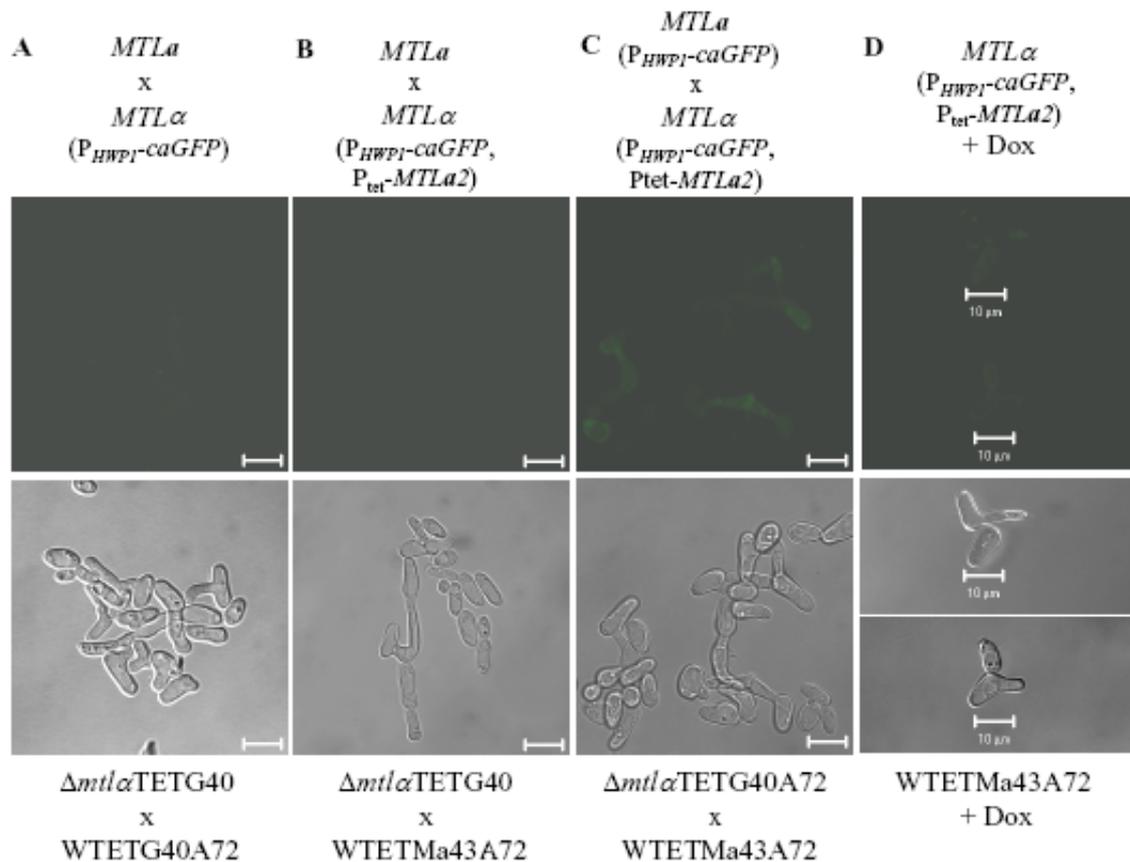


Abb. 13 Induktion der *HWPI*-Expression in *MTLa*-Zellen während des Matings und in *MTL α* -Zellen, in denen das Shmooring durch Tetrazyklin-induzierte *MTLa2*-Expression ausgelöst wurde. Die Stämme $\Delta mtl\alpha$ TETG40A72, WTETG40A72 und WTETMa43A72 tragen die $P_{HWPI-caGFP}$ -Fusion im Genom. **A-C**: Für das Mating wurden opaque-Zellen der *MTLa*-Stämme $\Delta mtl\alpha$ TETG40A und B bzw. $\Delta mtl\alpha$ TETG40A72 und $\Delta mtl\alpha$ TETG40B72 mit opaque-Zellen der *MTL α* -Stämme WTETG40A72 und WTETG40B72 bzw. WTETMa43A72 und WTETMa43B72 für 24 h in Lee's Medium bei 25°C inkubiert. **D**: opaque-Zellen der Stämme WTETMa43A72 und WTETMa43B72, die beide Fusionen $P_{tet-MTLa2}$ und $P_{HWPI-caGFP}$ in ihrem Genom trugen, wurden für 24 h in Lee's Medium bei 25°C mit 50 μ g/ml Doxyzyklin inkubiert. Die Zellen wurden mittels CLSM mikroskopiert. Die Linien auf den Bildern entsprechen 10 μ m.

4.1.7.3 Die Tetrazyklin-induzierte *MTLa2*-Expression in *MTL α* -opaque-Zellen bewirkt kein Selbst-Mating

Die mikroskopische Betrachtung der Zellen konnte nicht eindeutig zeigen, ob die durch *MTLa2*-Expression in *MTL α* -Zellen ausgelöste Shmoo-Bildung auch zum Mating der Zellen führt. Um nachzuweisen, ob ein solches Selbst-Mating dieser Stämme möglich ist, wurden

MTLα-Stämme konstruiert, die das Doxyzyklin-induzierbare *MTLa2*-Gen enthalten und Uridin-auxotroph (*ura3*) sowie Nourseothricin-resistent (*Nou^R*) sind. Dadurch wurde beim Mating dieser Stämme mit den ansonsten identischen Uridin-prototrophen (*URA3*), Nourseothricin-sensitiven (*Nou^S*) *MTLα*-Stämmen WTETMa43A und B eine Selektion von *URA3*-prototrophen, Nourseothricin-resistenten (*URA3*, *Nou^R*) Matingprodukten ermöglicht. Für die Konstruktion der Stämme wurde der *URA3*-Marker im Plasmid pTET43 gegen den *caSAT1*-Selektionsmarker ausgetauscht und die Kasette mit der P_{tet} -*MTLa2*-Fusion aus dem so hergestellten Plasmid pTET48 in eines der beiden *ADH1*-Allele des *ura3*-auxotrophen *MTLα*-Stammes WUM5A integriert. Zwei unabhängige Transformanten, WTETMa48A und B, wurden für die folgenden Experimente verwendet. Für das Selbst-Matingexperiment wurden opaque-Zellen der Stämme WTETMa43A oder B und WTETMa48A oder B zusammen auf Lee's Agarplatten mit 100 µg/ml Uridin und 50 µg/ml Doxyzyklin inkubiert. Nach fünf Tagen erfolgte die Selektion möglicher Matingprodukte, die *URA3*-prototroph und Nourseothricin-resistent sein sollten, auf Selektionsplatten (SD-Medium-CSM mit 200 µg/ml Nourseothricin) (Abb. 14).

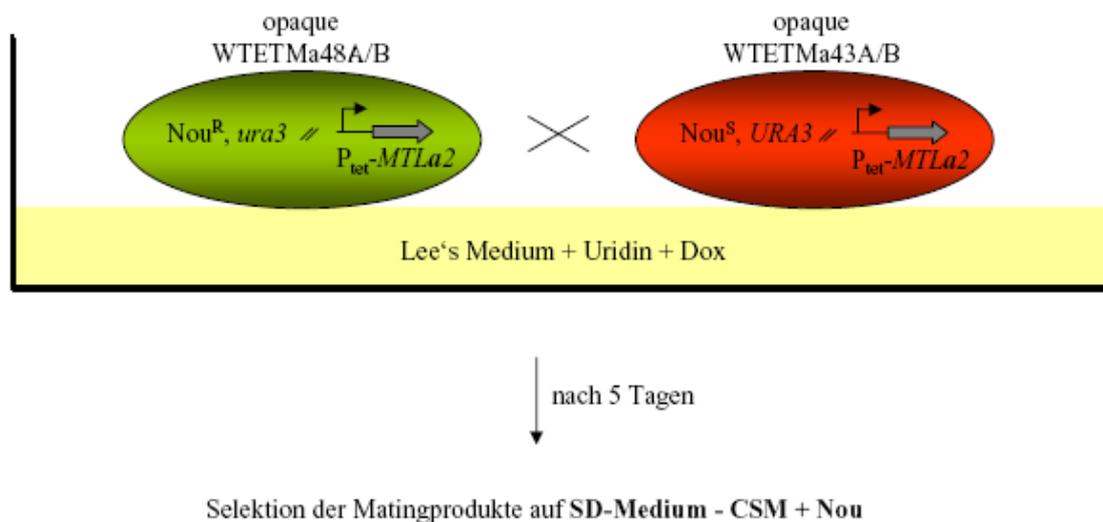


Abb. 14 Schematische Darstellung des Selbst-Matingexperiments zwischen den *ura3*, *Nou^R* *MTLα*-Stämmen WTETMa48A bzw. B und den *URA3*, *Nou^S* *MTLα*-Stämmen WTETMa43A bzw. B, die das *MTLa2*-Gen unter Kontrolle des Doxyzyklin-induzierbaren Promotors exprimieren. Matingprodukte sollten *URA3*, *Nou^R* sein.

Allerdings konnten bei diesem Experiment keine Matingprodukte erhalten werden, wohingegen die Matingeffizienz der *MTLα*-Stämme WTETMa48A oder B mit den *ade2*-

auxotrophen *MTLa*-Stämmen CMTL α M1A oder B (Kapitel 4.3.2.7) ca. $2,0 \times 10^{-1}$ betrug. Dieses Ergebnis demonstrierte, dass die *MTLa2*-Expression in *MTL* α -opaque-Zellen zwar die Bildung von Shmoos induziert, jedoch kein Selbst-Mating ermöglicht.

4.1.8 Tetrazyklin-induzierbare Gendeletion in *C. albicans*

4.1.8.1 Prinzip des Tetrazyklin-induzierbaren Gendeletionssystems

Um ein Tetrazyklin-induzierbares Gendeletionssystem in *C. albicans* zu etablieren, wurde das *ecaFLP* (enhanced *C. albicans*-adapted *FLP*)-Gen, das für die site-spezifische Rekombinase FLP codiert (Staub *et al.*, 2000), unter die Kontrolle des Tetrazyklin-induzierbaren Promotors gestellt. Die Kasette aus dem so hergestellten Plasmid pTET23 (Abb. 5H) wurde in eines der beiden *ADHI*-Allele des Stammes CF11 integriert, der ein von den Zielsequenzen der FLP-Rekombinase (*FRT*, *FLP* recombination target) flankiertes *MPA^R* (mycophenolic acid resistance)-Markergen im *ACT1*-Lokus trägt, wodurch die Stämme TETF23A und B entstanden (Park, 2002).

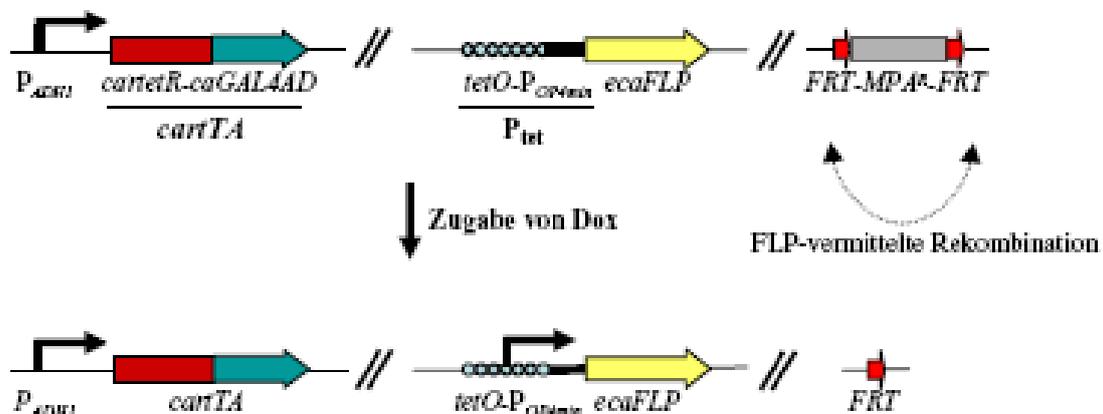


Abb. 15 Schema des Tetrazyklin-induzierbaren Gendeletionssystems. Das *ecaFLP*-Gen (enhanced *C. albicans*-adapted *FLP*), das für die site-spezifische Rekombinase FLP codiert, steht unter der Kontrolle des rtTA-abhängigen Promotors (P_{tet}) und kann durch Zugabe von Doxyzyklin (Dox) induziert werden, woraufhin die FLP-Rekombinase das von *FRT*-sites flankierte *MPA^R*-Gen aus dem Genom deletiert. Das *carrTA*-Gen und die P_{tet} -*ecaFLP*-Fusion befinden sich zusammen auf einer Kasette (siehe Abb. 5H für Details).

Nach der durch Zugabe von Doxyzyklin induzierten Expression des *ecaFLP*-Gens bindet die FLP-Rekombinase an die *FRT*-sites und schneidet die Kasette mit dem *MPA^R*-Gen aus dem Genom heraus, so dass die Zellen *MPA*-sensitiv werden. In meiner Diplomarbeit konnte ich bereits zeigen, dass die Deletion des *MPA^R*-Markergens aus dem *C. albicans*-Genom durch

die Doxyzyklin-induzierte Expression von *ecaFLP* effizient erfolgt. Die Funktionsweise dieses Systems ist in Abb. 15 schematisch dargestellt.

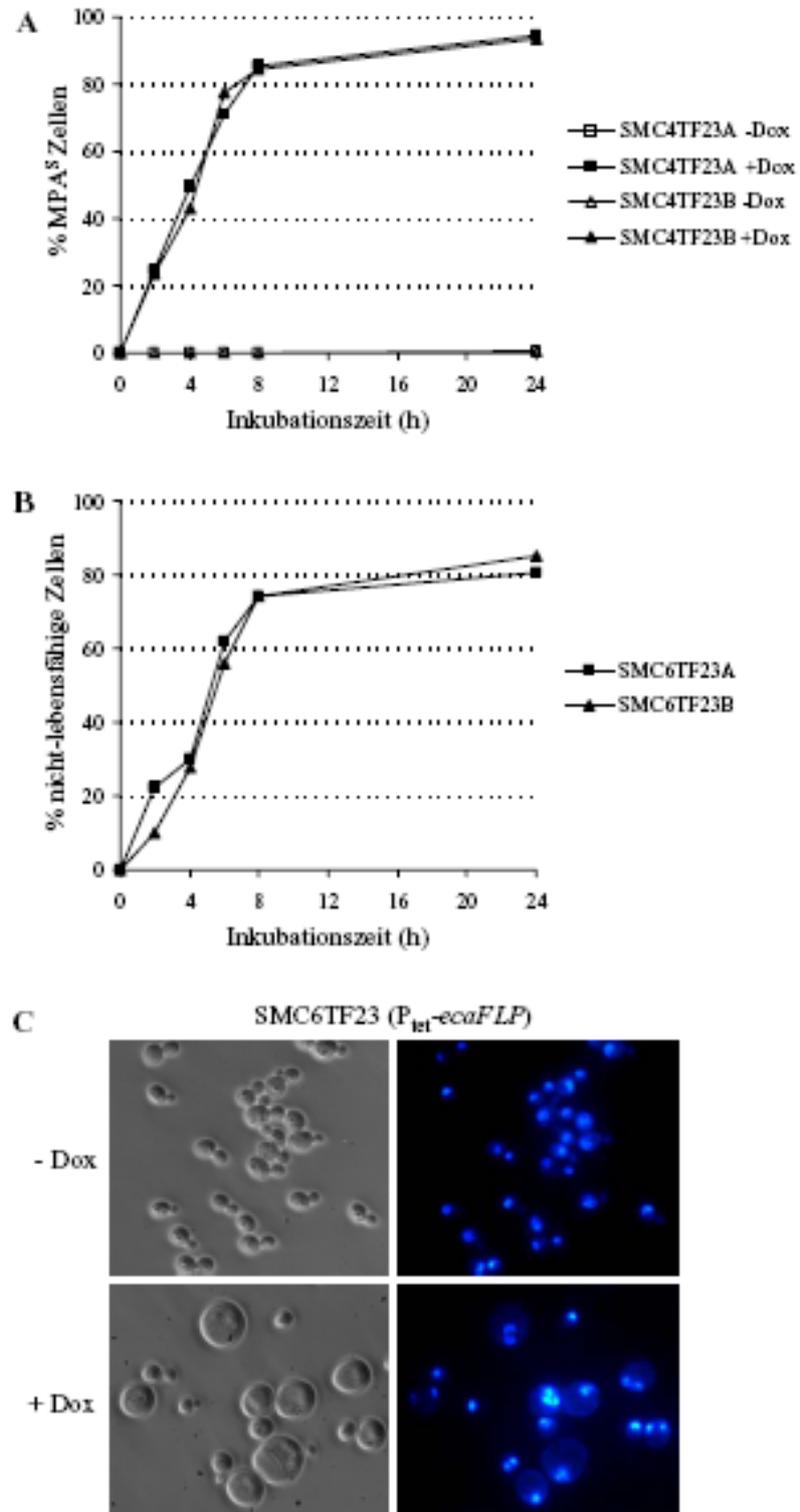
4.1.8.2 Herstellung von konditional letalen *C. albicans*-Mutanten durch Tetrazyklin-induzierbare Gendeletion

In unserer Arbeitsgruppe wurde bereits ein System zur Herstellung von konditional letalen *C. albicans*-Mutanten etabliert, das auf der FLP-vermittelten Deletion essentieller Gene beruht (Michel *et al.*, 2002). In diesem System steht das *ecaFLP*-Gen unter Kontrolle des induzierbaren *SAP2*-Promotors, für dessen Aktivierung die Zellen in einem entsprechenden Induktionsmedium inkubiert werden müssen. Nach diesem Schritt werden die so erhaltenen Nullmutanten in frisches Medium überführt, um die Effekte der Gendeletion auf die Zellen unter den gewünschten Bedingungen studieren zu können.

Um eine Medium-unabhängige Deletion eines essentiellen Gens zu ermöglichen, wurde in dieser Arbeit das Tetrazyklin-induzierbare System verwendet. Dafür wurde zunächst die Kassetten mit der P_{tet} -*ecaFLP*-Fusion aus dem Plasmid pTET23 (Abb. 5H) in eine heterozygote (SMC4) und in homozygote $\Delta cdc42$ -Mutanten (SMC6A und B) integriert, die alle eine zusätzliche ektopische Kopie des essentiellen *CDC42*-Gens zusammen mit dem *MPA^R*-Markergen zwischen flankierenden *FRT*-sites besitzen (Michel *et al.*, 2002). Zwei unabhängige Transformanten des Stammes SMC4 (SMC4TF23A und B) sowie je eine Transformante der Stämme SMC6A (SMC6TF23A) und SMC6B (SMC6TF23B) wurden für die folgenden Versuche verwendet. In den Stämmen SMC4TF23A/B konnte die Deletion der *FRT-CDC42-MPA^R-FRT*-Kassette aus dem Genom durch die Entstehung *MPA*-sensitiver Zellen detektiert werden, da in den Zellen noch ein Wildtyp-Allel von *CDC42* vorhanden war und sie somit überlebensfähig waren.

Um die Effizienz der Tetrazyklin-induzierten Deletion der *FRT-CDC42-MPA^R-FRT*-Kassette zu überprüfen, wurden die Stämme SMC4TF23A/B in An- oder Abwesenheit von Doxyzyklin inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden geeignete Verdünnungen der Kulturen auf Indikatorplatten (SD-Agarplatten mit 1,8 μ g/ml *MPA*) ausplattiert, und nach zwei Tagen Inkubation bei 30°C wurde der Prozentsatz von *MPA^S*-Zellen in den Populationen bestimmt (Abb. 16A). Acht Stunden nach Zugabe von Doxyzyklin waren ca. 85% der Zellen *MPA*-sensitiv, was darauf hinweist, dass die deletierbare *CDC42*-Kopie in den meisten Zellen aus dem Genom entfernt worden war. Der Prozentsatz der *MPA^S*-Zellen stieg bei längerer Inkubation mit Doxyzyklin noch leicht an, eine 100%ige Deletion konnte allerdings nicht erreicht werden. Ohne Zugabe von Doxyzyklin blieben die Zellen *MPA*-resistent, was demonstriert, dass keine Excision in Abwesenheit des Induktors stattfand.

Abb. 16 Tetrazyklin-induzierte Deletion des essentiellen *CDC42*-Gens. **A:** Zeitlicher Verlauf der Tetrazyklin-induzierten, FLP-vermittelten Excision der *FRT-CDC42-MPA^R-FRT*-Kassette in den Stämmen SMC4TF23A/B, welche die P_{tet} -*ecaFLP*-Fusion und die deletierbare *FRT-CDC42-MPA^R-FRT*-Kassette in einem heterozygoten *CDC42/cdc42* Hintergrund tragen. Die Stämme wurden bei 30°C in YPD-Medium mit oder ohne 50 µg/ml Doxyzyklin inkubiert und der Anteil an MPA^S-Zellen in der Population zu den angegebenen Zeitpunkten bestimmt. **B:** Erzeugung nicht lebensfähiger Zellen durch Doxyzyklin-induzierte Excision der einzigen, deletierbaren *CDC42*-Kopie in den Stämmen SMC6TF23A/B. Die Zellen wurden bei 30°C in YPD-Medium bis zu einer OD₆₀₀ von 0,1 inkubiert, dann wurden die Kulturen aufgeteilt und mit oder ohne 50 µg/ml Doxyzyklin weiter inkubiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden geeignete Verdünnungen ausplattiert, und der Anteil nicht lebensfähiger Zellen in den Doxyzyklin-induzierten Kulturen wurde nach der Formel $[1 - \text{cfu} (+ \text{Dox}) / \text{cfu} (- \text{Dox})] \times 100$ berechnet. **C:** Phänotyp von *cdc42*-Nullmutanten, die durch FLP-vermittelte Excision der *FRT-CDC42-MPA^R-FRT*-Kassette im homozygoten *cdc42/cdc42* Hintergrund entstanden. Die Stämme SMC6TF23A/B wurden für acht Stunden bei 30°C in YPD-Medium mit oder ohne 50 µg/ml Doxyzyklin inkubiert. Gezeigt sind Phasenkontrast- (links) und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen (rechts) von Zellen, deren Kerne mit Höchst-Farbstoff angefärbt wurden.



Anschließend wurden die Effekte der Doxyzyklin-induzierten *CDC42*-Deletion in den Stämmen SMC6TF23A/B beobachtet. In diesen Stämmen konnte die Effizienz des Ausschneidens der *FRT-CDC42-MPA^R-FRT*-Kassette nicht durch das Entstehen MPA-sensitiver Kolonien detektiert werden, da die erzeugten Nullmutanten nicht lebensfähig sind (Michel *et al.*, 2002). Deswegen wurde der Prozentsatz von Nullmutanten in der Population zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Induktion der *ecaFLP*-Expression anhand der CFU (colony forming units)-Zahlen der Kulturen von SMC6TF23A/B bestimmt, die in Anwesenheit bzw. Abwesenheit von Doxyzyklin inkubiert worden waren (Abb. 16B). Der Anteil von nicht-lebensfähigen Zellen, die durch die FLP-vermittelte *CDC42*-Deletion erzeugt worden waren, war leicht niedriger als der Anteil von MPA^S-Zellen im heterozygoten *CDC42/cdc42* Hintergrund, vermutlich weil sich die restlichen Zellen, in denen keine Gendeletion stattgefunden hatte, während der Inkubationsperiode weiter vermehrten, während die Nullmutanten nicht mehr proliferieren konnten. Acht Stunden nach Zugabe von Doxyzyklin waren ca. 75% der Zellen in der Population nicht mehr lebensfähig, und der Anteil dieser Zellen erhöhte sich mit längerer Inkubationszeit noch leicht, was darauf hinwies, dass der phänotypische Effekt der *CDC42*-Deletion in der Mehrzahl der Zellen zu beobachten sein sollte. Die meisten Zellen zeigten den charakteristischen Phänotyp von *cdc42* Nullmutanten, der sich in einer stark vergrößerten, runden und mehrkernigen Form äußert (Abb. 16C), da in den Nullmutanten kein apikales Wachstum mehr stattfinden kann. Diese Ergebnisse demonstrieren, dass das Tetrazyklin-induzierbare Genexpressionssystem auch für die Herstellung von konditional letalen Mutanten geeignet ist, in denen das essentielle Zielgen durch Zugabe von Doxyzyklin aus dem Genom herausgeschnitten wird, und sich anschließend die Effekte der Gendeletion auf den Phänotyp der Zellen untersuchen lassen.

4.1.9 Tetrazyklin-induzierbare Genexpression in *C. albicans*-Wildstämmen

In den bisherigen Versuchen wurde auf auxotrophe Wirtsstämmen zurückgegriffen, um das Tetrazyklin-induzierbare Genexpressionssystem in *C. albicans* anzuwenden. Es ist jedoch wünschenswert, das System nicht nur in *C. albicans*-Laborstämmen sondern auch in prototrophen Wildstämmen mit spezifischen Eigenschaften verwenden zu können, zum Beispiel in klinischen Isolaten, die eine Resistenz gegen antifungale Wirkstoffe entwickelt haben. Deshalb wurde das System weiter modifiziert, indem der *URA3*-Selektionsmarker gegen den dominanten Selektionsmarker *caSAT1* ausgetauscht wurde, der Resistenz gegen Nourseothricin verleiht (Reuß *et al.*, 2004). Zusätzlich wurden geeignete Schnittstellen für Restriktionsenzyme in die Kassette eingeführt, um Zielgene in einem einfachen

Klonierungsschritt unter die Kontrolle des Tetrazyklin-induzierbaren Promotors (P_{tet}) stellen zu können.

Zu diesem Zweck wurde das *caGFP*-Gen mit den Primern OPS10 und GFP24 amplifiziert, wobei eine *SalI*-site vor dem *caGFP*-Startcodon und eine *BglII*-site direkt hinter dem Stopcodon eingeführt wurden. Das *SalI*-*BglII*-Fragment mit dem *caGFP*-Gen wurde zusammen mit einem *BglII*-*PstI*-Fragment, das den *ACT1*-Terminator und den *caSAT1*-Marker enthielt, in die Tet-On-Kassette kloniert. Eine *SalI*-Schnittstelle im Intron des *caSAT1*-Markers war vorher zerstört worden, indem ein internes *SalI*-*ClaI*-Fragment durch ein ansonsten identisches *XhoI*-*ClaI*-Fragment ersetzt wurde, das mit den Primern SAT3 und SAT2 amplifiziert wurde. Durch den so eingeführten Basenaustausch wurde die *SalI*-Schnittstelle entfernt, ohne die Funktion des Markers zu beeinträchtigen. Außerdem wurde das rechte flankierende *ADHI*-Fragment der Kassette durch ein entsprechendes Fragment ersetzt, das mit den Primern ADH8 und ADH15 amplifiziert wurde, um eine zusätzliche *ApaI*-Schnittstelle einzuführen. In dem resultierenden Plasmid pNIM1 (Abb. 17A) ist das *caGFP*-Gen von "unique" *SalI*- und *BglII*-Schnittstellen flankiert, die jeweils auch mit *XhoI* bzw. *BamHI* kompatibel sind, wodurch andere ORFs bequem und flexibel anstelle von *caGFP* in die Kassette eingesetzt werden können.

Um die Anwendbarkeit dieser Kassette zu testen, wurde sie ins Genom verschiedener *C. albicans*-Wildstämme integriert. Die Isolatepaare F2/F5, G2/G5 und DSY294/DSY296 sind jeweils genetisch verwandt und wurden zu verschiedenen Zeitpunkten aus Patienten mit OPC isoliert, die mit Fluconazol behandelt wurden. Die aus späteren Infektionsepisoden isolierten F5, G5 und DSY296 hatten eine Resistenz gegen Fluconazol und andere toxische Substanzen entwickelt, die durch Überexpression von Effluxpumpen bedingt war, wobei die Isolate F5 und G5 das *MDR1*-Gen überexprimieren, das für einen "major facilitator" codiert, während DSY296 die Gene *CDR1* und *CDR2* überexprimiert, die für ABC-Transporter codieren (Sanglard *et al.*, 1995; Franz *et al.*, 1998). Die Überexpression dieser Effluxpumpen hatte keinen Einfluss auf die Sensitivität der Stämme gegenüber Nourseothricin, d.h. Nourseothricin ist offensichtlich kein Substrat für diese Transporter, und Nourseothricin-resistente Transformanten wurden für alle sechs Ausgangsstämme mit ähnlicher Effizienz erhalten. Zwölf Transformanten jedes Stammes wurden durch Southern-Hybridisierung analysiert und die meisten (87,5%) wiesen eine korrekte Integration der Kassette in den *ADHI*-Locus auf, was eine effiziente und spezifische Insertion der Tetrazyklin-induzierbaren Genexpressionskassette ins Genom der *C. albicans*-Wildstämme demonstriert (Daten nicht gezeigt). Jeweils zwei unabhängige Transformanten (F2NIM1A/B, F5NIM1A/B,

G2NIM1A/B, G5NIM1A/B, DSY294NIM1A/B und DSY296NIM1A/B) wurden verwendet, um die Doxyzyklin-induzierbare Expression des *caGFP*-Reportergens zu testen. Alle Stämme wiesen eine vergleichbare Fluoreszenz auf, was zeigt, dass die Überexpression von Effluxpumpen die Effizienz der Induktion des Tetrazyklin-Promotors durch Doxyzyklin nicht stört (Abb. 17B).

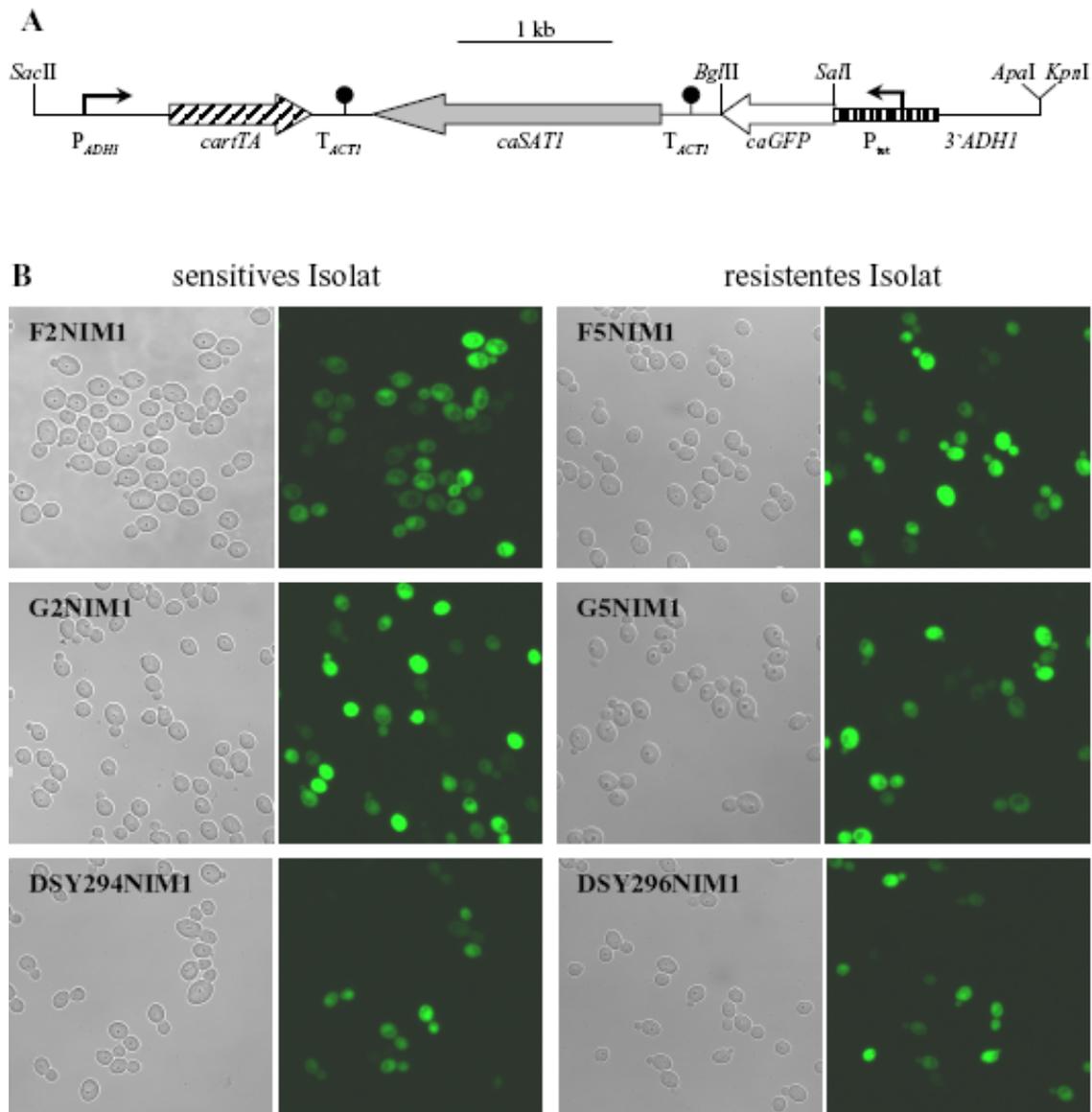


Abb. 17 Tetrazyklin-induzierbare Genexpression in *C. albicans*-Wildstämmen. **A**: Struktur der Tetrazyklin-induzierbaren Genexpressionskassette im Plasmid pNIM1. Die angegebenen Schnittstellen kommen jeweils nur einmal vor und können für den Austausch von *caGFP* gegen andere Gene bzw. für das Ausschneiden der gesamten Kassette aus dem Vektor verwendet werden. **B**: Die Expression des Tetrazyklin-induzierbaren *caGFP*-Gens in den angegebenen klinischen *C. albicans*-Isolaten, die sensitiv oder multiresistent gegen antifungale Medikamente und andere toxische Substanzen sind. Gezeigt sind Phasenkontrast- und entsprechende Fluoreszenzaufnahmen von Zellen, die für acht Stunden in YPD-Medium bei 30°C mit 50 µg/ml Doxyzyklin inkubiert wurden. Zum angegebenen Zeitpunkt fluoreszierten nicht alle Zellen, aber bei längerer Inkubation leuchteten alle Zellen. In Abwesenheit von Doxyzyklin wurde keine Fluoreszenz der Zellen beobachtet (Daten nicht gezeigt).

