

**Funktionelle Analyse einer
Familie von Oligopeptidtransportern
des humanpathogenen Hefepilzes *Candida albicans***



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

vorgelegt von
Oliver Rainer Reuß
aus Bad Kissingen

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 ausgehändigt am:

für Schmiddi

Danksagung

Bei Prof. Dr. Dr. h. c. mult. Jörg Hacker bedanke ich mich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes am Institut für Molekulare Infektionsbiologie.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Betreuer Prof. Dr. Joachim Morschhäuser für die Überlassung dieses interessanten Themas, für die engagierte Betreuung, seinen fachkundigen Rat und seine permanente Diskussionsbereitschaft.

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

Dank gebührt auch Dr. Åshild Vik und Prof. Dr. Roberto Kolter von der Harvard Medical School (Boston, MA, USA) für die Bereitstellung des *caSAT1*-Markers.

Bei Prof. Dr. Klaus Schröppel (Robert-Bosch-Krankenhaus, Stuttgart) bedanke ich mich für die Durchführung der Tierexperimente.

Für ihre Hilfsbereitschaft im Labor möchte ich allen Mitgliedern des *Candida*-Labors danken: Lilly, Davina, Nim, Peter, Julia, Ulsen, Neelam, Aditi, Teresa, Kajal, Manjistha und Sonja. Wir hatten während und nach der Arbeit jede Menge Spaß! Ganz besonders möchte ich Peter danken, der mir vom ersten Tag an mit Rat und Tat zur Seite stand. Auch danke ich allen Kolleginnen und Kollegen des Instituts für die gute Atmosphäre, auch außerhalb des Labors.

Besonderer Dank gilt A. Schmitt und Prof. Dr. Heinz Wiendl für die Hilfe am FACS-Gerät.

Ganz besonders möchte ich meiner Freundin Astrid für ihre liebevolle und unentwegte Unterstützung danken.

Auch danke ich Joschi, der gemeinsam mit mir das Studium bestritten hat und für so manche Abwechslung gesorgt hat.

Schließlich möchte ich mich bei meinen Eltern für deren Unterstützung bedanken.

Inhaltsverzeichnis

1	ZUSAMMENFASSUNG.....	1
1	SUMMARY	3
2	EINLEITUNG.....	5
2.1	ALLGEMEINE EINFÜHRUNG.....	5
2.2	VIRULENZFAKTOREN VON <i>C. ALBICANS</i>	7
2.2.1	<i>Zellwand und Adhärenz</i>	7
2.2.2	<i>Dimorphismus und Signaltransduktion</i>	9
2.2.3	<i>Sekretorische Aspartyl-Proteasen (SAPs)</i>	11
2.3	PEPTID-TRANSPORT IN PILZEN.....	14
2.3.1	<i>Das PTR-System</i>	14
2.3.2	<i>Das OPT-System</i>	17
2.4	HERSTELLUNG VON KNOCK-OUT-MUTANTEN IN <i>C. ALBICANS</i>	20
2.5	REPORTERSYSTEME FÜR DIE GENEXPRESSION	22
2.6	ZIELSETZUNG DIESER ARBEIT	23
3	MATERIAL UND METHODEN.....	25
3.1	VERWENDETE BAKTERIENSTÄMME UND PLASMIDE.....	25
3.1.1	<i>Escherichia coli K12-Stamm</i>	25
3.1.2	<i>Plasmide</i>	25
3.2	VERWENDETE <i>CANDIDA ALBICANS</i> -STÄMME.....	29
3.3	OLIGONUKLEOTIDE	36
3.4	GERÄTE UND CHEMIKALIEN	41
3.5	MIKROBIOLOGISCHE METHODEN.....	42
3.5.1	<i>Anzucht von Escherichia coli</i>	42
3.5.2	<i>Anzucht von Candida albicans</i>	42
3.5.2.1	Vollmedium und SD-Medium	42
3.5.2.2	Selektions- und Screeningmedien.....	42
3.5.2.3	Medien für die Wachstumstests	43
3.5.2.4	Medien für Sensitivitäts-Assay	43

3.6	MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN.....	44
3.6.1	Plasmidisolierung aus <i>E. coli</i>	44
3.6.2	Polymerasekettenreaktion (PCR) und Reinigung der PCR-Produkte	44
3.6.3	Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen	45
3.6.4	Aufreinigung von DNA mittels Agarose-Gelelektrophorese.....	46
3.6.5	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen.....	46
3.6.6	Ligation und Transformation von Plasmid-DNA	47
3.6.7	DNA-Sequenzierung	47
3.6.8	Transformation von <i>C. albicans</i> durch Elektroporation	48
3.6.9	Isolierung chromosomaler DNA aus <i>C. albicans</i>	50
3.6.10	Southern-Hybridisierung.....	51
3.6.11	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	52
3.6.12	Nachweis der GFP-Expression mittels Fluoreszenzmikroskopie und Durchflusszytometrie.....	53
4	ERGEBNISSE	55
4.1	IDENTIFIKATION EINER <i>CANDIDA ALBICANS</i> -GENFAMILIE, DIE FÜR OLIGOPEPTIDTRANSPORTER (OPT) CODIERT	55
4.2	ETABLIERUNG EINES NEUARTIGEN SELEKTIONSSYSTEMS IM <i>C. ALBICANS</i> -WILDTYP-HINTERGRUND ...	61
4.2.1	Design der SAT1-Flipper-Kassette.....	61
4.2.2	Funktionsweise des SAT1-Flippers	62
4.3	KONSTRUKTION VON <i>OPT1Δ</i> -NULLMUTANTEN IM WILDTYP-HINTERGRUND	64
4.3.1	Design der Deletionskassette.....	64
4.3.2	Transformation des Wildtyps SC5314.....	65
4.3.3	Reintegration intakter Kopien des <i>OPT1</i> -Gens in die <i>opt1Δ</i> -Mutanten.....	66
4.3.4	Phänotypische Analysen der <i>opt1Δ</i> -Nullmutanten	69
4.4	KONSTRUKTION VON WEITEREN EINZELMUTANTEN IM WILDTYP-HINTERGRUND (<i>OPT23Δ</i> - <i>OPT8Δ</i> -MUTANTEN)	71
4.4.1	Konstruktion von Plasmiden zur Inaktivierung der <i>OPT2</i> - und <i>OPT3</i> -Gene im Wildtyp.....	71
4.4.2	Konstruktion von Plasmiden zur Inaktivierung der <i>OPT4</i> - <i>OPT8</i> -Gene im Wildtyp SC5314.....	72
4.4.3	Phänotypische Analyse der <i>opt23Δ</i> - <i>opt8Δ</i> -Nullmutanten	76

4.5	KONSTRUKTION VON <i>OPT123Δ</i> -TRIPLEMUTANTEN.....	77
4.5.1	<i>Herstellung der opt123Δ-Triplemutanten</i>	77
4.5.2	<i>Konstruktion von Plasmiden für die Reintegration von OPT2 und OPT3 in die opt123Δ-Triplemutanten</i>	77
4.5.3	<i>Phänotypische Analyse der opt123Δ-Triplemutanten</i>	79
4.5.3.1	Wachstumstest in YCB-BSA.....	79
4.5.3.2	Expression des <i>GFP</i> -Gens unter der Kontrolle des <i>SAP2</i> -Promotors in den Triplemutanten	80
4.5.3.3	Nachweis von Sap2p im Überstand der <i>opt123Δ</i> -Triplemutanten in YCB-BSA-Medium	82
4.5.3.4	Expression des <i>SAP2</i> -Gens unter der Kontrolle des Tetracyclin-induzierbaren Promotors in den Triplemutanten.....	83
4.6	UNTERSUCHUNG DER EXPRESSIONSMUSTER DER <i>OPT</i> -GENE <i>IN VITRO</i>	85
4.6.1	<i>Konstruktion von P_{OPT}-GFP-Reporterplasmiden</i>	85
4.6.2	<i>Analyse der P_{OPT}-GFP-Reporterstämme mittels Fluoreszenzmikroskopie und Durchflusszytometrie</i>	87
4.6.3	<i>Untersuchung der Induktion ausgewählter OPT-Gene durch Peptide bestimmter Zusammensetzung</i>	90
4.6.4	<i>Untersuchung der Induktion von OPT2 in Abwesenheit von OPT1 und OPT3</i>	91
4.7	UNTERSUCHUNG DER EXPRESSIONSMUSTER DER <i>OPT</i> -GENE MITHILFE DES <i>ecaFLP</i> -REPORTERGENS.....	93
4.7.1	<i>Konstruktion von P_{OPT}-ecaFLP-Reporterplasmiden</i>	94
4.7.2	<i>Analyse der P_{OPT}-ecaFLP-Reporterstämme</i>	95
4.8	ÜBEREXPRESSION ALLER <i>OPT</i> -GENE UNTER KONTROLLE DES KONSTITUTIVEN <i>ADHI</i> -PROMOTORS ..	98
4.8.1	<i>Konstruktion von Plasmiden, in denen alle OPT-Gene unter der Kontrolle des konstitutiv exprimierten ADHI-Promotors stehen</i>	98
4.8.2	<i>Wachstumstests mit allen OPT-überexprimierenden Stämmen auf BSA</i>	101
4.8.3	<i>Konstruktion von opt1234Δ-Quadruple- und opt12345Δ-Quintuplemutanten</i>	102
4.8.4	<i>Wachstumstest mit den Mehrfachmutanten auf BSA</i>	105
4.8.5	<i>Wachstumstests mit allen OPT-überexprimierenden Stämmen auf Tetrapeptiden definierter Zusammensetzung</i>	106
4.8.6	<i>Wachstumstests mit allen OPT-überexprimierenden Stämmen auf Peptiden definierter Länge und Zusammensetzung</i>	108

5	DISKUSSION	111
5.1	IDENTIFIZIERUNG EINER GENFAMILIE VON OLIGOPEPTIDTRANSPORTERN	112
5.2	ETABLIERUNG DES <i>SATI-FLIPPERS</i> ZUR GENELETION IN SC5314	113
5.3	FUNKTIONELLE ANALYSE DER <i>OPT</i> -GENFAMILIE.....	116
5.4	ABSCHLIEBENDE WERTUNG UND AUSBLICK.....	126
6	LITERATURVERZEICHNIS	129
7	ANHANG	143
7.1	ERKLÄRUNGEN	143
7.2	PUBLIKATIONEN UND TAGUNGSBEITRÄGE	144
7.3	LEBENS LAUF.....	146

1 Zusammenfassung

Der Hefepilz *Candida albicans* ist Teil der natürlichen Mikroflora auf den Schleimhäuten des Verdauungs- und Urogenitaltrakts der meisten gesunden Menschen. Allerdings kann *C. albicans* vor allem in immunsupprimierten Patienten auch schwerwiegende Infektionen verursachen. Diese reichen von oberflächlichen Mykosen bis hin zu lebensbedrohlichen systemischen Infektionen. *C. albicans* besitzt eine Reihe von Eigenschaften, die es diesem opportunistisch humanpathogenen Pilz ermöglichen unterschiedliche Wirtsgewebe zu kolonisieren und zu infizieren. Ein wichtiger Virulenzfaktor sind sekretorische Aspartylproteasen (SAPs), die von einer großen Genfamilie von zehn *SAP*-Genen codiert werden. Die SAPs werden während der Infektion differentiell exprimiert und übernehmen unterschiedliche Rollen im Infektionsverlauf. So tragen sie zur Adhärenz bei, können Wirtsbarrieren und Moleküle der Wirtsimmunabwehr zerstören oder liefern Nährstoffe, indem sie Proteine abbauen. Unter den zehn *SAP*-Genen ist *SAP2* für ein Wachstum von *C. albicans* auf Proteinen als alleiniger Stickstoffquelle verantwortlich. Allerdings ist wenig über die Regulation der *SAP2*-Expression und über die Aufnahme der proteolytischen Abbauprodukte in die Zelle bekannt.

In dieser Arbeit wurde eine Familie von Oligopeptidtransportern von *C. albicans* funktionell analysiert. Da aus früheren Arbeiten bekannt war, dass *SAP2* durch Peptide mit mindestens acht Aminosäuren induziert werden kann, könnten einzelne Mitglieder dieser Familie neben der Transportfunktion auch eine Sensorfunktion für Peptide übernehmen und somit über einen Signalweg *SAP2* induzieren. In der Genomsequenz von *C. albicans* wurden neben dem bereits beschriebenen *OPT1*-Gen sieben weitere Gene identifiziert, deren Genprodukte signifikante Homologie zu Opt1p aufwiesen und die deshalb als *OPT2-OPT8* bezeichnet wurden. Um die Rolle dieser putativen Oligopeptidtransporter bei der *SAP2*-Induktion und beim Transport der durch Sap2p-Aktivität bereitgestellten proteolytischen Abbauprodukte zu untersuchen, wurden Mutanten hergestellt, in denen die *OPT*-Gene spezifisch deletiert waren. Zu diesem Zweck wurde eine Methode zur gezielten Geninaktivierung etabliert, die auf einem neuen, recycelbaren dominanten Selektionsmarker (*caSAT1*) beruht, der Resistenz gegen Nourseothricin verleiht. Die "SAT1-Flipping"-Strategie kann direkt in *C. albicans* Wildstämmen angewendet werden und umgeht somit alle Probleme, die mit der Verwendung von auxotrophen Ausgangsstämmen verbunden sind. Alle Mutanten, in denen jeweils eines der *OPT*-Gene inaktiviert war, verhielten sich wie der Wildtyp und zeigten keinen

Wachstumsdefekt auf bovinem Serumalbumin (BSA) als alleiniger Stickstoffquelle, während eine *sap2*-Nullmutante unter diesen Bedingungen nicht wachsen kann. Somit ist kein einzelnes *OPT*-Gen für *C. albicans* notwendig, um auf BSA als alleiniger Stickstoffquelle zu wachsen. Dagegen zeigten *opt123Δ*-Triplemutanten ähnlich wie die *sap2Δ*-Mutante einen starken Wachstumsdefekt auf BSA als alleiniger Stickstoffquelle, der durch Reintegration einer intakten Kopie von *OPT1*, *OPT2* oder *OPT3* wieder aufgehoben werden konnte. Der Wachstumsdefekt der *opt123Δ*-Triplemutanten war nicht auf eine fehlende Induktion von *SAP2* zurückzuführen, sondern auf das Unvermögen dieser Mutanten, die durch den proteolytischen Abbau von BSA entstandenen Peptide zu transportieren.

Mit Hilfe von Reportergenen konnte gezeigt werden, dass die einzelnen *OPT*-Gene differentiell exprimiert werden. Während keines der Gene in einem Vollmedium (YPD) exprimiert wurde, wurde eine starke Induktion von *OPT1* und *OPT3* in Gegenwart von BSA als alleiniger Stickstoffquelle beobachtet. Nach Expression von *OPT4* und *OPT5* unter Kontrolle des konstitutiven *ADHI*-Promotors in den *opt123Δ*-Triplemutanten konnte deren Wachstumsdefekt auf BSA als alleiniger Stickstoffquelle ebenfalls kompensiert werden, während die zusätzliche Deletion dieser Gene in den dabei entstandenen *opt1234Δ*-Quadruple- und *opt12345Δ*-Quintuplemutanten den Wachstumsdefekt noch verstärkte. Diese Ergebnisse bestätigten, dass die Gene *OPT1-OPT5* für funktionelle Oligopeptidtransporter codieren.

Weitere Experimente zeigten, dass die Oligopeptidtransporter unterschiedliche Substratpräferenzen haben. Während das Tetrapeptid LWMR für Stämme, die spezifisch *OPT3*, *OPT4*, oder *OPT5* exprimierten, ein besseres Substrat war als das Tetrapeptid LSKL, konnten Stämme, die spezifisch *OPT2* exprimierten, das LSKL-Peptid verwerten, nicht aber das LWMR-Peptid. Experimente mit Peptiden definierter Länge und Zusammensetzung wiesen außerdem darauf hin, dass die Oligopeptidtransporter in der Lage sind, auch längere Peptide mit bis zu mindestens acht Aminosäuren zu transportieren. Die Evolution einer Genfamilie, die für Oligopeptidtransporter mit unterschiedlicher Substratpräferenz codieren, hat deshalb vermutlich dazu beigetragen, dass *C. albicans* Proteine sehr effizient als Stickstoffquelle verwerten und sich an die Nahrungsbedingungen in verschiedenen Nischen optimal anpassen kann.

1 Summary

The yeast *Candida albicans* is a member of the microflora on mucosal surfaces of the gastrointestinal and urogenital tract in most healthy people. However, in immunocompromised patients *C. albicans* can cause superficial as well as life-threatening systemic infections. *C. albicans* exhibits a variety of characteristics that enable this opportunistic human fungal pathogen to colonize and infect different host tissues. Among these virulence factors are secreted aspartic proteinases (SAPs), which are encoded by a family of ten *SAP* genes. The SAPs are differentially expressed during infection and play different roles in disease progression by contributing to adherence, by degrading tissue barriers and host defence molecules or by providing nutrients through the digestion of proteins. Of the ten *SAP* genes, *SAP2* enables *C. albicans* to grow on proteins as a sole source of nitrogen. However, little is known about how *SAP2* expression is regulated and how proteolytic products are taken up into the cell.

In this work a family of oligopeptide transporters of *C. albicans* was functionally characterized. Since earlier studies had demonstrated that *SAP2* expression can be induced by peptides of at least eight amino acids in length, oligopeptide transporters, in addition to transporting peptides, might also serve as sensors which in the presence of peptides activate a signalling pathway that induces *SAP2* expression. Beside the already described *OPT1* gene, seven additional genes were identified in the *C. albicans* genome sequence whose encoded products exhibit significant similarity to Opt1p and hence were designated as *OPT2-OPT8*. To elucidate the role of these putative oligopeptide transporters in *SAP2* induction and in the uptake of proteolytic products provided by Sap2p activity, a series of mutants lacking specific *OPT* genes was constructed. For this purpose, a method for targeted gene inactivation was established that relies on the use of a new recyclable, dominant selection marker, *caSAT1*, which confers resistance to nourseothricin upon *C. albicans* transformants. The *SAT1* flipping strategy can be used directly in *C. albicans* wild-type strains and, therefore, circumvents all problems related to the use of auxotrophic host strains. All knockout mutants lacking single *OPT* genes behaved like the wild-type parental strain and did not show a growth defect in a medium containing bovine serum albumin (BSA) as the sole nitrogen source, conditions in which a *sap2* null mutant can not grow. Therefore, no single *OPT* gene is required for growth of *C. albicans* on BSA as the sole source of nitrogen. In contrast, *opt123Δ* triple mutants, similar to a *sap2Δ* mutant, had a severe growth defect on BSA as the sole nitrogen source,

which could be rescued by reintroduction of an intact copy of either *OPT1*, *OPT2* or *OPT3*. The poor growth of the *opt123Δ* triple mutants was not caused by failure to induce *SAP2* expression but by the inability of these mutants to efficiently transport the peptides produced by proteolytic degradation of BSA into the cell.

By using reporter genes it could be demonstrated that individual members of the *OPT* gene family are differentially expressed. While none of the *OPT* genes was detectably expressed in rich YPD medium, a strong induction of *OPT1* and *OPT3* was observed in the presence of BSA as the sole nitrogen source. Forced expression of *OPT4* and *OPT5* under control of the constitutive *ADHI* promoter in the *opt123Δ* triple mutants also complemented their growth defect on BSA as a sole nitrogen source, whereas the additional deletion of these genes in the resulting *opt1234Δ* quadruple and *opt12345Δ* quintuple mutants exacerbated the growth defect. These results confirmed that at least *OPT1-OPT5* encode functional oligopeptide transporters.

Additional experiments showed that the individual oligopeptide transporters differ in their substrate preferences. While the tetrapeptide LWMR was a better substrate than the tetrapeptide LSKL for strains that specifically expressed *OPT3*, *OPT4* or *OPT5*, strains specifically expressing *OPT2* grew on the LSKL peptide, but not on the LWMR peptide. Furthermore, experiments with peptides of defined length and sequence suggested that the oligopeptide transporters are also able to transport longer peptides up to at least eight amino acids in length. Therefore, the evolution of a gene family encoding oligopeptide transporters with different substrate preferences probably contributed to the ability of *C. albicans* to efficiently utilize proteins as a nitrogen source and adapt to the nutritional conditions in different host niches.

2 Einleitung

2.1 Allgemeine Einführung

Im Vergleich zu bakteriellen Infektionserregern spielen Pilze eine eher untergeordnete Rolle. So wurde die klinische Relevanz von Pilzkrankungen erst in der zweiten Hälfte des letzten Jahrhunderts erkannt. Hauptsächlich der medizinische Fortschritt hat dazu beigetragen, dass Pilzkrankungen des Menschen ein immer ernsthafteres Problem darstellen. Allmählich wurde erkannt, dass eine Schwächung des Immunsystems die Patienten empfänglich für eine Vielzahl von opportunistischen Pilzkrankungen macht. Infolgedessen stieg die Grundlagenforschung auf dem Gebiet der pathogenen Pilze stark an.

Es gibt ca. 150 klinisch relevante Pilzarten, die man aufgrund ihres morphologischen Erscheinungsbildes in Sprosspilze (z.B. *Candida albicans* und *Cryptococcus neoformans*), Fadenpilze (z.B. *Aspergillus fumigatus*) und klassisch dimorphe Pilze (z.B. *Histoplasma capsulatum* und *Blastomyces dermatidis*) einteilt (Staib et al., 2000a). Die Mehrheit der fakultativ humanpathogenen Pilzarten gehören zur Gattung *Candida*, die aufgrund eines fehlenden sexuellen Stadiums zu den Fungi imperfecti oder anamorphen Hefen gezählt werden. Es gibt insgesamt etwa 200 *Candida*-Arten, von denen nur wenige medizinische Bedeutung haben. So sind neben *C. albicans* auch *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei* und *C. dubliniensis* für *Candida*-Mykosen im Menschen verantwortlich.

Der gesunde Mensch verfügt über mechanische Barrieren wie Haut und Schleimhäute sowie über eine gesunde Mikroflora und ein intaktes Immunsystem, weshalb er vor Pilzinfektionen geschützt ist. *Candida albicans* befindet sich deshalb normalerweise als kommensaler Organismus im Gastrointestinaltrakt oder auf Schleimhäuten im Mund und Urogenitalbereich des Menschen und kann bei etwa 50% aller Menschen in dieser Form gefunden werden. Wenn jedoch das Gleichgewicht der normalen Flora gestört ist oder das Immunsystem geschwächt ist, dann kann *C. albicans* Krankheiten verursachen. Die Infektionen durch *C. albicans* sind demnach endogenen Ursprungs, nur selten erfolgt eine exogene Infektion (z.B. durch Katheter). Zu den immunschwächenden Maßnahmen gehören z.B. eine künstliche Immunsuppression bei Organtransplantationen und der Einsatz von Chemotherapeutika und Breitspektrum-Antibiotika. Besonders gefährdet sind auch neutropenische Patienten und Patienten mit Krankheiten wie AIDS oder Diabetes mellitus (Einsele et al., 2000).

Candida-Infektionen sind von zunehmender klinischer Bedeutung. Die Anzahl der Infektionen ist in den letzten 20-30 Jahren drastisch angestiegen. Die Mehrzahl der Patienten

sind immunsupprimierte Personen mit HIV-Infektionen und leiden an einer Form der oberflächlichen Candidiasis der Schleimhäute und an wiederkehrenden Infektionen. Zusätzlich leiden etwa 75% aller gesunden Frauen mindestens einmal in ihrem Leben an einer Pilzinfektion der Vagina und etwa 5% an periodisch wiederkehrenden Infektionen (Sobel, 1988, 1992). Eine Candidose kann neben oberflächlichen Körperbereichen auch tiefere Gewebsschichten und innerer Organe, wie Leber und Niere, befallen (Engelmann, 1999). Bei diesen tiefen Organmykosen disseminieren die *C. albicans*-Zellen über die Blutbahn in sämtliche Organe und können sich dort unter Ausbildung von Abszessen ansiedeln, was zu einer Mortalitätsrate von 30% führt (Kullberg and Oude Lashof, 2002; Martin *et al.*, 2003). Diese Form der Infektion kann auch im Verlauf einer Immunsuppression bei Organtransplantation auftreten (Engelmann, 1999). Somit ist eine der Herausforderungen dieses Forschungsgebietes zu klären, wie *C. albicans* den Wechsel von einem Kommensalen zu einem Pathogen vollführt und wie dieser Wechsel verhindert werden kann.

Gegen *C. albicans*-Infektionen gibt es zurzeit nur eine begrenzte Anzahl von geeigneten Wirkstoffen, da Pilze als Eukaryoten zellbiologische Gemeinsamkeiten mit dem Wirt aufweisen. Die Behandlung von Mykosen ist aufgrund der wenigen Angriffsmöglichkeiten und der Wirksamkeit der verwendeten Antimykotika unzulänglich. Eine effektive Dosierung geht bei manchen Antimykotika (z.B. Amphotericin B) mit schweren Nebenwirkungen einher. Zudem treten immer mehr *C. albicans*-Isolate auf, die gegen heute eingesetzte Antimykotika Resistenzen aufweisen. Im klinischen Einsatz sind überwiegend Antimykotika aus fünf Stoffklassen, die auf unterschiedlichen Wirkmechanismen beruhen. Darunter befinden sich unter anderem Polyene (z.B. Amphotericin B), die die Membranfunktion durch Anlagerung an das dort vorhandene Ergosterol stören. Azole (z.B. Fluconazol) und Allylamine (z.B. Terbinafin) stören die Ergosterol-Biosynthese an verschiedenen Stellen. Weniger häufig eingesetzt werden Fluoropyrimidine (z.B. 5-Fluorocytosin), die in den RNA-Metabolismus und in die DNA-Synthese eingreifen (Georgopapadakou, 1998). Die neue Stoffklasse der Echinocandine (z.B. Caspofungin) inhibiert die β -(1,3)-Glukan-Synthese und somit den Zellwandaufbau des Pilzes (Maschmeyer and Ruhnke, 2004). Aufgrund der steigenden Anzahl an *C. albicans*-Infektionen und der bereits aufgetretenen Resistenzen dieses Organismus gegen die vorliegenden Antimykotika ist es unerlässlich, neue und bessere Wirkstoffe zu finden, die auf grundlegende biologische Prozesse und/oder pathogene Faktoren von *C. albicans* zielen.

Die meisten Pathogene, darunter auch *C. albicans*, haben eine Vielzahl von Virulenzfaktoren und spezielle Strategien entwickelt, wie sie Wirtsgewebe besiedeln, Krankheiten auslösen und der Immunantwort entgehen können. Die Virulenzfaktoren, die *C. albicans* benötigt, um den Wirt zu infizieren, variieren in Abhängigkeit von Art, Ort und Stadium der Infektion und von der Art der Wirtsreaktion. Offenbar sind an der Infektion durch *C. albicans* mehrere Virulenzfaktoren beteiligt. Denn weder ist ein einzelner Virulenzfaktor für eine Infektion verantwortlich, noch werden alle exprimierten Virulenzfaktoren für eine bestimmte Phase der Infektion benötigt (Cutler, 1991; Odds, 1994). Die am meisten untersuchten Virulenzmerkmale von *C. albicans* sind Hyphenbildung, Oberflächenmoleküle (z.B. Adhäsine) und die Sekretion hydrolytischer Enzyme (z.B. sekretorische Aspartylproteasen und Phospholipasen) (Calderone and Fonzi, 2001).