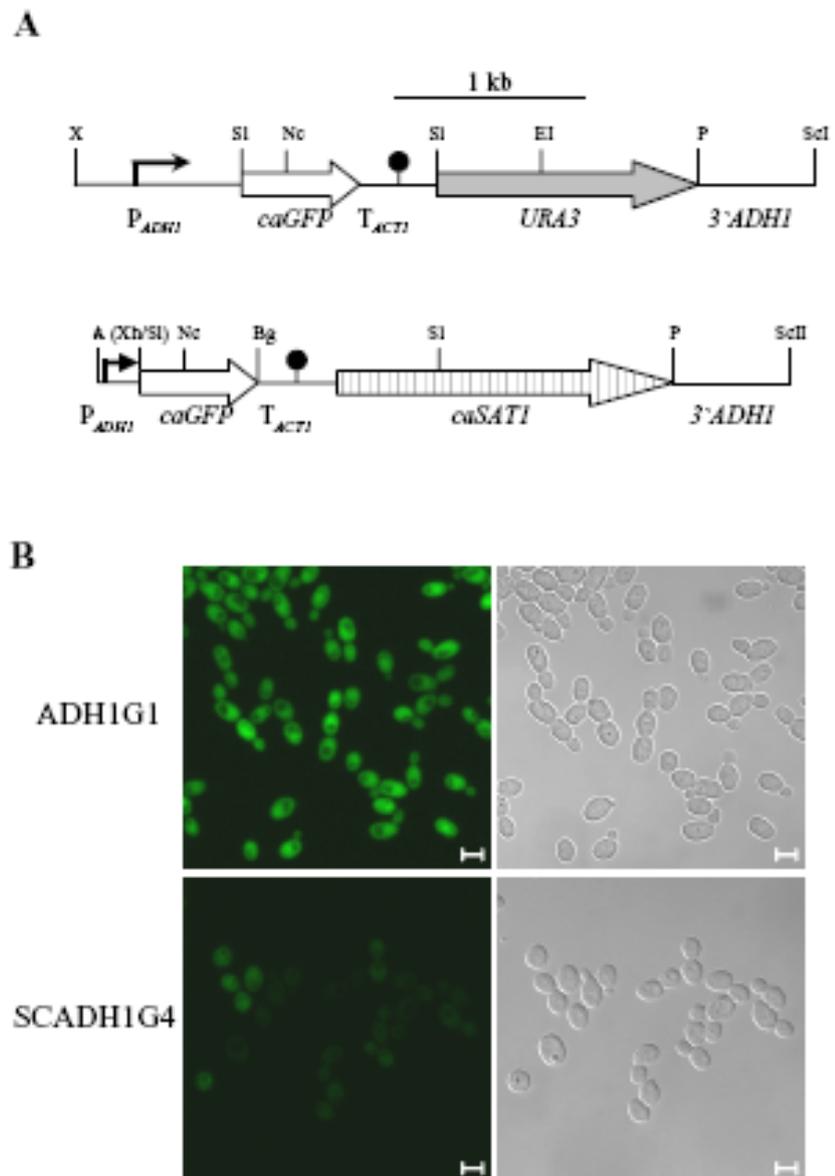
Die Kasette aus dem Plasmid pNIM1 wurde auch in den Wildstamm SC5314 und den aus SC5314 hergestellten *ura3*-auxotrophen Laborstamm CAI4 integriert. Jeweils zwei unabhängige Transformanten, SCNIM1A und B bzw. CNIM1A und B wurden verwendet, um die Tetrazyklin-induzierbare Gfp-Expression zu vergleichen. Im Vergleich zu den Transformanten des Laborstammes CAI4 war die Induktion der Gfp-Expression in SCNIM1A und B und auch in den oben genannten zwölf Stämmen etwas verzögert und schwächer, aber alle Zellen zeigten schließlich einen fluoreszierenden Phänotyp. Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass das Tetrazyklin-induzierbare Genexpressionssystem in Kombination mit dem dominanten *caSAT1*-Selektionsmarker generell auch in *C. albicans*-Wildstämmen eingesetzt werden kann.

4.1.10 Aktivität des *ADHI*-Promotors in den Stämmen SC5314 und CAI4

Die Beobachtung, dass die Tetrazyklin-induzierte Expression des *caGFP*-Gens im *ura3*-auxotrophen Stamm CAI4 stärker und schneller war als im Wildstamm SC5314 und den klinischen Isolaten (vergleiche Abb. 7A und Abb. 17B), könnte verschiedene Ursachen haben (siehe Diskussion). Ein möglicher Grund für dieses Phänomen war, dass der *ADHI*-Promotor in SC5314 weniger aktiv ist und deshalb eine geringere Menge des Transaktivators rtTA in den Zellen vorhanden ist. Um diese Hypothese zu testen, wurde die Aktivität des *ADHI*-Promotors in den Zellen mit Hilfe des *caGFP*-Reportergens verglichen. Das Plasmid pADH1G2, das die P_{ADHI} -*caGFP*-Fusion zusammen mit dem *URA3*-Marker trägt, wurde bereits im Abschnitt 4.1.2 beschrieben. Für die Herstellung von pADH1G4, das eine P_{ADHI} -*caGFP*-Fusion zusammen mit dem dominanten *caSAT1*-Marker enthält, wurde das *Sall*-*Bgl*III-Fragment mit dem *caGFP*-Gen aus pNIM1 in das *Xho*I-*Bgl*III-gespaltene pADH1E2 kloniert (Abb. 18A).

Die Kasette aus dem Plasmid pADH1G4 wurde in eines der *ADHI*-Allele im Stamm SC5314 integriert, wodurch die Stämme SCADH1G4A und B entstanden. Die Stämme SCADH1G4A/B und ADH1G1A/B (siehe Kapitel 4.1.1), welche die P_{ADHI} -*caGFP* im Genom tragen, wurden in YPD bis zur Log-Phase (für sechs Stunden) inkubiert, bevor die Zellen unter dem Mikroskop betrachtet wurden. Wie in Abb. 18B zu sehen ist, wurde das *caGFP*-Gen in den Stämmen ADH1G1A und B viel stärker exprimiert, als in den Stämmen SCADH1G4A und B. Diese Ergebnisse zeigen, dass der *ADHI*-Promotor im Stamm CAI4 offensichtlich stärker aktiv ist als im Stamm SC5314. Die verzögerte Aktivität des Tetrazyklin-induzierbaren Genexpressionssystems in SC5314 und anderen Wildtypstämmen liegt also höchst wahrscheinlich daran, dass rtTA dort weniger stark exprimiert wird.

Abb. 18 A: Aufbau der Kassetten mit der P_{ADHI} -*caGFP*-Fusion und dem *URA3*- bzw. *caSAT1*-Marker in den Plasmiden pADH1G2 (oben) bzw. pADH1G4 (unten). Der abgewinkelte Pfeil symbolisiert den *ADHI*-Promotor. Nach der Integration ins Genom steht *caGFP* in allen Fällen unter Kontrolle des vollständigen *ADHI*-Promotors. Relevante Schnittstellen: A, *ApaI*; B, *BamHI*; Bg, *BglII*; EI, *EcoRI*; Nc, *NcoI*; P, *PstI*; ScI, *SacI*; ScII, *SacII*; SI, *SalI*; X, *XbaI*; Xh, *XhoI*. **B:** Die Reporterstämme ADH1G1A/B (CAI4-Derivate) und SCADH1G4A/B (SC5314-Derivate) wurden für sechs Stunden in YPD bei 30°C inkubiert und anschließend unter dem Mikroskop betrachtet. Die Linien auf den Bildern entsprechen 5 µm.



4.2 Analyse der Rolle des Tup1-Repressors im *C. albicans*-*MTL α* -Stamm WO-1

Der konservierte globale Transkriptionsrepressor Tup1 reprimiert in *C. albicans* das Hyphenwachstum unter Bedingungen, in denen der Pilz normalerweise in der Hefeform wächst, und *tup1 Δ* -Mutanten des heterozygoten *MTLa/MTL α* -Stammes SC5314 sind konstitutiv filamentös. Aufgrund der zentralen Rolle dieses Repressors in der Regulation der Morphogenese von *C. albicans* erschien es möglich, dass Tup1 auch eine Rolle bei der Kontrolle des white-opaque-Switchings in *MTL*-homozygoten Stämmen spielt. Um dies zu untersuchen, wurde das *TUP1*-Gen im *MTL α* -Stamm WO-1 inaktiviert und die Mutanten hinsichtlich ihrer Fähigkeit zum white-opaque-Switching untersucht.

4.2.1 Konstruktion von *tup1 Δ* -Mutanten des *C. albicans*-Stammes WO-1

Für die Herstellung der *tup1 Δ* -Mutanten wurde die *URA3*-Flipping-Methode verwendet, die auf der sequentiellen Insertion einer recycelbaren DNA-Kassette mit dem *URA3*-Marker in die beiden Allele des Zielgens und der anschließenden, FLP-vermittelten Excision der Kassette aus dem Genom beruht (Morschhäuser *et al.*, 1999) (siehe Abb. 19). Das Plasmid pTUP1M2, das von Anja Strauß aus unserer Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt wurde, enthält eine *TUP1*-Deletionskassette, in der fast die gesamte codierende Region des *TUP1*-Gens durch den *URA3*-Flipper ersetzt ist (Abb. 20A). Das *SacI*-*KpnI*-Fragment aus pTUP1M2 wurde für die Transformation des Stammes WUM5A verwendet, einem *ura3 Δ* -Derivat des Stammes WO-1 (Strauß *et al.*, 2001). Aus zwei unabhängigen Transformanten, in denen die Deletionskassette korrekt in eines der beiden *TUP1*-Allele inseriert war (WTUP1M1A und B, Abb. 20C, Spur 3 und 4), wurde der *URA3*-Flipper durch FLP-vermittelte Rekombination wieder entfernt, wodurch die Uridin-auxotrophen Stämme WTUP1M2A und B entstanden (Abb. 20C, Spur 5 und 6). Nach Transformation dieser Stämme mit der gleichen Deletionskassette wurden die Stämme WTUP1M3A und B erhalten, in denen das noch verbliebene wildtypische *TUP1*-Allel durch den *URA3*-Flipper ersetzt war (Abb. 20C, Spur 7 und 8). Die Kassette wurde erneut aus diesen Stämmen ausgeschnitten, um die Uridin-auxotrophen *tup1 Δ* -Mutanten WTUP1M4A und B (Abb. 20C, Spur 9 und 10) zu erzeugen. In diese Mutanten wurde anschließend wieder eine intakte Kopie des *TUP1*-Gens durch Transformation mit dem *XbaI*-*SacI*-Fragment aus dem Plasmid pTUP1K2 eingeführt (Park, 2002; Abb. 20B, oben), um die komplementierten Stämme WTUP1K1A und B (Abb. 20C, Spur 11 und 12) herzustellen. Als Kontrolle wurde der *URA3*-Marker ohne das *TUP1*-Gen auf identische Weise in die *tup1 Δ* -Mutanten integriert. Zu diesem Zweck wurde die *TUP1*

upstream-Region mit den Primern TUP7 und TUP2 amplifiziert, an den eingeführten *Xba*I- und *Bgl*III-Schnittstellen gespalten und vor die T_{ACT1} -Sequenz kloniert. Das *Xba*I-*Sac*I-Fragment aus dem so hergestellten Plasmid pTUP1M3 (Abb. 20B, unten) wurde für die Transformation der Stämme WTUP1M4A und B verwendet, wobei die Uridin-prototrophen *tup1* Δ -Mutanten WTUP1M5A und B (Abb. 20C, Spur 13 und 14) entstanden.

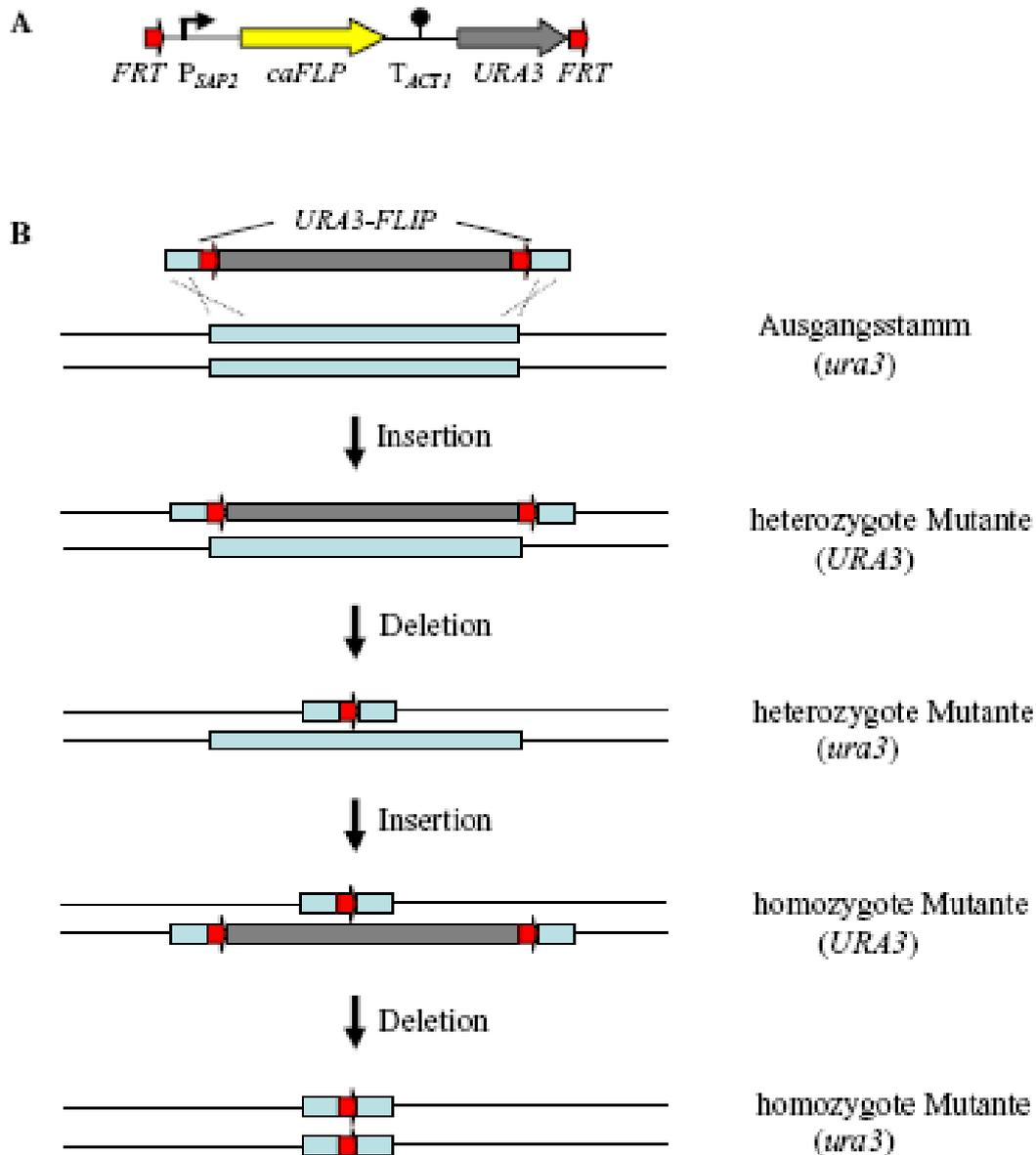


Abb. 19 Schema der sequenziellen Geninaktivierung in *C. albicans* durch die „*URA3*-Flipping“-Methode. **A:** Aufbau der *URA3*-Flipper-Kassette (*URA3-FLIP*). Das *caFLP*-Gen steht unter der Kontrolle des induzierbaren *SAP2*-Promotors (P_{SAP2} , abgewinkelter Pfeil) und ist mit der *ACT1*-Transkriptionsterminationssequenz (T_{ACT1} , schwarzer Kreis) fusioniert. Das *URA3*-Gen dient als Selektionsmarker bei der Herstellung der Mutanten. *FRT* (rote Pfeile) ist die 34 bp großen Erkennungssequenzen der FLP-Rekombinase. **B:** Schema der sequenziellen Geninaktivierung. Das Zielgen ist durch einen hellblauen Balken und die *URA3*-Flipperkassette durch den von roten Pfeilen flankierten grauen Balken dargestellt.

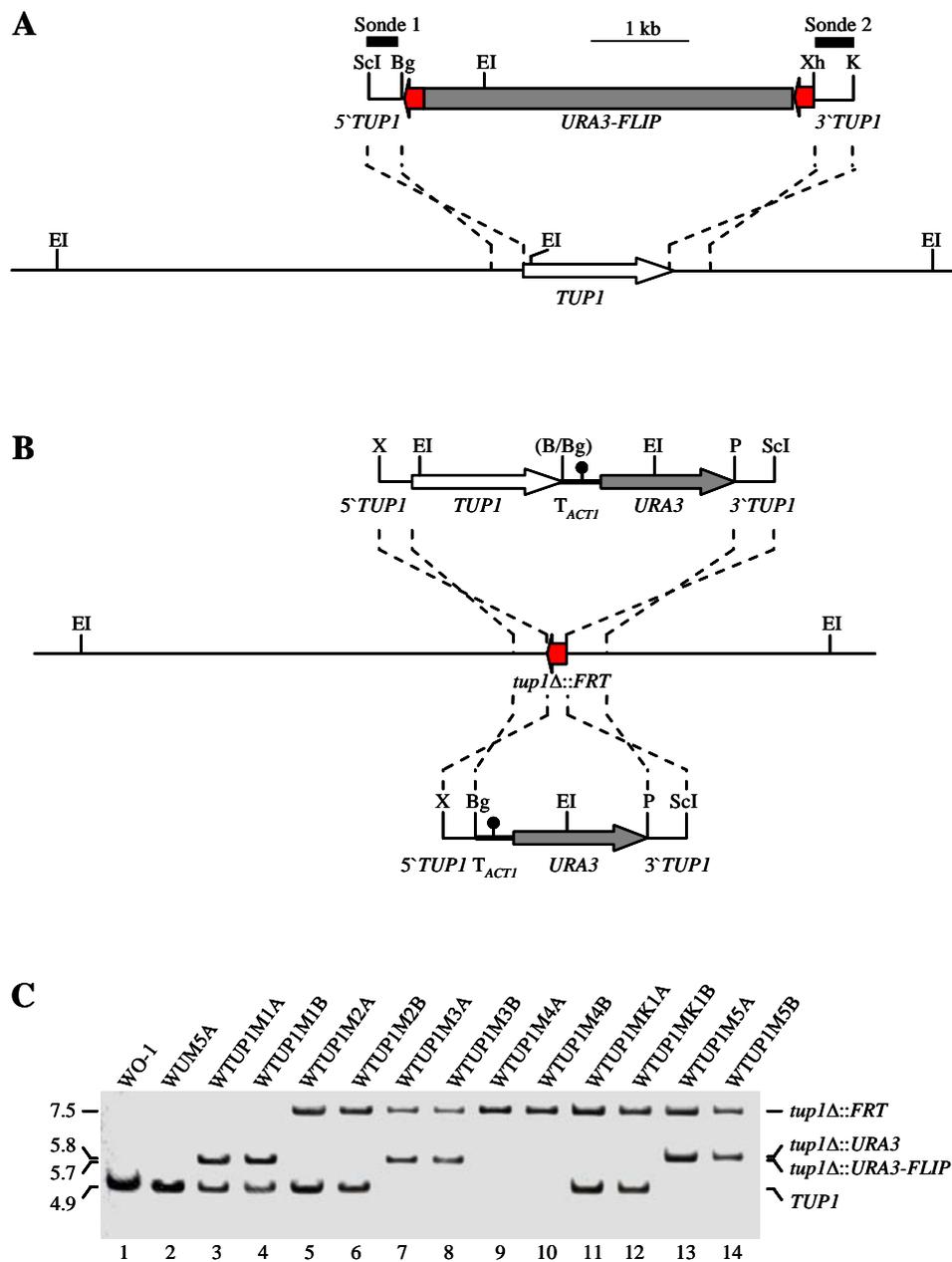


Abb. 20 Konstruktion der *tup1Δ*-Mutanten und der Komplementanten. **A:** Struktur der Deletionskassette aus dem Plasmid pTUP1M2 (oben) und genomische Struktur des *TUP1*-Lokus im Stamm WO-1 und dessen *ura3*-Derivat WUM5A (unten). Die codierende Region des *TUP1*-Gens ist durch den weißen Pfeil gekennzeichnet und die upstream- und downstream-Sequenzen durch die durchgezogenen Linien. Der von roten Pfeilen flankierte graue Balken repräsentiert die *URA3*-Flipper-Kassette (Details siehe Abb. 19A). Die Sonden, die für Southern-Hybridisierungsanalysen verwendet wurden, sind durch schwarze Balken dargestellt. **B:** Struktur der DNA-Fragmente aus pTUP1K1 (oben) bzw. pTUP1M3 (unten), die für die Reintegration einer intakten *TUP1*-Kopie (weißer Pfeil) bzw. nur des *URA3*-Markers (grauer Pfeil) in eines der inaktivierten *tup1Δ*-Allele (Mitte) verwendet wurden. Die *ACT1*-Transkriptionsterminationsequenz (T_{ACT1}) ist durch den schwarzen Kreis dargestellt. Relevante Schnittstellen, die zur Konstruktion der Plasmide und zum Ausschneiden der Kassetten verwendet wurden, sind angegeben: B, *Bam*HI; Bg, *Bgl*III; EI, *Eco*RI; K, *Kpn*I; P, *Pst*I; ScI, *Sac*I; X, *Xba*I; Xh, *Xho*I. In Klammern angegebene Schnittstellen wurden bei der Klonierung zerstört. **C:** Southern-Hybridisierung *Eco*RI-gespaltener genomischer DNA der Wildtypstämme WO-1 und WUM5A sowie der Mutanten mit der *TUP1*-spezifischen Sonde 1. Die Größe der hybridisierenden Fragmente (in kb) ist links angegeben und die Identität der Fragmente rechts.

4.2.2 Zell- und Koloniemorphologie der *tup1Δ*-Mutanten

Um die Auswirkung der *TUP1*-Deletion auf die Zell- und Kolonie-Morphologie des *MTLα*-Stammes WO-1 zu untersuchen, wurden die *tup1Δ*-Mutanten auf Lee's Agarplatten mit Phloxin B inkubiert.

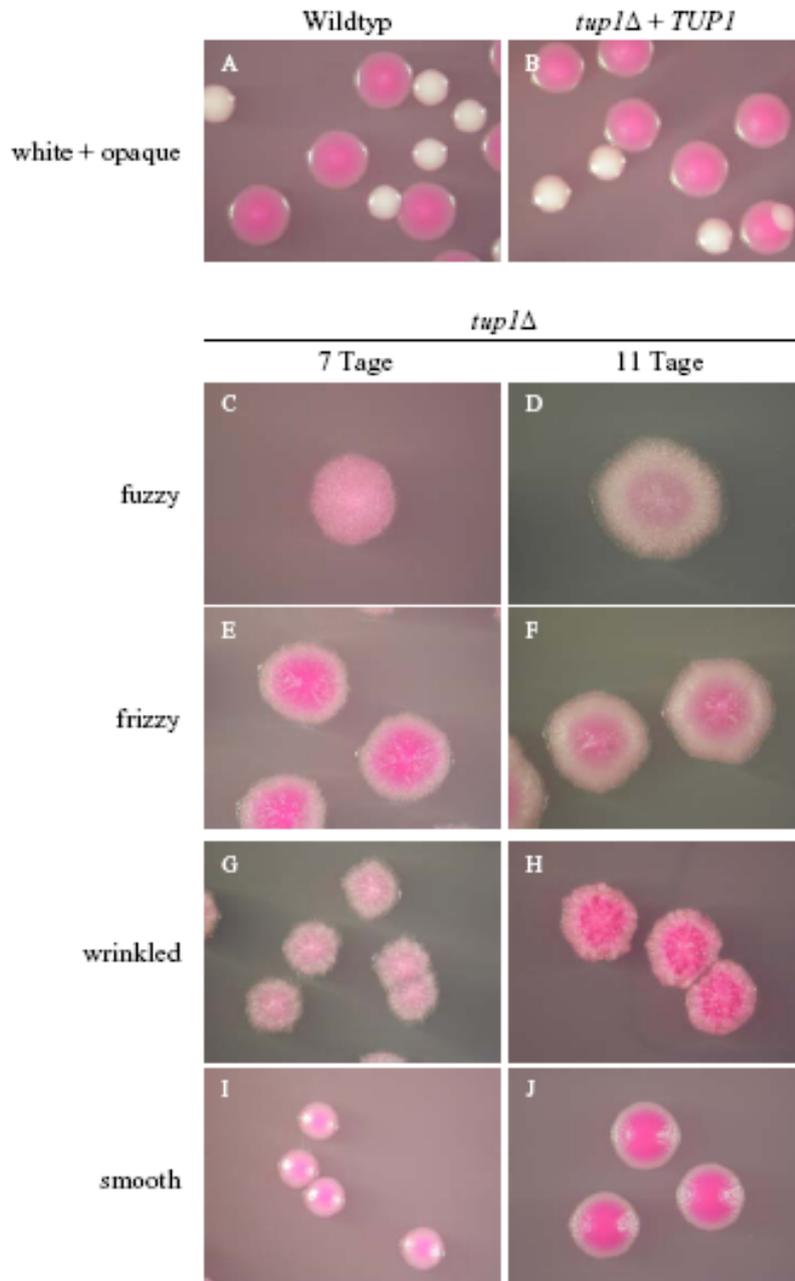


Abb. 21 Koloniephänotypen der *tup1Δ*-Mutanten. Eine Mischung von white- und opaque-Zellen des Wildtypstammes WUM5A (A) oder der komplementierten Stämme WTUP1K1A und B (B) und die vier unterschiedlichen Koloniephänotypen der *tup1Δ*-Mutanten WTUP1M4A und B, fuzzy (C und D), frizzy (E und F), wrinkled (G und H) und smooth (I und J), wurden auf Lee's Agarplatten mit Phloxin B ausplattiert und bei RT inkubiert. Die Photos wurden nach 7-tägiger Inkubation (A, B, C, E, G, I) und bei den *tup1Δ*-Mutanten auch nach 11 Tagen (D, F, H, J) aufgenommen. Die zwei unabhängig hergestellten Serien von *tup1Δ*-Mutanten und Komplementanten verhielten sich gleich und es ist nur jeweils eine gezeigt. Die Uridin-prototrophen *tup1Δ*-Mutanten WTUP1M5A und B wiesen die gleichen Phänotypen wie die Uridin-auxotrophen *tup1Δ*-Mutanten WTUP1M4A und B auf und sind ebenfalls nicht gezeigt.

Die heterozygoten *TUP1/tup1Δ*-Mutanten und die Komplementanten bildeten wie die wildtypischen Ausgangsstämme WO-1 und WUM5A halbkugelförmige white- und große, flache opaque-Kolonien (Abb. 21A und B bzw. Daten nicht gezeigt). Die mikroskopische Betrachtung von Zellen dieser Kolonien bestätigte, dass die Stämme die typische rundlich-ovale Hefemorphologie der white-Phase sowie die verlängerte Morphologie der opaque-Phase aufwiesen (Abb. 22I und J bzw. Daten nicht gezeigt). Im Gegensatz dazu bildeten die homozygoten *tup1Δ*-Mutanten keine typischen white- und opaque-Kolonien, sondern vier unterschiedliche andere Koloniephänotypen, die als fuzzy, frizzy, wrinkled und smooth bezeichnet wurden (Abb. 21C-J). Die fuzzy-Kolonien (Abb. 21C und D) zeigten eine stärkere Filamentierung als die frizzy-Kolonien (Abb. 21E und F) und bildeten dornartige Luftfilamente. Die wrinkled-Kolonien (Abb. 21G und H) waren kleiner als die fuzzy- und frizzy-Kolonien und hatten deutlich weniger Filamente. Die smooth-Kolonien (Abb. 21I und J) waren die kleinsten von allen vier Kolonietypen und hatten eine glatte Oberfläche. Diese Koloniephänotypen wurden in unabhängig konstruierten Uridin-auxotrophen (WTUP1M4A und B) und Uridin-prototrophen (WTUP1M5A und B) *tup1Δ*-Mutanten beobachtet.

Die mikroskopische Betrachtung von Zellen aus den vier Kolonievarianten der *tup1Δ*-Mutanten zeigte, dass die verschiedenen Kolonietypen aus morphologisch unterschiedlichen Zellen bestanden. Die Zellen aus den fuzzy-Kolonien bildeten lange Filamente mit parallelen Seiten und leichten Einschnürungen im Bereich der Septen (Abb. 22A und B). Die Zellen aus frizzy-Kolonien bestanden hauptsächlich aus Pseudohyphen, die im Vergleich zu den Zellen aus den anderen Kolonietypen eine erhöhte Verzweigung aufwiesen. Im Gegensatz zu der regelmäßigen Verzweigung normaler Pseudohyphen in der Nähe des Septums der Mutterzellen (Sudbery *et al.*, 2004) zeigten die Zellen der frizzy-Kolonien jedoch eine unregelmäßige Verzweigung auf verschiedenen Seiten der Mutterzellen (Abb. 22C und D). Die wrinkled-Kolonien enthielten aneinander gekettete Zellen, die etwas verlängert waren, ähnlich den Shmoo-förmigen Zellen (Abb. 22E und F). Die smooth-Kolonien zeichneten sich durch vergrößerte und oft verlängerte Hefe-ähnliche Zellen aus, deren Morphologie sich aber von der normaler white- oder opaque-Zellen unterschied (Abb. 22G und H). Aus diesen Beobachtungen konnte geschlossen werden, dass die verschiedenen Koloniephänotypen auf unterschiedliche Zellmorphologien der vier Varianten zurückzuführen sind, wobei die Länge der Zellen in der Reihenfolge fuzzy → frizzy → wrinkled → smooth abnimmt.

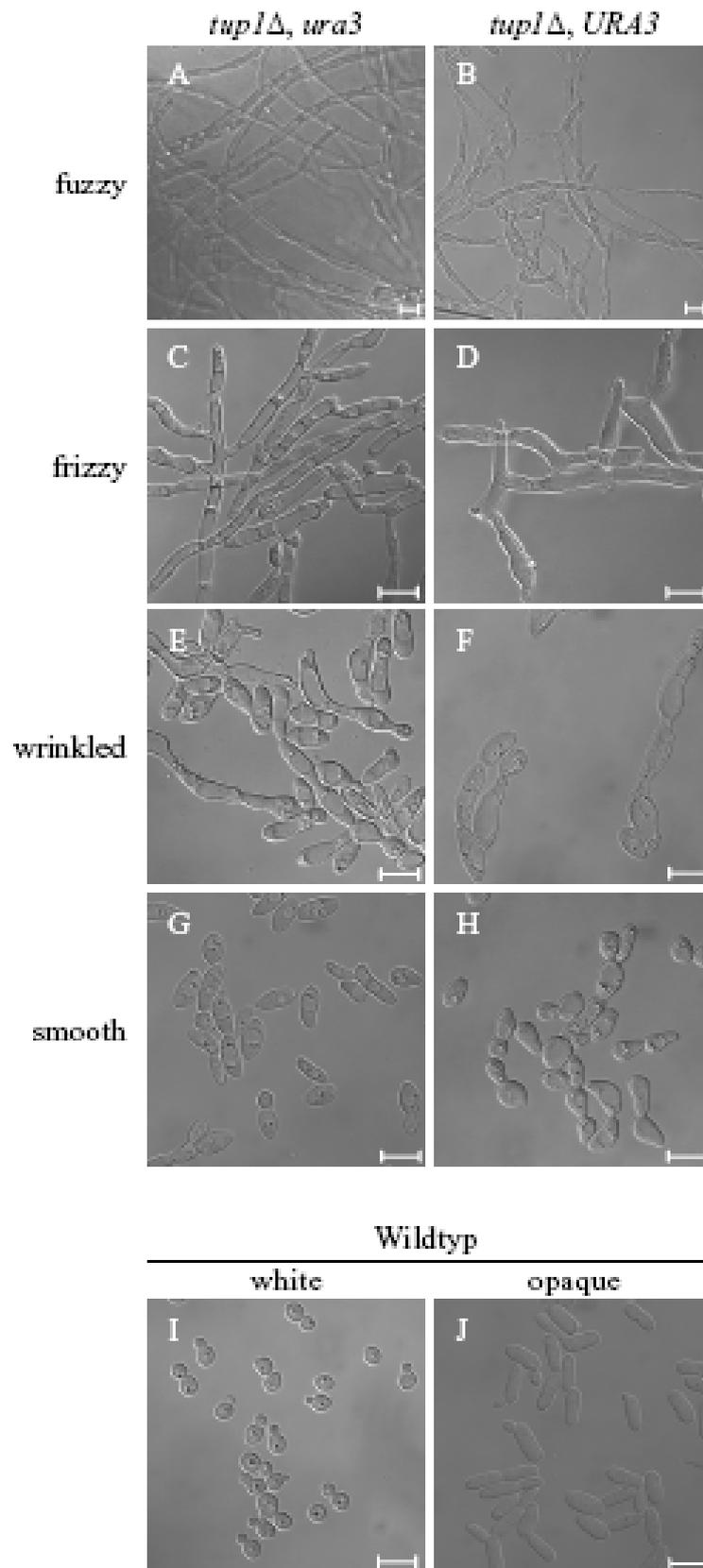


Abb. 22 Morphologie von Zellen aus den vier verschiedenen Kolonievarianten der *tup1Δ*-Mutanten WTUP1M4A und B (*ura3*, **A**, **C**, **E**, **G**) und WTUP1M5A und B (*URA3*, **B**, **D**, **F**, **H**). White- (**I**) und opaque-Zellen (**J**) des Wildtypstammes WUM5A sind zum Vergleich gezeigt. Die Zellen wurden aus Kolonien entnommen, die für 5 Tage bei RT auf Lee's Agarplatten mit Phloxin B inkubiert worden waren, und unter dem Mikroskop betrachtet. Die zwei unabhängig hergestellten Serien der *tup1Δ*-Mutanten verhielten sich identisch und nur eine ist gezeigt. Die Linien auf Bildern entsprechen jeweils 10 μ m.

4.2.3 Analyse des phänotypischen Switching

Im Gegensatz zu den in dieser Arbeit hergestellten *tup1Δ*-Mutanten des *MTLα*-Stammes WO-1 produzieren *tup1Δ*-Mutanten des *MTLα/α*-Stammes SC5314 nur eine Form und wachsen konstitutiv als Pseudohyphen (Braun and Johnson, 1997). Dieser Unterschied ließ vermuten, dass die *tup1Δ*-Mutanten des *MTLα*-Stammes WO-1 die Fähigkeit zum phänotypischen Switching beibehalten haben, obwohl sie keine normalen white- und opaque-Zellen mehr bilden konnten.

Tabelle 5 Switchingfrequenzen zwischen den vier unterschiedlichen Koloniephänotypen der *tup1Δ*-Mutanten

Stamm	Phänotyp der Ausgangskolonie	Zahl der Kolonien mit Phänotyp			
		fuzzy	frizzy	wrinkled	smooth
<i>ura3</i>					
WTUP1M4A	fuzzy	7917	9 (2) ^a	3 (5)	1
	frizzy	7 (5)	6738	11	1
	wrinkled	3 (6)	22 (7)	10831	7
	smooth	1	0 (2)	32 (2)	3450
WTUP1M4B	fuzzy	6273	12	1	1
	frizzy	8 (1)	11696	1 (1)	1
	wrinkled	1	23	6253	5
	smooth	8	6 (1)	3 (1)	13913
<i>URA3</i>					
WTUP1M5A	fuzzy	8372	3 (1)	2 (1)	1
	frizzy	1 (3)	3559	3	2
	wrinkled	1	8 (2)	21107	15 (1)
	smooth	1	6 (2)	31	13336
WTUP1M5B	fuzzy	9865	6 (2)	57	2
	frizzy	2	12172	6	15
	wrinkled	27	4 (1)	10223	12 (1)
	smooth	0 (5)	4 (1)	7 (6)	15781

^a Die Zahl in Klammern deutet auf die Zahl der Kolonien hin, die einen Sektor mit dem entsprechenden Phänotyp enthielten.

Um diese Hypothese zu testen, wurde untersucht, ob die *tup1Δ*-Mutanten reversibel von einem Koloniephänotyp zu den anderen drei Varianten switchen können. Zu diesem Zweck wurden die Zellen aus einzelnen Kolonien der verschiedenen Varianten suspendiert und in einer geeigneten Verdünnung auf Lee's Agarplatten ausplattiert. Nach sieben Tagen Inkubation bei RT wurde die Frequenz der aus diesen Zellen hervorgegangenen unterschiedlichen Koloniephänotypen ermittelt (siehe Methoden, Kapitel 3.8.2). Es zeigte sich, dass von jeder der vier Kolonievarianten alle drei anderen Koloniephänotypen gebildet werden konnten. Die Anzahl der jeweiligen Kolonietypen, die aus den unterschiedlichen Ausgangskolonien entstanden, ist in Tabelle 5 angegeben. Die zwei unabhängig hergestellten Serien der *tup1Δ*-Mutanten lieferten sowohl im *ura3*- als auch im *URA3*-Hintergrund vergleichbare Ergebnisse, und die durchschnittliche Switchingfrequenz ist in Abb. 23 zusammengefasst. Durch diese Versuche konnte nachgewiesen werden, dass die *tup1Δ*-Mutanten des Stammes WO-1 spontan und reversibel mit einer hohen Frequenz (ca. 10^{-3} bis 10^{-4}) zwischen den vier Phasenvarianten switchen können.