Jedoch ist es ungeklärt, wie die einzelnen Virulenzfaktoren reguliert und koordiniert sind und wie sie an der Virulenz beteiligt sind. Um dies näher zu untersuchen, wurden in den vergangenen Jahren molekularbiologische Methoden zur genetischen Veränderung von *C. albicans* entwickelt. Zudem wurden Tiermodelle etabliert, um verschiedene Aspekte des Infektionsverlaufes *in vivo* zu untersuchen.

2.2 Virulenzfaktoren von *C. albicans*

2.2.1 Zellwand und Adhärenz

Die Zellwand von Pilzen, Pflanzen und Bakterien ist eine dynamische Struktur und besitzt eine Reihe essentieller Funktionen. Dazu gehören unter anderem der Schutz vor osmotischem Stress, was dem Erhalt der Zellmorphologie und -physiologie dient (Navarro-Garcia *et al.*, 2001). Die Zellwand von Pathogenen ist zudem wichtig für eine Interaktion mit den Wirtszellen, da die Zellwand den ersten Kontakt zur Wirtszelle herstellt. Die Zellwand von *C. albicans* besteht hauptsächlich aus β -Glukanen, Mannoproteinen und Chitin. Mannoproteine machen etwa 50% des Gewichtes der Zellwand aus. Da sie auf der Zelloberfläche konzentriert vorkommen, haben sie antigene und immunmodulatorische Eigenschaften und spielen eine wichtige Rolle bei der Adhäsion und Interaktion mit Wirtszellen.

Als Kommensale von Schleimhäuten hat *C. albicans* verschiedene Mechanismen ausgebildet, an kolonisierenden Bakterien und direkt an Epithel- und Endothelzellen sowie an Proteine der extrazellulären Matrix des Wirtes zu adhären (Calderone and Gow, 2002). Erste

Beobachtungen, dass die Adhärenz von *C. albicans* zur Virulenz beiträgt, wurden Anfang der 80er Jahre gemacht (King *et al.*, 1980). In Adhäsionsassays wurde gezeigt, dass *C. albicans* am stärksten von insgesamt sieben getesteten *Candida*-Arten an Epithelzellen adhäriert. Da *C. albicans* unter allen *Candida*-Arten das stärkste Pathogen ist, geben diese Ergebnisse indirekte Hinweise, dass die Adhärenz an der Virulenz beteiligt ist. Zusätzlich wurde ein direkter Zusammenhang von Adhärenz und Virulenz im Tiermodell gefunden. So zeigten Cerulenin-resistente Stämme sowohl eine verringerte Adhärenz zu menschlichen Epithelzellen als auch eine Avirulenz in Tiermodellen (Calderone *et al.*, 1985; Lehrer *et al.*, 1986). Somit scheint ein Zusammenhang zwischen verringerter Adhärenz *in vitro* und verringerter Virulenz *in vivo* zu bestehen, was darauf hindeutet, dass die Adhärenz von *C. albicans* ein kritischer Schritt bei der Infektion darstellt. Die Adhärenz wird in der Regel durch eine Kombination von spezifischen und unspezifischen Mechanismen erreicht, die es *C. albicans* erlauben an unterschiedliche Gewebetypen und an künstliche Oberflächen anzuheften. Zu den spezifischen Mechanismen gehören Ligand-Rezeptor Wechselwirkungen, bei denen die Mannoproteine der Zellwand von *C. albicans* eine wichtige Rolle spielen. Zu den unspezifischen Faktoren dagegen zählen Mucopolysaccharid- und Protein-Protein-Interaktionen sowie die Hydrophobizität der *C. albicans*-Zellwand (Ollert *et al.*, 1993; Cotter and Kavanagh, 2000).

Von besonderer Bedeutung für die Adhärenz von *C. albicans* an Wirtszelloberflächen sind Mitglieder einer Familie von acht *ALS*-(*agglutinin-like sequence*) Genen, die für Zellwandglykoproteine codieren. Für die adhäsive Eigenschaft dieser Proteine zeigt sich eine N-terminale Domäne verantwortlich, die auf der Oberfläche von *C. albicans* präsentiert wird (Hoyer, 2001).

Ein weiteres Zellwand-Protein, das für die Interaktion von *C. albicans* mit Wirtszellen von Bedeutung ist, wurde von Staab und Kollegen isoliert. Dabei handelt es sich um Hwp1p, das hyphenspezifisch exprimiert wird. Dieses Protein ist über einen GPI-(Glycosylphosphatidylinositol)-Anker an das β -Glukan der Zellwand gebunden (Staab and Sundstrom, 1998). Die Bedeutung dieses Proteins für die Interaktion von *C. albicans* mit Wirtszellen wurde erkannt, indem gezeigt wurde, dass der N-Terminus dieses Proteins ein Substrat für die Transglutaminase von Säugetierzellen ist. Bei der Transglutaminase handelt es sich um ein vernetzendes Enzym, das in menschlichen Epithel- und Endothelzellen gefunden werden kann (Staab *et al.*, 1999). Dieses Enzym ist in der Lage Prolin-reiche Proteine, und somit auch den N-Terminus von Hwp1p, mit Proteinen in menschlichen

Epithelien zu vernetzen. Somit könnte *C. albicans* durch molekulares Mimikry die Besiedlung und Penetration von Wirtsgewebe einleiten. *hwp1Δ*-Mutanten sind kein Substrat für die menschliche Transglutaminase und sind infolgedessen weniger adhärenz zu menschlichen Epithelzellen und weniger virulent in einem Mausmodell systemischer Candidiasis (Staab *et al.*, 1999; Tsuchimori *et al.*, 2000).

2.2.2 Dimorphismus und Signaltransduktion

C. albicans ist in der Lage sowohl sphärische (Hefezellen und Chlamydosporen) als auch verlängerte Zellen (Hyphen und Pseudohyphen) zu bilden. Der Begriff „Dimorphismus“ beschreibt den Wechsel von der Hefe- in die Hyphenform und umgekehrt, der in Abhängigkeit von Umweltbedingungen reversibel erfolgen kann. Die rund-ovalen Hefezellen mit einem Durchmesser von ca. 3-5 μm trennen sich direkt nach der Knospung, während das Hyphenwachstum durch ständiges apikales Wachstum der Zellen charakterisiert ist. Dabei sind die Zellkompartimente durch Septen voneinander getrennt. Das Wachstum von Pseudohyphen hingegen unterscheidet sich von dem der echten Hyphen insofern, dass bei Pseudohyphen ein Wachstum durch unipolare Knospung erfolgt. Die Knospen, die sich an den verlängerten Zellen gebildet haben, bleiben jeweils mit der Mutterzelle verbunden. So bilden sich Filamente in Form von Ketten länglicher Blastokonidien. Chlamydosporen hingegen sind dickwandige sphärische Zellen, die aus Pseudohyphen entstehen können (Montazeri and Hedrick, 1984; Joshi *et al.*, 1993). Schließlich können noch durch spontanes phänotypisches switching vergrößerte und verlängerte Zellen entstehen, die sich von den Hefen- und Pseudohyphenzellen unterscheiden. Diese Zellen bilden keine nennenswerten Filamente. Dabei handelt es sich um so genannte opaque-Zellen, die im Matingprozess eine wichtige Rolle spielen (Soll *et al.*, 1993; Soll, 1997).

In vitro kann das Hyphenwachstum in Hefezellen durch Inkubation bei erhöhter Temperatur und in Gegenwart von Serum erfolgen (Buffo *et al.*, 1984). Da *C. albicans* zur Invasion von Gewebe in die Hyphenform wechselt, wird dieser dimorphe Wechsel als Virulenzfaktor diskutiert. Zudem wurde beobachtet, dass Keimschläuche fester als Hefezellen an Wirtszellen adhären und dass *C. albicans* nach Aufnahme von Makrophagen diese durch Ausbildung von Hyphen zerstören kann (Louria and Brayton, 1964; Kimura and Pearsall, 1980; Odds, 1988). Auch sind Mutanten, die keine Hyphen bilden können, im Mausmodell avirulent (Lo *et al.*, 1997). All dies untermauert die Vermutung, dass der Dimorphismus zur Virulenz beiträgt. Allerdings besteht auch die Möglichkeit, dass die Hefe- und die Hyphenform gemeinsam

durch ein koordiniertes Zusammenspiel zur Pathogenität von *C. albicans* beitragen (Odds, 1994). Die Hefe- und die Hyphenform unterscheiden sich nicht nur durch ihre Morphologie, sondern auch durch die Ausprägung anderer Virulenzmerkmale, wie Adhärenz oder die Sekretion hydrolytischer Enzyme.

Um den Dimorphismus und somit den Übergang von der Hefe- in die Hyphenform besser verstehen zu können, wurden in den letzten Jahren einige Anstrengungen unternommen, um das regulatorische Netzwerk, das diesem Phänomen zugrunde liegt, genetisch näher zu untersuchen. Zunächst wurden vergleichende Studien mit *S. cerevisiae* durchgeführt. Dadurch konnten in *C. albicans* zwei wichtige Signaltransduktionswege identifiziert werden: ein cAMP-abhängiger Signalweg und eine Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK)-Kaskade (Brown and Gow, 1999).

Am Ende des cAMP-abhängigen Signalweges steht der Transkriptionsfaktor Efg1p, ein DNA-bindendes Protein mit Helix-Loop-Helix-Struktur (Stoldt *et al.*, 1997). Efg1p ist ein sehr starker Regulator der morphogenetischen Prozesse in *C. albicans*, da er nicht nur den Wechsel von der Hefe- in die Hyphenform (Lo *et al.*, 1997; Stoldt *et al.*, 1997), sondern auch das phänotypische switching und die Bildung von Chlamydosporen reguliert (Sonneborn *et al.*, 1999a; Sonneborn *et al.*, 1999b). Efg1p wird über cAMP und Proteinkinase A reguliert und ist für das Wachstum von echten Hyphen von großer Bedeutung. Denn bei Mutanten, denen Efg1p fehlt, kann unter Hyphen-induzierenden Bedingungen, wie Wachstum in Gegenwart von Serum und GlcNAc, keine Hyphenbildung beobachtet werden (Lo *et al.*, 1997; Stoldt *et al.*, 1997). Eine weitere wichtige Komponente dieses Signalweges ist *RAS1*, das weit upstream liegt. Mutanten, denen Ras1p fehlt, sind ebenfalls nicht in der Lage in Gegenwart von Serum Hyphen zu bilden, während Pseudohyphen aber noch beobachtet werden konnten. Eine aktive Form von Ras1p stimuliert das Hyphenwachstum, während eine inaktive Form von Ras1p dieses unterdrückt (Feng *et al.*, 1999).

Zusätzlich wird das Hyphenwachstum durch Medien induziert, die nur sehr geringe Mengen an Stickstoff enthalten (z.B. SLAD) (Csank *et al.*, 1998). Ein ähnlicher Phänotyp wie auf SLAD-Platten wird auch in Medien beobachtet, die Mannitol als Kohlenstoffquelle und eine gut verwertbare Stickstoffquelle enthalten (modifiziertes Lee's Medium oder Spider Medium) (Liu *et al.*, 1994). Ein Mangel an Stickstoff aktiviert in *S. cerevisiae* die MAPK-Kaskade, die letztendlich in einer Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors Ste12p durch die Mitogen-aktivierte Protein-(MAP)-Kinase Kss1p resultiert (Liu *et al.*, 1993; Madhani and Fink, 1997). Diese Kaskade ist in *S. cerevisiae* am Mating-Prozess und an der Ausbildung von

Pseudohyphen beteiligt. Homologe Proteine der MAPK-Kaskade aus *S. cerevisiae*, darunter auch das Homolog der MAP-Kinase Kss1p (Cek1p) und das Homolog des Transkriptionsfaktors Ste12p (Cph1p), konnten in *C. albicans* identifiziert werden (Liu et al., 1994; Köhler and Fink, 1996; Leberer et al., 1996; Csank et al., 1998). Während Mutationen in *STE12* die Entwicklung von Pseudohyphen in *S. cerevisiae* blockieren und einen Defekt im Mating-Prozess verursachen, unterdrückt eine Mutation in *CPH1* in *C. albicans* die Hyphenentwicklung nur auf bestimmten Medien (Spider oder SLAD) (Liu et al., 1994; Köhler and Fink, 1996; Leberer et al., 1996; Csank et al., 1998). Diese Mutation hat keinen Einfluss auf die Bildung echter Hyphen in Gegenwart von Serum oder auf die Virulenz der Mutanten im Tiermodell.

Aufgrund der Tatsache, dass eine *cph1Δ efg1Δ* -Doppelmutante unter bestimmten *in vitro*-Bedingungen und in einigen Tiermodellen Hyphen ausbilden konnte, wurde gefolgert, dass zusätzlich zu den beiden Signalwegen andere Faktoren an dieser komplexen Regulation beteiligt sein müssen (Riggle *et al.*, 1999). So wurden in den vergangenen Jahren weitere Faktoren identifiziert, die an der morphogenetischen Regulation in *C. albicans* beteiligt sind. Darunter befinden sich sowohl Faktoren, die aktivierend auf das Hyphenwachstum einwirken (*CZF1* und *TEC1*; (Brown et al., 1999; Schweizer et al., 2000)), als auch Faktoren, die das filamentöse Wachstum reprimieren (*TUP1* und *NRG1*; (Braun and Johnson, 1997; Braun et al., 2000; Braun et al., 2001)). Allerdings ist es noch unklar wie die einzelnen Regulatoren unter einander verbunden sind und/oder wie sie weitere Virulenzgene beeinflussen können.