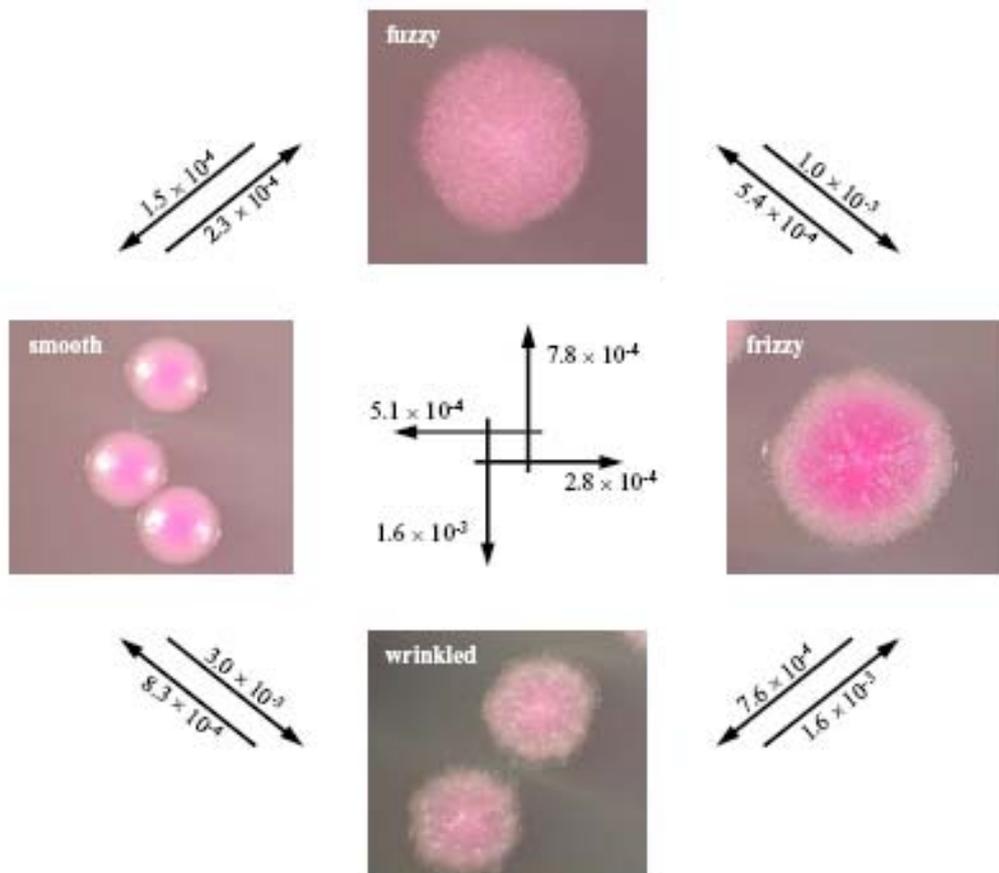


Abb. 23 Switchingfrequenzen zwischen den vier unterschiedlichen Koloniephänotypen der *tup1Δ*-Mutanten. Die Mittelwerte der Switchingfrequenzen der Stämme WTUP1M4A/B und WTUP1M5A/B, die in Tabelle 5 zu sehen sind, sind auf jedem Pfeil angegeben.

4.2.4 Analyse der Expression white- und opaque-spezifischer Gene

Da die *tup1Δ*-Mutanten des *MTLa/α*-Stammes SC5314 ausschließlich in einer filamentösen Form wachsen, schien es möglich, dass trotz der unterschiedlichen Zellmorphologien eine oder mehrere Phasenvarianten der *tup1Δ*-Mutanten des Stammes WO-1 der white- oder opaque-Phase entsprachen. Zur Klärung dieser Frage wurden Fusionen des *caGFP*-Reportergens mit den Promotoren des white-spezifischen *WH11*-Gens und der opaque-spezifischen *OP4*- und *SAPI*-Gene in das Genom der Stämme WTUP1M4A und B integriert, wodurch die Reporterstämme WTGW11A und B (P_{WH11} -*caGFP*) (Abb. 24B), WTGO4A und B (P_{OP4} -*caGFP*) (Abb. 25B) und WTGS1A und B (P_{SAPI} -*caGFP*) (Abb. 26B) entstanden. Die Plasmide pGFP68, pGFP70 und pGFP61, die für die Herstellung der Reporterstämme verwendet wurden, sind in Abb. 24A, Abb. 25A und Abb. 26A dargestellt.

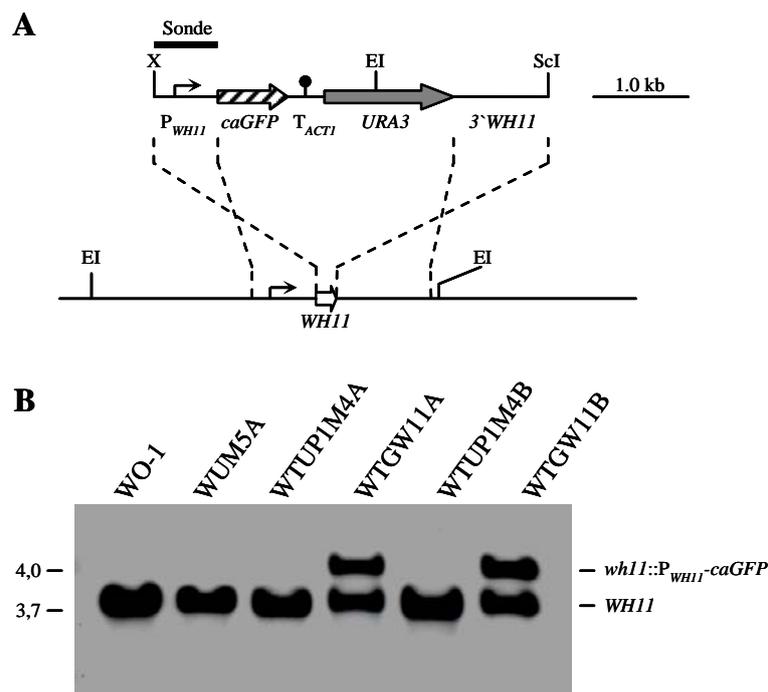


Abb. 24 Integration der P_{WH11} -*caGFP*-Reportergenfusion in eines der *WH11*-Allele der *tup1Δ*-Mutanten. **A:** Struktur der P_{WH11} -*caGFP*-Reportergenfusion aus dem Plasmid pGFP68 (oben) und genomische Struktur des *WH11*-Lokus im Stamm WO-1 und dessen Derivaten (unten). Die Sonde, die zum Nachweis der korrekten Integration durch Southern-Hybridisierung verwendet wurde, ist durch den schwarzen Balken dargestellt. Der weiße Pfeil stellt die codierende Region des *WH11*-Gens dar und die durchgezogenen Linien die upstream- und downstream-Regionen. Der *WH11*-Promotor (P_{WH11}) ist durch den abgewinkelten Pfeil symbolisiert und die *ACT1*-Transkriptionsterminationssequenz (T_{ACT1}) durch den schwarzen Kreis. Relevante Schnittstellen: EI, *EcoRI*; ScI, *SacI*; X, *XbaI*. **B:** Southern-Hybridisierung *EcoRI*-gespaltener chromosomaler DNA der Ausgangs- und Reporterstämme mit der *WH11*-spezifischen Sonde. Die Größe der hybridisierenden DNA-Fragmente (in kb) ist links angegeben und die jeweilige Identität rechts.

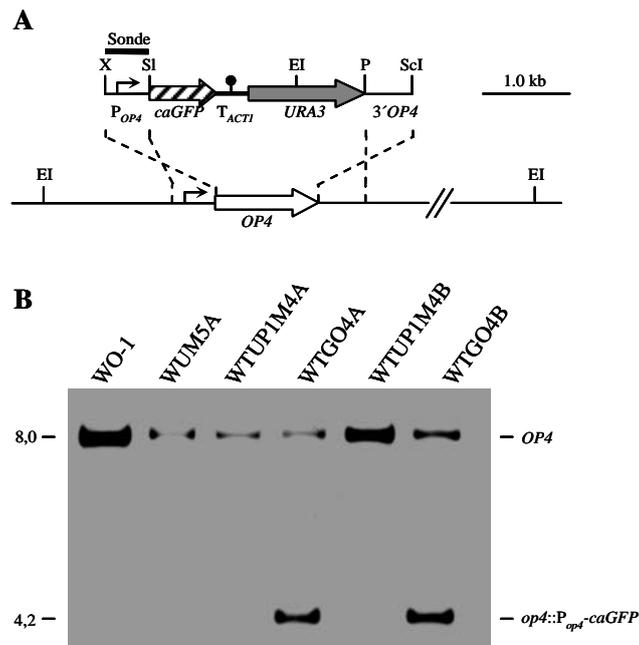


Abb. 25 Integration der P_{OP4} - $caGFP$ -Reportergenfusion in eines der $OP4$ -Allele der $tup1\Delta$ -Mutanten. **A:** Struktur der P_{OP4} - $caGFP$ -Reportergenfusion aus dem Plasmid pGFP70 (oben) und genomische Struktur des $OP4$ -Lokus im Stamm WO-1 und dessen Derivaten (unten). Die Sonde, die zum Nachweis der korrekten Integration durch Southern-Hybridisierung verwendet wurde, ist durch den schwarzen Balken dargestellt. Der weiße Pfeil stellt die codierende Region des $OP4$ -Gens dar und die durchgezogenen Linien die upstream- und downstream-Regionen. Der $OP4$ -Promotor (P_{OP4}) ist durch den abgewinkelten Pfeil symbolisiert. Relevante Schnittstellen: EI, *EcoRI*; P, *PstI*; ScI, *SacI*; SI, *Sall*; X, *XbaI*. **B:** Southern-Hybridisierung *EcoRI*-gespaltener chromosomaler DNA der Ausgangs- und Reporterstämme mit der $OP4$ -spezifischen Sonde. Die Größe der hybridisierenden DNA-Fragmente (in kb) ist links angegeben und die jeweilige Identität rechts.

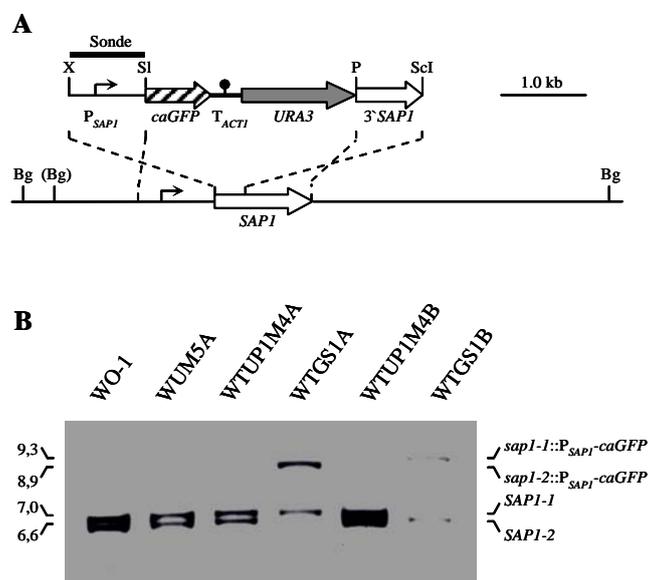


Abb. 26 Integration der P_{SAP1} - $caGFP$ -Reportergenfusion in eines der $SAP1$ -Allele der $tup1\Delta$ -Mutanten. **A:** Struktur der P_{SAP1} - $caGFP$ -Reportergenfusion aus dem Plasmid pGFP61 (oben) und genomische Struktur des $SAP1$ -Lokus im Stamm WO-1 und dessen Derivaten (unten). Die codierende Region des $SAP1$ -Gens ist durch den weißen Pfeil dargestellt und die upstream- und downstream-Regionen durch die durchgezogenen Linien. Die Sonde, die zum Nachweis der korrekten Integration durch Southern-Hybridisierung verwendet wurde, ist durch den schwarzen Balken dargestellt. Der $SAP1$ -Promotor (P_{SAP1}) ist durch den abgewinkelten Pfeil symbolisiert. Relevante Schnittstellen: Bg, *BglII*; P, *PstI*; ScI, *SacI*; SI, *Sall*; X, *XbaI*. Die in Klammern gezeigte *BglII*-Site fehlt im $SAP1-1$ Allel. **B:** Southern-Hybridisierung *BglII*-gespaltener chromosomaler DNA der Ausgangs- und Reporterstämme mit der $SAP1$ -spezifischen Sonde. Die Größe der hybridisierenden DNA-Fragmente (in kb) ist links angegeben und die jeweilige Identität rechts.

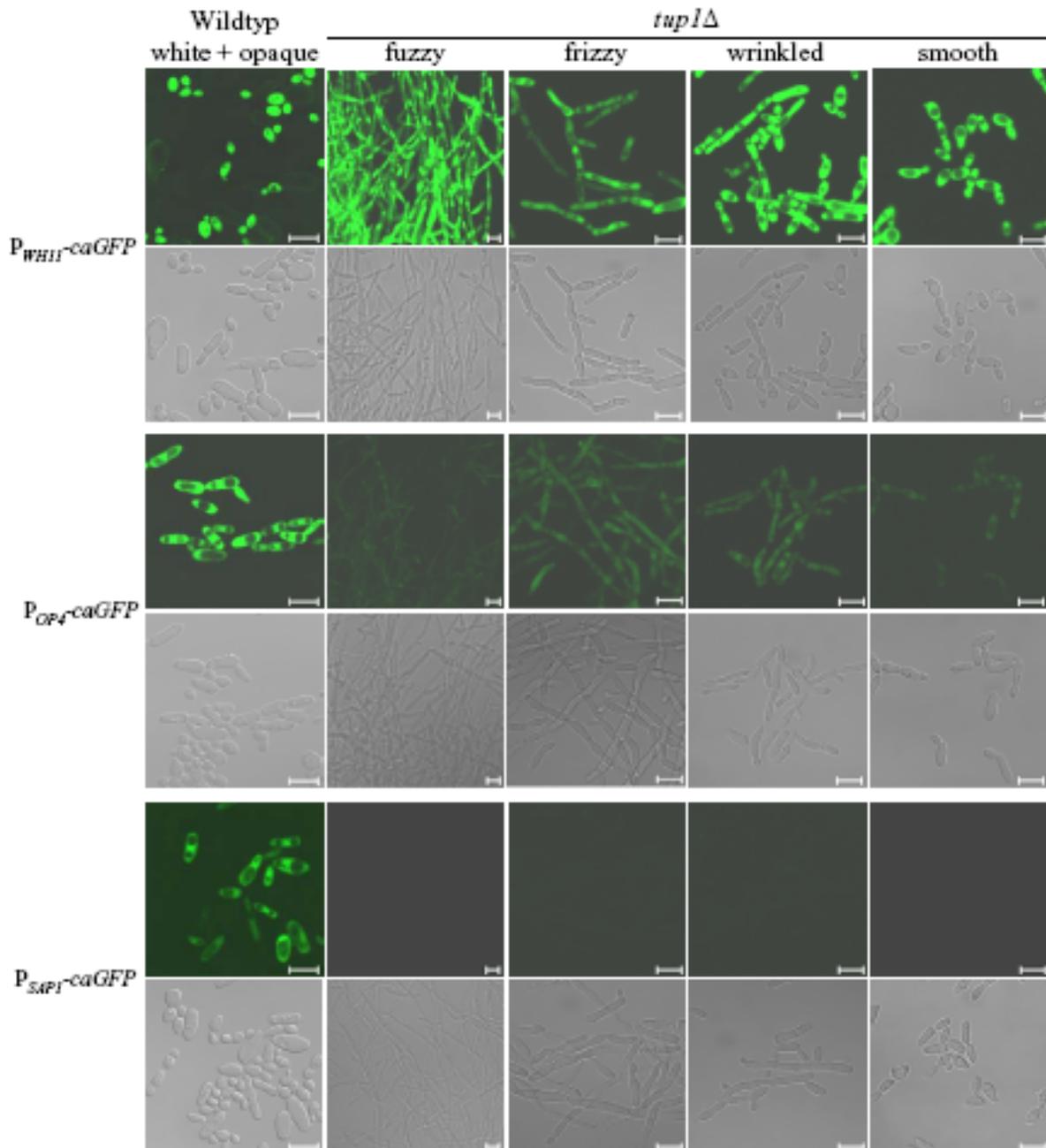


Abb. 27 Expression des white-phasenspezifischen Gens *WH11* und der opaque-phasenspezifischen Gene *OP4* und *SAP1* in den vier Phasenvarianten der *tup1Δ*-Mutanten. Zellen aus den vier Koloniephänotypen der *tup1Δ*-Mutanten mit der P_{WH11} -caGFP- (WTGW11A und B), P_{OP4} -caGFP- (WTGO4A und B) und P_{SAP1} -caGFP-Reportergenfusion (WTGS1A und B) wurden über Nacht in flüssigem Lee's Medium inkubiert und die GFP-Expression wurde unter dem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop beobachtet. White- und opaque-Zellen der Stämme WUGW11A (P_{WH11} -caGFP), WUGO4A (P_{OP4} -caGFP) und WUGS1A (P_{SAP1} -caGFP), die dieselben Reporterfusionen im wildtypischen Hintergrund tragen, wurden als Kontrolle verwendet und zur besseren Illustration der phasenspezifischen Genexpression vermischt. Die Bilder zeigen jeweils zugehörige Transmissions- und Fluoreszenz-mikroskopische Aufnahmen. Die beiden unabhängig konstruierten Reporterstämme verhielten sich gleich und nur einer ist jeweils gezeigt. Die Linien auf den Bildern entsprechen 10 μ m.

Die Reporterstämme produzierten die gleichen vier Koloniephänotypen wie deren Ausgangsstämme WTUP1M4A und B. Die Zellen aus jeder Kolonievariante der Reporterstämme wurden über Nacht in flüssigem Lee's Medium bei 25°C inkubiert und unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Als Kontrollen wurden white- und opaque-Zellen von Reporterstämmen verwendet, die durch Integration derselben Reporterfusionen in den wildtypischen Ausgangsstamm WUM5A hergestellt wurden (Strauß *et al.*, 2001, und unpublizierte Ergebnisse). Wie in Abb. 27 zu sehen ist, war der *WH11*-Promotor in allen vier phänotypischen Varianten der *tup1Δ*-Mutanten stark aktiviert, während der *SAP1*-Promotor in keiner der Varianten detektierbar induziert wurde. Die *tup1Δ*-Mutanten mit der P_{OP4} -*caGFP*-Fusion zeigten eine schwache Fluoreszenz in allen vier Phänotypen, was auf eine schwache Aktivierung des *OP4*-Gens hinweist.

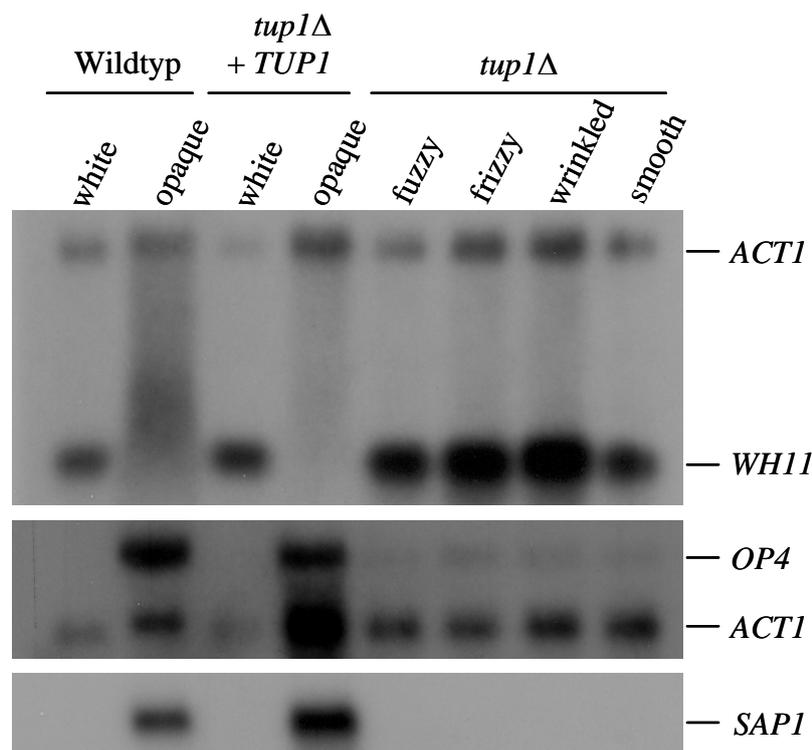


Abb. 28 Analyse der Expression des white-phasenspezifischen Gens *WH11* und der opaque-phasenspezifischen Gene *OP4* und *SAP1* in den vier Phasenvarianten der *tup1Δ*-Mutanten sowie in white- und opaque-Zellen von Kontrollstämmen durch Northern-Hybridisierung. White- und opaque-Zellen des Wildtypstammes WO-1 und der komplementierten Stämme WTUP1MK1A und B sowie der *tup1Δ*-Mutanten WTUP1M5A und B wurden bis zur Log-Phase in flüssigem Lee's Medium inkubiert und die Expression der phasenspezifischen Gene wurde durch Northern-Hybridisierung mit einer *WH11*-*ACT1*-Hybridsonde aus dem Plasmid pWH11N, einer *OP4*-*ACT1*-Hybridsonde aus dem Plasmid pOP4N und mit einer *SAP1*-spezifischen Sonde aus dem Plasmid pSAP1ex4 detektiert. Die Identität der mRNAs ist auf der rechten Seite des Blotbildes angezeigt; das *ACT1*-Transkript diente als eine interne Kontrolle. Nur eine der zwei unabhängig hergestellten Serien von Mutanten und komplementierten Stämmen ist jeweils gezeigt.

Das Expressionsmuster von white- und opaque-spezifischen Genen in den *tup1Δ*-Mutanten, das mit Hilfe des *caGFP*-Reportergens auf Einzelzellebene detektiert werden konnte, wurde zusätzlich durch Northern-Hybridisierungen mit entsprechenden Gen-spezifischen Sonden in Populationen der jeweiligen Phasenvarianten bestätigt (Abb. 28). Das *WH11*-Gen wurde in allen vier Phasenvarianten der *tup1Δ*-Mutanten konstitutiv exprimiert und die *OP4*-mRNA wurde ebenfalls, allerdings auf niedrigerem Niveau, in allen vier Phänotypen detektiert, während die Transkription des *SAP1*-Gens in den *tup1Δ*-Mutanten nicht nachweisbar war. Die normale phasenspezifische Genexpression dieser drei Gene wurde nach Reinsertion einer funktionellen Kopie des *TUPI*-Gens in die *tup1Δ*-Mutanten wiederhergestellt.

Das Expressionsmuster der phasenspezifischen Gene in *tup1Δ*-Mutanten entsprach weder dem von white- noch dem von opaque-Zellen und lieferte daher keinen Hinweis auf eine mögliche Beziehung zwischen den vier Kolonievarianten der *tup1Δ*-Mutanten und white- oder opaque-Zellen des Wildtyps. Überraschend war, dass das *WH11*-Gen in filamentösen Zellformen der *tup1Δ*-Mutanten stark exprimiert wurde, obwohl aus vorherigen Studien von Srikantha *et al.* bekannt war, dass die Expression des *WH11*-Gens in Hyphenzellen des *MTLα*-Stammes WO-1 nicht detektierbar ist (Srikantha *et al.*, 1997; Srikantha *et al.*, 2000). Dies wurde auch in dieser Arbeit nach Induktion des Hyphenwachstums in white-Zellen der Stämme WUGW11A und B, welche die *P_{WH11}-caGFP*-Fusion im Genom tragen, in RPMI-Medium mit 10% FCS bei 37°C bestätigt, da unter diesen Bedingungen keine Fluoreszenz der Zellen zu beobachten war (Daten nicht gezeigt). Dieses Ergebnis wies darauf hin, dass sich die filamentösen Zellen der *tup1Δ*-Mutanten auch von normalen Hyphen oder Pseudohyphen unterscheiden.

4.2.5 Analyse des Paarungsverhaltens der *tup1Δ*-Mutanten

Eine wichtige Eigenschaft von opaque-Zellen ist ihre Fähigkeit, sich mit opaque-Zellen des alternativen Paarungstyps zu paaren. Da die *tup1Δ*-Mutanten des *MTLα*-Stammes WO-1 zwar keine opaque-Zellen bildeten, aber immer noch reversibel zwischen verschiedenen Formen switchen konnten, wurde untersucht, ob eine der Phasenvarianten die Fähigkeit zum Mating mit opaque-Zellen eines *MTLa*-Stammes besaß. Da die *tup1Δ*-Mutanten WTUP1M4A und B Uridin-auxotrophe Stämme sind, wurde die Matinganalyse mit Adenin-auxotrophen *MTLa*-Partnerstämmen durchgeführt, was die Selektion von prototrophen Matingprodukten erlaubte. In einem anderen Projekt dieser Arbeit (siehe Kapitel 4.3.2.7, Abb. 45) wurde der Versuch unternommen, das *MTLα2*-Gen in dem *ade2*- und *ura3*-auxotrophen Stamm CAI8 (Fonzi and Irwin, 1993) zu inaktivieren. Dabei stellte sich aber heraus, dass der *MTLα*-Lokus in unserer

Kopie des Stammes CAI8 verloren gegangen war und der *URA3*-Selektionsmarker in allen Transformanten ektopisch inseriert war. Zwei dieser Transformanten, die Stämme CMTL α M1A und B, wurden aufbewahrt und nach Switching in die opaque-Phase als *ade2*-auxotrophe *MTLa*-Matingpartner verwendet. Diese Stämme konnten mit sich opaque-Zellen des *ura3 MTL α* -Kontrollstammes WUM5A mit hoher Frequenz paaren (Tabelle 6) und erwiesen sich somit als geeignete Teststämme für Matingexperimente.

Tabelle 6 Matingfrequenz der vier verschiedenen Phasenvarianten der *tup1 Δ* -Mutanten.

<i>MTLα</i> -Stamm und Kolonienphänotyp	Matingfrequenz mit opaque-Zellen des <i>MTLa</i> -Stammes ^a					
	CMTL α M1A			CMTL α M1B		
	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3
WTUP1M4A						
fuzzy	1.9 x 10 ⁻⁴	1.3 x 10 ⁻³	7.3 x 10 ⁻³	3.8 x 10 ⁻³	1.0 x 10 ⁻³	2.0 x 10 ⁻⁴
frizzy	5.8 x 10 ⁻³	2.3 x 10 ⁻²	1.0 x 10 ⁻³	7.6 x 10 ⁻³	7.3 x 10 ⁻³	5.8 x 10 ⁻³
wrinkled	2.3 x 10 ⁻²	1.1 x 10 ⁻²	2.2 x 10 ⁻²	1.2 x 10 ⁻²	2.0 x 10 ⁻⁴	3.7 x 10 ⁻³
smooth	< 10 ⁻⁸	< 10 ⁻⁹	< 10 ⁻⁸	1.2 x 10 ⁻⁶	1.7 x 10 ⁻⁸	< 10 ⁻⁹
WTUP1M4B						
fuzzy	6.2 x 10 ⁻⁵	1.3 x 10 ⁻³	6.4 x 10 ⁻⁴	2.4 x 10 ⁻³	1.8 x 10 ⁻³	4.9 x 10 ⁻⁴
frizzy	1.7 x 10 ⁻²	2.6 x 10 ⁻⁵	1.6 x 10 ⁻²	1.0 x 10 ⁻⁴	3.3 x 10 ⁻³	1.3 x 10 ⁻²
wrinkled	4.0 x 10 ⁻⁴	1.3 x 10 ⁻⁵	1.3 x 10 ⁻⁴	2.2 x 10 ⁻³	1.0 x 10 ⁻⁴	8.6 x 10 ⁻⁵
smooth	6.2 x 10 ⁻⁶	< 10 ⁻¹⁰	< 10 ⁻⁸	< 10 ⁻⁹	1.5 x 10 ⁻⁸	4.9 x 10 ⁻⁸
WUM5A opaque (Kontrolle)	5.9 x 10 ⁻²	1.4 x 10 ⁻¹	7.0 x 10 ⁻³	2.5 x 10 ⁻¹	4.1 x 10 ⁻¹	1.2 x 10 ⁻²

^a Matingtests mit allen Kombinationen der Stämme und Phasenvarianten wurden dreimal durchgeführt (Exp. 1-3)

Bei Matingexperimenten mit den fuzzy-, frizzy- und wrinkled-Phasenvarianten der *tup1 Δ* -Mutanten waren die Frequenzen der prototrophen Matingprodukte zwar niedriger als die Kontrollmatingfrequenz, aber alle drei Varianten konnten sich effizient mit opaque-Zellen der *MTLa*-Teststämme paaren (Tabelle 6). Im Gegensatz dazu wurden keine oder nur sehr wenig prototrophe Matingprodukte nach dem Mating mit der smooth-Phasenvariante der *tup1 Δ* -Mutanten erhalten. Die wenigen Matingprodukte stammten in diesem Fall vermutlich von Zellen, die von der smooth-Form zu einer der anderen drei Phänotypvarianten gewechselt waren. Diese Ergebnisse zeigten, dass die *tup1 Δ* -Mutanten des *MTL α* -Stammes WO-1 trotz

ihrer Unfähigkeit opaque-Zellen zu bilden immer noch reversibel von einer Mating-inkompetenten Phase (smooth) zu Mating-kompetenten Varianten (fuzzy, frizzy und wrinkled) switchen können. Bei Matingexperimenten mit opaque-Zellen eines Adenin-auxotrophen Stammes desselben Paarungstyps (CHY247 α , (Miller and Johnson, 2002)) wurde kein Mating beobachtet (Daten nicht gezeigt), wodurch bestätigt wurde, dass die Mating-kompetenten Varianten der *tup1* Δ -Mutanten, ebenso wie opaque-Zellen des Wildtyps, sich nur mit opaque-Zellen des alternativen Paarungstyps paaren.

Die Zellen wurden während des Matings verschiedener Kombinationen von **a**- und α -Stämmen auch mikroskopisch betrachtet, um zu sehen, ob die typischen Shmoozellen oder Zygoten mit ihrer charakteristischen Morphologie (Lockhart *et al.*, 2003) zu finden waren. Obwohl die Bildung von Zellaggregaten aus filamentösen und opaque-Zellen diese Untersuchungen erschwerte, konnten Shmoos beobachtet werden, die mit höchster Wahrscheinlichkeit von den *MTLa*-opaque-Zellen stammten und die nur in den Paarungen von *MTLa*-opaque-Zellen mit einem der drei filamentösen Phänotypen, nicht aber mit der smooth-Variante der *tup1* Δ -Mutanten auftraten. Die Fähigkeit, das Shmooring in opaque-Zellen des alternativen Paarungstyps zu induzieren, war ebenfalls ein Hinweis auf die Mating-Kompetenz der filamentösen Zellen der *tup1* Δ -Mutanten.

Da alle Mating-kompetenten Formen der *tup1* Δ -Mutanten filamentöses Wachstum zeigten, wurde getestet, ob auch normale Hyphen von *MTLa*- oder *MTL* α -Stämmen Mating-kompetent sind. Hyphenzellen, die aus white-Zellen der *MTLa*- und *MTL* α -Wildtypstämme in RPMI mit 10% FCS induziert wurden, konnten sich jedoch nicht miteinander paaren und es entstanden auch nur wenig Matingprodukte nach dem Mating der Hyphenzellen mit opaque-Zellen des alternativen Paarungstyps (die Matingfrequenz war niedriger als 10^{-7}). Darüber hinaus resultierten auch aus der Inkubation von Hyphenzellen eines *MTLa*-Stammes mit den vier Phänotypvarianten der *tup1* Δ -Mutanten nur wenige Matingprodukte (die Matingfrequenz war niedriger als 10^{-8}). Diese Ergebnisse zeigten, dass normale Hyphenzellen der *MTLa*- und *MTL* α -Wildtypstämme nicht zum Mating befähigt sind und die fuzzy-, frizzy- und wrinkled-Phasenvarianten der *tup1* Δ -Mutanten andere, Mating-kompetente Formen repräsentieren.

4.2.6 Genetische Analyse der Matingprodukte

Matingprodukte aus *MTL* α - und *MTLa*-Wildtypstämmen sind normalerweise tetraploid, können aber Chromosomen offensichtlich nach dem Zufallsprinzip verlieren und in den diploiden Zustand zurückkehren (Hull *et al.*, 2000; Magee and Magee, 2000; Miller and Johnson, 2002; Bennett and Johnson, 2003). Die meisten Matingprodukte der *tup1* Δ -

Mutanten und deren Matingpartner bildeten glatte Kolonien, aber eine Minderheit (ca. 1%) bildete auch einen filamentösen Koloniephänotyp. Um zu testen, ob die Matingprodukte Allele aus beiden Elternstämmen enthielten, wurden 108 willkürlich selektierte Matingprodukte aus verschiedenen Matingkombinationen - acht aus der Kombination WUM5A x CMTL α 2M1A oder B, 44 aus WTUP1M4A x CMTL α 2M1A oder B, 50 aus WTUP1M4B x CMTL α 2M1A oder B, und sechs filamentöse Matingprodukte aus WTUP1M4A oder B x CMTL α 2M1A oder B - durch Southern-Hybridisierung mit einer *TUP1*-spezifischen Sonde analysiert.

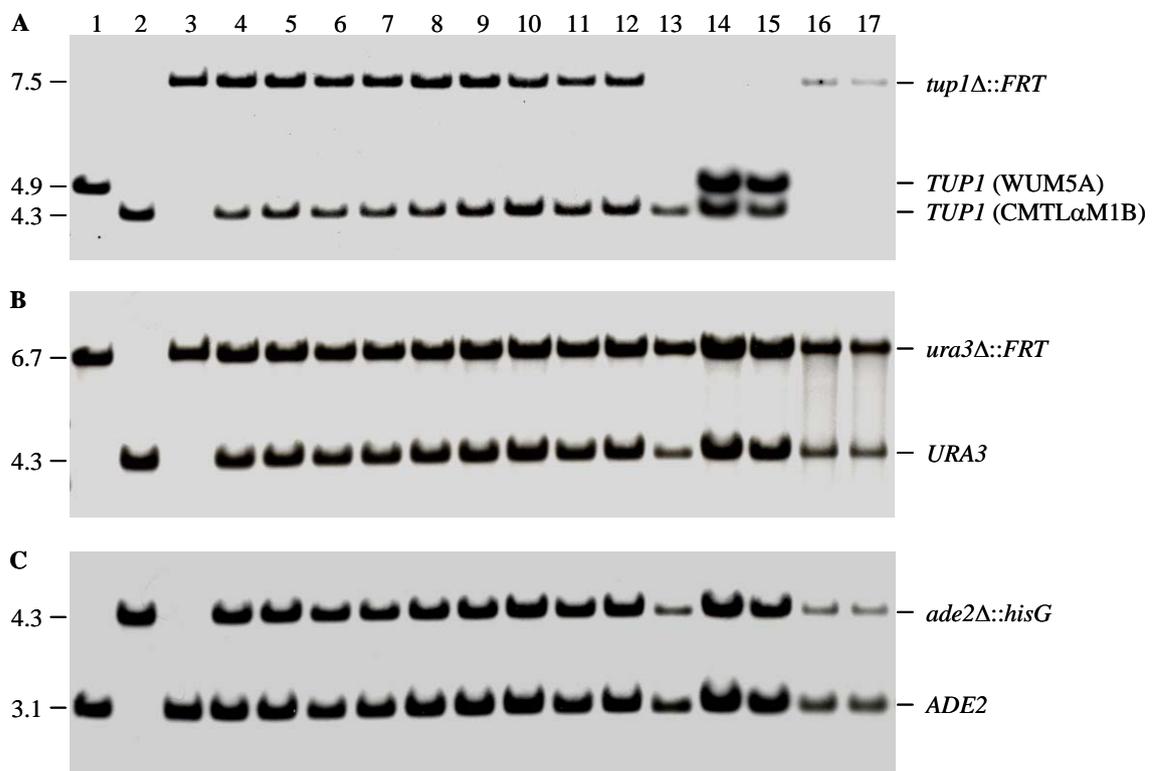


Abb. 29 Southern-Hybridisierungsanalyse der rekombinanten Matingprodukte. *EcoRI*-verdaute genomische DNA der Ausgangsstämme und der prototrophen Matingprodukte wurde mit *TUP1*- (A), *URA3*- (B) und *ADE2*-spezifischen (C) Sonden hybridisiert. Die Spuren 1-3 zeigen die Hybridisierungsmuster der Ausgangsstämme, die für die Matingexperimente verwendet wurden: 1, WUM5A (*MTL α* , *TUP1*, *ADE2*, *ura3*); 2, CMTL α M1B (*MTL α* , *TUP1*, *ade2*, *URA3*); 3, WTUP1M4 (*MTL α* , *tup1*, *ADE2*, *ura3*). Die Spuren 4-13 zeigen zufällig ausgewählte Matingprodukte aus der Kombination CMTL α M1B und WTUP1M4 in der fuzzy-Form (4-6), der frizzy-Form (7-9) bzw. der wrinkled-Form (10-12), die *TUP1/tup1*, *ADE2/ade2*, und *URA3/ura3* Allele von den Elternstämmen enthalten. Spur 13 zeigt ein Matingprodukt, das nur die *TUP1*-Wildtypallele aus dem Stamm CMTL α M1B, aber die *ADE2/ade2* und *URA3/ura3* Allele aus beiden Elternstämmen enthält. Im Gegensatz dazu zeigen Spur 16 und 17 Matingprodukte, die den filamentösen Koloniephänotyp produzierten und nur die mutierten *tup1 Δ* -Allele aus dem Stamm WTUP1M4B, aber die *ADE2/ade2* und *URA3/ura3* Allele aus beiden Elternstämmen enthielten. Spur 14 und 15 zeigen rekombinante Produkte zwischen den Kontrollstämmen CMTL α M1B und WUM5A in der opaque-Form. Die *TUP1*-Wildtypallele der zwei Elternstämmen konnten anhand eines *EcoRI*-Restriktionspolymorphismus unterschieden werden. Die Größe der hybridisierenden DNA-Fragmente (in kb) ist links angegeben und die jeweilige Identität rechts.

Die Matingprodukte wurden zunächst von den Selektionsplatten auf SD-Agarplatten ohne Adenin und Uridin ausgestrichen, um einzelne Kolonien zu gewinnen, bevor die genomische DNA isoliert wurde. Alle acht Matingprodukte der wildtypischen Kontrollstämme enthielten *TUP1*-Allele aus beiden Elternstämmen, die durch einen *EcoRI*-Restriktionspolymorphismus unterschieden werden konnten. Zwei Beispiele sind in Abb. 29A, Spur 14 und 15, gezeigt; die zugehörigen Ausgangsstämme sind in Spur 1 und 2 zu sehen. Von 94 Matingprodukten der *tup1Δ*-Mutanten und CMTL α 2M1A oder B, die glatte Kolonien bildeten, hatten 93 sowohl wildtypische als auch mutierte *TUP1*-Allele (Beispiele sind in Abb. 29A, Spuren 4-12, gezeigt). Ein Matingprodukt zeigte nur ein hybridisierendes Fragment, das dem wildtypischen *TUP1*-Allel des *MTL α* -Elternteils entsprach (Abb. 29A, Spur 13). Umgekehrt hatten sechs Matingprodukte mit dem filamentösen Koloniephänotyp nur die mutierten *tup1*-Allele, aber kein *TUP1*-Wildtypallel (zwei Beispiele sind in Abb. 29A, Spuren 16 und 17, gezeigt). Die Stämme, die die *TUP1*- oder *tup1*-Allele von nur einem Elternstamm aufwiesen, enthielten jedoch die *ADE2*- und *ade2*- sowie die *URA3*- und *ura3*-Allele aus beiden Elternstämmen, wie durch Hybridisierung mit entsprechenden Sonden nachgewiesen wurde (Abb. 29B und C, Spuren 13, 16 und 17). Diese Ergebnisse zeigten, dass aus dem Mating zwischen den *MTL α* -*tup1Δ*-Mutanten und einem *MTL α* -Matingpartner rekombinante Nachkommen entstanden, die spezifische Allele aus beiden Elternstämmen enthalten.

4.3 Funktionelle Analyse der phasenspezifischen Gene *WH11* und *OP4*

Phasenspezifisch exprimierte Gene könnten wichtig für den spezifischen Phänotyp von white- und opaque-Zellen sein oder auch eine Funktion bei der Induktion bzw. Repression des Switchings zwischen den beiden Phasen haben. Das white-spezifische Gen *WH11* und das opaque-spezifische Gen *OP4* gehören zu den ersten identifizierten phasenspezifisch exprimierten Genen; ihre Funktion konnte bisher jedoch noch nicht aufgeklärt werden. Um die Rolle dieser Gene beim white-opaque-Switching zu analysieren, wurden deshalb in dieser Arbeit *wh11Δ*- und *op4Δ*-Mutanten des Stammes WO-1 hergestellt und phänotypisch charakterisiert.

4.3.1 Funktionelle Analyse des *WH11*-Gens

4.3.1.1 Konstruktion von *wh11Δ*-Mutanten des *C. albicans*-Stammes WO-1

Zur Inaktivierung des *WH11*-Gens wurde ein Deletionskonstrukt verwendet, das von Anja Strauß aus unserer Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt wurde und in dem die codierende Region des *WH11*-Gens durch die *URA3*-Flipper-Kassette ersetzt ist (Abb. 30A). Der *ura3*-auxotrophe Stamm WUM5A wurde mit dem *SacI*-*KpnI*-Fragment aus pWH11M2 transformiert und zwei unabhängige Transformanten, WWH11M1A und B, in denen die Insertionskassette korrekt in eines der beiden *WH11*-Allele integriert war (siehe Abb. 30C, Spur 3) wurden weiter verwendet. Nach dem Ausschneiden der *URA3*-Flipper-Kassette durch FLP-vermittelte Rekombination wurden die *ura3*-auxotrophen Stämme WWH11M2A und B erhalten (Abb. 30C, Spur 4). Diese Stämme dienten für eine nochmalige Transformation mit der gleichen Deletionskassette, um das übrig gebliebene wildtypische *WH11*-Allel zu inaktivieren. Aus den dabei erhaltenen Stämmen WWH11M3A und B (Abb. 30C, Spur 5) wurde der *URA3*-Flipper wieder herausgeschnitten, wodurch die Uridin-auxotrophen, homozygoten *wh11Δ*-Mutanten WWH11M4A und B (Abb. 30C, Spur 6) entstanden.

Um sicherzustellen, dass eventuelle Phänotypen der *wh11Δ*-Mutanten tatsächlich auf die Deletion des *WH11*-Gens zurückzuführen sind, wurde eine intakte *WH11*-Kopie mit Hilfe des *URA3*-Markers wieder in die Mutanten reintegriert. Zu diesem Zweck wurde ein *XbaI*-*BglII* Fragment, das die codierende Region des *WH11*-Gens und upstream-Sequenzen (Position -678 bis +206) enthielt, mit dem Primerpaar WHS5 und WHS12 amplifiziert und zusammen mit einem *BglII*-*XhoI*-Fragment, das die Transkriptionsterminationssequenz des *ACT1*-Gens (T_{ACT1}) enthielt und mit den Primern ACT16 und ACT21 aus dem Plasmid pLACZ5 amplifiziert wurde, in das *XbaI*/*SalI*-gespaltene Plasmid pGFP68 kloniert.

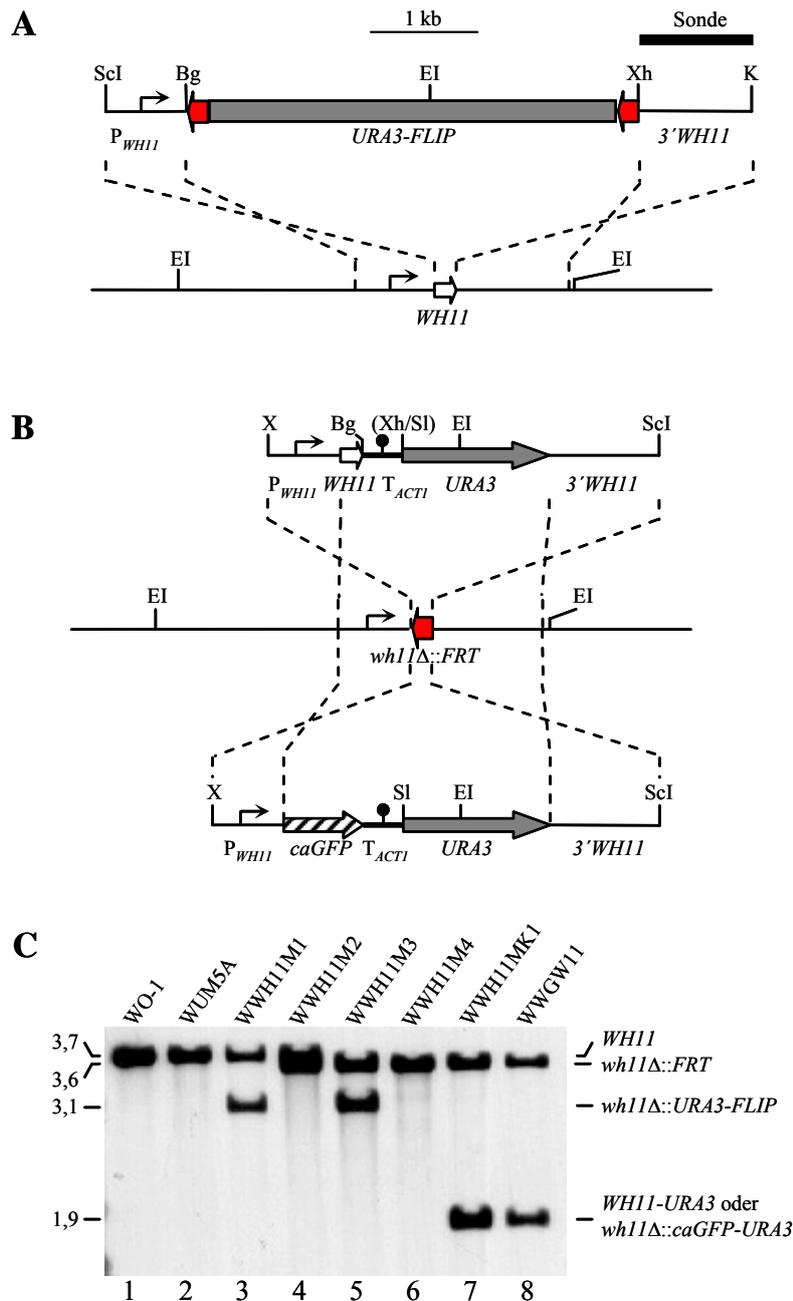


Abb. 30 Konstruktion der *wh11Δ*-Mutanten und Komplementanten. **A:** Struktur der Deletionskassette aus dem Plasmid pWH11M2 (oben) und genomische Struktur des *WH11*-Lokus im Stamm WO-1 und dessen *ura3*-Derivat WUM5A (unten). Die codierende Region des *WH11*-Gens ist als weißer Pfeil dargestellt und die upstream- und downstream-Bereiche als durchgezogene Linien. Der von roten Pfeilen flankierte graue Balken repräsentiert die *URA3*-Flipper-Kassette. Die Sonde, die für die Southern-Hybridisierungsanalyse verwendet wurde, ist durch den schwarzen Balken gekennzeichnet. **B:** Struktur der DNA-Fragmente aus pWH11K1 (oben) und pGFP68 (unten), die für die Reintegration einer intakten *WH11*-Kopie bzw. des *caGFP*-Gens (schraffierter Pfeil) mit Hilfe des *URA3*-Markers (grauer Pfeil) in eines der inaktivierten *wh11Δ*-Allele (Mitte) verwendet wurden. Der *WH11*-Promotor und die *ACT1*-Transkriptionsterminationssequenz sind als abgewinkelter Pfeil bzw. als dicke Linie mit schwarzem Kreis dargestellt. Relevante Schnittstellen: Bg, *Bg*III; EI, *Eco*RI; K, *Kpn*I; ScI, *Sac*I; SI, *Sal*I; X, *Xba*I; Xh, *Xho*I. In Klammern angegebene Schnittstellen wurden bei der Klonierung zerstört. **C:** Southern-Hybridisierung *Eco*RI-gespaltener chromosomaler DNA der wildtypischen Ausgangsstämme WO-1 und WUM5A sowie der *wh11*-Mutanten mit der *WH11*-spezifischen Sonde. Die Größe der hybridisierenden Fragmente (in kb) ist links angegeben und die jeweilige Identität rechts. Nur eine Serie der zwei unabhängig hergestellten Mutanten (A und B) ist hier gezeigt.

Das *XbaI-SacI*-Fragment aus dem dabei entstandenen Plasmid pWH11K1 (Abb. 30B, oben) wurde verwendet, um das *WH11*-Gen in eines der zerstörten *wh11Δ*-Allele der Mutanten WWH11M4A und B zu reintegrieren, wodurch die komplementierten Stämme WWH11K1A und B erhalten wurden (Abb. 30C, Spur 7). Zur Kontrolle wurde auch das *XbaI-SacI*-Fragment aus pGFP68 (Abb. 30B, unten), das das *GFP*-Gen anstelle von *WH11* enthält, in gleicher Weise in die *wh11Δ*-Mutanten integriert, wobei die Stämme WWGW11A und B entstanden (Abb. 30C, Spur 8). Letztere waren *URA3*-positive *wh11Δ*-Mutanten und dienten gleichzeitig auch als Reporterstämme für die phasenspezifische Genexpression, da sie das *GFP*-Gen unter der Kontrolle des *WH11*-Promotors exprimieren.

4.3.1.2 *WH11* ist nicht essenziell für die phasenspezifische Zell- und Koloniemorphologie

Um zu testen, ob die Deletion des *WH11*-Gens die Koloniemorphologie von white- bzw. opaque-Zellen beeinflusst, wurden die *wh11Δ*-Mutanten auf Lee's Agarplatten mit Phloxin B inkubiert. Sowohl die *URA3*-prototrophen als auch die *ura3*-auxotrophen *wh11Δ*-Mutanten bildeten white- und opaque-Kolonien, die sich nicht von denen des Wildtyps und der Kontrollstämme unterschieden (Abb. 31).

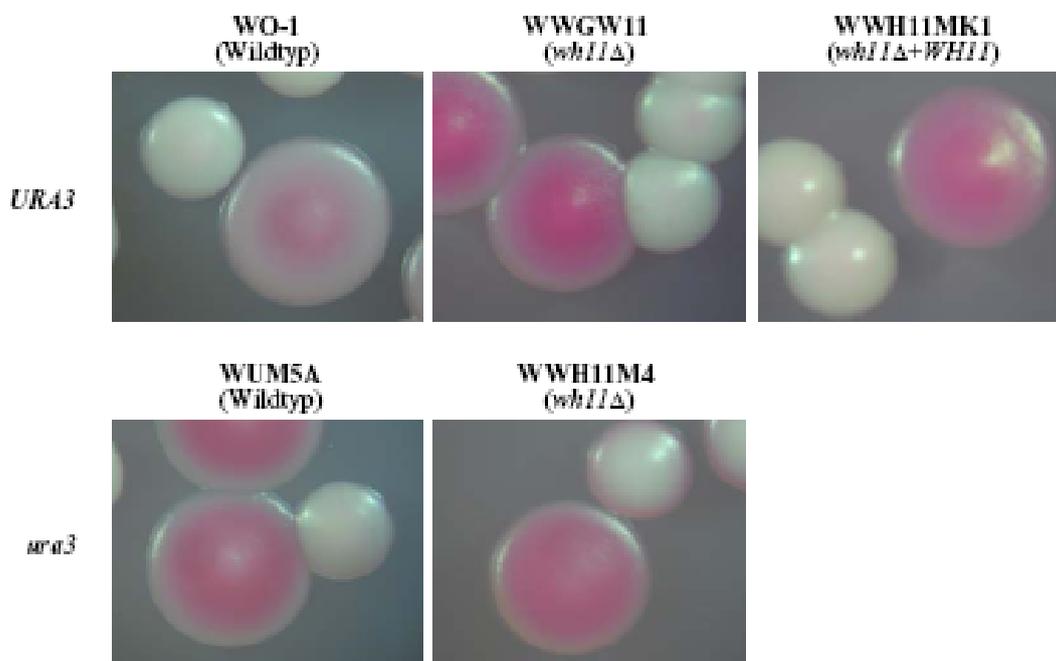


Abb. 31 Koloniemorphologie von white- und opaque-Zellen der *wh11Δ*-Mutanten und der Kontrollstämme. Die white- und opaque-Zellen wurden auf Lee's Agarplatten mit Phloxin B für sieben Tage bei RT inkubiert und anschließend photographiert. Alle Stämme produzierten die typischen großen, flachen opaque- und die kleinen, halbkugeligen white-Kolonien.

Die Morphologie von white- und opaque-Zellen wurde mit dem Rasterelektronenmikroskop (REM) untersucht. Die opaque-Zellen aller Stämme hatten die typische längliche Zellmorphologie mit den charakteristischen "Pimples" auf der Zelloberfläche, die allerdings auf frisch knospenden opaque-Zellen im allgemeinen noch nicht zu sehen waren. Auch die white-Zellen der Mutanten unterschieden sich nicht von denen der Kontrollstämmen und zeigten den typischen rund-ovalen Phänotyp mit glatter Oberfläche (Abb. 32). Diese Ergebnisse zeigten, dass die Deletion des *WH11*-Gens keine Auswirkungen auf die Zell- und Kolonimorphologie der white- und opaque-Phase hat.

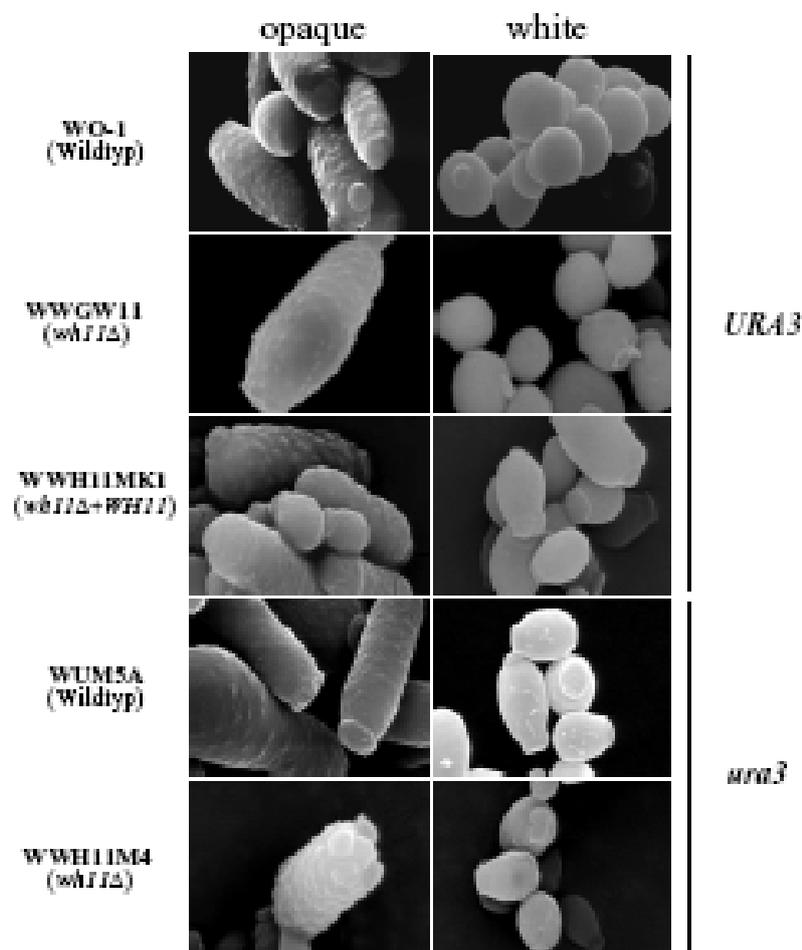


Abb. 32 Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von white- und opaque-Zellen der *wh11Δ*-Mutanten und der Kontrollstämmen. Die Zellen waren über Nacht (18 h) in Lee's Medium bei 25°C gewachsen.

4.3.1.3 *WH11* ist nicht notwendig für die phasenspezifische Genexpression

Obwohl die Inaktivierung des *WH11*-Gens keine detektierbaren zellulären Veränderungen der white- und opaque-Zellen bewirkte, war es dennoch möglich, dass die Mutation subtilere

Auswirkungen auf das phänotypische Switching hat. Deswegen wurde überprüft, ob die Expression von phasenspezifischen Genen in den *wh11Δ*-Mutanten verändert war. Zu diesem Zweck wurden die im Abschnitt 4.2.4 beschriebenen Reporterengenfusionen (siehe Abb. 24-26), bei denen das *caGFP*-Gen unter der Kontrolle phasenspezifischer Promotoren steht, in das Genom der *wh11Δ*-Mutanten integriert. Die Integration der P_{WH11} -*caGFP*-Fusion war bereits bei der Herstellung der Stämme WWGW11A und B erfolgt (siehe Abschnitt 4.3.1.1, Abb. 30). In analoger Weise wurden auch die P_{SAP1} -*caGFP*- und P_{OP4} -*caGFP*-Fusionen aus den Plasmiden pGFP61 und pGFP68 in die *wh11Δ*-Mutanten integriert, wobei die Stämme WWGO4A und B bzw. WWGS1A und B entstanden. Die Überprüfung der korrekten Integration der Reporterengenfusionen in eines der *SAP1*- bzw. *OP4*-Allele durch Southern-Hybridisierung ist in Abb. 33 dokumentiert.

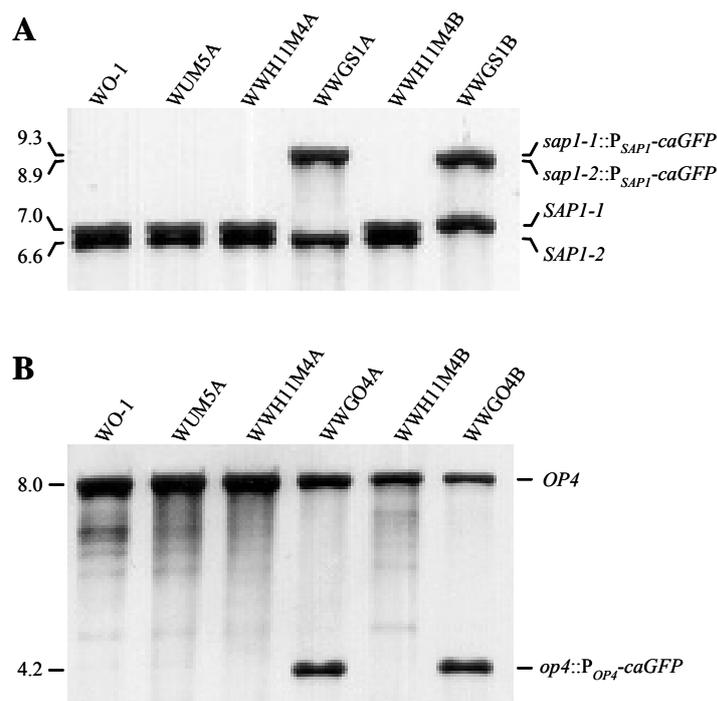


Abb. 33 Integration der P_{SAP1} -*caGFP*- und P_{OP4} -*caGFP*-Reporterengen-Fusionen in die entsprechenden Loci der *wh11Δ*-Mutanten. **A**: Southern-Hybridisierung *Bgl*II-gespaltener chromosomaler DNA der Ausgangsstämme und deren Derivate, bei denen die P_{SAP1} -*caGFP* Reporterengen-Fusion in eines der beiden *SAP1*-Allele integriert wurde, mit der *SAP1*-spezifischen Sonde. **B**: Southern-Hybridisierung *Eco*RI-gespaltener chromosomaler DNA der Ausgangsstämme und deren Derivate, in denen die P_{OP4} -*caGFP* Reporterengen-Fusion in eines der *OP4*-Allele integriert wurde, mit der *OP4*-spezifischen Sonde. Die Größe der DNA-Fragmente (in kb) ist jeweils links und die Identität rechts angegeben.

White- und opaque-Zellen der Reporterstämmen wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet. In Abb. 34 ist zu sehen, dass die Deletion des *WH11*-Gens keinen Effekt auf das white- und opaque-spezifische Genexpressionsmuster hatte. Wie in den Kontrollstämmen, die die gleichen Reporterfusionen im wildtypischen Hintergrund besitzen, wurde der Promotor des *WH11*-Gens in den white-Zellen der *wh11Δ*-Mutanten aktiviert und blieb in opaque-Zellen reprimiert. Umgekehrt wurden die opaque-spezifischen *OP4*- und *SAP1*-Promotoren auch in den *wh11Δ*-Mutanten in opaque-Zellen aktiviert und blieben in white-Zellen reprimiert. Diese Ergebnisse zeigten, dass *WH11* nicht essentiell für die normale Aktivierung und Deaktivierung zumindest dieser drei phasenspezifischen Gene ist.

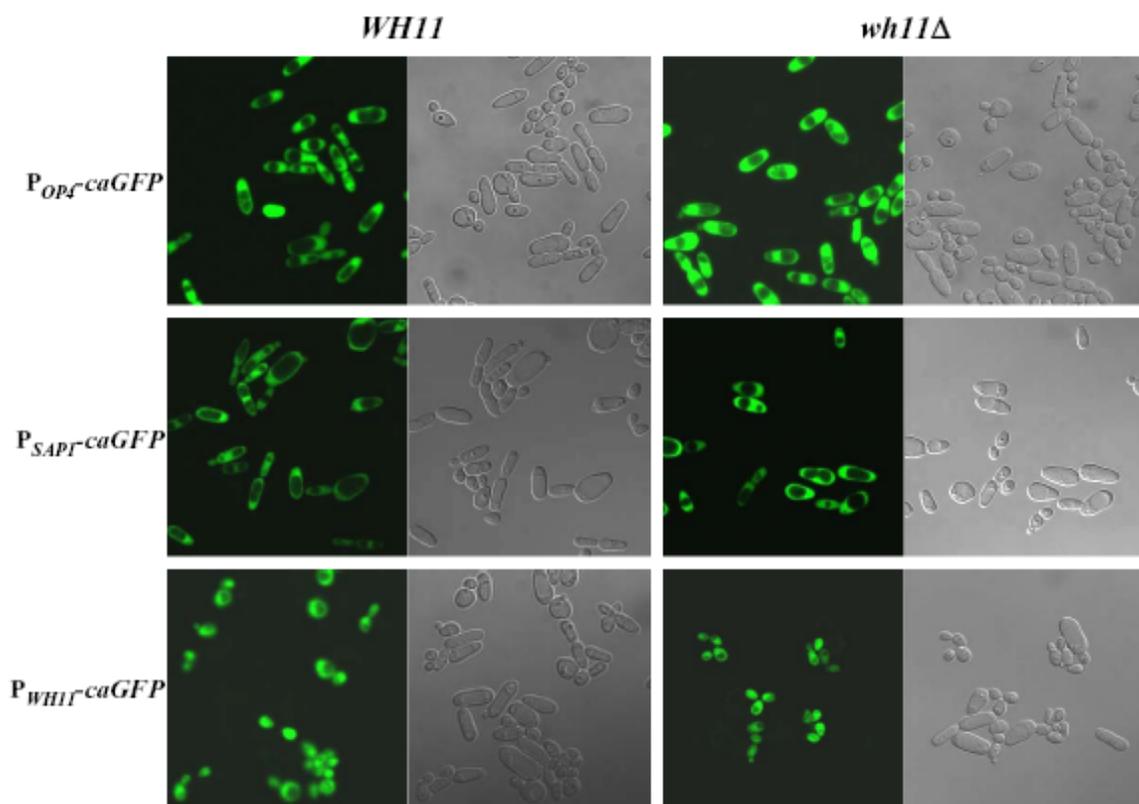


Abb. 34 Die Deletion des *WH11*-Gens hat keinen Einfluss auf die Expression von phasenspezifischen Genen. White- und opaque-Kolonien der *wh11Δ*-Mutanten und der Kontrollstämmen, die die unterschiedlichen Reporterfusionen enthielten, wurden in flüssigem Lee's Medium über Nacht inkubiert und unter dem Konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop betrachtet. Die Abbildung zeigt jeweils Transmissions- und zugehörige fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Zellen. Zur besseren Illustration der phasenspezifischen Genexpression wurden white- und opaque-Zellen vor der Aufnahme vermischt.

Tabelle 7 Frequenz des white-opaque-Switchings in *wh11Δ*-Mutanten und Kontrollstämmen.

Stamm	Genotyp	white ^a				opaque ^a			
		Kolonie	white	opaque	w/o ^b	Kolonie	opaque	white	o/w ^b
<i>URA3</i>									
WO-1	Wildtyp	Nr. 1	5376	0	25	Nr. 1	2264	1	1
		Nr. 2	4568	1	19	Nr. 2	2800	7	2
		Nr. 3	4536	0	15	Nr. 3	3760	4	0
WWGW11A	<i>wh11Δ</i>	Nr. 1	3328	0	2	Nr. 1	2856	1	0
		Nr. 2	2864	1	13	Nr. 2	1592	0	0
		Nr. 3	8160	0	33	Nr. 3	1852	1	0
WWGW11B	<i>wh11Δ</i>	Nr. 1	2200	2	8	Nr. 1	2080	1	0
		Nr. 2	2964	2	5	Nr. 2	3116	2	0
		Nr. 3	4020	2	4	Nr. 3	2756	3	2
WWH11MK1A	<i>wh11Δ + WH11</i>	Nr. 1	4272	0	23	Nr. 1	2080	11	4
		Nr. 2	3304	0	22	Nr. 2	2088	7	3
		Nr. 3	5286	0	8	Nr. 3	1768	11	6
WWH11MK1B	<i>wh11Δ + WH11</i>	Nr. 1	2668	0	5	Nr. 1	1488	2	5
		Nr. 2	2712	1	4	Nr. 2	2232	9	0
		Nr. 3	3164	1	2	Nr. 3	2092	13	9
<i>ura3</i>									
WUM5A	Wildtyp	Nr. 1	2836	1	14	Nr. 1	3800	6	0
		Nr. 2	3520	1	4	Nr. 2	4420	19	5
		Nr. 3	3480	2	15	Nr. 3	2976	4	0
WWH11M4A	<i>wh11Δ</i>	Nr. 1	4040	1	10	Nr. 1	2796	71	1
		Nr. 2	2564	1	8	Nr. 2	1612	63	14
		Nr. 3	4080	2	22	Nr. 3	2144	83	10
WWH11M4B	<i>wh11Δ</i>	Nr. 1	1720	0	0	Nr. 1	2476	86	0
		Nr. 2	2080	0	0	Nr. 2	2224	62	4
		Nr. 3	2792	0	0	Nr. 3	2012	56	0

^a In jedem Experiment wurde eine Einzelkolonie des angegebenen Phänotyps suspendiert und auf Lee's Agarplatten mit Phloxin B ausplattiert. Die Zahlen entsprechen den white-, opaque- und sektorierten Kolonien, die in jedem Versuch erhalten wurden.

^b w/o steht für white-Kolonien mit opaque-Sektor, o/w für opaque-Kolonien mit white-Sektor.

4.3.1.4 Die Deletion des *WH11*-Gens hat keinen Einfluss auf das white-opaque-Switching

In einer früheren Arbeit wurde gezeigt, dass die künstliche Expression des *WH11*-Gens in opaque-Zellen zu einer erhöhten Switchingfrequenz von der opaque- zur white-Phase führt (Kvaal *et al.*, 1997). Daher wurde erwartet, dass die Deletion von *WH11* zu einer Instabilität der white-Phase und zu einem erhöhten Switching der Zellen von der white- zur opaque-Phase führen würde. Um dies zu testen, wurde die Switchingfrequenz der *wh11Δ*-Mutanten und der Kontrollstämme in beide Richtungen bestimmt. Aus mehreren unabhängigen, sieben Tage alten white- und opaque-Kolonien der verschiedenen Stämme wurden jeweils Zellsuspensionen in H₂O hergestellt und in geeigneter Verdünnung auf Lee's Agarplatten mit Phloxin B ausplattiert. Nach sieben Tagen Inkubation wurde dann die Anzahl der white- und opaque-Kolonien sowie von Kolonien mit einem Sektor der anderen Phase bestimmt.

Wie in Tabelle 7 zu sehen ist, führte die Deletion von *WH11* nicht zu einem erhöhten Switching von der white- in die opaque-Phase. Auch das Switching von der opaque- in die white-Phase war in *URA3*-positiven Stämmen vergleichbar, unabhängig vom Vorhandensein des *WH11*-Gens. Die *ura3*-auxotrophen *wh11Δ*-Mutanten zeigten jedoch im Vergleich zum *ura3*-auxotrophen Kontrollstamm WUM5A einen signifikant erhöhten Anteil ($P < 0,05$, t-Test) an white-Zellen in den opaque-Kolonien. Der Grund für das erhöhte Switching von der opaque- zur white-Phase in den *ura3-wh11Δ*-Mutanten ist unklar, da es nach Reintegration des *URA3*-Gens, mit oder ohne *WH11*, nicht mehr beobachtet wurde. Unabhängig davon zeigten diese Ergebnisse, dass das *WH11*-Gen nicht für eine stabile Aufrechterhaltung des white-Phänotyps benötigt wird.

4.3.2 Funktionelle Analyse des *OP4*-Gens

4.3.2.1 Konstruktion von *op4Δ*-Mutanten des *C. albicans*-Stammes WO-1

Zur Inaktivierung des *OP4*-Gens wurde ein Deletionskonstrukt verwendet, das von Anja Strauß aus unserer Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt wurde und in dem fast die gesamte codierende Region des *OP4*-Gens durch die *URA3*-Flipper-Kassette ersetzt ist (Abb. 35A). Der *ura3*-auxotrophe Stamm WUM5A wurde mit dem *SacI-KpnI*-Fragment aus dem Plasmid pOP4M2 transformiert und zwei unabhängige Transformanten, WOP4M1A und B, in denen die Deletionskassette korrekt in eines der *OP4*-Allele integriert war (Abb. 35C, Spuren 3 und 4), wurden weiter verwendet.

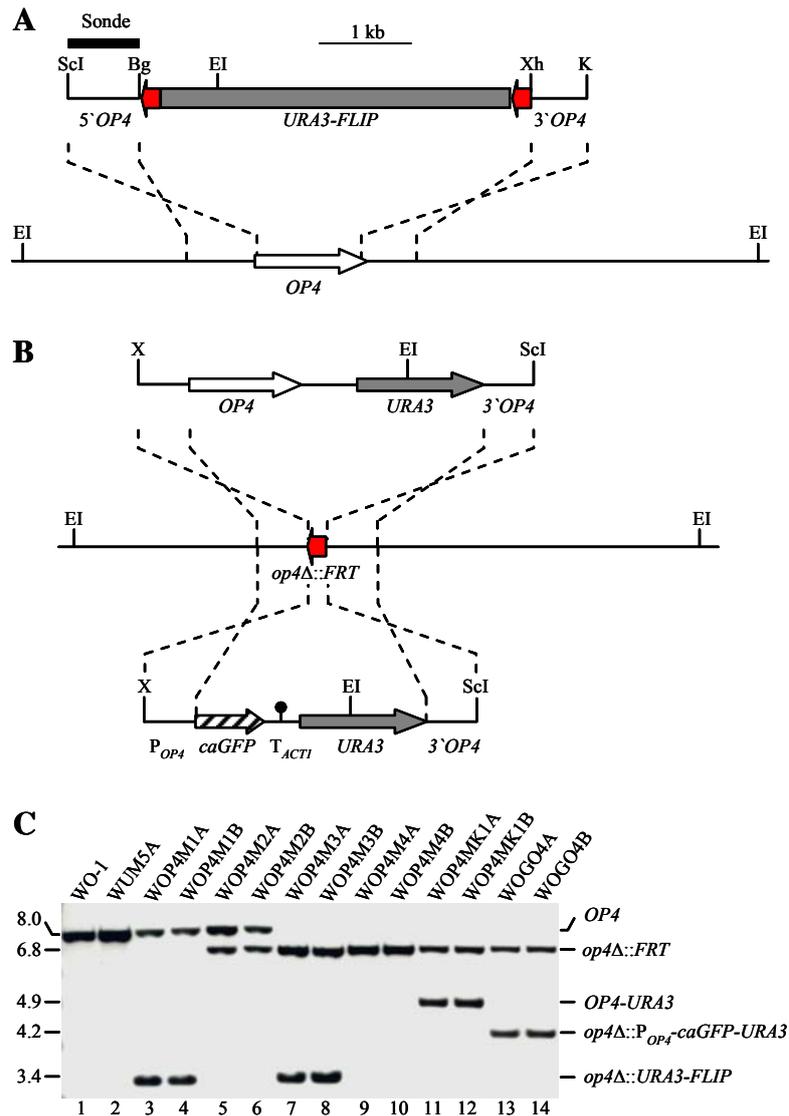


Abb. 35 Konstruktion der *op4Δ*-Mutanten und Komplementanten. **A:** Struktur der Deletionskassette aus dem Plasmid pOP4M2 (oben) und genomische Struktur des *OP4*-Locus im Stamm WO-1 und dessen *ura3*-Derivat WUM5A (unten). Die codierende Region des *OP4*-Gens ist durch den weißen Pfeil dargestellt und die upstream- und downstream-Sequenzen durch die durchgezogenen Linien. Der von roten Pfeilen flankierte graue Balken repräsentiert die *URA3*-Flipper-Kassette. Die Sonde, die für die Southern-Hybridisierungsanalyse verwendet wurde, ist durch den schwarzen Balken gekennzeichnet. **B:** Struktur der DNA-Fragmente aus den Plasmiden pOP4K1 (oben) und pGFP70 (unten), die für die Reintegration einer intakten *OP4*-Kopie bzw. des *caGFP*-Gens (schraffierter Pfeil) in eines der inaktivierten *op4Δ*-Allele (Mitte) mit Hilfe des *URA3*-Selektionsmarkers (grauer Pfeil) verwendet wurden. Die *ACT1*-Transkriptionsterminationssequenz (*T_{ACT1}*) ist durch einen schwarzen Kreis symbolisiert. Relevante Schnittstellen: Bg, *Bg*III; EI, *Eco*RI; K, *Kpn*I; ScI, *Sac*I; X, *Xba*I; Xh, *Xho*I. **C:** Southern Hybridisierung *Eco*RI-gespaltener genomischer DNA der wildtypischen Ausgangsstämme WO-1 und WUM5A sowie der *op4Δ*-Mutanten mit der *OP4*-spezifischen Sonde. Die Größe der hybridisierenden Fragmentes (in kb) ist links angegeben und die jeweilige Identität rechts.