2.2.3 Sekretorische Aspartyl-Proteasen (SAPs)

Ein wichtiger Faktor, der zur Virulenz von *C. albicans* beiträgt, ist die Sekretion hydrolytischer Enzyme. Hydrolytische Enzyme spielen allgemein eine wichtige Rolle in der Pathogenität von Bakterien (Finlay and Falkow, 1989), Protozoen (McKerrow *et al.*, 1993) und pathogenen Hefepilzen (Ogrydziak, 1993). Bei den am stärksten an der Virulenz beteiligten hydrolytischen Enzymen von *C. albicans* handelt es sich neben den Phospholipasen um die Proteasen.

In früheren Experimenten wurde schnell erkannt, dass die Proteasen im Zusammenhang mit der Pathogenität von *C. albicans* stehen. So wurde Anfang der 80er Jahre beobachtet, dass die Stärke der *in vitro*-Proteaseaktivität von *C. albicans*, *C. tropicalis* und *C. parapsilosis* mit ihrer Pathogenität korrelierte (Rüchel *et al.*, 1983). In den vergangenen Jahren zeigten zudem einige Studien, dass die Protease-Gene von *C. albicans* auch *in vivo* differentiell reguliert und

exprimiert werden. So werden diese zu unterschiedlichen Zeitpunkten innerhalb des Infektionsprozesses, aber auch in unterschiedlichen Infektionsmodellen differentiell exprimiert (Staib et al., 2000b; Naglik et al., 2004).

In *C. albicans* gehören alle bedeutenden und gut untersuchten sekretierten Proteasen zur Klasse der sekretorischen Aspartyl-Proteasen (SAPs) (Naglik et al., 2003). Kürzlich wurden zwei neue Klassen extrazellulärer Proteasen in *C. albicans* identifiziert. Dabei handelt es sich um eine Metallo- und um eine Serinprotease. Die Serinprotease ist über einen großen pH-Bereich aktiv und ist zudem in der Lage menschliche Serumproteine und Komponenten der extrazellulären Matrix abzubauen. In Medium mit bovinem Serumalbumin (BSA) als alleiniger Stickstoffquelle allerdings wurde nur eine Aktivität von Aspartyl-Proteasen und nicht von Metallo- oder Serinproteasen beobachtet (dos Santos et al., 2006).

Die Klasse der sekretorischen Aspartyl-Proteasen wird in *C. albicans* von einer Familie bestehend aus zehn *SAP*-Genen codiert (Monod et al., 1994; Monod et al., 1998; Albrecht et al., 2006). Es wird diskutiert, dass die *SAP*-Gene unterschiedliche Rollen im Verlauf der Infektion übernehmen. So können sie z.B. zur Adhärenz beitragen (Watts et al., 1998), Wirtsgewebe abbauen (Colina et al., 1996; Morschhäuser et al., 1997), Moleküle des Immunsystems zerstören (Rüchel, 1986; Kaminishi et al., 1995) oder Wirtsproteine verdauen, um sie als Nahrungsquelle zu verwerten (Staib, 1965). Von den zehn *SAP*-Genen ermöglicht *SAP2* *C. albicans* ein Wachstum auf Proteinen. Hinweise darauf ergeben sich dadurch, dass die *SAP2*-Expression durch ein Medium, das Proteine als alleinige Stickstoffquelle enthält, induziert wird, und dass eine *C. albicans sap2Δ*-Mutante nicht in der Lage ist in einem solchen Medium zu wachsen (Hube et al., 1994; Hube et al., 1997). Sap2p ist in der Lage einige menschliche Proteine abzubauen, darunter auch Moleküle wie Mucin, die die Oberflächen von Schleimhäuten schützen (Colina et al., 1996; de Repentigny et al., 2000), und sekretorisches Immunoglobulin A (Rüchel, 1986; Goldman et al., 1995). Zudem kann Sap2p Toxine und Enzyme neutralisieren (Kilian et al., 1988) und viele Moleküle der extrazellulären Matrix wie Keratin, Kollagen und Vimentin abbauen (Ray and Payne, 1990; Ogrydziak, 1993; Hube, 1996). Auch ein Abbau von Lactoferrin, Lactoperoxidase, Kathepsin D und Komplement durch Sap2p wurde beobachtet (Germaine and Tellefson, 1981; Kaminishi et al., 1995; Hube, 1996).

Alle zehn *SAP*-Gene codieren für Präproenzyme, die etwa 60 Aminosäuren länger sind als die reifen Enzyme. Die Prozessierung erfolgt während des Transportes über den Sekretionsweg. Nach der Translation der mRNA im Cytoplasma gelangen die Präproenzyme in das raue

endoplasmatische Retikulum (rER). Dort wird das N-terminale Signalpeptid durch eine Signal-Peptidase entfernt und das Proenzym gelangt anschließend in den Golgi-Apparat, wo es durch eine Kex2-Protease weiter prozessiert wird (Togni et al., 1996; Newport and Agabian, 1997). Danach wird das Enzym in sekretorische Vesikel verpackt und zur Plasmamembran transportiert. Dort bleiben die Enzyme entweder mit der Membran verbunden, werden über einen GPI-(Glycosylphosphatidylinositol)-Anker in die Zellwand eingefügt (Sap9p und Sap10p) oder werden nach außen sekretiert (Naglik et al., 2003; Albrecht et al., 2006). Die reifen Enzyme enthalten Sequenz-Motive, die typisch für Aspartyl-Proteasen sind, einschließlich der beiden konservierten Aspartat-Reste des aktiven Zentrums. Die reifen Enzyme Sap1p bis Sap10p haben eine Größe zwischen 35 und 50 kDa (Monod *et al.*, 1994; Monod *et al.*, 1998) und sind an den meisten extrazellulären proteolytischen Aktivitäten von *C. albicans* beteiligt. Die einzelnen Saps zeigen deutliche Unterschiede im pH-Optimum. So haben Sap1p-Sap3p die größte Aktivität bei niedrigen pH-Werten, während Sap4p-Sap6p ihre größte Aktivität bei höheren pH-Werten haben. Dabei decken die Saps einen pH-Bereich von 2.0 bis 7.0 ab. Dies ermöglicht *C. albicans* unterschiedlichste Gewebe, wie verschiedene Schleimhäute, Haut und innere Organe, zu kolonisieren.

Interessanterweise sind die Gene *SAP1-SAP6* auf Sequenzebene stark miteinander verwandt. *SAP1-SAP3* und *SAP4-SAP6* bilden jeweils Untergruppen mit sehr hoher Homologie zueinander (Hube *et al.*, 1994). Die Gene zeigen eine differentielle Expression *in vitro*. So werden *SAP1-SAP3* spezifisch in Hefezellen exprimiert, während *SAP4-SAP6* spezifisch in der Hyphenform exprimiert werden (Hube *et al.*, 1994). Die Expression von *SAP1* wurde hauptsächlich im Zusammenhang mit dem Phänomen des phänotypischen switching im Stamm WO1 nachgewiesen. Zellen der opaque-Phase exprimieren *SAP1*, während Zellen der white-Phase *SAP1* nicht exprimieren. In den opaque-Zellen kann zusätzlich die Expression von *SAP3* beobachtet werden, allerdings nur, wenn auch *SAP2* exprimiert wird, d.h. nur dann, wenn ein Protein die einzig verfügbare Stickstoffquelle im Medium ist (White and Agabian, 1995). Sap9p und Sap10p besitzen als einzige Mitglieder der *SAP*-Genfamilie einen GPI-(Glycosylphosphatidylinositol)-Anker, mit dem die beiden Proteasen mit der Plasmamembran verbunden oder in der Zellwand von *C. albicans* verankert sind (Albrecht *et al.*, 2006).

Die Regulation der Expression der *SAP*-Gene ist weitgehend ungeklärt. Da die *SAP*-Gene aber Präproenzyme codieren, könnte die Regulation der Protease-Expression auf mRNA- oder Protein-Ebene kontrolliert werden (Naglik et al., 2003). Experimente mit dem Proteaseinhibitor Pepstatin A zeigten, dass die *SAP2*-Expression in *C. albicans* über einen

positiven Rückkopplungsmechanismus reguliert wird. Denn proteolytische Abbauprodukte, die durch eine basale Sap2p-Aktivität entstehen, und Peptide mit mindestens acht Aminosäuren sind in der Lage *SAP2* zu induzieren (Lerner and Goldman, 1993; Hube et al., 1994). Für die Induktion der *SAP2*-Expression durch diese Peptide sind im Wesentlichen zwei Mechanismen denkbar. Zum einen könnten Zelloberflächenrezeptoren die Peptide im Außenmedium binden und die Expression von *SAP2* durch eine dadurch aktivierte Signalkaskade induzieren. Zum anderen könnten aber die Peptide auch durch spezifische Transporter in die Zelle aufgenommen werden und dort direkt die *SAP2*-Expression steuern (Lerner and Goldman, 1993). Somit ist denkbar, dass Oligopeptidtransporter an der Induktion von *SAP2* beteiligt sind, entweder in der Rolle eines Transporters oder in der Rolle eines Sensorproteins.

2.3 Peptid-Transport in Pilzen

Die Fähigkeit von Organismen Peptide zu transportieren ist ubiquitär und wurde in Bakterien, Pilzen, Pflanzen und Tieren beobachtet. Nach der Aufnahme der Peptide werden diese sehr schnell in einzelne Aminosäuren zerlegt, die dann als Quelle für Aminosäuren, Stickstoff und Kohlenstoff dienen. Zudem wurde beschrieben, dass Peptidtransport auch eine Rolle beim Recycling von Zellwandproteinen und beim Übertragen von Signalen, wie etwa bei der Sporulation in *Bacillus subtilis* oder bei der Chemotaxis in *Escherichia coli*, spielt (Lubkowitz et al., 1997). In Säugern werden Peptidtransporter zur Aufnahme von peptidähnlichen Stoffen, wie etwa β -Lactam Antibiotika, Angiotensin-konvertierendes Enzym (ACE) und Renin-Inhibitoren, verwendet (Leibach and Ganapathy, 1996; Yang et al., 1999). *S. cerevisiae* besitzt zwei genetisch und physiologisch unterschiedliche Protonen-gekoppelte Transportsysteme für Peptide. Das PTR-(Peptide Transport)-System ist spezifisch für Di-/Tripeptide, während das OPT-(Oligopeptide Transport)-System Tetra- und Pentapeptide transportiert.

2.3.1 Das PTR-System

Das PTR-System besteht in *S. cerevisiae* aus mindestens drei voneinander abhängigen Genen (*PTR1*, *PTR2*, *PTR3*), wobei *PTR2* den eigentlichen Transporter und *PTR1/PTR3* regulatorische Proteine codieren.

PTR2 codiert für ein integrales Membranprotein (Ptr2p) mit 601 Aminosäuren und zwölf Transmembrandomänen, das an der Translokation der Di-/Tripeptide über die Plasmamembran beteiligt ist. *PTR2* ist essentiell für den Peptidtransport in *S. cerevisiae*, denn eine *ptr2*-Mutante ist nur nach Komplementation mit *PTR2* in der Lage Dipeptide zu transportieren (Perry *et al.*, 1994).

PTR1 reguliert die Transkription von *PTR2* und ist als Regulator ebenfalls essentiell für den Peptidtransport. So ist eine *ptr1*-Mutante nicht in der Lage kleine Peptide zur Deckung des auxotrophen Bedarfs zu verwerten, ist resistent gegenüber toxischen Peptiden und unfähig radioaktiv markierte Dipeptide auf Wildtyp-Niveau zu transportieren (Island *et al.*, 1991). *PTR1* codiert für ein Protein mit 1950 Aminosäuren, welches Ubr1p entspricht (Alagramam *et al.*, 1995). *UBR1* ist eine essentielle Komponente des „N-end rule pathway“, ein Ubiquitin-abhängiges Proteindegradationssystem (Bartel *et al.*, 1990). Dieses System zielt auf Proteine, die ein Degradationssignal („N-degron“) tragen (Bachmair *et al.*, 1986), das aus einem destabilisierenden N-terminalen Rest und einem Lysinrest besteht (Bachmair and Varshavsky, 1989; Varshavsky, 1996). Ubr1p/Ptr1p arbeitet mit einem spezifischen Ubiquitin-konjugierenden Enzym (Ubc2p/Rad6p) zusammen, um „N-end rule“ Substrate abzubauen (Dohmen *et al.*, 1991). Innerhalb des PTR-Systems ist das Substrat dieses Ubiquitin-abhängigen Proteindegradationssystems Cup9p (Varshavsky, 1996). Cup9p bindet an den *PTR2*-Promotor in der Rolle eines Repressors. Nach Ubiquitinierung von Cup9p durch Ubr1p/Ptr1p löst sich Cup9p vom *PTR2*-Promotor und infolgedessen wird *PTR2* exprimiert (Byrd *et al.*, 1998). Daten aus früheren Experimenten deuten darauf hin, dass aufgenommene Peptide an Ubr1p/Ptr1p binden und somit den Ubr1p/Ptr1p-abhängigen Abbau von Cup9p beschleunigen. Somit könnten diese Peptide als Induktoren dienen (Turner *et al.*, 2000).