Nach FLP-vermittelter Excision der *URA3*-Flipper-Kassette wurden die Uridin-auxotrophen Stämme WOP4M2A und B erhalten (Abb. 35C, Spur 5 und 6). Diese Stämme wurden wieder mit der gleichen Deletionskassette transformiert, um das verbliebene wildtypische *OP4*-Allel zu inaktivieren. Der *URA3*-Flipper wurde aus den dabei entstandenen Stämmen WOP4M3A

und B (Abb. 35C, Spur 7 und 8) wieder entfernt, um die *ura3*-auxotrophen *op4Δ*-Mutanten WOP4M4A und B (Abb. 35C, Spur 9 und 10) zu erhalten. In diese Stämme wurde eine intakte Kopie des *OP4*-Gens mit Hilfe des *XbaI-SacI*-Fragments aus dem Plasmid pOP4K1 (Park, 2002; Abb. 35B, oben) reintegriert, um die komplementierten Stämme WOP4K1A und B (Abb. 35C, Spur 11 und 12) herzustellen. Zur Kontrolle wurde auch das *XbaI-SacI*-Fragment aus pGFP70 (Abb. 35B, unten), das das *caGFP*-Gen anstelle von *OP4* enthält, in gleicher Weise in die *op4Δ*-Mutanten integriert, wobei die Stämme WOGO4A und B (Abb. 35C, Spur 13 und 14) entstanden. Letztere waren *URA3*-positive *op4Δ*-Mutanten und dienten gleichzeitig auch als Reporterstämme für die phasenspezifische Genexpression, da sie das *caGFP*-Gen unter der Kontrolle des *OP4*-Promotors exprimieren.

4.3.2.2 *OP4* ist nicht essenziell für die phasenspezifische Zell- und Kolonie-Morphologie

Um zu untersuchen, ob die Deletion des *OP4*-Gens die Koloniemorphologie von opaque-Zellen veränderte, wurden die *op4Δ*-Mutanten auf Lee's Agarplatten mit Phloxin B inkubiert.

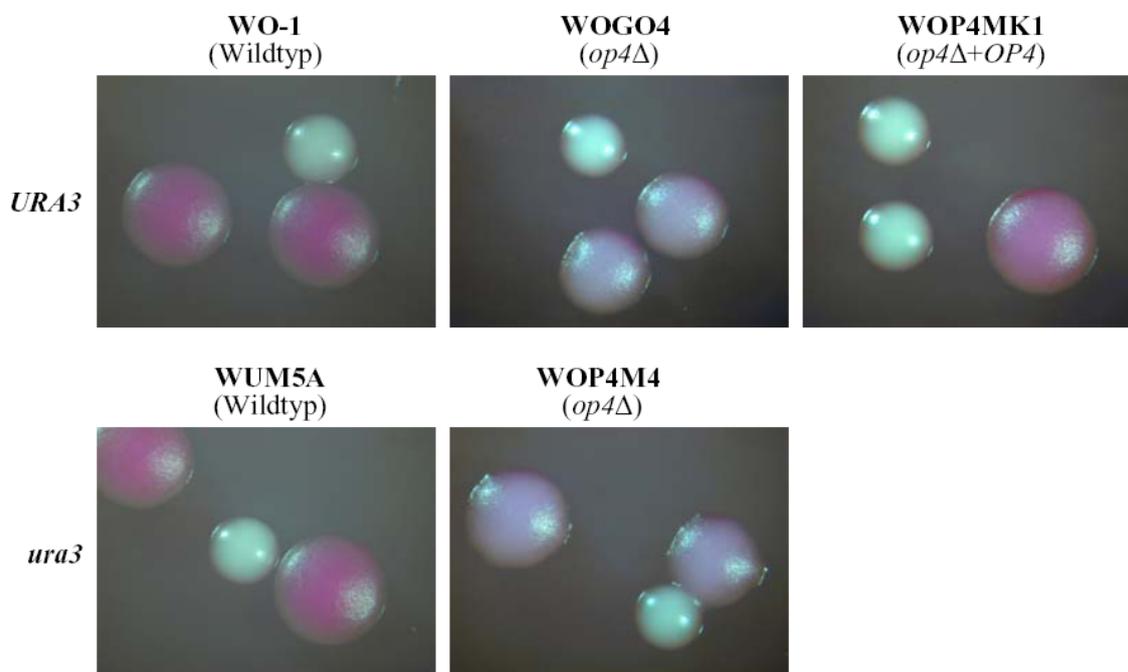


Abb. 36 Koloniephänotyp von white- und opaque-Zellen der *op4Δ*-Mutanten und der Kontrollstämmen. White- und opaque-Zellen jedes Stammes wurden gemischt und auf Lee's Agarplatten mit Phloxin B ausplattiert. Die Photos wurden nach 7 Tagen Inkubation bei RT (20-22°C) aufgenommen.

Die *op4Δ*-Mutanten bildeten weiße, halbkugelförmige white-Kolonien, die sich von denen der Kontrollstämmen nicht unterschieden. Auch die opaque-Kolonien der *op4Δ*-Mutanten hatten die typischen Merkmale, flache Form und rosa Farbe, beibehalten. Sie waren jedoch etwas

kleiner und weniger intensiv durch Phloxin B gefärbt als die opaque-Kolonien der Kontrollstämme (Abb. 36). Dieser Phänotyp, der in beiden unabhängig hergestellten Serien von Mutanten sowohl im *URA3*- als auch im *ura3*-Hintergrund beobachtet wurde, könnte durch das verlangsamte Wachstum der *op4Δ*-Mutanten bei RT verursacht worden sein (siehe auch folgenden Abschnitt 4.3.2.3), da sich die Koloniegröße aller Stämme nach längerer Inkubationszeit (mehr als 10 Tage) angeglichen hatte, obwohl die Koloniefarbe der *op4Δ*-Mutanten immer noch geringfügig blasser war als bei den Kontrollstämmen (Daten nicht gezeigt). Um zu testen, ob die *op4Δ*-Mutanten noch die typische opaque-Zellmorphologie besaßen, wurden white- und opaque-Zellen der Stämme mittels Rasterelektronenmikroskopie untersucht. Die opaque-Zellen aller Stämme zeigten die typische verlängerte Zellmorphologie mit Pimples auf der Zelloberfläche, während die white-Zellen die rund-ovale Form mit glatter Oberfläche aufwiesen (Abb. 37). Die Deletion von *OP4* hatte demnach weder in der white- noch in der opaque-Phase einen erkennbaren Einfluss auf die Zell- und Koloniemorphologie.

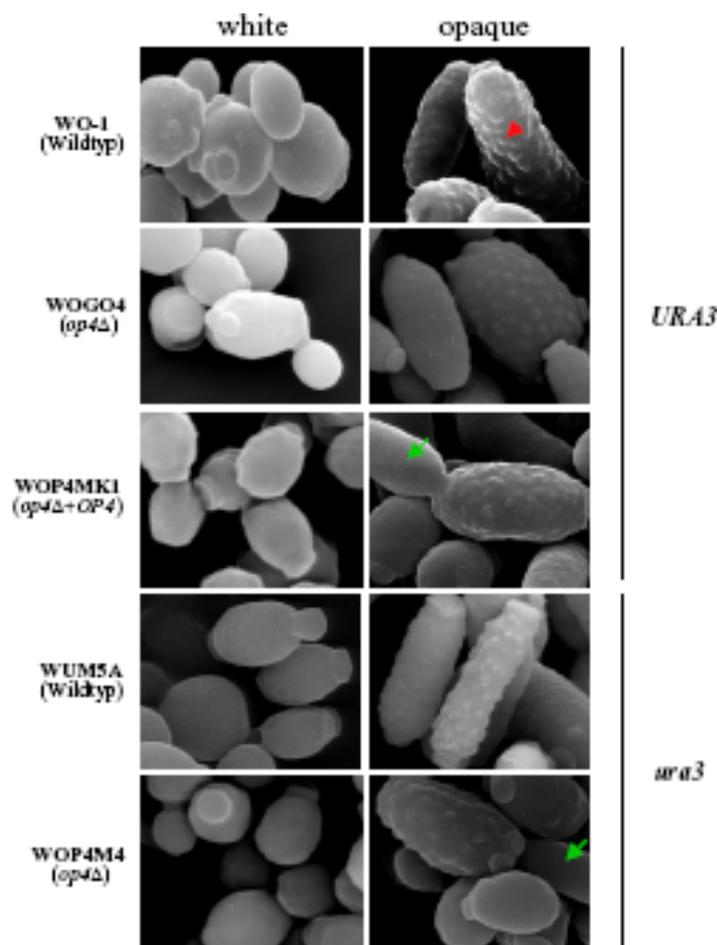


Abb. 37 Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von white- und opaque-Zellen der *op4Δ*-Mutanten und Kontrollstämmen. Die Zellen wurden über Nacht in Lee's Medium bei 25°C inkubiert. Frische Knospen von opaque-Zellen (grüne Pfeile) zeigten noch nicht die typischen Oberflächen-Pimples älterer Zellen (roter Pfeil).

4.3.2.3 *OP4* ist wichtig für das normale Wachstum von opaque-Zellen

Da die opaque-Phase bei 37°C instabil ist (Slutsky *et al.*, 1987), wurden die *MTL*-homozygoten Stämme allgemein bei Raumtemperatur auf Lee's Medium mit Phloxin B inkubiert und dort aufbewahrt.

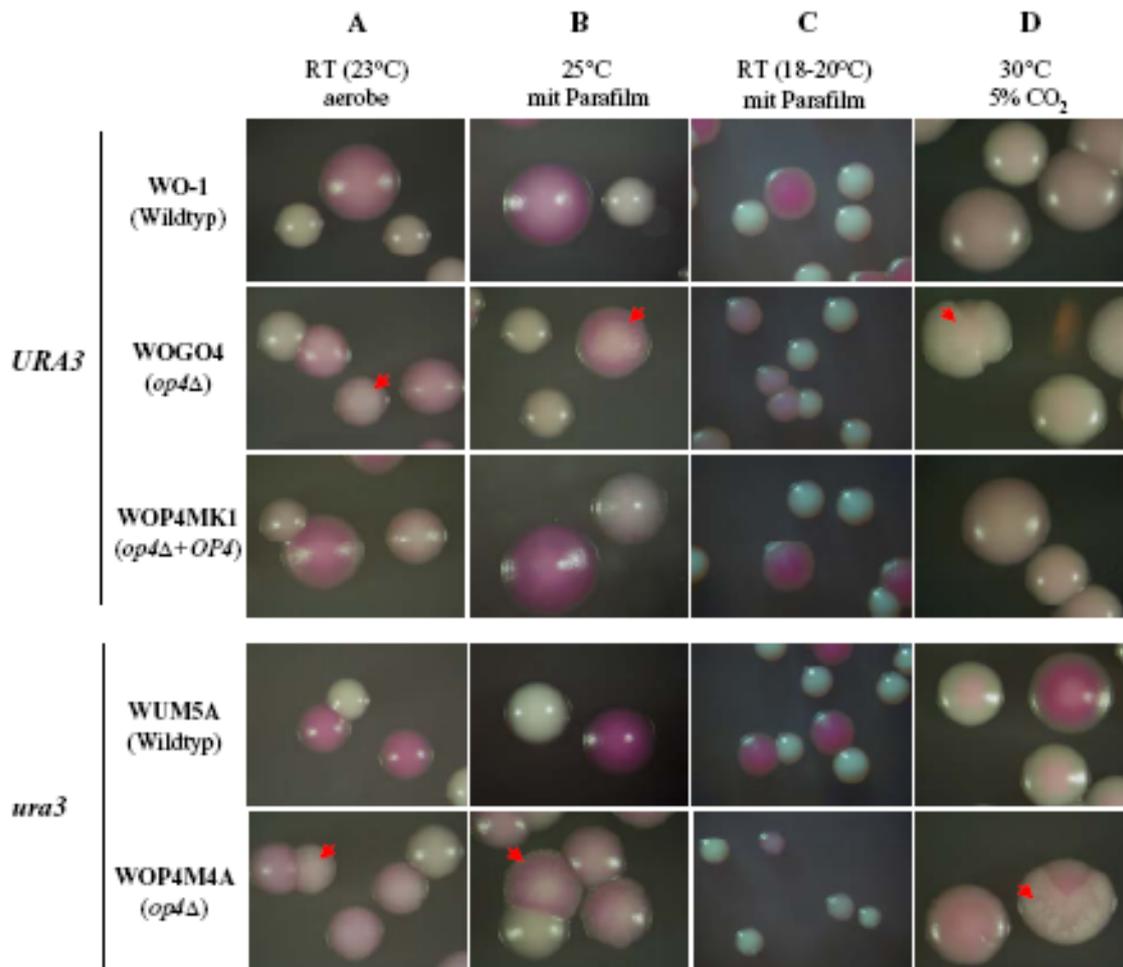


Abb. 38 White- und opaque-Koloniephänotypen der *op4Δ*-Mutanten und der Kontrollstämmen unter verschiedenen Wachstumsbedingungen. White- und opaque-Zellen wurden auf Lee's Agarplatten mit Phloxin B ausplattiert und für fünf (A, B und D) oder sieben Tage (C) unter den angegebenen Bedingungen inkubiert. Die Kolonien in B und C stammen von Platten, die mit Parafilm abgedichtet waren. Die aus opaque-Zellen der *op4Δ*-Mutanten entstandenen filamentösen Kolonien, die mit einem roten Pfeil markiert sind, hatten eine samtartige Oberfläche.

Die Raumtemperatur im Labor schwankte über das Jahr zwischen 18°C und 26°C, was als optimale Temperatur für das Beibehalten des opaque-Phänotyps gilt (Soll, 1992). Dadurch wurde ein interessantes Phänomen beobachtet, nämlich dass die opaque-Kolonien der *op4Δ*-Mutanten bei Temperaturen unter 25°C erkennbar kleiner waren als die von Wildtypstämmen und Komplementanten (Abb. 36 und Abb. 38A und C), was bei höheren Temperaturen nicht

beobachtet wurde (Abb. 38D und Daten nicht gezeigt). Das verlangsamte Wachstum der *op4Δ*-Mutanten fiel vor allem bei Temperaturen unter 20°C auf (Abb. 38C). Außerdem bildeten die *op4Δ*-Mutanten spontan noch einen anderen Koloniephänotyp mit einer samtartigen Oberfläche (Abb. 38, rote Pfeile). Dieser Koloniephänotyp wurde nur in der opaque-Phase ausgeprägt und bei Temperaturen unter 20°C seltener beobachtet (Abb. 38). Auf Platten, die mit Parafilm umwickelt waren oder bei Inkubation mit 5% CO₂ wurde dieser Phänotyp schneller ausgebildet, wobei die Größe der Kolonien variabel war. Obwohl die Kolonien filamentös aussahen, bestanden sie aus einer Mischung von normalen opaque-Zellen und extrem lang gezogenen Zellen ohne Septum, die aber keine typischen Hyphen waren (Abb. 39).

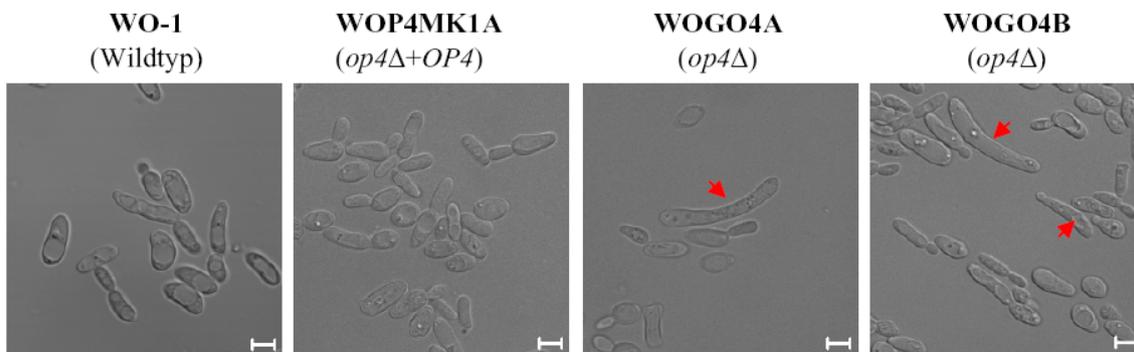


Abb. 39 Morphologie der Zellen aus Kolonien der *op4Δ*-Mutanten mit samtartiger Oberfläche. Die Zellen stammten aus Kolonien von Platten, die mit Parafilm umwickelt für 7 Tage bei 25°C inkubiert wurden. Zum Vergleich sind opaque-Zellen des Wildtypstammes WO-1 und einer Komplementante gezeigt. Die ungewöhnlich langen Zellen der *op4Δ*-Mutanten sind mit einem roten Pfeil markiert. Die Linien auf den Bildern entsprechen jeweils 5 µm.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die *op4Δ*-Mutanten zwar noch die normale opaque-Zell- und Koloniemorphologie ausprägen konnten, jedoch ein erkennbar verlangsamtes Wachstum in der opaque-Phase bei niedrigen Temperaturen aufwiesen und außerdem noch spontan einen neuen Zell- und Koloniephänotyp ausprägten. Diese Beobachtungen lieferten jedoch keine Information über die spezifische Funktion des *OP4*-Gens.

4.3.2.4 Versuch der Lokalisation von Op4

Um zusätzliche Informationen über die Funktion von *OP4* zu gewinnen, wurde der Versuch unternommen, die zelluläre Lokalisation des *OP4*-Genprodukts mit Hilfe von Gfp- bzw. HA-Epitop-Fusionen zu bestimmen.

Um eine C-terminale Gfp-Fusion herzustellen, wurde ein Teil der codierenden Region des *OP4*-Gens mit den Primern OPS10 und OPS14 amplifiziert, wobei eine *HindIII*-Schnittstelle an der Position +800 und eine *BamHI*-Schnittstelle an der Position +1210 anstelle des Stopcodons eingeführt wurde. Das PCR-Produkt wurde mit *HindIII/BamHI* gespalten und zusammen mit dem *BamHI-EcoRI*-[*caGFP-T_{ACT1}-5'URA3*]-Fragment aus dem Plasmid pYML127G3 und dem *EcoRI-SacI*-[*3'URA3-3'OP4*]-Fragment aus pOP4K1 in den *HindIII/SacI* gespaltenen Vektor pKSII kloniert. Das Insert aus dem so hergestellten Plasmid pOP4G1 wurde zur Transformation des wildtypischen Stammes WUM5A und der heterozygoten *OP4/op4*-Mutanten WOP4M2A und B verwendet und die korrekte Integration der *OP4-GFP*-Fusion in ein intaktes *OP4*-Allel durch Southern-Hybridisierung überprüft (Daten nicht gezeigt). Drei bzw. zwei unabhängige Transformanten wurden für die weitere Analyse aufbewahrt, wobei die Stämme WOP4G1A-C neben der *OP4-caGFP*-Fusion noch ein wildtypisches *OP4*-Allel besitzen, während die Stämme WΔOP4G1A und B nur das *caGFP*-markierte *OP4*-Gen enthalten.

Zur Herstellung eines Op4-3xHA-Fusionsproteins wurde das *BamHI-EcoRI*-[*3xHAT-T_{ACT1}-5'URA3*]-Fragment aus dem Plasmid pYML127HAT1 anstelle des *caGFP-T_{ACT1}-5'URA3*-Fragments in das mit den gleichen Enzymen gespalte pOP4G1 kloniert. Das Insert aus dem dabei entstandenen Plasmid pOP4HAT1 wurde ebenfalls in ein intaktes *OP4*-Allel der oben genannten Stämme integriert, so dass die Stämme WOP4HAT1A und B bzw. WΔOP4HAT1A und B erhalten wurden. Alle hergestellten Stämme konnten opaque-Kolonien bilden, die aus verlängerten opaque-Zellen mit typischen Pimples auf der Zelloberfläche bestanden, was mittels REM bestätigt wurde (Daten nicht gezeigt).

Die intrazelluläre Lokalisation des Gfp-markierten Op4-Proteins in den Stämmen WOP4G1A und B bzw. WΔOP4G1A und B wurde durch Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie bestimmt. Zur besseren Orientierung wurden gleichzeitig die Zellkerne mit dem Höchst-Farbstoff und die Vakuolen mit dem lipophilen Farbstoff FM4-64, der in die Vakuolenmembran interkaliert, angefärbt. Wie in Abb. 40A-D zu sehen ist, wurde eine grüne Fluoreszenz der Zellen im Cytosol und auch im Zellkern, jedoch nicht in der Vakuole detektiert, was darauf hinwies, dass das Op4-Protein sowohl im Cytoplasma als auch im Zellkern von opaque-Zellen lokalisiert ist. Zusätzliche Versuche, die zelluläre Lokalisation der Gfp- bzw. 3xHA-markierten Proteine mittels Transmissionselektronmikroskopie zu bestimmen, waren allerdings nicht erfolgreich (Daten nicht gezeigt).

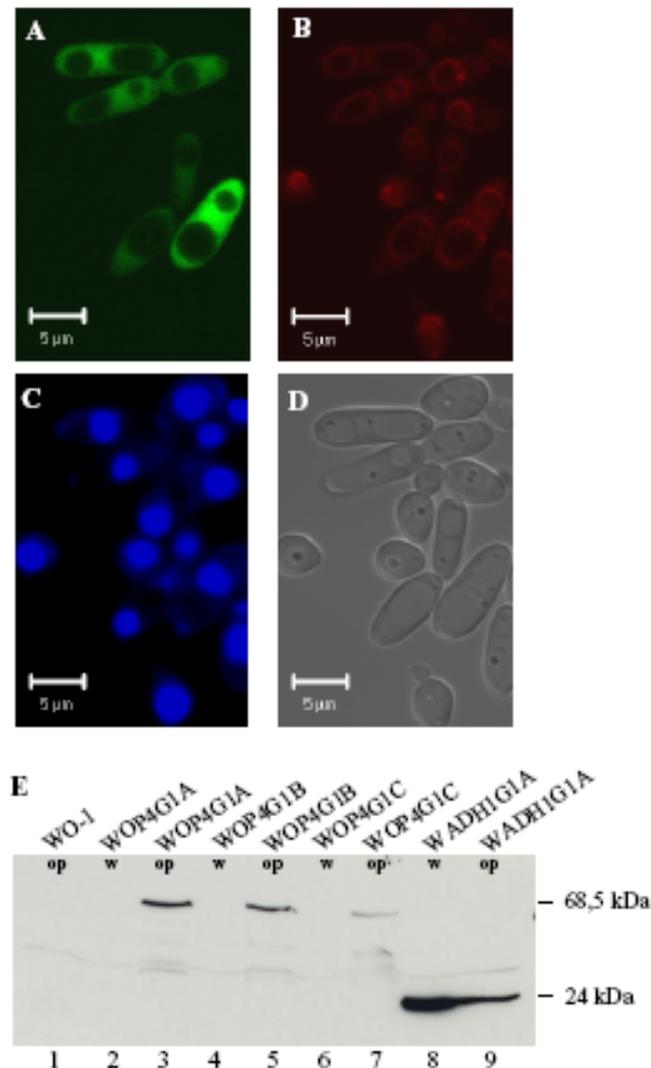
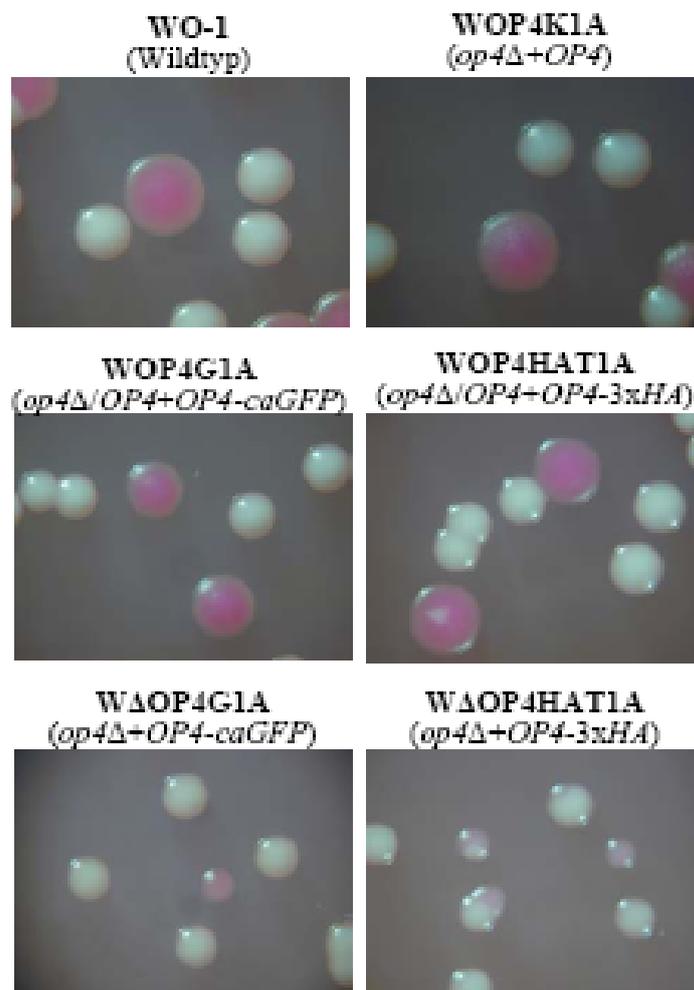


Abb. 40 A-D: Zelluläre Lokalisation des Op4-Gfp-Fusionsproteins. White- und opaque-Zellen der Stämme W Δ OP4G1A und B wurden über Nacht in Lee's Medium bei 25°C inkubiert. Das Op4-Gfp-Fusionsprotein ist als grüne Fluoreszenz sowohl im Cytosol als auch im Zellkern von opaque-Zellen sichtbar (A). Der Zellkern wurde mit dem Höchstfarbstoff gefärbt (C) und die Vakuolenmembran mit dem Vitalfarbstoff FM4-64 (B). Das Phasenkontrastbild ist in D zu sehen. Identische Ergebnisse wurden mit den Stämmen WOP4G1A und B erhalten (nicht gezeigt). **E:** Westernblot-Analyse zur Überprüfung des Op4-Gfp-Fusionsproteins. Proteinextrakte aus white- und opaque-Zellen der angegebenen Stämme wurden über SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und durch Western-Immunoblotting mit einem anti-Gfp-Antikörper detektiert. Der Stamm WADH1G1A exprimiert das native Gfp konstitutiv in white- und opaque-Zellen unter Kontrolle des *ADH1*-Promotors und diente als Positivkontrolle; der Stamm WO-1 diente als Negativkontrolle. Die Größen des Op4-Gfp-Fusionsproteins (68,5 kDa) und von Gfp (24 kDa) sind rechts angegeben.

Zur Überprüfung der korrekten Expression der Op4-Gfp- und Op4-3xHA-Fusionsproteine wurden Gesamtzellextrakte von white- und opaque-Zellen der Stämme WOP4G1A-C und WOP4HAT1A und B mittels Western-Immunoblotting mit anti-GFP- bzw. anti-HA-Antikörpern untersucht. Als Positivkontrollen wurden der Stamm WADH1G1A, der das *GFP*-Gen unter Kontrolle des *ADH1*-Promotors konstitutiv exprimiert, bzw. der Stamm SCHATS22B verwendet, der ein 3xHA-markiertes Sap2-Protein sekretiert (in diesem Fall

wurde der Überstand einer YCB-BSA-Kultur verwendet). Fusionsproteine erwarteter Größe wurden nur in opaque-, nicht aber in white-Zellen der Stämme WOP4G1A, B und C (Abb. 40E, Spuren 3, 5 und 7) bzw. WOP4HAT1A und B (Daten nicht gezeigt) nachgewiesen, während Gfp sowohl in white- als auch in opaque-Zellen des Positivkontrollstammes WADH1G1 exprimiert wurde (Abb. 40E, Spuren 8 und 9). White-Zellen dieses Stammes produzierten mehr Gfp als opaque-Zellen, in denen der *ADHI*-Promoter weniger aktiv ist (siehe Abschnitt 4.1.3.3).

Abb. 41 White- und opaque-Kolonien des wildtypischen Kontrollstammes WO-1, der Komplementante WOP4K1A, sowie der Stämme, die eine *OP4-caGFP*- oder *OP4-3xHA*-Fusion in An- oder Abwesenheit eines wildtypischen *OP4*-Allels im Genom tragen. White- und opaque-Zellen der Stämme wurden gemischt und für 7 Tage auf Lee's Agarplatten mit Phloxin B bei RT (18-20°C) inkubiert. Die A- und B-Serien der Stämme zeigten jeweils einen identischen Phänotyp und nur eine Serie ist hier gezeigt.

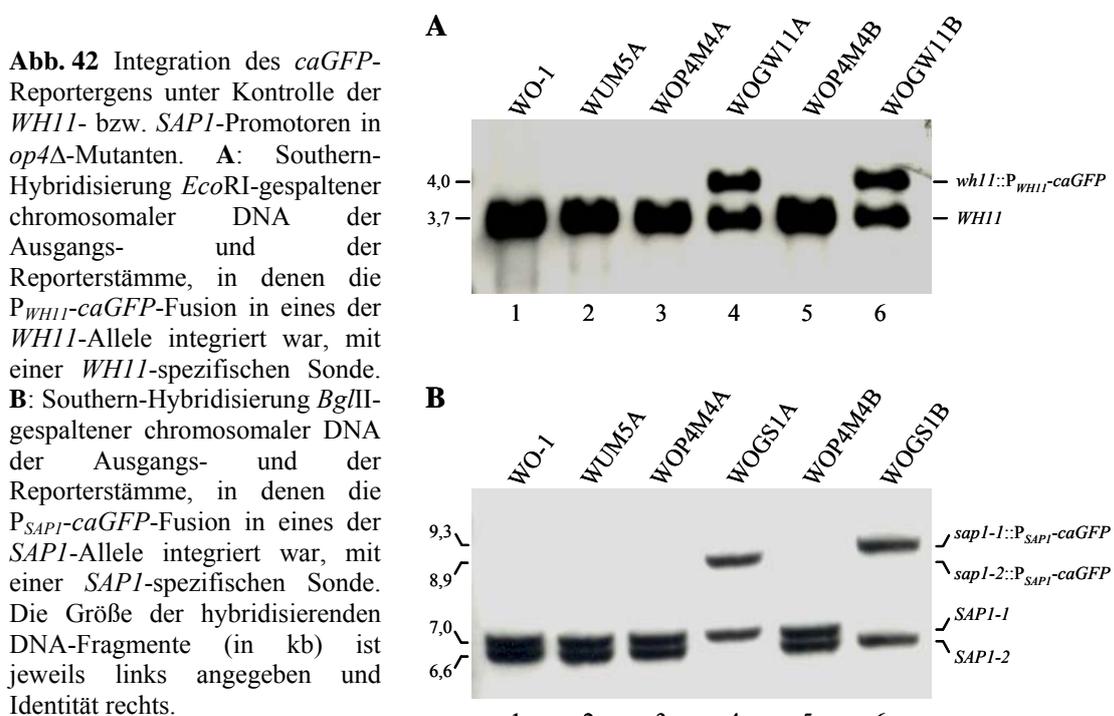


Bei der phänotypischen Analyse der Stämme WΔOP4G1A und B bzw. WΔOP4HAT1A und B, die lediglich das Gfp- bzw. 3xHA-markierte Op4-Protein exprimieren, aber kein wildtypisches *OP4*-Gen besitzen, stellte sich allerdings heraus, dass sie bei niedriger Temperatur genauso langsam wuchsen wie die *op4Δ*-Mutanten und folglich deren Wachstumsdefekt nicht komplementieren konnten (Abb. 41). Diese Ergebnisse zeigten, dass die Fusionsproteine nicht funktionell sind und die Lokalisationsstudien deshalb mit Vorsicht

betrachtet werden müssen. Aus diesem Grund wurden keine weiteren Analysen mit den Fusionsproteinen mehr durchgeführt.

4.3.2.5 *OP4* ist nicht notwendig für die phasenspezifische Genexpression

Um zu untersuchen, ob *OP4* für die normale Expression phasenspezifischer Gene in white- und opaque-Zellen benötigt wird, wurden die P_{WH11} -*caGFP*- und P_{SAP1} -*caGFP*-Reporterfusionen aus den Plasmiden pGFP68 (Abb. 24A) bzw. pGFP61 (Abb. 26A) ins Genom der *op4Δ*-Mutanten WOP4M4A und B integriert, wobei die Stämme WOGW11A und B (Abb. 42A, Spuren 4 und 6) und WOGS1A und B (Abb. 42B, Spuren 4 und 6) entstanden. Eine P_{OP4} -*caGFP*-Fusion war bereits bei der Herstellung der Stämme WOGO4A und B in die *op4Δ*-Mutanten eingeführt worden (Abschnitt 4.3.2.1, Abb. 35).



White- und opaque-Zellen der Reporterstämme wurden mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Abb. 43 zeigt, dass die Deletion von *OP4* das phasenspezifische Genexpressionsmuster nicht beeinflusste. Wie in den Kontrollstämmen waren die opaque-spezifischen *OP4*- und *SAP1*-Promotoren in opaque-Zellen der *op4Δ*-Mutanten aktiviert und in white-Zellen reprimiert. Umgekehrt war der *WH11*-Promotor in white-Zellen der *op4Δ*-Mutanten aktiviert und blieb in opaque-Zellen abgeschaltet.

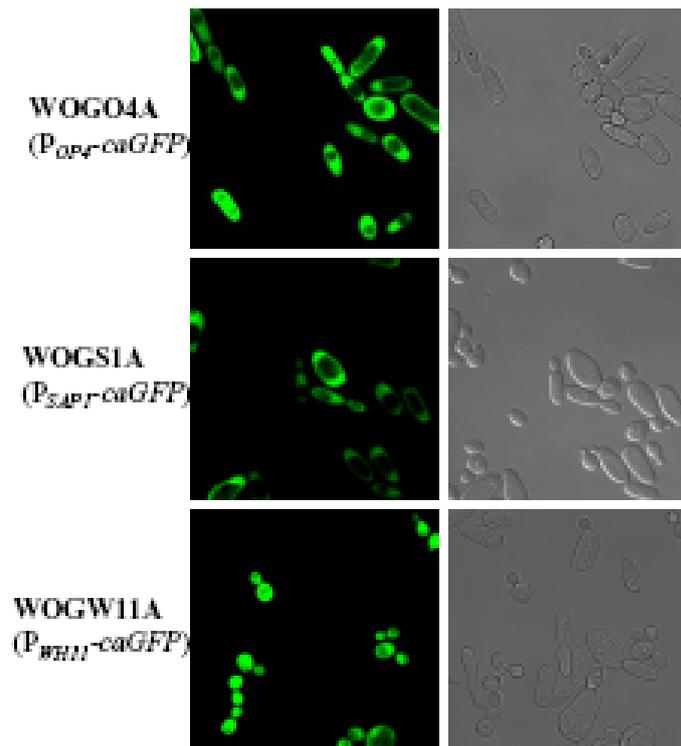


Abb. 43 Die Deletion des *OP4*-Gens hat keinen Einfluss auf die Expression von phasenspezifischen Genen. White- und opaque-Kolonien der *wh11Δ*-Mutanten und der Kontrollstämmen, die die unterschiedlichen Reporter-gen-Fusionen enthielten, wurden in flüssigem Lee's Medium über Nacht inkubiert und unter dem Konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop betrachtet. Die Abbildung zeigt jeweils Transmissions- und zugehörige fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Zellen. Zur besseren Illustration der phasenspezifischen Genexpression wurden white- und opaque-Zellen vor der Aufnahme vermischt.

4.3.2.6 Die Deletion von *OP4* hat keinen Einfluss auf das white-opaque-Switching

Um zu testen, ob das *OP4*-Gen wichtig für die Aufrechterhaltung der opaque-Phase ist, wurde die Switchingfrequenz von *op4Δ*-Mutanten und Kontrollstämmen von der white- zur opaque-Phase und umgekehrt bestimmt. Aus mehreren unabhängigen, sieben Tage alten white- und opaque-Kolonien der verschiedenen Stämme wurden Zellsuspensionen hergestellt und in geeigneter Verdünnung auf Lee's Agarplatten mit Phloxin B ausplattiert. Nach sieben Tagen Inkubation wurde dann die Anzahl der white- und opaque-Kolonien sowie von Kolonien mit einem Sektor der anderen Phase bestimmt. Die Ergebnisse, die in Tabelle 8 zusammengefasst sind, zeigen, dass die Deletion von *OP4* keine erhöhte Switchingfrequenz von der opaque- zur white-Phase zur Folge hatte. Auch das Switching von der white- zur opaque-Phase trat in allen Stämmen unabhängig von der An- oder Abwesenheit des *OP4*-Gens ähnlich häufig auf. Dies lässt den Schluss zu, dass das Gen *OP4* nicht notwendig für die Aufrechterhaltung des opaque-Zellphänotyps ist.

Tabelle 8 Frequenz des white-opaque-Switchings in $\Delta op4$ -Mutanten und Kontrollstämmen

Stamm	Genotyp	white				opaque			
		Kolonie	white	opaque	w/o ^b	Kolonie	opaque	white	o/w ^b
<i>URA3</i>									
WO-1	Wildtyp	Nr. 1	1569	6	6	Nr. 1	2629	63	10
		Nr. 2	1613	4	6	Nr. 2	1891	46	11
		Nr. 3	1044	3	7	Nr. 3	1338	80	16
WOGO4A	<i>op4Δ</i>	Nr. 1	1324	1	5	Nr. 1	1132	3	0
		Nr. 2	1336	0	2	Nr. 2	776	27	2
		Nr. 3	1341	0	3	Nr. 3	985	35	7
WOGO4B	<i>op4Δ</i>	Nr. 1	1029	1	7	Nr. 1	784	22	0
		Nr. 2	824	0	1	Nr. 2	1168	48	1
		Nr. 3	1295	4	9	Nr. 3	472	20	0
WOP4MK1A	<i>op4Δ + OP4</i>	Nr. 1	1403	1	16	Nr. 1	1639	91	6
		Nr. 2	1538	1	9	Nr. 2	1301	164	14
		Nr. 3	1396	3	9	Nr. 3	408	64	8
WOP4MK1B	<i>op4Δ + OP4</i>	Nr. 1	1793	5	0	Nr. 1	900	12	1
		Nr. 2	1803	1	5	Nr. 2	820	14	4
		Nr. 3	995	1	3	Nr. 3	816	22	6
<i>ura3</i>									
WUM5A	Wildtyp	Nr. 1	2981	0	5	Nr. 1	1093	6	3
		Nr. 2	2109	0	4	Nr. 2	1156	12	2
		Nr. 3	2564	0	5	Nr. 3	558	28	7
WOP4M4A	<i>op4Δ</i>	Nr. 1	2607	1	8	Nr. 1	1156	54	7
		Nr. 2	2303	0	7	Nr. 2	569	22	3
		Nr. 3	2792	1	5	Nr. 3	601	56	10
WOP4M4B	<i>op4Δ</i>	Nr. 1	5952	1	5	Nr. 1	451	22	0
		Nr. 2	2176	0	3	Nr. 2	364	26	2
		Nr. 3	2812	1	4	Nr. 3	856	58	0

^a In jedem Experiment wurde eine Einzelkolonie des angegebenen Phänotyps in H₂O suspendiert und eine geeignete Verdünnung auf Lee's Agarplatten mit Phloxin B ausplattiert. Die Zahlen entsprechen den white-, opaque- und sektorierten Kolonien, die in jedem Versuch erhalten wurden.

^b w/o steht für white-Kolonien mit opaque-Sektor, o/w für opaque-Kolonien mit white-Sektor.

4.3.2.7 *OP4* ist nicht essentiell für das Mating von opaque-Zellen des *C. albicans*-Stammes WO-1

Da opaque-Zellen die paarungskompetente Form von *C. albicans* sind, haben opaque-spezifische Gene möglicherweise eine Funktion beim Mating. Deshalb wurde getestet, ob opaque-Zellen der *op4Δ*-Mutanten noch fähig sind, sich mit gleicher Effizienz mit opaque-Zellen des alternativen Paarungstyps zu paaren. Da die *op4Δ*-Mutanten WOP4M4A und B und der wildtypische Ausgangsstamm WUM5A *ura3*-auxotrophe Stämme des Paarungstyps *MTLα* sind, wurde ein geeigneter Mating-Teststamm des Paarungstyps *MTLα* mit einer anderen Auxotrophie benötigt, um prototrophe Matingprodukte selektionieren zu können. Ein solcher entstand beim Versuch, das *MTLα2*-Gen im Stamm CAI8, einem *ura3-ade2*-auxotrophen Derivat des *MTLα/MTLα*-Stammes SC5314 (Fonzi and Irwin, 1993), mit Hilfe des *URA3*-Markers zu inaktivieren.

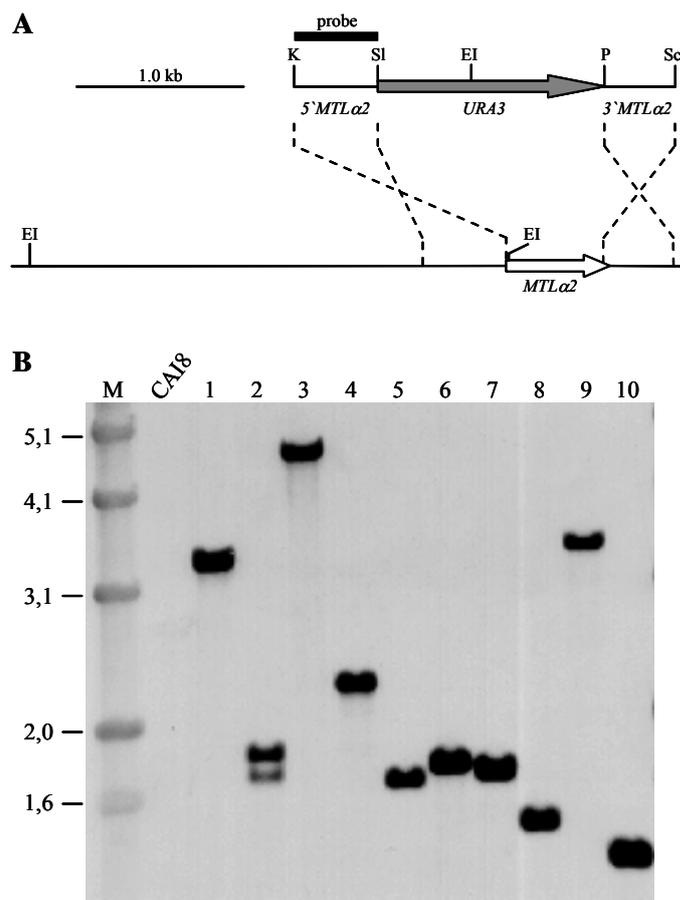


Abb. 44 A: Struktur der Insertionskassette aus dem Plasmid pMTL α 2M2 (oben), die zur Deletion des *MTLα2*-Gens im Stamm CAI8 verwendet werden sollte. Der genomische *MTLα2*-Lokus, im Stamm SC5314, der auch im Stamm CAI8 vorhanden sein sollte, ist darunter dargestellt. **B:** Southern-Hybridisierung *EcoRI*-gespaltener genomischer DNA des Ausgangsstammes CAI8 und von 10 Transformanten, welche die *mtlα2Δ::URA3*-Deletionskassette tragen, mit der *MTLα2*-Sonde, die in A gekennzeichnet ist. Die Größen des 1 kb-DNA-Markers sind links angegeben.

Zu diesem Zweck wurde mir eine Deletionskassette konstruiert, in der die codierende Region des *MTL α 2*-Gens durch den *URA3*-Marker ersetzt ist. Ein *KpnI*-*SacI*-Fragment mit dem upstream-Bereich des *MTL α 2*-Gens (-511 bis -6) wurde über PCR mit den Primern MAT α 1 und MAT α 2 aus genomischer DNA von CAI4 amplifiziert und in das *KpnI*/*SacI*-gespaltene Plasmid pTUP1M3 (siehe Abb. 20B) kloniert, woraus pMTL α 2M1 resultierte. Anschließend wurde ein *PstI*-*SacI*-Fragment mit der downstream-Region des *MTL α 2*-Gens (+518 bis +961) mit dem Primerpaar MAT α 3 und MAT α 4 amplifiziert und in das *PstI*/*SacI*-gespaltene pMTL α 2M1 kloniert, wobei das Plasmid pMTL α 2M2 entstand (Abb. 44A). Nach Transformation des Stammes CAI8 mit dem *KpnI*-*SacI*-Fragment aus pMTL α 2M2 stellte sich jedoch heraus, dass die im Labor vorhandene Kopie des Stammes CAI8 den *MTL α* -Lokus verloren hatte und die Deletionskassette mit dem *URA3*-Selektionsmarker in allen Transformanten ektopisch inseriert war, wie Southern-Hybridisierungen mit einer *MTL α 2*-spezifischen Sonde sowie mit einer *MTL α 1*-spezifischen Sonde, die mit dem Primerpaar MTL α 1-1 und MTL α 1-2 aus genomischer DNA des Stammes CAI4 amplifiziert wurde, bestätigten (Abb. 44B und Daten nicht gezeigt). Zwei unabhängige Transformanten, CMTL α M1A und B (Abb. 44B, Spur 2 und 3), wurden aufbewahrt und als *ade2*-auxotrophe *MTLa*-Matingpartner verwendet.

Tabelle 9 Matingfrequenz der *op4 Δ* -Mutanten

<i>MTLα</i> -Stämme	Matingfrequenz mit opaque-Zellen der <i>MTLa</i> -Stämme ^a			
	CMTL α 2M1A		CMTL α 2M1B	
	Exp.1	Exp.2	Exp.1	Exp.2
WOP4M4A	3,8 x 10 ⁻⁴	2,6 x 10 ⁻³	2,4 x 10 ⁻¹	2,9 x 10 ⁻³
WOP4M4B	3,0 x 10 ⁻³	1,5 x 10 ⁻¹	1,1 x 10 ⁻¹	3,6 x 10 ⁻²
WUM5A	1,1 x 10 ⁻²	1,0 x 10 ⁻²	2,4 x 10 ⁻³	1,0 x 10 ⁻¹

^a Matingtests mit jeder Kombination der Stämme wurden zwei Mal durchgeführt (Exp. 1 und 2).

Beim Mating von opaque-Zellen der Stämme CMTL α M1A und B mit opaque-Zellen des wildtypischen Kontrollstammes WUM5A entstanden prototrophe Matingprodukte mit einer hohen Frequenz, wodurch bestätigt wurde, dass CMTL α M1A und B sich gut als *MTLa*-Mating-Teststämme eigneten. Prototrophe Matingprodukte wurde in ähnlich hoher Frequenz

auch beim Mating dieser Stämme mit opaque-Zellen der *op4* Δ -Mutanten WOP4M4A und B erhalten (Tabelle 9), was darauf hinwies, dass *OP4* keine Funktion beim Mating zumindest von *MTL* α -Zellen hat.

5 Diskussion

C. albicans ist ein Bestandteil der normalen Mikroflora auf Schleimhäuten des Verdauungs- und Urogenitaltraktes bei den meisten gesunden Menschen. Bei immunsupprimierten Patienten kann dieser Pilz jedoch schwere Mykosen verursachen und hat aufgrund des starken Anstiegs der Anzahl von immungeschwächten Patienten in den letzten Jahrzehnten immer mehr an Bedeutung gewonnen (Odds, 1988). *Candida*-Mykosen können sowohl als lokal beschränkte, mukokutane Infektionen als auch als systemische Organmykosen verlaufen. Bis heute sind die Therapiemöglichkeiten aufgrund des mangelnden Verständnisses der pathogenen Eigenschaften dieses Opportunisten immer noch sehr beschränkt. Die molekulargenetische Analyse von *C. albicans* ist durch dessen Eigenschaften und vor allem den Mangel an Techniken für effiziente genetische Manipulationen begrenzt (Berman and Sudbery, 2002). Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit ein Genexpressionssystem in *C. albicans* etabliert, das durch Zugabe von Tetrazyklin eine induzierbare Expression oder eine Deletion von Genen ermöglicht. Dieses System kann für die Untersuchung der Funktion von Genen in *C. albicans* eingesetzt werden und zum Verständnis der Eigenschaften dieses Pilzes beitragen.

Ein bedeutendes Merkmal von *C. albicans* ist die Fähigkeit des phänotypischen Switchings zwischen verschiedenen Morphologien, die unterschiedliche Virulenzeigenschaften aufweisen (Soll, 1992). Neben dem Wechsel zwischen Hefe- und Hyphen-Form ist das white-opaque-Switching des Stammes WO-1 eine intensiv untersuchte Virulenzeigenschaft. Vor allem ist das Switching von der white- zur opaque-Phase ein notwendiger Vorgang für das Mating von *C. albicans*, welches nur in *MTLa*- oder *MTL α* -homozygoten Zellen vorkommt (Miller and Johnson, 2002). Trotz der Entdeckung, dass der *Mtl1*/ α 2-Repressorkomplex die Fähigkeit des Switchings in die Mating-kompetente opaque-Phase kontrolliert, bleibt bis jetzt ungeklärt, wie das white-opaque-Switchingphänomen reguliert wird und welche Bedeutung das Switching und das Mating während des Infektionsverlaufes haben. Die detaillierte Aufklärung der Funktionen von white- und opaque-spezifisch exprimierten Genen ist daher notwendig, um diesen Prozess besser zu verstehen. In der vorliegenden Arbeit wurde deswegen im *MTL α* -homozygoten *C. albicans*-Stamm WO-1 die Funktion des *TUPI*-Gens während des white-opaque-Switchings untersucht. Das *TUPI*-Gen codiert für einen konservierten globalen Transkriptionsrepressor (Smith and Johnson, 2000) und spielt bei der Regulation des filamentösen Wachstums im *MTLa*/ α -heterozygoten *C. albicans*-Stamm SC5314 eine

entscheidende Rolle (Braun and Johnson, 1997a). Außerdem wurde die Funktion des white-spezifischen *WH11*-Gens und des opaque-spezifischen *OP4*-Gens beim white-opaque-Switching untersucht. Zu diesem Zweck wurden Mutanten des Stammes WO-1 hergestellt, in denen *TUP1*, *WH11*, oder *OP4* spezifisch deletiert wurden, und der Effekt der Gendeletion auf die phasenspezifischen Zell- und Koloniemorphologie, Frequenz des Switchings, Expression phasenspezifischer Gene und Matingeffizienz untersucht.

5.1 Etablierung eines Tetrazyklin-induzierbaren Genexpressionssystems in *C. albicans*

5.1.1 Etablierung und Optimierung des Tetrazyklin-induzierbaren Genexpressionssystems

In dieser Arbeit wurde ein System etabliert, das eine induzierbare Expression von Genen in *C. albicans*-Zellen durch ein kleines Molekül, Doxyzyklin, als Induktor unabhängig vom Wachstumsmedium ermöglicht. Ein wichtiger Aspekt bei jedem regulierbaren Genexpressionssystem ist eine möglichst vollständige Repression unter nicht induzierenden Bedingungen und eine gute Induzierbarkeit des Promotors. Um dies zu erreichen, wurden die verschiedenen Komponenten des Systems durch empirische Versuche optimiert. Verschiedene in der Literatur beschriebene Core-Promotoren von *C. albicans*-wurden mit dem *tet*-Operator kombiniert und dann hinsichtlich ihrer Verwendbarkeit für eine kontrollierte Expression des *ecaFLP*-Reportergens getestet. Die basale Aktivität der putativen *ADHI*- und *WH11*-Minimalpromotoren war zu hoch, da hier auch eine FLP-Aktivität in Abwesenheit des Transaktivators beobachtet wurde (Löffler, 2001). Nur der *OP4*-Minimalpromotor lieferte zufriedenstellende Ergebnisse, da mit diesem Promotor keine Expression von *ecaFLP* oder anderen in dieser Arbeit getesteten Genen in Abwesenheit von Doxyzyklin detektiert wurde. In ähnlicher Weise wurden verschiedene Promotoren auf eine genügend hohe und konstitutive Expression des Transaktivators geprüft. Die *ACT1*- und *TEF3*-Promotoren waren weniger effizient als der *ADHI*-Promotor für die rtTA-abhängige, Doxyzyklin-induzierbare Expression mehrerer Zielgene. Deswegen wurde der *ADHI*-Lokus gewählt, um die Kasette ins *C. albicans*-Genom zu integrieren und dadurch den Transaktivator unter Kontrolle des *ADHI*-Promotors konstitutiv zu exprimieren. Nur in opaque-Zellen wurde der in der opaque-Phase konstitutiv aktive *OP4*-Promotor anstelle des *ADHI*-Promotors verwendet, da die Aktivität des *ADHI*-Promotors in opaque-Zellen deutlich niedriger war als in white-Zellen und mit dem *OP4*-Promotor bessere Ergebnisse erzielt wurden. Um das System aufzubauen,

wurde zunächst eine *C. albicans*-adaptierte Version des ursprünglichen *rtetR*-Gens (Gossen *et al.*, 1995) in Kombination mit der GAL4-Aktivierungsdomäne (Ma and Ptashne, 1987) verwendet. Jedoch zeigte der daraus resultierende Transaktivator auch in Abwesenheit von Doxyzyklin eine basale Aktivierung des Tet-Promotors und wies außerdem keine gute Induzierbarkeit auf (Löffler, 2001). Dagegen erlaubte ein anderer *C. albicans*-adaptierter reverser Transaktivator, der die von Urlinger *et al.* (Urlinger *et al.*, 2000) beschriebenen Aminosäureaustausche (S12G, E19G, A56P, D148E und H179R) enthielt (Park, 2002), in Kombination mit den anderen optimierten Komponenten die Etablierung des effizient induzierbaren Genexpressionssystems, das in dieser Arbeit beschrieben ist.

5.1.2 Vorteile und Effizienz des Tetrazyklin-induzierbaren Genexpressionssystems

Das Tetrazyklin-induzierbare Genexpressionssystem ist komplementär zum Tet-Off-System, das schon früher für *C. albicans* adaptiert wurde (Nakayama *et al.*, 2000) und besonders nützlich für die Repression von Genen unter Bedingungen ist, in denen sie normalerweise exprimiert werden. Zum Beispiel wurde das Tet-Off-System in einem knockdown-Ansatz angewendet, um die Funktion von essenziellen *C. albicans*-Genen in großem Umfang zu studieren (Roemer *et al.*, 2003). Außerdem wurde das Tet-Off-System zum Ausschalten der Expression des *NRG1*-Repressors verwendet, um die durch die konstitutive Expression von *NRG1* unter Kontrolle des Tet-Promotors verursachte Inhibierung der Hyphenbildung aufzuheben (Saville *et al.*, 2003).

Im Gegensatz zum Tet-Off-System erlaubt das in dieser Arbeit entwickelte Tet-On-System eine induzierbare Expression von Genen unter Bedingungen, in denen sie normalerweise nicht exprimiert werden. Dazu gehören heterologe Gene, die im wildtypischen Genom von *C. albicans* nicht vorhanden sind, (z.B. das *ecaFLP*-Gen, das zum Ausschneiden eines spezifischen DNA-Fragments aus dem Genom verwendet wurde), mutierte Allele bestimmter Gene (z.B. das dominant-negative *CDC42^{D118A}*-Allel) oder Gene, die in manchen Zelltypen fehlen (z.B. *MTLa1* und *MTLa2* in *MTL α* -Stämmen), aber auch native Gene wie *NRG1*, deren Expression unter bestimmten Bedingungen herunterreguliert ist. Wenn solche Gene unter die Kontrolle des Tetrazyklin-induzierbaren Promotors gestellt sind, wird die zusätzliche Kopie der Gene in Abwesenheit des Induktors Doxyzyklin nicht exprimiert und die Stämme verhalten sich wie der Wildtypstamm. Durch Zugabe von Doxyzyklin zu den Zellen kann dann die Auswirkung einer artifiziellen Genexpression unter jeder gewünschten Bedingung untersucht werden. Unabhängig vom verwendeten Wachstumsmedium sowie den

verschiedenen Zellmorphologien konnte durch Zugabe von Doxyzyklin eine induzierte Expression des *caGFP*-Gens und damit eine Fluoreszenz der Zellen erzeugt werden. Um die Effizienz dieses Systems weiter zu testen, wurden Zielgene ausgewählt, bei denen bestimmte Effekte auf die verschiedenen morphologischen Formen von *C. albicans* erwartet wurden. Die bereits früher beschriebene Bildung von vergrößerten, mehrkernigen Zellen nach Expression des dominant-negativen *CDC42^{D118A}*-Allels (Ushinsky *et al.*, 2002) bzw. nach FLP-vermittelter Deletion des wildtypischen *CDC42*-Gens (Michel *et al.*, 2002) wurde auch bei Expression der entsprechenden Gene mit Hilfe des Tet-On-Systems erreicht. Außerdem war die Repression der Hyphenbildung durch erzwungene Expression des *NRG1*-Gens (Braun *et al.*, 2001; Saville *et al.*, 2003) auch unter Verwendung des Tetrazyklin-induzierbaren Genexpressionssystems möglich. Darüber hinaus konnten mit Hilfe des Tet-On-Systems zelluläre Verhaltensweisen induziert werden, die bisher nicht beschrieben wurden. So wurde in opaque-*MTL α* -Zellen durch Expression des *MTLa1*-Gens das Switching in die white-Phase ausgelöst und durch induzierte Expression des *MTLa2*-Gens die Shmoo-Bildung.

Ein beträchtlicher Vorteil des in dieser Arbeit etablierten Tetrazyklin-induzierbaren Genexpressionssystems besteht darin, dass alle benötigten Komponenten in einer Kasette enthalten sind. Dieses Design vermeidet eine Abhängigkeit von bestimmten Wirtsstämmen, wie beim Tet-Off-System, das bisher nur in zuvor konstruierten Stämmen verwendet wurde, die den Tetrazyklin-regulierten Transaktivator exprimieren (Nakayama *et al.*, 2000; Roemer *et al.*, 2003; Saville *et al.*, 2003). In Kombination mit dem dominanten *caSAT1*-Selektionsmarker kann das Tet-On-System deshalb in einem einzigen Transformationsschritt in jeden beliebigen *C. albicans*-Stamm eingebracht werden. Da die codierende Region von Zielgenen auf einfache Weise über PCR amplifiziert und anstelle des *caGFP*-Reportergens in das Plasmid pNIM1 inseriert werden kann, können sehr schnell Stämme konstruiert werden, die ein gewünschtes Zielgen unter Kontrolle des Tetrazyklin-induzierbaren Promotors exprimieren. Die Kasette mit dem *caGFP*-Reportergen kann verwendet werden, um ansonsten identische Kontrollstämmen herzustellen und um die Induktion der Genexpression im jeweiligen Stammhintergrund, Zelltyp und unter den verwendeten experimentellen Bedingungen zu kontrollieren.

5.1.3 Problematik und Verbesserungsmöglichkeit des Tetrazyklin-induzierbaren Genexpressionssystems

Obwohl das Tet-On-System für viele Untersuchungen sehr gut eingesetzt werden kann, sollten auch seine Grenzen bedacht werden. Die Verwendung des *GFP*-Reportergens zeigte,

dass das Doxyzyklin die Genexpression nicht in allen Zellen einer *C. albicans*-Kultur gleichzeitig induzierte, sondern einige Zellen früher als andere auf die Zugabe von Doxyzyklin reagierten. Deswegen kann ein Phänotyp möglicherweise nicht in allen Zellen einer Population zu einem gegebenen Zeitpunkt beobachtet werden. Abhängig vom Zielgen kann eine ausreichende Genexpression in manchen Fällen entweder nur nach einer verlängerten Inkubation mit Doxyzyklin oder nicht in allen Zellen erreicht werden. Zum Beispiel ermöglichte die Tetrazyklin-induzierte Expression der FLP-Rekombinase zwar die Deletion des essenziellen *CDC42*-Gens in den meisten Zellen (über 80%) der Population, so dass nicht-lebensfähige Mutanten erhalten wurden ohne das Medium wechseln zu müssen. Allerdings wurde eine deutlich effizientere *ecaFLP*-Expression unter der Kontrolle des *SAP2*-Promotors nach Passage der Zellen in einem *SAP2*-induzierendem Medium erreicht, was zu einer fast reinen (>99%) Population von Nullmutanten führte (Michel *et al.*, 2002). Dies weist darauf hin, dass die Expression der FLP-Rekombinase unter Anwendung des in dieser Arbeit entwickelten Tet-On-Systems nicht ausreichend für die vollständige Deletion des Gens in einer Population ist und das System noch verbessert werden kann.

Die *MTLa1*-Expression in *MTL α* -opaque-Zellen durch Zugabe von Doxyzyklin konnte das morphologische Switching von der opaque- zur white-Phase erzwingen. Dennoch lag kein vollständiges physiologisches Switching vor. Obwohl die meisten Zellen nach der Induktion wie die white-Form aussahen, bildeten nur ca. 40-60% der Zellen auch white-Kolonien, wobei dieser Prozentsatz von Experiment zu Experiment sehr variabel war. Dieses Ergebnis ist vermutlich dadurch zu erklären, dass in diesem Fall der Transaktivator (*rtTA*) unter der Kontrolle des opaque-spezifischen *OP4*-Promotors exprimiert wurde, der nach dem Wechsel in die white-Phase abgeschaltet wird, so dass keine weitere Aktivierung des Zielgens stattfinden konnte. In vielen Zellen war der white-Phänotyp offensichtlich noch nicht stabil ausgeprägt, so dass sie nach dem Ausplattieren auf Agarplatten ohne Doxyzyklin wieder opaque-Kolonien bildeten. Um die Funktion von Genen zu untersuchen, die das white-opaque-Switching regulieren, sollte deswegen das *rtTA*-Gen unter einen Promotor gestellt werden, der sowohl in der white- als auch in der opaque-Phase eine genügend starke Expression des Transaktivators erlaubt.

Eine weitere Limitation dieses Systems besteht darin, dass für die maximale Induktion des Tetrazyklin-induzierbaren Promotors eine höhere Doxyzyklin-Konzentration (50 $\mu\text{g/ml}$) benötigt wird als für die effiziente Repression des Tetrazyklin-reprimierbaren Promotors in *C. albicans* (20 $\mu\text{g/ml}$) (Nakayama *et al.*, 2000; Saville *et al.*, 2003). Bei 50 $\mu\text{g/ml}$ Doxyzyklin wurde ein hemmender Effekt auf das Hyphenwachstum von *C. albicans* auf

Festmedien beobachtet. Dieser negative Effekt war bei niedrigeren Doxyzyklin-Konzentrationen nicht zu sehen, allerdings war auch die Induktion der Genexpression bei diesen Konzentrationen weniger effizient. Deswegen ist es wichtig, bei allen Experimenten Kontrollstämme einzusetzen und zu testen, welche Doxyzyklin-Konzentration für die jeweilige Untersuchung am besten geeignet ist.

5.1.4 Konstitutiv aktive Promotoren für die Expression von rtTA

Während der Etablierung und Optimierung des Tetrazyklin-induzierbaren Genexpressionssystems wurde festgestellt, dass die Effizienz des Genexpressionssystems stark vom exprimierten Zustand des reversen Tet-Transaktivators (rtTA) in Zellen abhängig ist. Für die konstitutive Expression von rtTA wurden die oben genannten drei Promotoren (*ACT1*-, *TEF3*- und *ADHI*-Promotor) angewandt, wobei der *ADHI*-Promotor die beste Aktivität in diesem Tetrazyklin-induzierbaren Genexpressionssystem zeigte. Bevor diese Promotoren in diesem System verwendet wurden, wurde deren Aktivität in *C. albicans*-Zellen mit Hilfe des *caGFP*-Gens bestimmt (Daten nicht gezeigt). Aus der Literatur war bekannt, dass alle drei Promotoren in *C. albicans*-Zellen konstitutiv aktiv sind (Bertram *et al.*, 1996; Delbruck and Ernst, 1993; Myers *et al.*, 1992). In dieser Arbeit wurde aber beobachtet, dass der *ACT1*-Promotor weniger aktiv im Vergleich zu den *TEF3*- und *ADHI*-Promotoren in allen getesteten Phänotypen (Hefe, Hyphen bzw. white- und opaque-Form) von *C. albicans* war, was in den bereits veröffentlichten Arbeiten gegenteilig beschrieben wurde (Berman and Sudbery, 2002). Obwohl das *caGFP*-Gen unter dem *TEF3*-Promotor genauso stark wie unter dem *ADHI*-Promotor exprimiert wurde, war die Aktivität des *TEF3*-Promotors im Tetrazyklin-induzierbaren Genexpressionssystem von der Wachstumsphase abhängig (Daten nicht gezeigt). Der *TEF3*-Promotor wurde in der Log-Phase am stärksten aktiviert. Der *ADHI*-Promotor wurde in Hefezellen ebenfalls in der Log-Phase am stärksten exprimiert. Die Aktivität in der Adaptationsphase und in der stationären Phase war niedriger. Der *ADHI*-Promotor scheint unter Hypheninduktionsbedingung, RPMI mit 10% Serum, am stärksten aktiviert zu sein. Dies könnte an der niedrigen Glucosekonzentration im RPMI-Medium liegen, da Glucose im Vergleich zu anderen Kohlenstoffquellen (Galaktose, Pyruvat, Glycerin, Lactat bzw. Succinat) die Expression von *ADHI* unterdrückt (Bertram *et al.*, 1996). Auch könnte die Repression des *ADHI*-Promotors durch Tup1 aufgrund der verringerten Expression oder Aktivität von Tup1 während des Hyphenwachstums aufgehoben worden sein (Murad *et al.*, 2001; Swoboda *et al.*, 1994). Dieser Promotor war auch in der opaque-Phase weniger aktiv, während er in der white-Phase des *MTL α* -homozygoten Stammes genauso

stark wie in Hefezellen des *MTLa*/ α -heterozygoten Stammes exprimiert wurde. Obwohl der *ADHI*-Promotor konstitutiv mit einer gewissen Intensität in den meisten Zellen aktiviert wurde, zeigte er auch eine unterschiedliche Aktivität von Stamm zu Stamm, z.B. bei CAI4 und SC5314. Das nun vorhandene Wissen über die Aktivität der verschiedenen Promotoren kann dazu benutzt werden, um das Tetrazyklin-induzierbare Genexpressionssystem für den Einsatz unter den gewünschten Untersuchungsbedingungen zu optimieren.

5.1.5 Charakterisierung der durch *Mtla2* induzierten Shmoo-Zellen

Ein interessantes Ergebnis war, dass die Tetrazyklin-induzierte Expression von *MTLa2* in *MTLa*-Zellen die Shmoo-Bildung induzierte, aber nicht in *MTLa*-Zellen. Der Transkriptionsfaktor *Mtla2*-Aktivator aktiviert in *C. albicans* die für das **a**-Mating verantwortlichen Gene, während *Mtla1* das α -Mating fördert (Tsong *et al.*, 2003). Die Bildung von Shmoos könnte dadurch zustande gekommen sein, dass diese Zellen nun beide Aktivatoren, *Mtla1* und *Mtla2*, exprimierten, aufgrund des Fehlens des *MTLa1*-Gens aber nicht den **a1**/ α 2-Repressor. Deshalb exprimierten sie vermutlich sowohl **a**- als auch α -spezifische Gene, darunter beide Pheromone und die entsprechenden Rezeptoren, so dass die Shmoobildung durch ein autokrines Signaling induziert wurde. Obwohl nachgewiesen werden konnte, dass die durch *MTLa2*-Expression induzierten *MTLa*-Shmoozellen Eigenschaften von **a**-Zellen besaßen, konnten sich diese Zellen nicht untereinander paaren. Das autokrine Signaling in den Zellen könnte eventuell nicht ausreichend für das Mating mit anderen Zellen derselben Population sein, falls eine genügend hohe Pheromonkonzentration nur in der Nähe der produzierenden Zellen selbst zustande kommt. Die Matingfrequenz dieser *MTLa*-Shmoozellen mit *MTLa*-opaque-Zellen war unter induzierenden und nicht-induzierenden Bedingungen gleich und ähnlich wie die von normalen *MTLa*-opaque-Zellen mit *MTLa*-opaque-Zellen. Dies weist darauf hin, dass die Überexpression von *MTLa2* während des Matings keinen negativen Einfluss auf die Matingeffizienz hat. Die *MTLa2*-Überexpression in *MTLa*/ α -heterozygoten Stämmen in Anwesenheit von Doxyzyklin induzierte keine Shmoo-Bildung, bewirkte jedoch, dass die Zellen im Vergleich zu normalen Hefe-Zellen bzw. white-Zellen vergrößert waren und auf Lee's Agarplatten mit Phloxin B leicht pinkfarbene Kolonien bildeten (Daten nicht gezeigt). In weiteren Experimenten könnte geprüft werden, ob in den induzierten Shmoo-Zellen die Gene, die für die Shmoo-Bildung verantwortlich sind, hochreguliert sind.

5.1.6 Bewertung des Genexpressionssystems und Ausblick

Das in dieser Arbeit entwickelte Tetrazyklin-induzierbare Genexpressionssystem ist eine sehr nützliche Methode, um die Funktion von Genen in *C. albicans* zu untersuchen und das Verhalten sowie die Eigenschaften der verschiedenen morphologischen Formen dieses Organismus zu manipulieren. Was noch zur Optimierung dieses Systems untersucht werden kann, ist die Analyse des Expressionsgrades von rtTA in Abhängigkeit von den Wachstumsphasen und unter unterschiedlichen Wachstumsbedingungen in Anwesenheit von Doxyzyklin.

5.2 Funktionelle Charakterisierung des globalen Transkriptionsrepressors Tup1 in *C. albicans* *MTL α* -Stamm WO-1

In heterozygoten *MTLa/MTL α -C. albicans*-Stämmen wird das Switching in die opaque-Phase durch den *Mtla1/ α 2*-Repressorkomplex blockiert. Es ist jedoch bis jetzt nicht bekannt, wie in *MTL*-homozygoten Zellen das white-opaque-Switching, das ja nur in einer Frequenz von ca. 10^{-3} auftritt, kontrolliert wird. Ein Studie zeigte, dass die Histondeacetylasen *Hda1* und *Rdp3* eine Rolle beim Aufrechterhalten des semi-stabilen Zustandes der white- und opaque-Phase spielen, da *hda1 Δ* -Mutanten ein erhöhtes Switching von der white- zur opaque-Phase und *rfd3 Δ* -Mutanten ein erhöhtes Switching in beide Richtungen zeigten (Srikantha *et al.*, 2001). Trotzdem bleibt der Masterregulator unbekannt, der das Switchingereignis induziert.