PTR3 ist ein weiteres regulatorisches Element und erhöht die Expression von *PTR2*. *PTR3* codiert für ein Protein mit 678 Aminosäuren und zeigt keine Ähnlichkeit zu bereits identifizierten Genen. Genetische Analysen zeigten, dass *PTR3* zusammen mit *CUP9* und *PTR1* an der Regulation der Expression von *PTR2* beteiligt ist (Barnes *et al.*, 1998). Weitere Analysen ergaben, dass Ptr3p Teil des so genannten SPS-Sensors (Forsberg and Ljungdahl, 2001) ist, der aus den Komponenten Ssy1p, Ptr3p und Ssy5p besteht. Zellen, denen eine dieser drei Komponenten des Sensors fehlt, sind nicht in der Lage auf mikromolare Konzentrationen an Aminosäuren im Medium zu reagieren (Jorgensen *et al.*, 1998; Bernard and Andre, 2001; Forsberg and Ljungdahl, 2001). Ssy1p ist die einzige Komponente des SPS-Sensors, die in die Plasmamembran integriert ist. Zudem transportiert Ssy1p als einziges Mitglied der AAP-

(Aminosäure-Permease)-Familie keine Aminosäuren (Didion et al., 1998; Iraqui et al., 1999; Klasson et al., 1999; Gaber et al., 2003). Der SPS-Sensor fungiert als Ligand-aktivierter Rezeptor von extrazellulären Aminosäuren, der die Kernlokalisierung von Stp1p und Stp2p, zweier latent exprimierter Transkriptionsfaktoren, kontrolliert (Andreasson and Ljungdahl, 2002). Als Reaktion auf die Zugabe von Aminosäuren werden Stp1p und Stp2p endoproteolytisch gespalten. Die kürzere Form beider Transkriptionsfaktoren, denen nun die negativ regulierenden Domänen fehlen, gelangen in den Zellkern und induzieren dort Gene, die durch den SPS-Sensor reguliert werden (Andreasson and Ljungdahl, 2004). Zusätzlich wird eine weitere Komponente benötigt, um die Prozessierung von Stp1p und Stp2p durch den SPS-Sensor zu ermöglichen. Dabei handelt es sich um Shr3p, ein Integralprotein, das in der Membran des endoplasmatischen Retikulums lokalisiert ist (Klasson *et al.*, 1999). Shr3p fungiert als ein Chaperon, das spezifisch von den AAPs (inklusive Ssy1p) benötigt wird, um das endoplasmatische Retikulum verlassen zu können (Klasson *et al.*, 1999; Kota and Ljungdahl, 2005). Eine *shr3Δ*-Mutante ist weder in der Lage Aminosäuren wahrzunehmen, noch aufzunehmen.

Orthologe des *S. cerevisiae* PTR-Systems (*CaPTR2*, (Basrai *et al.*, 1995)), der AAPs und der bekannten Komponenten des SPS-Sensors konnten im Genom von *C. albicans* identifiziert werden (Martinez and Ljungdahl, 2004). *CaPTR2* wurde über heterologe Expression einer *C. albicans*-Genbank in einer *S. cerevisiae*-Dipeptidtransportmutante identifiziert. CaPtr2p hat ähnliche Eigenschaften wie Ptr2p von *S. cerevisiae*, besteht aus 623 Aminosäuren und hat zwölf putative Transmembrandomänen (Basrai et al., 1995). In der Genomsequenz von *C. albicans* konnte zudem kürzlich ein weiteres PTR-Gen identifiziert werden, das *PTR22* genannt wurde (unveröffentlichtes Ergebnis). Einige Studien liefern eindeutige Beweise, dass *C. albicans* ebenfalls den SPS-Sensor benutzt, um extrazelluläre Aminosäuren in ähnlicher Weise wie *S. cerevisiae* wahrzunehmen. So wird Csy1p, das Ortholog zu Ssy1p, zur Aminosäure-induzierten Expression der AAP-Gene benötigt, denn *csy1Δ*-Mutanten wiesen einen starken Defekt in der Aufnahme von Aminosäuren auf (Brega *et al.*, 2004). Weiterhin wird Csh3p, das Ortholog zu Shr3p, für eine einwandfreie Lokalisation der AAPs und von Csy1p an der Plasmamembran benötigt (Martinez and Ljungdahl, 2004). So zeigten die *csh3Δ*-Mutanten alle Phänotypen einer *csy1Δ*-Mutante, darunter auch der starke Defekt in der Aufnahme von Aminosäuren. Außerdem sind sie nicht in der Lage einen morphologischen Wechsel als Reaktion auf induzierende Aminosäuren zu vollziehen. Zusätzlich waren die *csh3Δ*-Mutanten in einem Mausmodell weniger virulent, was darauf hindeutet, dass die

Fähigkeit Aminosäuren aufzunehmen essentiell für das Wachstum von *C. albicans* in Säugern ist (Martinez and Ljungdahl, 2004). Es deutet demnach alles darauf hin, dass in *C. albicans* CaPtr3p, CaSsy5p und Csy1p zusammen den Ca-SPS-Sensorkomplex bilden (Martinez and Ljungdahl, 2005).

Schließlich wurde gezeigt, dass die Transkriptionsfaktoren Stp1p und Stp2p auch in *C. albicans* als latente Vorstufen synthetisiert und als Antwort auf extrazelluläre Aminosäuren proteolytisch prozessiert werden (Martinez and Ljungdahl, 2005). Stp1p und Stp2p zeigen in *C. albicans* Unterschiede in den Genen, die sie aktivieren. So aktiviert Stp1p Gene, die für die Verwertung extrazellulärer Proteine benötigt werden (*SAP2*, *OPT1*, *OPT3*, *PTR2*), während Stp2p Gene aktiviert, die für Aminosäure-Permeasen codieren (AAPs). Zusätzlich wird Stp1p durch die Verfügbarkeit an Aminosäuren kontrolliert, d.h. in Gegenwart einer hohen Konzentration von Aminosäuren im Medium wird Stp1p kaum exprimiert, während in Gegenwart mikromolarer Konzentrationen an Aminosäuren Stp1p stark exprimiert wird (Martinez and Ljungdahl, 2005). Dies deutet darauf hin, dass die Zellen zunächst extrazelluläre Aminosäuren verwerten und erst dann sekretorische Proteasen induzieren, wenn die Verfügbarkeit von Aminosäuren begrenzt ist. Diese Ergebnisse stimmen mit früheren Studien überein, die zeigten, dass Aminosäuren dann die Expression von Proteasen inhibierten, wenn die vorhandenen Aminosäuren als Stickstoffquelle ausreichten (Banerjee *et al.*, 1991; Hube *et al.*, 1994) und dass niedrige Konzentrationen von Aminosäuren selbst in der Abwesenheit extrazellulärer Proteine die Sekretion von Proteasen stimulieren (Homma *et al.*, 1993) und den Di-/Tripeptidtransport erhöhen konnten (Basrai *et al.*, 1992).

2.3.2 Das OPT-System

Drei Beobachtungen führten zu der Annahme, dass es in *C. albicans* neben einem Di-/Tripeptidtransporter noch ein anderes Peptidtransportsystem geben muss. Die erste Beobachtung war, dass Mutanten, die resistent gegen die toxischen Peptidanaloga Bacilysin, Polyoxin und Nikkomycin Z (sind Substrate für Di-/Tripeptidtransporter) waren, noch in der Lage waren Tetra- und Pentapeptide so effizient wie der Wildtyp zu transportieren. Ebenso konnten Mutanten, die resistent gegen mehrere toxische Tetrapeptide waren, Dipeptide auf Wildtyp-Niveau transportieren (McCarthy *et al.*, 1985; Payne and Shallow, 1985; Milewski *et al.*, 1988). Weiter zeigten Experimente, mit denen die Aufnahme von radioaktiven Peptiden und farbgebenden Substraten getestet werden sollte, dass Dipeptide nicht mit Tetra-/Pentapeptiden um die Aufnahme in die Zelle konkurrierten (Yadan *et al.*, 1984; McCarthy *et*

al., 1985; Milewski et al., 1988). Zusätzlich wurde beobachtet, dass die Sensitivität der Zellen gegen toxische Di- und Tripeptide durch die Stickstoffquelle und durch mikromolare Konzentrationen an Aminosäuren beeinflusst werden konnte. Die Sensitivität der Zellen gegen toxische Tetra- und Pentapeptide hingegen konnte nicht in einer derartigen Weise beeinflusst werden (Basrai *et al.*, 1992). Aus diesen Studien wurde gefolgert, dass in *C. albicans* ein zweites System für den Peptidtransport existieren muss. Dieses System sollte spezifisch Tetra-/Pentapeptide transportieren. Tatsächlich wurde experimentell ein neuartiges Oligopeptidtransporter-Gen in *C. albicans* identifiziert, das weder einen ABC-, noch einen PTR-Transporter codiert (Lubkowitz *et al.*, 1997). Hierzu wurde eine *C. albicans* Genbank in eine *S. cerevisiae ptr2*-Mutante transformiert, die nicht in der Lage ist Di- und Tripeptide zu transportieren. Die erhaltenen Transformanten wurden auf ihre Fähigkeit hin getestet auf Tetrapeptiden zu wachsen, die normalerweise nicht verwertet werden. Durch diese Vorgehensweise konnte ein Gen aus *C. albicans* (*OPT1*) identifiziert werden, das ein Wachstum der Transformante auf einem Tetrapeptid ermöglichte, während der Ausgangsstamm nicht in der Lage war dieses Peptid zu verwerten. Wie durch weitere Wachstumstests und Experimente mit toxischen und radioaktiven Peptiden gezeigt wurde, ist Opt1p in der Lage Tetra- und Pentapeptide zu transportieren. Auch der Transport von Tripeptiden wurde in geringem Maße beobachtet. *OPT1* aus *C. albicans* codiert für ein integrales Membranprotein (Opt1p) mit 783 Aminosäuren und zwölf Transmembrandomänen (Lubkowitz et al., 1997).

Durch Sequenzvergleiche wurden in *S. cerevisiae* zunächst drei homologe Gene identifiziert (*ScOPT1*, *ScOPT2*, *YGL114w*). *YGL114w* zeigt hohe Homologie zu Yellow Stripe 1 (YS1) von *Zea mays*, das für einen Eisen-Phytosiderophore-Transporter codiert (Curie *et al.*, 2001). Yen und Kollegen (Yen *et al.*, 2001) schlossen aufgrund von Sequenzanalysen Ygl114wp und YS1 in die OPT-Familie mit ein. Genetische Analysen allerdings ergaben, dass Ygl114wp nicht in der Lage ist Oligopeptide zu transportieren. Außerdem zeigten *in silico* Analysen grundlegende Unterschiede im Aufbau von Ygl114wp im Vergleich zu anderen Mitgliedern der OPT-Familie (Wiles et al., 2006). *ScOPT1* und *ScOPT2* codieren tatsächlich für Oligopeptidtransporter mit ähnlichen Eigenschaften wie *CaOPT1* (Lubkowitz et al., 1998; Hauser et al., 2001). Beide werden in *S. cerevisiae* allerdings nicht unter vegetativen Wachstumsbedingungen, sondern nur während der Sporulation exprimiert (Velculescu et al., 1997; Chu et al., 1998).

Es konnten für das OPT-System keine regulatorischen Elemente mit Homologie zu *PTR1* und *PTR3* identifiziert werden. Die OPT-Familie ist wesentlich weniger weit verbreitet als die PTR-Familie, denn die OPT-Familie scheint auf Pilze und Pflanzen beschränkt zu sein, während die PTR-Familie in nahezu allen Organismen gefunden werden kann. Über Sequenzanalysen konnten mittlerweile *OPT*-Gene in 14 Pilz- und vier Pflanzenarten identifiziert werden, was zu 81 Pilz- und 22 Pflanzenproteinen führte (Wiles et al., 2006). Neben den bereits erwähnten Arten befinden sich darunter z.B. *Schizosaccharomyces pombe*, *Neurospora crassa*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus nidulans* und *Arabidopsis thaliana*. Interessanterweise konnten in *Candida glabrata* keine *OPT*-Gene identifiziert werden (Wiles et al., 2006). *PTR*-Gene hingegen konnten z.B. auch in *Drosophila melanogaster* (*OPT1*, (Roman et al., 1998)) und in *Caenorhabditis elegans* (*OPT1*, *OPT2* und *OPT3*, (Fei et al., 2000)) gefunden werden. Verwirrend ist allerdings die Bezeichnung „OPT“, da diese Gene eindeutig zur PTR-Familie und nicht zur OPT-Familie gehören. Auch in Bakterien konnten Transporter der PTR-Familie identifiziert werden, einschließlich der DtpT-Transporter von *Lactococcus lactis* und *Bacillus subtilis* (Hagting et al., 1994; Saier et al., 1999).

Oligopeptidtransporter könnten zusätzlich zum Peptidtransport auch an der Regulation der *SAP2*-Expression beteiligt sein. Denn es ist bekannt, dass proteolytische Abbauprodukte, die durch eine basale Sap2p-Aktivität entstehen, und Peptide mit mindestens acht Aminosäuren in der Lage sind, *SAP2* zu induzieren (Lerner and Goldman, 1993; Hube et al., 1994). Die *SAP2*-Expression könnte, wie bereits beschrieben, über Sensorproteine in der Membran oder durch direkten Transport kleiner Peptide in das Innere der Zelle induziert werden. Somit könnten Oligopeptidtransporter sowohl in der Rolle eines Sensorproteins als auch in der Rolle eines Transporters an der Regulation von *SAP2* beteiligt sein. Eine Sensor-Funktion wurde schon für einige Mitglieder anderer Transporter-Familien beschrieben, z.B. für die Ammonium-Permease Mep2p (Lorenz and Heitman, 1998), für die Glucose-Transporter-Homologe Snf3p und Rgt2p (Özcan et al., 1996), für die Aminosäure-Permease Gap1p (Donaton et al., 2003) und für das Aminosäure-Permease-Homolog Ssy1p (Didion et al., 1998; Iraqui et al., 1999; Klasson et al., 1999). Einige dieser Proteine (Rgt2p, Snf3p, Ssy1p) sind anderen Mitgliedern der jeweiligen Transporterfamilie sehr ähnlich, haben allerdings ihre Transportfunktion verloren und fungieren nur noch als Sensor.

2.4 Herstellung von knock-out-Mutanten in *C. albicans*

Da es sich bei *C. albicans* um einen diploiden Organismus ohne bekannte haploide Phase handelt, müssen zur Geninaktivierung beide Allele eines Gens deletiert werden. Frühere Arbeiten basierten auf dem Prinzip der Selektion prototropher Transformanten von auxotrophen Ausgangsstämmen. Als auxotropher Ausgangsstamm wird überwiegend CAI4 benutzt, ein *ura3*-negatives Derivat des Wildtypes SC5314. Die am häufigsten benutzte Methode zur Gendeletion ist der *URA3*-Blaster (Fonzi and Irwin, 1993). Hier ist der *URA3*-Selektionsmarker von bakteriellen *hisG*-Sequenzen und homologen Sequenzen des Zielgens flankiert. Transformanten mit integriertem *URA3*-Marker im ersten der beiden Allele des Zielgens können in der Abwesenheit von Uridin im Medium von den *ura3*-negativen Ausgangsstämmen selektioniert werden. Die heterozygoten Mutanten werden dann auf Platten mit 5-Fluoroorotic-Acid (FOA) ausplattiert. In Gegenwart von FOA können nur *ura3*-negative Zellen wachsen, da FOA durch das *URA3*-Genprodukt in eine toxische Verbindung (5-F-UMP) umgewandelt wird. Auf diesen Platten kommt es somit zur Selektion spontan gebildeter *ura3*-negativer heterozygoter Mutanten. Die spontane Bildung *ura3*-negativer Zellen basiert hauptsächlich auf homologer Rekombination der beiden flankierenden *hisG*-Sequenzen. Die *ura3*-negativen heterozygoten Mutanten können dann in einer zweiten Runde eingesetzt werden, um das verbleibende Allel zu deletieren. Zwar wurde diese Methode sehr oft erfolgreich eingesetzt, dennoch ist der spontane Verlust des *URA3*-Markers in den heterozygoten Mutanten ein sehr seltenes Ereignis. Die spontane Rekombinationsfrequenz wurde mit 10^{-5} bis 10^{-6} angegeben (Fonzi and Irwin, 1993). Um den Selektionsmarker effektiv aus dem Genom zu entfernen und nicht mit toxischen Substanzen wie FOA umgehen zu müssen, wurde in späteren Arbeiten die FLP-Rekombinase aus *S. cerevisiae* verwendet (Morschhäuser *et al.*, 1999). In dieser Methode ist der *URA3*-Marker von den Erkennungssequenzen der FLP-Rekombinase (*FRT*-sites) flankiert. Zusätzlich enthält diese *URA3*-Flipper-Kassette das Gen, das für die FLP-Rekombinase codiert, unter der Kontrolle des induzierbaren *SAP2*-Promotors. Nach der Zerstörung des ersten Allels durch Integration der *URA3*-Flipper-Kassette in ein Allel des Zielgens über homologe Rekombination wird der *SAP2*-Promotor durch ein entsprechendes Wachstumsmedium induziert und der *URA3*-Marker wird durch FLP-vermittelte Deletion aus dem Genom geschnitten. Zurück bleibt das zerstörte Allel mit einer *FRT*-site. Nun kann die gleiche Deletionskassette für eine zweite Runde eingesetzt werden, um das zweite verbleibende Allel des Zielgens zu zerstören.

In anderen Studien wurden zwei unterschiedliche Selektionsmarker verwendet, um beide Allele des Zielgens in einem Schritt zu deletieren. Dafür wurden allerdings doppelt-auxotrophe Ausgangsstämme benötigt (Kurtz and Marrinan, 1989; Negredo *et al.*, 1997). Eine effiziente Variante dieser Methode stellt ein Ansatz dar, in dem mittels PCR Deletionskassetten konstruiert wurden, die unterschiedliche Selektionsmarker enthielten. Die PCR-Produkte wurden anschließend für eine Transformation eines doppelt-auxotrophen Stammes verwendet (Wilson *et al.*, 1999). In etwa 5-10% aller Transformanten waren beide Allele korrekt deletiert. Allerdings lassen sich mit dieser Methode nur beide Allele eines einzigen Gens deletieren. Eine Konstruktion von Mehrfachmutanten ist mit dieser Vorgehensweise unmöglich. Auch eine Komplementation der Nullmutante ist nicht realisierbar, da hierfür ein dritter Selektionsmarker benötigt wird. Für letzteres Problem wurden Stämme mit drei Auxotrophien konstruiert, die eine Komplementation der Nullmutanten mithilfe eines dritten Selektionsmarkers erlauben (Wilson *et al.*, 2000).

Für alle vorgestellten Deletionssysteme ist die Verwendung auxotropher Ausgangsstämme erforderlich. Somit ist eine Deletion beliebiger Gene in klinischen Isolaten mit den beschriebenen Methoden nicht möglich. Einige Studien in der Vergangenheit lieferten zudem Ergebnisse, die zu kritischen Diskussionen in Hinblick auf die Nutzung des *URA3*-Markers führten. So kann die ektopische Integration des *URA3*-Gens zu einer zu schwachen Expression führen, was mit pleiotropen Effekten unabhängig von der Inaktivierung des Zielgens verbunden sein kann. Damit kann die Verwendung dieses Selektionssystems die Interpretation der Ergebnisse erschweren (Lay *et al.*, 1998; Sundstrom *et al.*, 2002; Brand *et al.*, 2004). Da weiterhin eine Uridin-Auxotrophie *C. albicans* avirulent werden lässt (Kirsch and Whitney, 1991; Cole *et al.*, 1995), beeinträchtigt dieses Markersystem die Virulenz und virulenzrelevante Eigenschaften, wie etwa Hyphenausbildung und Adhärenz (Bain *et al.*, 2001; Cheng *et al.*, 2003). Der Einsatz dominanter Selektionsmarker umgeht diese Probleme. Der erste dominante Selektionsmarker, der zur zielgerichteten Gendeletion in *C. albicans* verwendet wurde, war der *MPA^R*-Marker, der Resistenz gegen Mycophenolsäure (MPA) verleiht (Wirsching *et al.*, 2000a). Um ein Markerrecycling zu gewährleisten, wurde in der *URA3*-Flipper-Kassette das *URA3*-Gen gegen das *MPA^R*-Gen ausgetauscht, was zur *MPA^R*-Flipper-Kassette führte. Allerdings ist die Effizienz dieses Systems sehr gering, da das *MPA^R*-Gen ein mutiertes Allel der Inosin-Monophosphat-Dehydrogenase aus *C. albicans* selbst darstellt und somit eine Integration der Deletionskassette oft in diesen Locus anstelle des Zielgenlokus erfolgt. Zudem ist die Selektionsdauer der Transformanten mit 4-7 Tagen sehr

lang. Dennoch wurde die *MPA^R*-Flipper-Methode in der Vergangenheit erfolgreich eingesetzt, um die Rolle von Effluxpumpen in der Resistenz von klinischen *C. albicans*- und *Candida dubliniensis*-Isolaten zu untersuchen oder um *ura3*-negative Derivate von bestimmten Stämmen für weitere genetische Manipulationen zu konstruieren (Wirsching et al., 2000a; Staib et al., 2001; Strauss et al., 2001; Wirsching et al., 2001; Moran et al., 2002).

In dieser Arbeit wurde ein weiteres Deletionssystem mit dem neuen dominanten Selektionsmarker *caSAT1* etabliert. Dabei handelt es sich um eine schnelle und effiziente Methode um zielgerichtet Gene aus dem Genom von *C. albicans* zu deletieren.

2.5 Reportersysteme für die Genexpression

Reportergene werden eingesetzt, um die Genexpression leichter untersuchen zu können. Solche Gene sind entweder mit dem Promotor oder mit der codierenden Region des zu untersuchenden Gens fusioniert. Da *C. albicans* CUG-Codons, die normalerweise als Leucin translatiert werden, als Serin übersetzt, müssen alle heterologen Gene für den Einsatz in *C. albicans* an diesen ungewöhnlichen Codongebrauch angepasst werden (Ohama et al., 1993).

Das *LAC4*-Gen aus *Kluyveromyces lactis*, das für eine β -Galactosidase codiert, war das erste funktionelle heterologe Reportergen, das in *C. albicans* zur Analyse der Genexpression eingesetzt wurde (Leuker et al., 1992). Die beiden enthaltenen CUG-Codons beeinträchtigten nicht die Aktivität des Enzyms. Auch das Luciferase-Gen aus *Renilla reniformis* konnte erfolgreich in *C. albicans* eingesetzt werden, da das Gen kein CUG-Codon enthielt (Srikantha et al., 1996). Das *GFP*-Gen aus *Aequoria victoria* hingegen konnte erst nach Austausch des einzigen CUG-Codons in *C. albicans* exprimiert werden (Morschhäuser et al., 1998). Das *GFP*-Reportergen ist bereits bei vielen Pro- und Eukaryoten erfolgreich eingesetzt worden. Es ist als Reporter der Genexpression sehr gut geeignet, da es keine Co-Faktoren benötigt und zudem eine Analyse auf Einzelzellebene möglich ist (Chalfie et al., 1994). Allerdings ist die Sensitivität von *GFP* um einiges niedriger als die von *LAC4* und *LUC*. Gfp ist zudem ein sehr stabiles Protein, weshalb mit diesem Reporter keine negative Regulation von Promotoren untersucht werden kann (Spellig et al., 1996).

In anderen Studien wurde eine an *C. albicans* angepasste Version des *FLP*-Gens aus *S. cerevisiae* verwendet, um die Expression von *SAP2* während einer Infektion zu untersuchen (Staib et al., 1999). Dazu wurde der Promotorbereich des *SAP2*-Gens mit der codierenden Region des *FLP*-Gens fusioniert. Eine Expression der FLP-Rekombinase aufgrund der

Induktion des Zielgenpromotors während einer Infektion, führte in den Reporterstämmen zum Verlust des *MPA^R*-Markers, der Resistenz gegen Mycophenolsäure verlieh und von den Erkennungssequenzen (*FRT*-sites) der FLP-Rekombinase flankiert war. Dies führte zu MPA-sensitiven Mutanten, die vom MPA-resistenten Ausgangsstamm auf geeigneten Platten unterschieden werden konnten. Auf diesen Platten konnte schließlich der Prozentsatz an MPA-sensitiven Zellen ermittelt werden, was Hinweise auf die Expression des untersuchten Gens lieferte. Der Austausch von vier Aminosäuren führte zu einer FLP-Rekombinase mit erhöhter Aktivität (*ecaFLP*). Damit konnte die differentielle Expression der Mitglieder der *SAP*-Genfamilie während einer Infektion in verschiedenen Mausmodellen untersucht werden (Staub et al., 2000b). Bei diesem System handelt es sich um ein IVET-(*in vivo*-Expressionstechnologie)-System, das auch in der vorliegenden Arbeit eingesetzt wurde.

2.6 Zielsetzung dieser Arbeit

Zu Beginn dieser Arbeit wurde diskutiert, dass Oligopeptide, die aus Proteinen durch basale Sap-Aktivität entstehen, die *SAP2*-Expression induzieren können. Hinweise darauf ergaben sich, da eine Sap-Aktivität für eine *SAP2*-Induktion durch BSA notwendig war (Hube et al., 1994; Staub et al., 2002) und Oligopeptide mit acht oder mehr Aminosäuren die Expression von Proteasen induzieren konnten (Lerner and Goldman, 1993). Es wurde vorgeschlagen, dass Peptide durch spezifische Rezeptoren auf der Zelloberfläche wahrgenommen werden, die dann eine Signalkaskade aktivieren, was letztendlich zu einer Induktion der Expression von Proteasen führt. Alternativ wurde diskutiert, dass die Peptide zunächst ins Innere der Zelle transportiert werden und dort die Expression von Proteasen induzieren (Lerner and Goldman, 1993). Im Rahmen dieser Arbeit sollte daher untersucht werden, ob die Oligopeptidtransporter von *C. albicans* zusätzlich zu ihrer Transportaktivität als Sensoren fungieren, die in Anwesenheit von Peptiden Signalkaskaden aktivieren, die dann die *SAP2*-Expression induzieren.

3 Material und Methoden

3.1 Verwendete Bakterienstämme und Plasmide

3.1.1 *Escherichia coli* K12-Stamm

Für alle durchgeführten Klonierungsarbeiten in *E. coli* wurde der Laborstamm 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) verwendet (Bethesda Research Laboratories, 1986).

3.1.2 Plasmide

Grundsätzlich kam als Klonierungsvektor für die Herstellung der für diese Arbeit benötigten Plasmide (Tabelle 1) pBluescript KS+ (Stratagene, Heidelberg, Germany) zum Einsatz. In einigen Fällen diente jedoch das Plasmid pBC SK+ (Stratagene) als Klonierungsvektor. Bei letzterem ist die Orientierung der „Multi-Cloning-Site“ in Bezug auf den *lacZ*-Promotor umgekehrt. Zusätzlich enthält es ein Chloramphenicol-Resistenzgen anstelle des Ampicillin-Resistenzgens von pBluescript KS+.