Da der globale Transkriptionsrepressor Tup1 das filamentöse Wachstum des *MTLa/ α* -heterozygoten *C. albicans*-Stammes SC5314 reguliert (Braun and Johnson, 1997a), schien es möglich, dass Tup1 auch bei der Kontrolle des Switchings von der white- zur opaque-Phase beteiligt sein kann. Zudem reguliert der Tup1-Ssn6-Repressorkomplex in *S. cerevisiae* durch spezifische Bindung an die DNA-Bindungsproteine α 2/Mcm1 oder **a**1/ α 2 die Expression der **a**-spezifischen Gene in **a**-Zellen bzw. der haploid-spezifischen Gene in diploiden **a**/ α -Zellen (Komachi *et al.*, 1994; Smith and Johnson, 2000). In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb untersucht, ob Tup1 das white-opaque-Switching reguliert, welches nur in *MTLa*- oder *MTL α* -homozygoten Stämmen vorkommt. Zu diesem Zweck wurde das *TUP1*-Gen im *MTL α* -homozygoten Stamm WO-1 deletiert, der als Modell für die Untersuchung des white-opaque-Switchings verwendet wird.

5.2.1 Zell- und Koloniemorphologie der *tup1Δ*-Mutanten

Ähnlich wie die bereits hergestellten *tup1Δ*-Mutanten des *MTLa/α*-heterozygoten Stammes SC5314, die nicht in der Hefeform wachsen können und ausschließlich nur filamentöse Zellen bilden (Braun and Johnson, 1997b), beeinflusste die Deletion von *TUP1* die Zell- und Koloniemorphologie des Stammes WO-1 stark. Während die heterozygoten *TUP1/tup1*-Mutanten und die Komplementanten genauso wie die Wildtypstämme WO-1 und WUM5A zwischen white- und opaque-Zellen switchen konnten, zeigten die *tup1Δ*-Mutanten weder die white- noch die opaque-Morphologie ihres Elternstammes WO-1. Stattdessen bildeten sie vier verschiedene, semi-stabile Zell- und Kolonieförmungen, die leicht voneinander unterscheidbar waren. Ähnliche Ergebnisse wurden vor kurzem auch von Zhao *et al.* berichtet, die *tup1Δ*-Mutanten aus einem anderen auxotrophen Derivat des Stammes WO-1 konstruierten (Zhao *et al.*, 2002). Allerdings waren die Phänotypen der *tup1Δ*-Varianten, die in deren Studien als „fuzzy large“, „fuzzy small“, „smooth“ und „revertant fuzzy“ bezeichnet wurden, nicht vollkommen identisch zu denen, die in dieser Arbeit bei den Mutanten beobachtet wurden. Deswegen wurden etwas unterschiedliche Namen, nämlich „fuzzy“, „frizzy“, „wrinkled“ und „smooth“ verwendet, um eine Verwechslung zu vermeiden.

Ein wichtiger Unterschied zwischen den Ergebnissen von Zhao *et al.* und dieser Arbeit betrifft die Rolle von *TUP1* in der Regulation des Switchings. Die *tup1Δ*-Mutanten von Zhao *et al.* hatten die Fähigkeit zum reversiblen Switching zwischen den verschiedenen Phasen verloren und zeigten nur ein begrenztes, unidirektionales Switching in drei („fuzzy large“ → „fuzzy small“ → „smooth“ → „revertant fuzzy“) oder zwei Schritten („fuzzy large“ → „smooth“ → „revertant fuzzy“). Aus diesen Ergebnissen schlossen Zhao *et al.*, dass *TUP1* nicht nur für die Aufrechterhaltung der normalen Morphologie der Zellen notwendig ist, sondern auch essentiell für das reversible Switching zwischen verschiedenen Phasen. Im Gegensatz dazu konnten die *tup1Δ*-Mutanten dieser Arbeit reversibel zwischen vier Phänotypen switchen, was beweist, dass *TUP1* das Switchingereignis nicht kontrolliert. Obwohl weder die Morphologie noch das Genexpressionsmuster der vier Phasenvarianten der *tup1Δ*-Mutanten dem von white- oder opaque-Zellen entsprachen, enthielt das phänotypische Switching der *tup1Δ*-Mutanten außerdem einen wichtigen Aspekt des white-opaque-Switchings, nämlich die Fähigkeit Mating-kompetente Zellen zu generieren.

5.2.2 Expression der phasenspezifischen Gene in *tup1Δ*-Mutanten

Die *TUP1*-Deletion beeinflusste auch die normale Regulation der phasenspezifischen Gene. Das white-spezifische Gen *WH11* wurde in allen vier Phänotypvarianten der *tup1Δ*-Mutanten

stark exprimiert. Allerdings wurde weder in den Untersuchungen von Srikantha *et al.* (Srikantha *et al.*, 1997; Srikantha *et al.*, 2000) noch in dieser Arbeit eine *WH11*-Expression in aus white-Zellen des *MTL α* -homozygoten Stammes WO-1 induzierten filamentösen Zellen beobachtet. Das opaque-spezifische *SAP1*-Gen, dessen Expression in Hyphenzellen bis jetzt noch nicht beobachtet wurde, wurde auch in keiner der vier Varianten der *tup1 Δ* -Mutanten detektierbar exprimiert. Aber ein zweites opaque-spezifisches Gen, *OP4*, wurde auf niedrigem Niveau in allen vier Phänotypvarianten exprimiert. Dies weist darauf hin, dass das Genexpressionsmuster der verschiedenen Varianten weder dem von white-Phase-Zellen noch dem von opaque-Phase-Zellen des Ausgangsstammes entspricht. *TUP1* scheint daher an der normalen Regulation dieser Gene beteiligt zu sein. Dass die Expression der phasenspezifischen Gene in den *tup1 Δ* -Mutanten dereguliert ist, ist nicht überraschend, da Tup1 ein genereller Repressor ist, der in *C. albicans* die Expression vieler Gene kontrolliert (Murad *et al.*, 2001). Außerdem wurden Bindungsstellen für Regulatorproteine (z.B. Mcm1), die in *S. cerevisiae* den Tup1-Ssn6-Korepressorkomplex an die Promotorregion reprimierter Gene rekrutieren, in der upstream-Region des opaque-spezifischen *OP4*-Gens identifiziert (Lockhart *et al.*, 1998). Eine deregulierte Expression von white- und opaque-spezifischen Genen in *tup1 Δ* -Mutanten wurde auch von Zhao *et al.* gefunden (Zhao *et al.*, 2002), wobei es allerdings einige Unterschiede in der Expression der Gene *WH11*, *SAP1* und *OP4* in den vier Phänotypen „fuzzy large“, „fuzzy small“, „smooth“ und „revertant fuzzy“ und den vier Phasenvarianten der in dieser Arbeit hergestellten *tup1 Δ* -Mutanten gab, die möglicherweise auf die morphologischen Unterschiede zurückzuführen sind.

5.2.3 Matingkompetenz der *tup1 Δ* -Mutanten

Obwohl die *tup1 Δ* -Mutanten keine opaque-Zellen bilden konnten, waren die drei filamentösen Phasenvarianten „fuzzy“, „frizzy“ und „wrinkled“ fähig, effizient mit opaque-Zellen des alternativen Paarungstyps zu maten. Somit waren sie in dieser Hinsicht den Matingkompetenten opaque-Zellen des wildtypischen Ausgangsstammes ähnlich. Allerdings war die Matingeffizienz geringer als bei opaque-Zellen. Dagegen konnten die Zellen der „smooth“-Variante nicht maten, so wie white-Zellen des Ausgangsstammes.

Warum die Deletion von *TUP1* in der „smooth“-Phasenvariante kein filamentöses Wachstum bewirkte, ist unklar. Eine mögliche Erklärung wäre eine veränderte Expression oder Aktivität von anderen Faktoren, die das filamentöse Wachstum kontrollieren, in dieser Phasenvariante. In frühere Arbeiten wurde gezeigt, dass die zusätzliche Deletion des Transkriptionsfaktors *EFG1* in *tup1 Δ* -Mutanten des *MTL α* -heterozygoten Stammes SC5314 den Übergang von

konstitutiv filamentösem Wachstum zum Wachstum in Hefeform ermöglichte (Braun and Johnson, 2000). Es wäre deshalb interessant, den Effekt einer *EFG1*-Deletion in *tup1Δ*-Mutanten des *MTLα*-homozygoten Stammes WO-1 zu untersuchen. Außerdem könnte man die Expression von am Hyphenwachstum oder am Mating beteiligten Transkriptionsfaktoren oder Co-repressoren in den vier unterschiedlichen Phänotypen der *tup1Δ*-Mutanten vergleichen. Beispielsweise kann man die Expression der Gene, die an dem das Pheromonsignal übertragenden MAPK-Signalweg beteiligt sind (Chen *et al.*, 2002) und gleichzeitig unter bestimmten Bedingungen beim filamentösen Wachstum eine wichtige Rolle spielen (Liu *et al.*, 1994a) untersuchen. All dies könnte weitere Informationen liefern, warum die *tup1Δ*-Mutanten auch in der smooth-Form wachsen konnten und warum nur die filamentösen Zellen der *tup1Δ*-Mutanten die Matingfähigkeit erhalten haben. Chen *et al.* (2002) zeigten, dass die Überexpression des Transkriptionsfaktors *CPH1* der MAPK-Kaskade in *MTL*-homozygoten Stämmen eine hohe Matingeffizienz und eine Aktivierung der Pheromonresponse-Gene *FUS1* und *FIG1* zur Folge hat. Dann wäre es möglich, dass diese Gene in den filamentösen Phänotypen der *tup1Δ*-Mutanten genauso wie während der Überexpression von *CPH1* hochreguliert werden, da dort die Tup1-vermittelte Repression fehlt und somit das Tup1 epistatisch von Cph1 abhängt (Braun and Johnson, 1997a). Um dies zu testen, wurde eine Analyse der Expression des *FUS1*- und *FIG1*-Gens mittels Northern-Hybridisierung in allen drei filamentösen Phänotypen der *tup1Δ*-Mutanten und während des Kontrollmatings zwischen wildtypischen α - und α -Zellen durchgeführt. Die Expression des *FUS1*- und *FIG1*-Gens konnte weder in den drei filamentösen Phänotypen der *tup1Δ*-Mutanten noch während des Kontrollmatings detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Deshalb konnte durch dieses Experiment keine Aussage darüber getroffen werden, ob es zu einer erhöhten Aktivierung der MAPK-Kaskade in den filamentösen Phänotypen der *tup1Δ*-Mutanten gekommen ist. Deshalb kommen andere Gene, die während des Matings durch die Aktivierung der MAPK-Kaskade hochreguliert werden, in Frage, um deren Überexpression in filamentösen *tup1Δ*-Mutanten zu testen.

Obwohl die Expression der phasenspezifischen Gene *WH11*, *OP4* und *SAP1* in allen vier Varianten der *tup1Δ*-Mutanten in gleicher Weise verändert war, behielten nur die drei filamentösen Phasenvarianten „fuzzy“, „frizzy“ und „wrinkled“ die Matingfähigkeit mit *MTLa*-opaque-Zellen bei. Aus dieser Beobachtung kann geschlossen werden, dass die *tup1Δ*-Mutanten immer noch die Expression der Faktoren, die für das Mating in einer α -spezifischen Weise benötigt werden, in ausreichender Weise regulieren können. Dies betrifft Gene, die

direkt durch den $a1/\alpha2$ -Repressorkomplex, über das white-opaque-Switching oder durch das **a**-Pheromon reguliert werden (Tsong *et al.*, 2003). Außerdem wird dadurch ebenfalls deutlich, dass Tup1 nicht essentiell für die Regulation von vielen Aktivitäten ist, die mit dem Switching und dem Mating von *C. albicans* in Verbindung stehen. Allerdings war die Matingeffizienz von *tup1* Δ -Mutanten im Vergleich zu der des wildtypischen Ausgangsstamm deutlich reduziert, was auf die veränderte Expression von Genen, die für das Mating benötigt werden, und/oder die veränderte Morphologie der Zellen zurückzuführen sein könnte.

Worauf die phänotypischen Unterschiede der von Zhao *et al.* und der in dieser Arbeit konstruierten *tup1* Δ -Mutanten beruhen, ist unbekannt. Da die Mutanten in beiden Fällen aus dem Stamm WO-1 konstruiert wurden, kommen die Unterschiede wahrscheinlich durch unbekannte, unspezifische Mutationen zu Stande. Die Mutanten von Zhao *et al.* könnten eine Mutation enthalten, die in nur Kombination mit der *TUPI*-Deletion das reversible Switching zwischen den Phasenvarianten verhindert. Aber es ist auch möglich, dass die in dieser Arbeit hergestellten *tup1* Δ -Mutanten eine kompensatorische Mutation enthalten, die einen durch die *TUPI*-Deletion verursachten Defekt im Switching zwischen allen Phänotypen aufhebt. Eine solche Mutation müsste in diesem Fall dann bereits im Ausgangsstamm WUM5A vorhanden sein, weil die beiden unabhängig hergestellten Serien von *tup1* Δ -Mutanten gleiche Phänotypen zeigten. Auch die *ura3*-Mutante WUM5A wurde aus dem Wildtypstamm WO-1 durch gezielte Gendeletion konstruiert (Strauß *et al.*, 2001). Dagegen wurde der auxotrophe Ausgangsstamm für die von Zhao *et al.* konstruierten *tup1* Δ -Mutanten erhalten, indem zunächst ein *ade2*-negatives Derivat des Stammes WO-1 durch unspezifische, chemische Mutagenese generiert wurde und anschließend die beiden *URA3*-Allele deletiert wurden, wobei vermutlich noch eine mitotische Rekombination involviert war, was zum Verlust heterozygoter Bereiche des entsprechenden Chromosoms führt. Außerdem basiert das Marker-Recycling bei der *URA*-Blaster-Strategie, die für die Deletion von *TUPI* von Zhao *et al.* verwendet wurde, auf der negativen Selektion mit FOA (5-fluoro-orotic acid), das selbst ein Mutagen ist (Wellington and Rustchenko, 2005) und das bei der in dieser Arbeit verwendeten *URA3*-Flipping-Strategie nicht benötigt wird (Morschhäuser *et al.*, 1999). Unabhängig von den Unterschieden bei der Stammkonstruktion kann die Möglichkeit einer spontanen Mutation während der Kultivierung des Stammes WO-1 in den beiden Labors nicht ausgeschlossen werden. Unabhängig von den Ursachen für die phänotypischen Unterschiede der *tup1* Δ -Mutanten zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass in einem geeigneten

genetischen Hintergrund *MTL*-homozygote *C. albicans*-Stämme in filamentöse Formen switchen können, die sich von normalen Hyphen und Pseudohyphen dadurch unterscheiden, dass sie sich mit einem Matingpartner des alternativen Paarungstyps paaren können, was normalerweise ein charakteristisches Merkmal von opaque-Zellen ist. Zumindest gilt dies für den in dieser Arbeit verwendeten *MTL* α -Stamm WO-1, aber es ist zu vermuten, dass das gleiche Ergebnis auch bei *MTLa*-Stämmen erhalten würde. In dieser Hinsicht ist auch die von Legrand *et al.* vor kurzem gemachte Beobachtung, dass einige homozygote *MTLa*- oder *MTL* α -*C. albicans*-Isolate maten konnten, obwohl keine opaque-förmigen Zellen gefunden wurden (Legrand *et al.*, 2004). Dies bestätigt ebenfalls die Annahme, dass *C. albicans* in manchen genetischen Hintergründen in eine Mating-kompetente Form switchen kann ohne die opaque-Zellmorphologie auszubilden.

Zusammengefasst unterstützen die Ergebnisse dieser Arbeit nicht die Theorie, dass Tup1 eine entscheidende Rolle bei der Regulation des Switchingvorgangs spielt (Liu *et al.*, 1994b; Zhao *et al.*, 2002). Obwohl *TUP1* sowohl in *MTL* α -Zellen als auch in *MTLa*/ α -Zellen eine wichtige Funktion bei der Kontrolle der Zellmorphologie und der Genexpression ausübt, können *tup1* Δ -Mutanten des *MTL* α -Stammes WO-1 immer noch reversibel zu einem Mating-kompetenten Zelltyp switchen und mit einem Matingpartner des alternativen Paarungstyps maten.

5.3 Charakterisierung der phasenspezifischen Gene *WH11* und *OP4* im *MTL* α -homozygoten *C. albicans*-Stamm WO-1

5.3.1 Charakterisierung des white-phasenspezifischen Gens *WH11* im *C. albicans*-Stamm WO-1

Frühere Arbeiten hatten vermuten lassen, dass das white-phasenspezifische Gen *WH11* wichtig für den Erhalt der rund-ovalen Zellmorphologie von white-Zellen ist und bei der Kontrolle der Switchingfrequenz zwischen den white- und opaque-Phasen eine Rolle spielt (Kvaal *et al.*, 1997). Deswegen wurde erwartet, dass die Deletion von *WH11*, dessen Genprodukt Homologie zu dem niedermolekularen Hitzeschock-Protein Hsp12 von *S. cerevisiae* aufweist, einen Defekt im white-opaque-Switching verursachen würde und die Funktion dieses Gens mit Hilfe der *wh11* Δ -Mutanten aufgeklärt werden könnte. Die phänotypische Analyse der in dieser Arbeit hergestellten *wh11* Δ -Mutanten des Stammes WO-1 zeigte jedoch, dass die Deletion des *WH11*-Gens weder die phasenspezifische Zell- und Kolonimorphologie noch die Expression der getesteten phasenspezifischen Gene oder die

Switchingfrequenz beeinflusste. Obwohl *WH11* spezifisch nur in white-Zellen aktiviert wird, konnte aus den in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnissen nicht abgeleitet werden, dass Wh11 für das phänotypische Switching notwendig ist, sondern dass dieses Protein andere Funktionen in white-Zellen zu haben scheint, die nach dem Switching in die opaque-Phase nicht mehr benötigt werden. Allerdings kann die Möglichkeit nicht ausgeschlossen werden, dass *WH11* funktionell redundant mit einem anderen Gen sein könnte, das dessen Rolle in den Deletionsmutanten zumindest teilweise übernimmt.

Die Beobachtung von Kvaal *et al.* (Kvaal *et al.*, 1997), dass eine künstliche Expression von *WH11* in der opaque-Phase eine stark erhöhte Switchingfrequenz dieser Zellen zur white-Phase bewirkte, weist darauf hin, dass die *WH11*-Expression von opaque-Zellen nicht toleriert wird. Dies könnte der Grund sein, warum dessen Expression in opaque-Zellen unterdrückt wird. Eine Studie, in der die Transkriptionsprofile von white- und opaque-Zellen miteinander verglichen wurden, zeigte, dass eine große Zahl von Genen mit sehr unterschiedlichen, u.a. metabolischen Funktionen in diesen zwei Zelltypen differentiell reguliert wird (Lan *et al.*, 2002). Es ist deshalb vorstellbar, dass viele phasenspezifische Gene, einschließlich *WH11*, eine Rolle in der Adaptation von white- und opaque-Zellen an spezielle Umweltbedingungen haben, aber für die Expression und Aufrechterhaltung der phasenspezifischen Zellmorphologie und für das phänotypische Switching nicht benötigt werden.

5.3.2 Charakterisierung des opaque-phasenspezifischen Gens *OP4* im *C. albicans*-Stamm WO-1

Das *OP4*-Gen scheint spezifisch für *C. albicans* zu sein, da sich in Datenbanken keine Homologien auf Basis von DNA- und Aminosäure-Sequenzen finden (Lockhart *et al.*, 1998). Da auch das white-opaque-Switching nur in *C. albicans* (und der eng verwandten Spezies *C. dubliniensis*) beobachtet wurde, lag die Vermutung nahe, dass *OP4* eine wichtige Funktion beim white-opaque-Switching bzw. bei der Ausprägung des spezifischen Phänotyps von opaque-Zellen hat. Die Analyse der in dieser Arbeit hergestellten *op4Δ*-Mutanten des Stammes WO-1 zeigte, dass die Deletion von *OP4* weder die Zellmorphologie noch die Expression der getesteten phasenspezifischen Gene oder das Switching selbst beeinflusst. Außerdem war *OP4* für das Mating von *C. albicans* nicht essentiell, was eine spezifische Eigenschaft der opaque-Zellen von *C. albicans* ist. Aber es gab einige interessante Beobachtungen bei der Analyse der *op4Δ*-Mutanten. Die opaque-Zellen der *op4Δ*-Mutanten zeigten ein verlangsamtes Wachstum vor allem auf bzw. in Lee's Medium bei niedrigen Temperaturen. Dieses Phänomen war auf Lee's Medium bei höheren Temperaturen nicht

festzustellen. Daraus lässt sich ableiten, dass Op4 für das Wachstum der opaque-Zellen unter bestimmten Bedingungen benötigt wird. Es ist möglich, dass Op4 besonders bei niedrigen Temperaturen (18°C-25°C) eine Funktion als Chaperon ausübt. Außerdem führt der zusätzliche Koloniephänotyp der *op4Δ*-Mutanten mit samtartiger Oberfläche, der spontan von opaque-Kolonien entwickelt wurde, zu einer weiteren Möglichkeit in der Regulation der phänotypischen Morphologie.

Außerdem bildeten die *op4Δ*-Mutanten nur hell rosafarbene opaque-Kolonien auf Lee's Medium mit Phloxin B, anders als der wildtypische Stamm WO-1 und die Komplementanten, die intensiv rosafarbene opaque-Kolonien bildeten. Es wurde nun vor kurzem von Silver *et al.* nachgewiesen, dass die Aufnahme des lipophilen Farbstoffs Phloxin B in *upc2Δ*-Mutanten deutlich vermindert war. Weiterhin war die Hochregulierung der bei der Ergosterol-Biosynthese beteiligten Gene von *C. albicans*, *ERG2* und *ERG11*, durch die Deletion von *UPC2* geblockt (Silver *et al.*, 2004). Die opaque-Zellen der *op4Δ*-Mutanten zeigten eine ähnlich verminderte Aufnahme des Farbstoffs Phloxin B, was ebenfalls auf eine veränderte Zusammensetzung der Zellmembran wie bei den *upc2Δ*-Mutanten zurückzuführen sein könnte. Falls diese Hypothese richtig ist, dann könnte die Sensitivität von opaque-Zellen der *op4Δ*-Mutanten gegenüber Azol-Antimykotika verändert sein. Deswegen wurden ein MHK-Test mit Fluconazol und ein Membransensibilitätstest gegenüber SDS, das als Tensid direkt die Lipiddoppelschicht der Membran angreift, durchgeführt. Aber die *op4Δ*-Mutanten zeigten keine erhöhte Sensitivität gegenüber Fluconazol oder SDS, was indirekt nicht auf eine Veränderung der Membranzusammensetzung bei den *op4Δ*-Mutanten hinweist. Zusätzlich wurde eine mögliche Toxizität von Phloxin B auf opaque-Zellen von *C. albicans* in dieser Arbeit anhand des MHK-Tests überprüft, wobei keine toxische Wirkung auf Zellen des Wildtyps und der *op4Δ*-Mutanten festgestellt wurde. Derzeit ist noch nicht bekannt, wie der Farbstoff Phloxin B in die Zellen aufgenommen wird. Die Kenntnis darüber würde eine gezielte Charakterisierung des *OP4*-Gens bei den *op4Δ*-Mutanten erleichtern, da diese eine verringerte Aufnahme zeigten. Ob dieser Phänotyp im Zusammenhang mit dem verlangsamten Wachstum oder mit einer Veränderung der Membranzusammensetzung steht, bleibt trotz alledem unklar.

Hinweise auf einen unterschiedlichen Metabolismus von white- und opaque-Zellen ergaben sich durch globale Genexpressionsanalysen mit Hilfe von DNA-Microarrays (Lan *et al.*, 2002). Diese Experimente zeigten, dass in der white-Phase vor allem Gene des fermentativen Metabolismus angeschaltet wurden und in der opaque-Phase solche, die beim oxidativen Metabolismus eine Rolle spielen. Die spontane Ausbildung der Kolonien mit samtartiger

Oberfläche war oft zu beobachten, wenn die opaque-Zellen der *op4Δ*-Mutanten unter Sauerstoff limitierten Wachstumsbedingungen, z.B. auf mit Parafilm umwickelten Platten oder im Inkubator mit 5% CO₂, inkubiert wurden. Deswegen wurde untersucht, ob die *op4Δ*-Mutanten den Wechsel der opaque-Zellen in die andere Morphologie unter Wachstumsbedingungen eingehen, in denen eher das respiratorische Wachstum der Zellen hervorgerufen werden kann. Dafür wurden die Zellen der *op4Δ*-Mutanten und der Kontrollstämme auf Lee's Agarplatten mit 2% Glycerin anstatt 1,25% Glucose als einzige Kohlenstoffquelle unter unterschiedlichen Wachstumsbedingungen inkubiert. Die opaque-Kolonien aller Stämme waren viel kleiner als die white-Kolonien und bei den *op4Δ*-Mutanten war kein morphologischer Wechsel erkennbar. Dies weist darauf hin, dass die opaque-Zellen unabhängig von *OP4* bei diesen Bedingungen, unter denen das respiratorische Wachstum gefördert wird, nicht gut wachsen können. Dieses Ergebnis passt nicht zur Hypothese, dass opaque-Zellen eher an einen oxidativen Metabolismus angepasst sind. Es könnte aber darauf zurückgeführt werden, dass das *ADHI*-Gen in der opaque-Phase weniger stark exprimiert wird als in der white-Phase. Es ist bekannt, dass der Expressionsgrad von *ADHI* einen starken Einfluss auf das Wachstum von *C. albicans* auf unterschiedlichen Kohlenstoffquellen hat (Bertram *et al.*, 1996). In jedem Fall weist auch diese Beobachtung darauf hin, dass white- und opaque-Zellen unterschiedlich gut an spezifische Umweltbedingungen angepasst sind und das Switching eine bessere Adaptation an verschiedene Wirtsnischen ermöglicht.

Um zusätzliche Erkenntnisse über die Funktion von Op4 zu erhalten, wurde versucht, die Lokalisation des Op4-Proteins in der Zelle zu bestimmen. Zwar exprimierten opaque-Zellen, die eine *OP4-GFP* bzw. eine *OP4-3xHA*-Fusion trugen, jeweils Fusionsproteine der erwarteten Größe, und das Op4-Gfp-Fusionsprotein konnte im Zytosol und auch im Zellkern detektiert werden. Die Fusionsproteine konnten jedoch nicht den Wachstumsdefekt der *op4Δ*-Mutanten bei niedrigen Temperaturen komplementieren und waren deshalb nicht funktionell. Deshalb ist es möglich, dass ihre Lokalisation nicht mit der des normalen Op4-Proteins übereinstimmt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass *OP4* eine unbekannte Funktion in opaque-Zellen von *C. albicans* hat, die nicht im Zusammenhang mit dem phänotypischen Switching und den bekannten spezifischen Eigenschaften der opaque-Zellen steht, die jedoch wichtig für das normale Wachstum von opaque-Zellen bei niedrigen Temperaturen ist.

Die white- bzw. opaque-phasenspezifischen Gene *WH11* und *OP4*, deren funktionelle Charakterisierung beim white-opaque Switching in dieser Arbeit untersucht wurde, gehören

zu den mittlerweile über 400 bekannten phasenspezifisch exprimierten Genen, die wahrscheinlich als Folge des Switchingereignisses in der white- bzw. opaque-Phase aktiviert werden. Die genaue Funktion der beiden Gene konnte in dieser Arbeit nicht aufgeklärt werden. Trotzdem konnten einige wichtige Informationen gewonnen werden, die das Verständnis des white-opaque-Switching von *C. albicans* erweitern. Von zentralem Interesse ist immer noch die Aufklärung des molekularen Mechanismus, über den das Switching von der white- zur Mating-kompetenten opaque-Phase induziert wird. Die Identifizierung von Bedingungen, die das white-opaque-Switching auslösen, und die Charakterisierung der daran beteiligten Signaltransduktionswege wäre ein wichtiger Schritt, um die Regulation des Switchings und seine Bedeutung für die Biologie und Pathogenität von *C. albicans* besser zu verstehen.

6 Literaturverzeichnis

- Albrecht, A., Felk, A., Pichova, I., Naglik, J.R., Schaller, M., de Groot, P., Maccallum, D., Odds, F.C., Schafer, W., Klis, F., Monod, M. and Hube, B. (2006) Glycosylphosphatidylinositol-anchored proteases of *Candida albicans* target proteins necessary for both cellular processes and host-pathogen interactions. *J Biol Chem*, **281**, 688-694.
- Ausubel, F., Brent, R., Kingston, R., D., M., J., S., Smith, J. and Struhl, K. (1989) *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley&Sons, New York.
- Backen, A.C., Broadbent, A.D., Fetherston, R.W., Rosamond, J.D., Schnell, N.F. and Stark, M.J. (2000) Evaluation of the *CaMAL* promoter for regulated expression of genes in *Candida albicans*. *Yeast*, **16**, 1121-1129.
- Balan, I., Alarco, A.M. and Raymond, M. (1997) The *Candida albicans* *CDR3* gene codes for an opaque-phase ABC-transporter. *J Bacteriol*, **179**, 7210-7218.
- Baron, U., Gossen, H. and Bujard, H. (1997) Tetracycline-controlled transcription in eukaryotes: novel transactivators with graded transactivation potential. *Nucl Acids Res*, **25**, 2723-2729.
- Bedell, G.W. and Soll, D.R. (1979) Effects of low concentrations of zinc on the growth and dimorphism of *Candida albicans*: evidence for zinc-resistant and -sensitive pathways for mycelium formation. *Infect Immun*, **26**, 348-354.
- Bennett, R.J. and Johnson, A.D. (2003) Completion of a parasexual cycle in *Candida albicans* by induced chromosome loss in tetraploid strains. *Embo J*, **22**, 2505-2515.
- Bennett, R.J. and Johnson, A.D. (2005) Mating in *Candida albicans* and the search for a sexual cycle. *Annu Rev Microbiol*, **59**, 233-255.
- Bennett, R.J., Miller, M.G., Shau, P.R., Maxon, M.E. and Johnson, A.D. (2005) Nuclear fusion occurs during mating in *Candida albicans* and is dependent on the *KAR3* gene. *Mol. Microbiol.*, **55**, 1046-1059.
- Bennett, R.J., Uhl, M.A., Miller, M.G. and Johnson, A.D. (2003) Identification and characterization of a *Candida albicans* mating pheromone. *Mol Cell Biol*, **23**, 8189-8201.
- Berman, J. and Sudbery, P.E. (2002) *Candida albicans*: a molecular revolution built on lessons from budding yeast. *Nat Rev Genetics*, **3**, 918-930.
- Bertram, G., Swoboda, R.K., Gooday, G.W., Gow, N.A. and Brown, A.J. (1996) Structure and regulation of the *Candida albicans* *ADH1* gene encoding an immunogenic alcohol dehydrogenase. *Yeast*, **12**, 115-127.
- Birnboim, H.C. and Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*, **7**.

- Biswas, K. and Morschhauser, J. (2005) The Mep2p ammonium permease controls nitrogen starvation-induced filamentous growth in *Candida albicans*. *Mol Microbiol*, **56**, 649-669.
- Biswas, K., Rieger, K.J. and Morschhäuser, J. (2003) Functional characterization of *CaCBF1*, the *Candida albicans* homolog of centromere binding factor 1. *Gene*, **323**, 43-55.
- Braun, B.R., Head, W.S., Wang, M.X. and Johnson, A.D. (2000) Identification and characterization of *TUP1*-regulated genes in *Candida albicans*. *Genetics*, **156**, 31-44.
- 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. and Johnson, A.D. (2000) *TUP1*, *CPH1* and *EFG1* make independent contributions to filamentation in *Candida albicans*. *Genetics*, **155**, 57-67.
- Braun, B.R., Kadosh, D. and Johnson, A.D. (2001) *NRG1*, a repressor of filamentous growth in *C. albicans*, is down-regulated during filament induction. *Embo J*, **20**, 4753-4761.
- Brown, A.J. and Gow, N.A. (1999) Regulatory networks controlling *Candida albicans* morphogenesis. *Trends Microbiol*, **7**, 333-338.
- Calderone, R.A. and Fonzi, W.A. (2001) Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends Microbiol*, **9**, 327-335.
- Care, R.S., Trevethick, J., Binley, K.M. and Sudbery, P.E. (1999) The *MET3* promoter: a new tool for *Candida albicans* molecular genetics. *Mol Microbiol*, **34**, 792-798.
- Chen, J., Chen, J., Lane, S. and Liu, H. (2002) A conserved mitogen-activated protein kinase pathway is required for mating in *Candida albicans*. *Molecular Microbiology*, **46**, 1335-1344.
- Colina, A.R., Aumont, F., Deslauriers, N., Belhumeur, P. and de Repentigny, L. (1996) Evidence for degradation of gastrointestinal mucin by *Candida albicans* secretory aspartyl proteinase. *Infect Immun*, **64**, 4514-4519.
- Cormack, B.P., Bertram, G., Egerton, M., Gow, N.A., Falkow, S. and Brown, A.J. (1997) Yeast-enhanced green fluorescent protein (yEGFP) a reporter of gene expression in *Candida albicans*. *Microbiology*, **143**, 303-311.
- Cowen, L.E., Nantel, A., M.S., W., Thomas, D.Y., D.C., T., Kohn, L.M. and Anderson, J.B. (2002) Population genomics of drug resistance in *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci USA*, **99**, 9284-9289.
- Csank, C., Makris, C., Meloche, S., Schroppel, K., Rollinghoff, M., Dignard, D., Thomas, D.Y. and Whiteway, M. (1997) Derepressed hyphal growth and reduced virulence in a *VH1* family-related protein phosphatase mutant of the human pathogen *Candida albicans*. *Mol Biol Cell*, **8**, 2539-2551.

- Csank, C., Schröppel, K., Leberer, E., Harcus, D., Mohamed, O., Meloche, S., Thomas, D.Y. and Whiteway, M. (1998) Roles of the *Candida albicans* mitogen-activated protein kinase homolog, Cek1p, in hyphal development and systemic candidiasis. *Infect Immun*, **66**, 2713-2721.
- Cutler, J.E. (1991) Putative virulence factors of *Candida albicans*. *Annu Rev Microbiol*, **45**, 187-218.
- Daniels, K.J., Lockhart, S.R., Staab, J.F., Sundstrom, P. and Soll, D.R. (2003) The adhesin Hwp1 and the first daughter cell localize to the a/a portion of the conjugation bridge during *Candida albicans* mating. *Mol Biol Cell*, **14**, 4920-4930.
- D'Antonio, D., Violante, B., Mazzoni, A., Bonfini, T., Capuani, M.A., D'Aloia, F., Iacone, A., Schioppa, F. and Romano, F. (1998) A nosocomial cluster of *Candida inconspicua* infections in patients with hematological malignancies. *J Clin Microbiol*, **36**, 792-795.
- De Backer, M.D., Magee, P.T. and Pla, J. (2000) Recent developments in molecular genetics of *Candida albicans*. *Annu Rev Microbiol*, **54**, 463-498.
- Degenkolb, J., Takahasci, M., Ellestad, G.A. and Hillen, W. (1991) Structural requirements of tetracycline-Tet repressor interaction: determination of equilibrium binding constants for tetracycline analogs with the Tet repressor. *Antimicrob. Agents Chemother*, **35**, 1591-1595.
- Delbruck, S. and Ernst, J.F. (1993) Morphogenesis-independent regulation of actin transcript levels in the pathogenic yeast *Candida albicans*. *Mol Microbiol*, **10**, 859-866.
- DeRisi, J.L., Iyer, V.R. and Brown, P.O. (1997) Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. *Science*, **278**, 680-686.
- Doebbeling, B.N., Stanley, G.L. and Sheetz, C.T. (1992) Comparative efficacy of alternative hand washing agents in reducing nosocomial infections in intensive care units. *N Engl J Med*, **327**, 88-93.
- Donnelly, J.P., Dralle, H., Ghannoum, M.A., Goldman, M., Hage, C.A., Holzheimer, R.G., Kuhn, D.M., Kullberg, B.J., Maschmeyer, G., Oude Lashof, A.M.L., Ruhnke, M. and Wheat, L.J. (2003) *Mykosen*. Holzapfel Verlag, München.
- Edmondson, D.G., Smith, M.M. and Roth, S.Y. (1996) Repression domain of the yeast global repressor Tup1 interacts directly with histones H3 and H4. *Genes Dev*, **10**, 1247-1259.
- El Barkani, A., Kurzai, O., Fonzi, W.A., Roman, A., Porta, A., Frosch, M. and Muhlschlegel, F.A. (2000) Dominant active alleles of *RIM101* (*PRR2*) bypass the pH restriction on filamentation of *Candida albicans*. *Mol Cell Biol*, **20**, 4635-4647.
- Engelmann, E. (1999) Sproßpilze. In Hahn, H., Falke, D., Kauffman, S. and Ullmann, U. (eds.), *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*. Springer Verlag Berlin Heidelberg, New York, pp. 701-710.
- Ernst, J.F. (2000) Transcription factors in *Candida albicans* - environmental control of morphogenesis. *Microbiology*, **146**, 1763-1774.