Bezeichnung	Relevante Eigenschaften	Referenz
Deletionskassetten und deren Vorstufen.		
pOPT1M1	Vorstufe zu pOPT1M2	diese Arbeit
pOPT1M2	enthält <i>SAT1</i> -Flipper-Kassette zur Inaktivierung von <i>OPT1</i> (mit P _{SAP2-1})	diese Arbeit
pOPT1M3	enthält <i>SAT1</i> -Flipper-Kassette zur Inaktivierung von <i>OPT1</i> (mit P _{MAL2})	diese Arbeit
pOPT23M1	Vorstufe zu pOPT23M2	diese Arbeit
pOPT23M2	enthält <i>SAT1</i> -Flipper-Kassette zur Inaktivierung von <i>OPT2</i> und <i>OPT3</i>	diese Arbeit
pOPT4M1	Vorstufe zu pOPT4M2	diese Arbeit
pOPT4M2	enthält <i>SAT1</i> -Flipper-Kassette zur Inaktivierung von <i>OPT4</i>	diese Arbeit
pOPT5M1	Vorstufe zu pOPT5M2	diese Arbeit
pOPT5M2	enthält <i>SAT1</i> -Flipper-Kassette zur Inaktivierung von <i>OPT5</i>	diese Arbeit
pOPT6M1	Vorstufe zu pOPT6M2	diese Arbeit
pOPT6M2	enthält <i>SAT1</i> -Flipper-Kassette zur Inaktivierung von <i>OPT6</i>	diese Arbeit
pOPT7M1	Vorstufe zu pOPT7M2	diese Arbeit
pOPT7M2	enthält <i>SAT1</i> -Flipper-Kassette zur Inaktivierung von <i>OPT7</i>	diese Arbeit
pOPT8M1	Vorstufe zu pOPT8M2	diese Arbeit
pOPT8M2	enthält <i>SAT1</i> -Flipper-Kassette zur Inaktivierung von <i>OPT8</i>	diese Arbeit

Bezeichnung	Relevante Eigenschaften	Referenz
Plasmide zur Reintegration einzelner <i>OPT</i>-Gene und deren Vorstufen.		
pOPT1A	enthält die codierende Region des Allels <i>OPT1-1</i>	diese Arbeit
pOPT1B	enthält die codierende Region des Allels <i>OPT1-2</i>	diese Arbeit
pOPT2	enthält die codierende Region des Allels <i>OPT2</i>	diese Arbeit
pOPT3A	enthält die codierende Region des Allels <i>OPT3-1</i>	diese Arbeit
pOPT3B	enthält die codierende Region des Allels <i>OPT3-2</i>	diese Arbeit
pOPT31A	enthält Allel <i>OPT3-1</i> , fusioniert mit 5` <i>OPT2</i>	diese Arbeit
pOPT31B	enthält Allel <i>OPT3-2</i> , fusioniert mit 5` <i>OPT2</i>	diese Arbeit
pOPT4A	enthält die codierende Region des Allels <i>OPT4-1</i>	diese Arbeit
pOPT4B	enthält die codierende Region des Allels <i>OPT4-2</i>	diese Arbeit
pOPT1K1A	enthält die <i>SAT1</i> -Flipper-Kassette zur Reintegration von <i>OPT1-1</i>	diese Arbeit
pOPT1K1B	enthält die <i>SAT1</i> -Flipper-Kassette zur Reintegration von <i>OPT1-2</i>	diese Arbeit
pOPT23K2	enthält die <i>SAT1</i> -Flipper-Kassette zur Reintegration von <i>OPT2</i>	diese Arbeit
pOPT23K3A	enthält die <i>SAT1</i> -Flipper-Kassette zur Reintegration von <i>OPT3-1</i>	diese Arbeit
pOPT23K3B	enthält die <i>SAT1</i> -Flipper-Kassette zur Reintegration von <i>OPT3-2</i>	diese Arbeit
Plasmide zur gezielten Expression der <i>OPT</i>-Gene und deren Vorstufen.		
pADH1E1	enthält Konstrukt zur Überexpression einzelner <i>OPT</i> -Gene (in pBluescript KS+)	diese Arbeit
pADH1E2	enthält Konstrukt zur Überexpression einzelner <i>OPT</i> -Gene (in pBC SK+)	diese Arbeit
pOPT1E1	enthält <i>OPT1-1</i> unter der Kontrolle von P _{ADHI}	diese Arbeit
pOPT2E1	enthält <i>OPT2</i> unter der Kontrolle von P _{ADHI}	diese Arbeit
pOPT3E1A	enthält <i>OPT3-1</i> unter der Kontrolle von P _{ADHI}	diese Arbeit
pOPT3E1B	enthält <i>OPT3-2</i> unter der Kontrolle von P _{ADHI}	diese Arbeit
pOPT4E1	enthält <i>OPT4-2</i> unter der Kontrolle von P _{ADHI}	diese Arbeit
pOPT5E1	enthält <i>OPT5</i> unter der Kontrolle von P _{ADHI}	diese Arbeit
pOPT6E1A	enthält <i>OPT6-1</i> unter der Kontrolle von P _{ADHI}	diese Arbeit
pOPT6E1B	enthält <i>OPT6-2</i> unter der Kontrolle von P _{ADHI}	diese Arbeit
pOPT7E1A	enthält <i>OPT7-1</i> unter der Kontrolle von P _{ADHI}	diese Arbeit
pOPT7E1B	enthält <i>OPT7-2</i> unter der Kontrolle von P _{ADHI}	diese Arbeit
pOPT8E1A	enthält <i>OPT8-1</i> unter der Kontrolle von P _{ADHI}	diese Arbeit
pOPT8E1B	enthält <i>OPT8-2</i> unter der Kontrolle von P _{ADHI}	diese Arbeit
pSAT3	[5` <i>CBF1</i> -T _{ACT1} - <i>caSAT1-3`ADHI</i>]-Fragment	M. Sengupta
Plasmide mit TET-System.		
pNIM1	enthält <i>GFP</i> unter der Kontrolle von P _{Tet}	(Park and Morschhäuser, 2005)
pSAP2ex4	enthält <i>SAP2</i> unter der Kontrolle von P _{Tet}	P. Staib

Bezeichnung	Relevante Eigenschaften	Referenz
Reporterkonstrukt zur Analyse der <i>SAP2</i>-Induktion und dessen Vorstufen.		
pGFP55	enthält <i>GFP</i> unter der Kontrolle von P_{SAP2-I} ; mit <i>URA3</i> -Marker	(Staub, 2001)
pGFP72	enthält <i>GFP</i> unter der Kontrolle von P_{HWP1} ; mit <i>caSAT1</i> -Marker	Yang-Nim Park
pSAP2G1	enthält <i>GFP</i> unter der Kontrolle von P_{SAP2-I} ; mit <i>caSAT1</i> -Marker	diese Arbeit
<i>GFP</i>-Reporterkonstrukte zur <i>OPT</i>-Genexpressionsanalyse und die jeweiligen Vorstufen.		
pOPT1G21	Vorstufe zu pOPT1G22	diese Arbeit
pOPT1G22	enthält <i>GFP</i> unter der Kontrolle von P_{OPT1-2}	diese Arbeit
pOPT2G21	Vorstufe zu pOPT2G22	diese Arbeit
pOPT2G22	enthält <i>GFP</i> unter der Kontrolle von P_{OPT2}	diese Arbeit
pOPT2G23	enthält <i>GFP</i> unter der Kontrolle von P_{OPT2} ; zur Integration in den <i>opt23Δ</i> -Lokus der <i>opt123Δ</i> -Triplemutanten	diese Arbeit
pOPT3G21	Vorstufe zu pOPT3G22	diese Arbeit
pOPT3G22	enthält <i>GFP</i> unter der Kontrolle von P_{OPT3}	diese Arbeit
pOPT4G21	Vorstufe zu pOPT4G22	diese Arbeit
pOPT4G22	enthält <i>GFP</i> unter der Kontrolle von P_{OPT4-1}	diese Arbeit
pOPT5G21	Vorstufe zu pOPT5G22	diese Arbeit
pOPT5G22	enthält <i>GFP</i> unter der Kontrolle von P_{OPT5}	diese Arbeit
pOPT6G21	Vorstufe zu pOPT6G22	diese Arbeit
pOPT6G22	enthält <i>GFP</i> unter der Kontrolle von P_{OPT6}	diese Arbeit
pOPT7G21	Vorstufe zu pOPT7G22	diese Arbeit
pOPT7G22	enthält <i>GFP</i> unter der Kontrolle von P_{OPT7}	diese Arbeit
pOPT8G21	Vorstufe zu pOPT8G22	diese Arbeit
pOPT8G22	enthält <i>GFP</i> unter der Kontrolle von P_{OPT8}	diese Arbeit
<i>ecaFLP</i>-Reporterkonstrukte zur <i>OPT</i>-Genexpressionsanalyse.		
pOPT1FL1	enthält <i>ecaFLP</i> unter der Kontrolle von P_{OPT1-2}	diese Arbeit
pOPT2FL1	enthält <i>ecaFLP</i> unter der Kontrolle von P_{OPT2}	diese Arbeit
pOPT3FL1	enthält <i>ecaFLP</i> unter der Kontrolle von P_{OPT3}	diese Arbeit
pOPT4FL1	enthält <i>ecaFLP</i> unter der Kontrolle von P_{OPT4-1}	diese Arbeit
pOPT5FL1	enthält <i>ecaFLP</i> unter der Kontrolle von P_{OPT5}	diese Arbeit
pOPT6FL1	enthält <i>ecaFLP</i> unter der Kontrolle von P_{OPT6}	diese Arbeit
pOPT7FL1	enthält <i>ecaFLP</i> unter der Kontrolle von P_{OPT7}	diese Arbeit
pOPT8FL1	enthält <i>ecaFLP</i> unter der Kontrolle von P_{OPT8}	diese Arbeit

Bezeichnung	Relevante Eigenschaften	Referenz
Plasmide, die zur Konstruktion des <i>SATI</i>-Flippers benötigt wurden.		
pA83	enthält <i>caSATI</i> -Marker	Åshild Vik
pMAL2P	enthält P_{MAL2}	diese Arbeit
pMAL2P2	enthält P_{MAL2}^* (längere Version vom P_{MAL2})	diese Arbeit
pSAT1	enthält <i>caSATI</i> -Marker	diese Arbeit
pSFI3	enthält <i>CdMPA^R</i> -Flipper-Kassette mit <i>caFLP</i> unter der Kontrolle von P_{SAP2-1} (in pBluescript KS+)	(Bader, 2005)
pSFS1	enthält <i>SATI</i> -Flipper-Kassette mit <i>caFLP</i> unter der Kontrolle von P_{SAP2-1} (in pBluescript KS+)	diese Arbeit
pSFS1A	enthält <i>SATI</i> -Flipper-Kassette mit <i>caFLP</i> unter der Kontrolle von P_{SAP2-1} (in pBC SK+)	diese Arbeit
pSFS2	enthält <i>SATI</i> -Flipper-Kassette mit <i>caFLP</i> unter der Kontrolle von P_{MAL2} (in pBluescript KS+)	diese Arbeit
pSFS2A	enthält <i>SATI</i> -Flipper-Kassette mit <i>caFLP</i> unter der Kontrolle von P_{MAL2} (in pBC SK+)	diese Arbeit
pSFS3	enthält <i>SATI</i> -Flipper-Kassette mit <i>caFLP</i> unter der Kontrolle von P_{MAL2}^* (in pBluescript KS+)	diese Arbeit
pSFU1	enthält <i>URA3</i> -Flipper-Kassette mit <i>caFLP</i> unter der Kontrolle von P_{SAP2} (in pBluescript KS+)	(Morschhäuser et al., 1999)

Tabelle 1 In dieser Arbeit verwendete Plasmide.

3.2 Verwendete *Candida albicans*-Stämme

Stamm	Ausgangsstamm	Genotyp ^a	Referenz
SC5314		Wildstamm	(Gillum <i>et al.</i> , 1984)
CFI1	CAI4	<i>ACT1/act1::FRT-MPA^R-FRT</i>	(Staib <i>et al.</i> , 1999)
S2FI6A	CFI1	<i>sap2-1::P_{SAP2-1}-caFLP/sap2-2::FRT</i>	(Staib, 2001)
SAP2MS4	SC5314	<i>sap2Δ::FRT/sap2Δ::FRT</i>	U. Lermann
<i>opt</i> Einzel- und Doppelmutanten			
OPT1M1A	SC5314	<i>OPT1-1/opt1-2Δ::SAT1-FLIP^b</i>	diese Arbeit
OPT1M1B	SC5314	<i>opt1-1Δ::SAT1-FLIP/OPT1-2</i>	diese Arbeit
OPT1M2A	OPT1M1A	<i>OPT1-1/opt1-2Δ::FRT</i>	diese Arbeit
OPT1M2B	OPT1M1B	<i>opt1-1Δ::FRT/OPT1-2</i>	diese Arbeit
OPT1M3A	OPT1M2A	<i>opt1-1Δ::SAT1-FLIP/opt1-2Δ::FRT</i>	diese Arbeit
OPT1M3B	OPT1M2B	<i>opt1-1Δ::FRT/opt1-2Δ::SAT1-FLIP</i>	diese Arbeit
OPT1M4A	OPT1M3A	<i>opt1-1Δ::FRT/opt1-2Δ::FRT</i>	diese Arbeit
OPT1M4B	OPT1M3B	<i>opt1-1Δ::FRT/ opt1-2Δ::FRT</i>	diese Arbeit
OPT1MK1A	OPT1M4A	<i>OPT1-1::SAT1-FLIP/opt1-2Δ::FRT</i>	diese Arbeit
OPT1MK1B	OPT1M4B	<i>opt1-1Δ::FRT/OPT1-2::SAT1-FLIP</i>	diese Arbeit
OPT1MK2A	OPT1MK1A	<i>OPT1-1::FRT/opt1-2Δ::FRT</i>	diese Arbeit
OPT1MK2B	OPT1MK1B	<i>opt1-1Δ::FRT/OPT1-2::FRT</i>	diese Arbeit
OPT23M1A	SC5314	<i>opt23-1Δ::SAT1-FLIP/OPT23-2</i>	diese Arbeit
OPT23M1B	SC5314	<i>OPT23-1/opt23-2Δ::SAT1-FLIP</i>	diese Arbeit
OPT23M2A	OPT23M1A	<i>opt23-1Δ::FRT/OPT23-2</i>	diese Arbeit
OPT23M2B	OPT23M1B	<i>OPT23-1/opt23-2Δ::FRT</i>	diese Arbeit
OPT23M3A	OPT23M2A	<i>opt23-1Δ::FRT/opt23-2Δ::SAT1-FLIP</i>	diese Arbeit
OPT23M3B	OPT23M2B	<i>opt23-1Δ::SAT1-FLIP/opt23-2Δ::FRT</i>	diese Arbeit
OPT23M4A	OPT23M3A	<i>opt23-1Δ::FRT/opt23-2Δ::FRT</i>	diese Arbeit
OPT23M4B	OPT23M3B	<i>opt23-1Δ::FRT/opt23-2Δ::FRT</i>	diese Arbeit
OPT4M1A	SC5314	<i>opt4-1Δ::SAT1-FLIP/OPT4-2</i>	diese Arbeit
OPT4M1B	SC5314	<i>OPT4-1/opt4-2Δ::SAT1-FLIP</i>	diese Arbeit
OPT4M2A	OPT4M1A	<i>opt4-1Δ::FRT/OPT4-2</i>	diese Arbeit
OPT4M2B	OPT4M1B	<i>OPT4-1/opt4-2Δ::FRT</i>	diese Arbeit
OPT4M3A	OPT4M2A	<i>opt4-1Δ::FRT/opt4-2Δ::SAT1-FLIP</i>	diese Arbeit