- Felk, A., Schafer, W. and Hube, B. (2000) *Candida albicans* secretory aspartic proteinase (*SAP10*) gene. GenBank accession number AF146440.
- Feng, Q., Summers, E., Guo, B. and Fink, G. (1999) Ras signaling is required for serum-induced hyphal differentiation in *Candida albicans*. *J Bacteriol*, **181**, 6339-6346.
- Fonzi, W.A. and Irwin, M.Y. (1993) Isogenic strain construction and gene mapping in *Candida albicans*. *Genetics*, **134**, 717-728.
- Franz, R., Kelly, S.L., Lamb, D.C., Kelly, D.E., Ruhnke, M. and Morschhäuser, J. (1998) Multiple molecular mechanisms contribute to a stepwise development of fluconazole resistance in clinical *Candida albicans* strains. *Antimicrob Agents Chemother*, **42**, 3065-3072.
- Gale, C.A., Bendel, C.M., McClellan, M., Hauser, M., Becker, J.M., Berman, J. and Hostetter, M.K. (1998) Linkage of adhesion, filamentous growth, and virulence in *Candida albicans* to a single gene, *INT1*. *Science*, **279**, 1355-1358.
- Garcia-Sanchez, S., Mavor, A.L., Russell, C.L., Argimon, S., Dennison, P., Enjalbert, B. and Brown, A.J. (2005) Global roles of Ssn6 in Tup1- and Nrg1-dependent gene regulation in the fungal pathogen, *Candida albicans*. *Mol Biol Cell*, **16**, 2913-2925.
- Gari, E., Piedrafita, L., Aldea, M. and Herrero, E. (1997) A set of Vectors with a tetracycline-regulatable promoter system for modulated gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **13**, 837-848.
- Georgopapadakou, N.H. (1998) Antifungals: mechanism of action and resistance, established and novel drugs. *Curr Opin Microbiol*, **1**, 547-557.
- Gerami-Nejad, M., Berman, J. and Gale, C.A. (2001) Cassettes for PCR-mediated construction of green, yellow and cyan fluorescent protein fusion in *Candida albicans*. *Yeast*, **18**, 859-864.
- 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. and 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. and 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, B. and Gorman, J.W. (1991) Repeated use of *GAL1* for gene disruption in *Candida albicans*. *Genetics*, **129**, 19-24.
- Gossen, M. and Bujard, H. (1992) Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 5547-5551.

- Gossen, M., Freundlieb, S., Bender, G., Muller, G., Hillen, W. and Bujard, H. (1995) Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. *Science*, **268**, 1766-1769.
- Gow, N. and Gadd, G.M. (1995) *The Growing Fungus*. Chapman and Hall, London, UK.
- Gow, N.A. (1997) Germ tube growth of *Candida albicans*. *Curr Top Med Mycol*, **8**, 43-55.
- Gow, N.A., Brown, A.J. and Odds, F.C. (2002) Fungal morphogenesis and host invasion. *Curr Opin Microbiol*, **5**, 366-371.
- Hassan, M.T., Schönig, K., Berger, S., Graewe, W. and Bujard, H. (2001) Long-term, noninvasive imaging of regulated gene expression in living mice. *Genesis*, **29**, 116-122.
- Hazan, K.C. (1995) New and emerging yeast pathogens. *Clin Microbiol Res*, **8**, 462-478.
- Hillen, W. and Berens, C. (1994) Mechanisms underlying expression of *Tn10* encoded tetracycline resistance. *Annu Rev Microbiol*, **48**, 345-369.
- Horvath, A. and Riezman, H. (1994) Rapid protein extraction from *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **10**, 1305-1310.
- Hostetter, M.K. (1994) Adhesins and ligands involved in the interaction of *Candida* spp. with epithelial and endothelial surfaces. *Clin Microbiol Rev*, **7**, 29-42.
- Hoyer, L.L. (2001) The *ALS* gene family of *Candida albicans*. *Trends Microbiol*, **9**, 176-180.
- Hube, B., Monod, M., A., S.D., Brown, A.J. and Gow, N.A. (1994) Expression of seven members of the gene family encoding secretory aspartyl proteinases in *Candida albicans*. *Mol Microbiol*, **14**, 87-99.
- Hull, C.M. and Johnson, A.D. (1999) Identification of a mating type-like locus in the asexual pathogenic yeast *Candida albicans*. *Science*, **285**, 1271-1275.
- Hull, C.M., Raisner, R.M. and Johnson, A.D. (2000) Evidence for mating of the "asexual" yeast *Candida albicans* in a mammalian host. *Science*, **289**, 307-310.
- Jones, S., White, G. and Hunter, P.R. (1994) Increased phenotypic switching in strains of *Candida albicans* associated with invasive infections. *J Clin Microbiol*, **32**, 2869-2870.
- Kadosh, D. and Johnson, A.D. (2001) Rfg1, a protein related to the *Saccharomyces cerevisiae* hypoxic regulator Rox1, controls filamentous growth and virulence in *Candida albicans*. *Mol Cell Biol*, **21**, 2496-2505.
- Karababa, M., Coste, A.T., Rognon, B., Bille, J. and Sanglard, D. (2004) Comparison of gene expression profiles of *Candida albicans* azole-resistant clinical isolates and laboratory strains exposed to drugs inducing multidrug transporters. *Antimicrob Agents Chemother*, **48**, 3064-3079.

- Keleher, C.A., Redd, M.J., Schultz, J., Carlson, M. and Johnson, A.D. (1992) Ssn6-Tup1 is a general repressor of transcription in yeast. *Cell*, **68**, 709-719.
- Khalaf, R.A. and Zitomer, R.S. (2001) The DNA binding protein Rfg1 is a repressor of filamentation in *Candida albicans*. *Genetics*, **157**, 1503-1512.
- Klengel, T., Liang, W.J., Chaloupka, J., Ruoff, C., Schroppel, K., Naglik, J.R., Eckert, S.E., Mogensen, E.G., Haynes, K., Tuite, M.F., Levin, L.R., Buck, J. and Muhlschlegel, F.A. (2005) Fungal Adenylyl Cyclase Integrates CO(2) Sensing with cAMP Signaling and Virulence. *Curr Biol*, **15**, 2021-2026.
- Kobayashi, S.D. and Cutler, J.E. (1998) *Candida albicans* hyphal formation and virulence: is there a clearly defined role? *Trends Microbiol*, **6**, 92-94.
- Köhler, G., White, T.C. and 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.
- Köhler, J.R. and Fink, G.R. (1996) *Candida albicans* strains heterozygous and homozygous for mutations in mitogen-activated protein kinase signalling components have defects in hyphal development. *Proc Natl Acad Sci USA*, **93**.
- Komachi, K., Redd, M.J. and Johnson, A.D. (1994) The WD repeats of Tup1 interact with the homeo domain protein alpha 2. *Genes Dev*, **8**, 2857-2867.
- Kumamoto, C.A. and Vines, M.D. (2005) Alternative *Candida albicans* lifestyles: growth on surfaces. *Annu Rev Microbiol*, **59**, 113-133.
- Kvaal, C., Lachke, S.A., Srikantha, T., Daniels, K., McCoy, J. and Soll, D.R. (1999) Misexpression of the opaque-phase-specific gene *PEP1* (*SAP1*) in the white phase of *Candida albicans* confers increased virulence in a mouse model of cutaneous infection. *Infect Immun*, **67**, 6652-6662.
- Kvaal, C.A., Srikantha, T. and Soll, D.R. (1997) Misexpression of the white-phase-specific gene *WH11* in the opaque phase of *Candida albicans* affects switching and virulence. *Infect Immun*, **65**, 4468-4475.
- Lan, C.Y., Newport, G., Murillo, L.A., Jones, T., Scherer, S., Davis, R.W. and Agabian, N. (2002) Metabolic specialization associated with phenotypic switching in *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 14907-14912.
- Lane, S., Zhou, S., Pan, T., Dai, Q. and Liu, H. (2001) The basic helix-loop-helix transcription factor *Cph2* regulates hyphal development in *Candida albicans* partly via Tec1. *Mol Cell Biol*, **21**, 6418-6428.
- Leberer, E., Marcus, D., Broadbent, I.D., Clark, K.L., Dignard, D., Ziegelbauer, K., Schmidt, A., Gow, N.A., Brown, A.J. and Thomas, D.Y. (1996) Signal transduction through homologs of the Ste20p and Ste7p protein kinases can trigger hyphal formation in the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci USA*, **93**.

- Lee, K.L., Buckley, H.R. and 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. and 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.
- Lengeler, K.B., Davidson, R.C., D'Souza, C., Harashima, T., Shen, W.C., Wang, P., Pan, X., Waugh, M. and Heitman, J. (2000) Signal Transduktion cascades regulating fungal development and virulence. *Microbiol Mol Biol Rev*, **64**, 746-785.
- Leuker, C.E., Sonneborn, A., Delbruck, S. and 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.
- Lischewski, A., Ruhnke, M., Tennagen, I., Schonian, G., Morschhauser, J. and Hacker, J. (1995) Molecular epidemiology of *Candida* isolates from AIDS patients showing different fluconazole resistance profiles. *J Clin Microbiol*, **33**, 769-771.
- Liu, H. (2001) Transcriptional control of dimorphism in *Candida albicans*. *Curr Opin Microbiol*, **4**, 728-735.
- Liu, H. (2002) Co-regulation of pathogenesis with dimorphism and phenotypic switching in *Candida albicans*, a commensal and a pathogen. *Int J Med Microbiol*, **292**, 299-311.
- Liu, H., Köhler, J. and Fink, G.R. (1994) Suppression of hyphal formation in *Candida albicans* by mutation of a *STE12* homolog. *Science*, **266**, 1723-1726.
- Lo, H.J., Köhler, J.R., DiDomenico, B., Loebenberg, D., Cacciapuoti, A. and Fink, G.R. (1997) Nonfilamentous *C. albicans* mutants are avirulent. *Cell*, **90**, 939-949.
- Lockhart, S.R., Daniels, K.J., Zhao, R., Wessels, D. and Soll, D.R. (2003a) Cell biology of mating in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell*, **2**, 49-61.
- Lockhart, S.R., Nguyen, M., Srikantha, T. and Soll, D.R. (1998) A MADS box protein consensus binding site is necessary and sufficient for activation of the opaque-phase-specific gene *OP4* of *Candida albicans*. *J Bacteriol*, **180**, 6607-6616.
- Lockhart, S.R., Pujol, C., Daniels, K.J., Miller, M.G., Johnson, A.D., Pfaller, M.A. and Soll, D.R. (2002) In *Candida albicans*, white-opaque switchers are homozygous for mating type. *Genetics*, **162**, 737-745.
- Lockhart, S.R., Zhao, R., Daniels, K.J. and Soll, D.R. (2003b) Alpha-pheromone-induced "shmooing" and gene regulation require white-opaque switching during *Candida albicans* mating. *Eukaryot Cell*, **2**, 847-855.
- Löffler, S. (2001) Etablierung eines Tetrazyklin-abhängigen Genexpressionssystems in *Candida albicans*. *Diplomarbeit*.

- Ma, J. and Ptashne, M. (1987) A new class of yeast transcriptional activators. *Cell*, **51**, 113-119.
- Magee, B.B., Legrand, M., Alarco, A.M., Raymond, M. and 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.
- 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.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F. and Sambrook, J. (1982) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Maschmeyer, G. and Ruhnke, M. (2004) Update on antifungal treatment of invasive *Candida* and *Aspergillus* infections. *Mycoses*, **47**, 263-276.
- Mayser, P., Laabs, S., Heuer, K.U. and Grunder, K. (1996) Detection of extracellular phospholipase activity in *Candida albicans* and *Rhodotorula rubra*. *Mycopathologia*, **135**, 149-155.
- Michel, S., Ushinsky, S., Klebl, B., Leberer, E., Thomas, D., Whiteway, M. and 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, A.P. (1998) Dimorphism and virulence in *Candida albicans*. *Curr Opin Microbiol*, **1**, 687-692.
- Monod, M. and Borg-von Zepelin, M. (2002) Secreted proteinases and other virulence mechanisms of *Candida albicans*. *Chem Immunol*, **81**, 114-128.
- Monod, M., Hube, B., Hess, D. and Sanglard, D. (1998) Differential regulation of *SAP8* and *SAP9*, which encode two new members of the secreted aspartic proteinase family in *Candida albicans*. *Microbiology*, **144 (Pt 10)**, 2731-2737.
- Morrow, B., Srikantha, T., Anderson, J. and Soll, D.R. (1993) Coordinate regulation of two opaque-phase-specific genes during white-opaque switching in *Candida albicans*. *Infect Immun*, **61**, 1823-1828.
- Morrow, B., Srikantha, T. and Soll, D.R. (1992) Transcription of the gene for a pepsinogen, *PEP1*, is regulated by white-opaque switching in *Candida albicans*. *Mol Cell Biol*, **12**, 2997-3005.
- Morschhäuser, J., Michel, S. and 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. and Staib, P. (1999) Sequential gene disruption in *Candida albicans* by FLP-mediated site-specific recombination. *Mol Microbiol*, **32**, 547-556.
- Morschhäuser, J., Virkola, R., Korhonen, T.K. and Hacker, J. (1997) Degradation of human subendothelial extracellular matrix by proteinase-secreting *Candida albicans*. *FEMS Microbiol Lett*, **153**, 349-355.
- Murad, A.M., d'Enfert, C., Gaillardin, C., Tournu, H., Tekaiia, F., Talibi, D., Marechal, D., Marchais, V., Cottin, J. and Brown, A.J. (2001a) Transcript profiling in *Candida albicans* reveals new cellular functions for the transcriptional repressors CaTup1, CaMig1 and CaNrg1. *Mol Microbiol*, **42**, 981-993.
- Murad, A.M., Leng, P., Straffon, M., Wishart, J., Macaskill, S., MacCallum, D., Schnell, N., Talibi, D., Marechal, D., Tekaiia, F., d'Enfert, C., Gaillardin, C., Odds, F.C. and Brown, A.J. (2001b) *NRG1* represses yeast-hypha morphogenesis and hypha-specific gene expression in *Candida albicans*. *Embo J*, **20**, 4742-4752.
- Myers, K.K., Fonzi, W.A. and Sypherd, P.S. (1992) Isolation and sequence analysis of the gene for translation elongation factor 3 from *Candida albicans*. *Nucleic Acids Res*, **20**, 1705-1710.
- Naglik, J., Albrecht, A., Bader, O. and Hube, B. (2004) *Candida albicans* proteinases and host/pathogen interactions. *Cell Microbiol*, **6**, 915-926.
- Naglik, J.R., Challacombe, S.J. and Hube, B. (2003a) *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. *Microbiol Mol Biol Rev*, **67**, 400-428, table of contents.
- Naglik, J.R., Newport, G., White, T.C., Fernandes-Naglik, L.L., Greenspan, J.S., Greenspan, D., Sweet, S.P., Challacombe, S.J. and Agabian, N. (1999) In vivo analysis of secreted aspartyl proteinase expression in human oral candidiasis. *Infect Immun*, **67**, 2482-2490.
- Naglik, J.R., Rodgers, C.A., Shirlaw, P.J., Dobbie, J.L., Fernandes-Naglik, L.L., Greenspan, D., Agabian, N. and Challacombe, S.J. (2003b) Differential expression of *Candida albicans* secreted aspartyl proteinase and phospholipase B genes in humans correlates with active oral and vaginal infections. *J Infect Dis*, **188**, 469-479.
- Nakayama, H., Mio, T., Nagahashi, S., Kokado, M., Arisawa, M. and Aoki, Y. (2000) Tetracycline-regulatable system to tightly control gene expression in the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Infect Immun*, **68**, 6712-6719.
- Navarro-García, F., Sánchez, M., Nombela, C. and Pla, J. (2001) Virulence genes in the pathogenic yeast *Candida albicans*. *FEMS Microbiol Rev*, **25**, 245-268.
- Nguyen, M.H., Peacock, J.E., Jr., Tanner, D.C., Morris, A.J., Nguyen, M.L., Snyderman, D.R., Wagener, M.M. and Yu, V.L. (1995) Therapeutic approaches in patients with candidemia. Evaluation in a multicenter, prospective, observational study. *Arch Intern Med*, **155**, 2429-2435.
- Odds, F.C. (1988) *Candida* and candidosis: a review and bibliography. *Baillière Tindall, London, United Kingdom*.

- Odds, F.C. (1994) *Candida* species and virulence. *ASM News*, **60**, 313-318.
- Odds, F.C. (2000) pathogene fungi in the 21st century. *Trends Microbiol*, **8**, 200-201.
- Panwar, S.L., Legrand, M., Dignard, D., Whiteway, M. and Magee, P.T. (2003) MFalpha1, the gene encoding the mating pheromone of *Candida albicans*. *Eukaryot Cell*, **2**, 1350-1360.
- Park, Y.N. (2002) Analyse des phänotypischen Switchings und Etablierung eines Tetrazykline-induzierbaren Genexpressionssystems in *Candida albicans*. *Diplomarbeit*.
- Phan, Q.T., Belanger, P.H. and Filler, S.G. (2000) Role of hyphal formation in Interactions of *Candida albicans* with endothelial cells. *Infect Immun*, **68**, 3485-8490.
- Praekelt, U.M. and Meacock, P.A. (1990) *HSP12*, a new small heat shock gene of *Saccharomyces cerevisiae*: analysis of structure, regulation and function. *Mol Gen Genet*, **223**, 97-106.
- Ray, T.L. and Payne, C.D. (1990) Comparative production and rapid purification of *Candida* acid proteinase from protein-supplemented cultures. *Infect Immun*, **58**, 508-514.
- Reuß, O., Vik, Å., Kolter, R. and Morschhäuser, J. (2004) The SAT1 flipper, an optimized tool for gene disruption in *Candida albicans*. *Gene*, **341**, 119-127.
- Rex, J.H., Rinaldi, M.G. and Pfaller, M.A. (1995) Resistance of *Candida* species to fluconazole. *Antimicrob Agents Chemother*, **39**, 1-8.
- Riggle, P.J., Andrutis, K.A., Chen, X., Tzipori, S.R. and Kumamoto, C.A. (1999) Invasive lesions containing filamentous forms produced by a *Candida albicans* mutant that is defective in filamentous growth in culture. *Infect Immun*, **67**, 3649-3652.
- Rikkerinke, E.H., Magee, B.B. and Magee, P.T. (1988) Opaque-white phenotype transition: a programmed morphological transition in *Candida albicans*. *J Bacteriol*, **170**, 895-899.
- Robert, F., Lebreton, F., Bougnoux, M.E., Paugam, A., Wassermann, D., Schlotterer, M., Tourte-Schaefer, C. and Dupouy-Camet, J. (1995) Use of random amplified polymorphic DNA as a typing method for *Candida albicans* in epidemiological surveillance of a burn unit. *J Clin Microbiol*, **33**, 2366-2371.
- Roemer, T., Jiang, B., Davison, J., Ketela, T., Veillette, K., Breton, A., Tandia, F., Linteau, A., Sillaots, S., Marta, C., Martel, N., Veronneau, S., Lemieux, S., Kauffman, S., Becker, J., Storms, R., Boone, C. and Bussey, H. (2003) Large-scale essential gene identification in *Candida albicans* and applications to antifungal drug discovery. *Mol Microbiol*, **50**, 167-181.
- Ruhnke, M., Eigler, A., Tennagen, I., Geiseler, B., Engelmann, E. and 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.

- Ruhnke, M. and Maschmeyer, G. (2002) management of mycoses in patients with hematologic disease and cancer - review of literature. *Eur. J. Med. Res.*, **7**.
- Sadowski, P.D. (1995) The Flp recombinase of the 2-micron plasmid of *Saccharomyces cerevisiae*. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, **51**, 53-91.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. and Erlich, H.A. (1988) Primer directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA-Polymerase. *Science*, **239**, 487-491.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA*, **74**, 5463-5467.
- Sanglard, D., Kuchler, K., Ischer, F., Pagani, J.L., Monod, M. and Bille, J. (1995) Mechanisms of resistance to azole antifungal agents in *Candida albicans* isolates from AIDS patients involve specific multidrug transporters. *Antimicrob Agents Chemother*, **39**, 2378-2386.
- 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.
- Saville, S.P., Lazzell, A.L., Monteagudo, C. and Lopez-Ribot, J.L. (2003) Engineered control of cell morphology *in vivo* reveals distinct roles for yeast and filamentous forms of *Candida albicans* during infection. *Eukaryot Cell*, **2**, 1053-1060.
- Schaller, M., Hube, B., Ollert, M.W., Schäfer, W., Borg-von Zepelin, M., Thoma-Greber, E. and Korting, H.C. (1999) *In vivo* expression and localization of *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases during oral candidiasis in HIV-infected patients. *J Invest Dermatol*, **112**, 383-386.
- Schröppel, K., Srikantha, T., Wessels, D., DeCock, M., Lockhart, S.R. and Soll, D.R. (1996) Cytoplasmic localization of the white phase-specific *WH11* gene product of *Candida albicans*. *Microbiology*, **142 (Pt 8)**, 2245-2254.
- Schweizer, A., Rupp, S., Taylor, B.N., Rollinghoff, M. and Schroppel, K. (2000) The TEA/ATFs transcription factor CaTec1p regulates hyphal development and virulence in *Candida albicans*. *Mol Microbiol*, **38**, 435-445.
- Shapperd, M.G., Poulter, R.T.M. and Sullivan, P.A. (1985) *Candida albicans*: biology, genetics, and pathogenicity. *Annu Rev Microbiol*, **39**.
- Sheppard, D.C., Yeaman, M.R., Welch, W.H., Phan, Q.T., Fu, Y., Ibrahim, A.S., Filler, S.G., Zhang, M., Waring, A.J. and Edwards, J.E., Jr. (2004) Functional and structural diversity in the Als protein family of *Candida albicans*. *J Biol Chem*, **279**, 30480-30489.
- Silver, P.M., Oliver, B.G. and White, T.C. (2004) Role of *Candida albicans* transcription factor Upc2p in Drug resistance and sterol Metabolism. *Eukaryot Cell*, **2**, 1391-1397.

- Slutsky, B., M., S., J., A., L., R., Pfaller, M. and Soll, D.R. (1985) white-opaque transition: a second high-frequency switching system in *Candida albicans*. *J Bacteriol*.
- Slutsky, B., Staebell, M., Anderson, J., Risen, L., Pfaller, M. and Soll, D.R. (1987) "White-opaque transition": a second high-frequency switching system in *Candida albicans*. *J Bacteriol*, **169**, 189-197.
- Smith, R.L. and Johnson, A.D. (2000) Turning genes off by Ssn6-Tup1: a conserved system of transcriptional repression in eukaryotes. *Trends Biochem Sci*, **25**, 325-330.
- Sobel, J.D. (1992) Pathogenesis and treatment of recurrent vulvovaginal candidiasis. *Clin Infect Dis*, **14 (Suppl. 1)**, 148-153.
- Soll, D.R. (1992) High-frequency Switching in *Candida albicans*. *Clin Microbiol Rev*, **5**, 183-203.
- Soll, D.R. (1996) The emerging molekular biology of switching in *Candida albicans*. *ASM News*, **62**, 415-420.
- Soll, D.R. (2003) Mating-type locus homozygosis, phenotypic switching and mating: a unique sequence of dependencies in *Candida albicans*. *BioEaasys*, **26**, 10-20.
- Soll, D.R., Morrow, B. and Srikantha, T. (1993) High-frequency phenotypic switching in *Candida albicans*. *Trends Genet*, **9**, 61-65.
- Sonneborn, A., Tebarth, B. and Ernst, J.F. (1999) Control of white-opaque phenotypic switching in *Candida albicans* by the Efg1p morphogenetic regulator. *Infect Immun*, **67**, 4655-4660.
- Southern, E.M. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol*, **98**, 503-517.
- Srikantha, T., Klapach, A., Lorenz, W.W., Tsai, L.K., A., L.L., Gorman, J.A. and R., S.D. (1996) The sea pansy *Renilla reniformis* Luciferase serves as a sensitive bioluminescent reporter for differential gene expression in *Candida albicans*. *J Bacterol*, **178**, 121-129.
- Srikantha, T., Morrow, B., Schröppel, K. and Soll, D.R. (1995) The frequency of integrative transformation at phase-specific genes of *Candida albicans* correlates with their transcriptional state. *Mol Gen Genet*, **246**, 342-352.
- Srikantha, T. and Soll, D.R. (1993) A white-specific gene in the white-opaque switching system of *Candida albicans*. *Gene*, **131**, 53-60.
- Srikantha, T., Tsai, L., Daniels, K., Klar, A.J. and Soll, D.R. (2001) The histone deacetylase genes *HDA1* and *RPD3* play distinct roles in regulation of high-frequency phenotypic switching in *Candida albicans*. *J Bacteriol*, **183**, 4614-4625.

- Srikantha, T., Tsai, L.K., Daniels, K. and Soll, D.R. (2000) *EFG1* null mutants of *Candida albicans* switch but can not express the complete phenotype of white-phase budding cells. *J Bacteriol*, **182**, 1580-1591.
- Srikantha, T., Tsai, L.K. and Soll, D.R. (1997) The *WH11* gene of *Candida albicans* is regulated in two distinct developmental programs through the same transcription activation sequences. *J Bacteriol*, **179**, 3837-3844.
- Staab, J.F., Bradway, S.D., Fidel, P.L. and Sundstrom, P. (1999) Adhesive and mammalian transglutaminase substrate properties of *Candida albicans*. *Science*, **283**, 1535-1538.
- Staab, J.F., Ferrer, C.A. and Sundstrom, P. (1996) Developmental expression of a tandemly repeated, proline- and glutamine-rich amino acid motif on hyphal surfaces on *Candida albicans*. *J. Biol. Chem.*, **271**, 6298-6305.
- Staib, P., Kretschmar, M., Nichterlein, T., Hof, H. and Morschhäuser, J. (2000) Differential activation of a *Candida albicans* virulence gene family during infection. *Proc Natl Acad Sci USA*, **97**, 6102-6107.
- Staib, P., Kretschmar, M., Nichterlein, T., Köhler, G., Michel, S., Hof, H., Hacker, J. and Morschhäuser, J. (1999) Host-induced, stage-specific virulence gene activation in *Candida albicans* during infection. *Mol Microbiol*, **32**, 533-546.
- Staib, P. and Morschhäuser, J. (2005) Differential expression of the *NRG1* repressor controls species-specific regulation of chlamyospore development in *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*. *Mol Microbiol*, **55**, 637-652.
- Stoldt, V.R., Sonneborn, A., Leuker, C.E. and 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 morphogenetic processes in fungi. *Embo J*, **16**, 1982-1991.
- Stone, R.L., Matarese, V., Magee, B.B., Magee, P.T. and Bernlohr, D.A. (1990) Cloning, sequencing and chromosomal assignment of a gene from *Saccharomyces cerevisiae* which is negatively regulated by glucose and positively by lipids. *Gene*, **96**, 171-176.
- Strauß, A., Michel, S. and Morschhäuser, J. (2001) Analysis of Phase-Specific Gene Expression at the Single-Cell Level in the White-Opaque Switching System of *Candida albicans*. *J Bacteriol*, **183**, 3761-3769.
- Sudbery, P., Gow, N. and Berman, J. (2004) The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. *Trends Microbiol*, **12**, 317-324.
- Sundstrom, P. (1999) Adhesins in *Candida albicans*. *Curr Opin Microbiol*, **2**, 353-357.
- Sundstrom, P., Cutler, J.E. and 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.

- Swoboda, R.K., Bertram, G., Delbruck, S., Ernst, J.F., Gow, N.A., Gooday, G.W. and Brown, A.J. (1994) Fluctuations in glycolytic mRNA levels during morphogenesis in *Candida albicans* reflect underlying changes in growth and are not a response to cellular dimorphism. *Mol Microbiol*, **13**, 663-672.
- Tavanti, A., Pardini, G., Campa, D., Davini, P., Lupetti, A. and Senesi, S. (2004) Differential expression of secretory aspartyl proteinase genes (*SAP1-10*) in oral *Candida albicans* isolates with distinct karyotypes. *J Clin Microbiol*, **42**, 4726-4734.
- Tsong, A.E., Miller, M.G., Raisner, R.M. and Johnson, A.D. (2003) Evolution of a combinatorial transcriptional circuit: a case study in yeasts. *Cell*, **115**, 389-399.
- Tzamarias, D. and Struhl, K. (1994) Functional dissection of the yeast Cyc8-Tup1 transcriptional co-repressor complex. *Nature*, **369**, 758-761.
- Tzung, K.W., Williams, R.M., Scherer, S., Federspiel, N., Jones, T., Hansen, N., Bivolarevic, V., Huizar, L., Komp, C., Surzycki, R., Tamse, R., Davis, R.W. and Agabian, N. (2001) Genomic evidence for a complete sexual cycle in *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 3249-3253.
- Uhl, M.A., Biery, M., Craig, N. and Johnson, A.D. (2003) Haploinsufficiency-based large-scale forward genetic analysis of filamentous growth in the diploid human fungal pathogen *Candida albicans*. *EMBO J*, **22**, 2668-2678.
- Uhl, M.A. and Johnson, A.D. (2001) Development of *Streptococcus thermophilus lacZ* as a reporter gene for *Candida albicans*. *Microbiology*, **147**, 1189-1195.
- Urlinger, S., Baron, U., Thellmann, M., Hasan, M.T., Bujard, H. and Hillen, W. (2000) Exploring the sequence space for tetracycline-dependent transcriptional activators: novel mutations yield expanded range and sensitivity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 7963-7968.
- Ushinsky, S.C., H Marcus, D., Ash, J., Dignard, D., Marcil, A., Morchhauser, J., Thomas, D.Y., Whiteway, M. and Leberer, E. (2002) *CDC42* is required for polarized growth in human pathogen *Candida albicans*. *Eukaryot Cell*, **1**, 95-104.
- Verstrepen, K.J., Reynolds, T.B. and Fink, G.R. (2004) Origins of variation in the fungal cell surface. *Nat Rev Microbiol*, **2**, 533-540.
- Wellington, M. and Rustchenko, E. (2005) 5-Fluoro-orotic acid induces chromosome alterations in *Candida albicans*. *Yeast*, **22**, 57-70.
- White, T.C. (1997) Increased mRNA levels of *ERG16*, *CDR*, and *MDR1* correlate with increases in azole resistance in *Candida albicans* isolates from a patient infected with human immunodeficiency virus. *Antimicrob Agents Chemother*, **41**, 1482-1487.
- White, T.C. and Agabian, N. (1995) *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases: Isoenzyme pattern is determined by cell type, and levels are determined by environmental factors. *J Bacteriol*, **177**, 5215-5221.

- White, T.C., Miyasaki, S.H. and Agabian, N. (1993) Three distinct secreted aspartyl proteinases in *Candida albicans*. *J Bacteriol*, **175**, 6126-6133.
- Whiteway, M. and Oberholzer, U. (2004) *Candida* morphogenesis and host-pathogen interactions. *Curr Opin Microbiol*, **7**, 350-357.
- Wilson, I.A., Niman, H.L., Houghten, R.A., Cherenon, A.R., Connolly, M.L. and Lerner, R.A. (1984) The structure of an antigenic determinant in a protein. *Cell*, **37**, 767-778.
- Wilson, R.B., Davis, D., Enloe, B.M. and Mitchell, A.P. (2000) A recyclable *Candida albicans* *URA3* cassette for RCR product-directed gene disruptions. *Yeast*, **16**, 65-70.
- Wilson, R.B., Davis, D. and Mitchell, A.P. (1999) Rapid hypothesis testing with *Candida albicans* through gene disruption with short homology regions. *J Bacteriol*, **181**, 1868-1874.
- Wirsching, S., Michel, S. and 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.
- Wu, W., Pujol, C., Lockhart, S.R. and Soll, D.R. (2005) Chromosome loss followed by duplication is the major mechanism of spontaneous mating-type locus homozygosity in *Candida albicans*. *Genetics*, **169**, 1311-1327.
- Zhao, R., Lockhart, S.R., Daniels, K. and Soll, D.R. (2002) Roles of *TUP1* in switching, phase maintenance, and phase-specific gene expression in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell*, **1**, 353-365.

A Anhang

Erklärungen

Ich versichere, dass ich diese Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quelle 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, Juli 2006

Yang-Nim Park

Publikationen

Park, Y. N., Strauß, A. and Morschhäuser, J. (2004) The white-phase-specific gene *WH11* is not required for white-opaque switching in *Candida albicans*. *Mol Genet Genomics* 272, 88-97.

Park, Y. N. and Morschhäuser, J. (2005) Tetracycline-Inducible Gene Expression and Gene Deletion in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* 4, 1328-42.

Park, Y. N. and Morschhäuser, J. (2005) *Candida albicans* *MTLalpha tup1Δ* mutants can reversibly switch to mating-competent, filamentous growth forms. *Mol Microbiol* 58, 1288-302.

Park, Y. N. and Morschhäuser, J. (2006) The opaque-phase-specific gene *OP4* is required for normal growth of opaque cells, but not for white-opaque switching and mating in *Candida albicans* (in preparation)

Lebenslauf

Name: Yang-Nim Park

Geburtsdatum: 14.05.1969

Geburtsort: Chunnam Chindo, Südkorea

Nationalität: Koreanisch

Gegenwärtige Adresse: Kopernikusstr. 12, D-97218, Gerbrunn
E-mail: yangnim.park@gmail.com

Akademische Qualifikationen:

1992 - 1996: **Bachelor of Science (Biologie)**
Kyounggi University, Seoul/Suwon, Südkorea

1998 - 2002: **Diplom Biologie**
(Hauptfach: Mikrobiologie, Nebenfächer: Genetik und Zoologie (mit Schwerpunkt Zell- und Entwicklungsbiologie) an der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

Forschungserfahrungen:

1993 - 1995: Wissenschaftliche Mitarbeiter als Studentin an der Kyounggi Universität
Im Mikrobiologische Labor bei Prof. Dr. Sang-Sub Lee,
„Klassifikation der photosynthetischen Bakterien aus den Gewässern in Suwon in Südkorea und die Untersuchung der kommerziellen Anwendungsmöglichkeiten der isolierten Farbstoffe aus den Bakterien.“ „Macroarray-Analyse dieser photosynthetischen Bakterien.“

März 2001 - 2002: Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. J. Morschhäuser am Zentrum für Infektionsforschung bzw. Institut für Molekulare Infektionsbiologie der Universität Würzburg
Titel: „Analyse des phänotypischen Switching und Etablierung eines Tetrazyklin-induzierbaren Genexpressionssystems in *Candida albicans*.“

Seit März 2002: Doktorarbeit in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. J. Morschhäuser am Zentrum für Infektionsforschung bzw. Institut für Molekulare Infektionsbiologie der Universität Würzburg