Stamm	Ausgangsstamm	Genotyp^a	Referenz
OPT4M3B	OPT4M2B	<i>opt4-1Δ::SAT1-FLIP/opt4-2Δ::FRT</i>	diese Arbeit
OPT4M4A	OPT4M3A	<i>opt4-1Δ::FRT/opt4-2Δ::FRT</i>	diese Arbeit
OPT4M4B	OPT4M3B	<i>opt4-1Δ::FRT/opt4-2Δ::FRT</i>	diese Arbeit
OPT5M1A	SC5314	<i>OPT5-1/opt5-2Δ::SAT1-FLIP</i>	diese Arbeit
OPT5M1B	SC5314	<i>OPT5-1/opt5-2Δ::SAT1-FLIP</i>	diese Arbeit
OPT5M2A	OPT5M1A	<i>OPT5-1/opt5-2Δ::FRT</i>	diese Arbeit
OPT5M2B	OPT5M1B	<i>OPT5-1/opt5-2Δ::FRT</i>	diese Arbeit
OPT5M3A	OPT5M2A	<i>opt5-1Δ::SAT1-FLIP/opt5-2Δ::FRT</i>	diese Arbeit
OPT5M3B	OPT5M2B	<i>opt5-1Δ::SAT1-FLIP/opt5-2Δ::FRT</i>	diese Arbeit
OPT5M4A	OPT5M3A	<i>opt5-1Δ::FRT/opt5-2Δ::FRT</i>	diese Arbeit
OPT5M4B	OPT5M3B	<i>opt5-1Δ::FRT/opt5-2Δ::FRT</i>	diese Arbeit
OPT6M1A	SC5314	<i>OPT6/opt6Δ::SAT1-FLIP</i>	diese Arbeit
OPT6M1B	SC5314	<i>OPT6/opt6Δ::SAT1-FLIP</i>	diese Arbeit
OPT6M2A	OPT6M1A	<i>OPT6/opt6Δ::FRT</i>	diese Arbeit
OPT6M2B	OPT6M1B	<i>OPT6/opt6Δ::FRT</i>	diese Arbeit
OPT6M3A	OPT6M2A	<i>opt6Δ::SAT1-FLIP/opt6Δ::FRT</i>	diese Arbeit
OPT6M3B	OPT6M2B	<i>opt6Δ::SAT1-FLIP/opt6Δ::FRT</i>	diese Arbeit
OPT6M4A	OPT6M3A	<i>opt6Δ::FRT/opt6Δ::FRT</i>	diese Arbeit
OPT6M4B	OPT6M3B	<i>opt6Δ::FRT/opt6Δ::FRT</i>	diese Arbeit
OPT7M1A	SC5314	<i>OPT7/opt7Δ::SAT1-FLIP</i>	diese Arbeit
OPT7M1B	SC5314	<i>opt7Δ::SAT1-FLIP/OPT7</i>	diese Arbeit
OPT7M2A	OPT7M1A	<i>OPT7/opt7Δ::FRT</i>	diese Arbeit
OPT7M2B	OPT7M1B	<i>opt7Δ::FRT/OPT7</i>	diese Arbeit
OPT7M3A	OPT7M2A	<i>opt7Δ::SAT1-FLIP/opt7Δ::FRT</i>	diese Arbeit
OPT7M3B	OPT7M2B	<i>opt7Δ::FRT/opt7Δ::SAT1-FLIP</i>	diese Arbeit
OPT7M4A	OPT7M3A	<i>opt7Δ::FRT/opt7Δ::FRT</i>	diese Arbeit
OPT7M4B	OPT7M3B	<i>opt7Δ::FRT/opt7Δ::FRT</i>	diese Arbeit
OPT8M1A	SC5314	<i>opt8-1Δ::SAT1-FLIP/OPT8-2</i>	diese Arbeit
OPT8M1B	SC5314	<i>OPT8-1/opt8-2Δ::SAT1-FLIP</i>	diese Arbeit
OPT8M2A	OPT8M1A	<i>opt8-1Δ::FRT/OPT8-2</i>	diese Arbeit
OPT8M2B	OPT8M1B	<i>OPT8-1/opt8-2Δ::FRT</i>	diese Arbeit
OPT8M3A	OPT8M2A	<i>opt8-1Δ::FRT/opt8-2Δ::SAT1-FLIP</i>	diese Arbeit
OPT8M3B	OPT8M2B	<i>opt8-1Δ::SAT1-FLIP/opt8-2Δ::FRT</i>	diese Arbeit

Stamm	Ausgangsstamm	Genotyp ^a	Referenz
OPT8M4A	OPT8M3A	<i>opt8-1Δ::FRT/opt8-2Δ::FRT</i>	diese Arbeit
OPT8M4B	OPT8M3B	<i>opt8-1Δ::FRT/opt8-2Δ::FRT</i>	diese Arbeit
OPT67M1A	OPT7M4A	<i>opt7Δ::FRT/opt7Δ::FRT</i> <i>OPT6/opt6Δ::SAT1-FLIP</i>	diese Arbeit
OPT67M1B	OPT7M4B	<i>opt7Δ::FRT/opt7Δ::FRT</i> <i>OPT6/opt6Δ::SAT1-FLIP</i>	diese Arbeit
OPT67M2A	OPT67M1A	<i>opt7Δ::FRT/opt7Δ::FRT</i> <i>OPT6/opt6Δ::FRT</i>	diese Arbeit
OPT67M2B	OPT67M1B	<i>opt7Δ::FRT/opt7Δ::FRT</i> <i>OPT6/opt6Δ::FRT</i>	diese Arbeit
OPT67M3A	OPT67M2A	<i>opt7Δ::FRT/opt7Δ::FRT</i> <i>opt6Δ::SAT1-FLIP/opt6Δ::FRT</i>	diese Arbeit
OPT67M3B	OPT67M2B	<i>opt7Δ::FRT/opt7Δ::FRT</i> <i>opt6Δ::SAT1-FLIP/opt6Δ::FRT</i>	diese Arbeit
OPT67M4A	OPT67M3A	<i>opt7Δ::FRT/opt7Δ::FRT</i> <i>opt6Δ::FRT/opt6Δ::FRT</i>	diese Arbeit
OPT67M4B	OPT67M3B	<i>opt7Δ::FRT/opt7Δ::FRT</i> <i>opt6Δ::FRT/opt6Δ::FRT</i>	diese Arbeit
<i>opt123Δ</i>-Triplemutanten und die entsprechenden Komplementanten.			
OPT123M1A	OPT1M4A	<i>opt1-1Δ::FRT/opt1-2Δ::FRT</i> <i>OPT23-1/opt23-2Δ::SAT1-FLIP</i>	diese Arbeit
OPT123M1B	OPT1M4B	<i>opt1-1Δ::FRT/opt1-2Δ::FRT</i> <i>OPT23-1/opt23-2Δ::SAT1-FLIP</i>	diese Arbeit
OPT123M2A	OPT123M1A	<i>opt1-1Δ::FRT/opt1-2Δ::FRT</i> <i>OPT23-1/opt23-2Δ::FRT</i>	diese Arbeit
OPT123M2B	OPT123M1B	<i>opt1-1Δ::FRT/opt1-2Δ::FRT</i> <i>OPT23-1/opt23-2Δ::FRT</i>	diese Arbeit
OPT123M3A	OPT123M2A	<i>opt1-1Δ::FRT/opt1-2Δ::FRT</i> <i>opt23-1Δ::SAT1-FLIP/opt23-2Δ::FRT</i>	diese Arbeit
OPT123M3B	OPT123M2B	<i>opt1-1Δ::FRT/opt1-2Δ::FRT</i> <i>opt23-1Δ::SAT1-FLIP/opt23-2Δ::FRT</i>	diese Arbeit
OPT123M4A	OPT123M3A	<i>opt1-1Δ::FRT/opt1-2Δ::FRT</i> <i>opt23-1Δ::FRT/opt23-2Δ::FRT</i>	diese Arbeit
OPT123M4B	OPT123M3B	<i>opt1-1Δ::FRT/opt1-2Δ::FRT</i> <i>opt23-1Δ::FRT/opt23-2Δ::FRT</i>	diese Arbeit
OPT123MK11A	OPT123M4A	<i>OPT1-1-SAT1-FLIP/opt1-2Δ::FRT</i> <i>opt23-1Δ::FRT/opt23-2Δ::FRT</i>	diese Arbeit
OPT123MK11B	OPT123M4B	<i>OPT1-1-SAT1-FLIP/opt1-2Δ::FRT</i> <i>opt23-1Δ::FRT/opt23-2Δ::FRT</i>	diese Arbeit
OPT123MK12A	OPT123MK11A	<i>OPT1-1-FRT/opt1-2Δ::FRT</i> <i>opt23-1Δ::FRT/opt23-2Δ::FRT</i>	diese Arbeit

Stamm	Ausgangsstamm	Genotyp^a	Referenz
OPT123MK12B	OPT123MK11B	<i>OPT1-1-FRT/opt1-2Δ::FRT</i> <i>opt23-1Δ::FRT/opt23-2Δ::FRT</i>	diese Arbeit
OPT123MK21A	OPT123M4A	<i>opt1-1Δ::FRT/opt1-2Δ::FRT</i> <i>OPT2-opt3Δ::SAT1-FLIP/opt23Δ::FRT</i>	diese Arbeit
OPT123MK21B	OPT123M4B	<i>opt1-1Δ::FRT/opt1-2Δ::FRT</i> <i>OPT2-opt3Δ::SAT1-FLIP/opt23Δ::FRT</i>	diese Arbeit
OPT123MK22A	OPT123MK21A	<i>opt1-1Δ::FRT/opt1-2Δ::FRT</i> <i>OPT2-opt3Δ::FRT/opt23Δ::FRT</i>	diese Arbeit
OPT123MK22B	OPT123MK21B	<i>opt1-1Δ::FRT/opt1-2Δ::FRT</i> <i>OPT2-opt3Δ::FRT/opt23Δ::FRT</i>	diese Arbeit
OPT123MK31A	OPT123M4A	<i>opt1-1Δ::FRT/opt1-2Δ::FRT</i> <i>opt2Δ-OPT3-1-SAT1-FLIP/opt23Δ::FRT</i>	diese Arbeit
OPT123MK31B	OPT123M4B	<i>opt1-1Δ::FRT/opt1-2Δ::FRT</i> <i>opt23Δ::FRT/opt2Δ-OPT3-2-SAT1-FLIP</i>	diese Arbeit
OPT123MK32A	OPT123MK31A	<i>opt1-1Δ::FRT/opt1-2Δ::FRT</i> <i>opt2Δ-OPT3-1-FRT/opt23Δ::FRT</i>	diese Arbeit
OPT123MK32B	OPT123MK31B	<i>opt1-1Δ::FRT/opt1-2Δ::FRT</i> <i>opt23Δ::FRT/opt2Δ-OPT3-2-FRT</i>	diese Arbeit
<i>opt1234Δ-Quadruplemutanten</i>			
OPT1234M1A	OPT123M4A	<i>opt1-1Δ::FRT/opt1-2Δ::FRT</i> <i>opt23-1Δ::FRT/opt23-2Δ::FRT</i> <i>opt4-1Δ::SAT1-FLIP/OPT4-2</i>	diese Arbeit
OPT1234M1B	OPT123M4B	<i>opt1-1Δ::FRT/opt1-2Δ::FRT</i> <i>opt23-1Δ::FRT/opt23-2Δ::FRT</i> <i>OPT4-1/opt4-2Δ::SAT1-FLIP</i>	diese Arbeit
OPT1234M2A	OPT1234M1A	<i>opt1-1Δ::FRT/opt1-2Δ::FRT</i> <i>opt23-1Δ::FRT/opt23-2Δ::FRT</i> <i>opt4-1Δ::FRT/OPT4-2</i>	diese Arbeit
OPT1234M2B	OPT1234M1B	<i>opt1-1Δ::FRT/opt1-2Δ::FRT</i> <i>opt23-1Δ::FRT/opt23-2Δ::FRT</i> <i>OPT4-1/opt4-2Δ::FRT</i>	diese Arbeit
OPT1234M3A	OPT1234M2A	<i>opt1-1Δ::FRT/opt1-2Δ::FRT</i> <i>opt23-1Δ::FRT/opt23-2Δ::FRT</i> <i>opt4-1Δ::FRT/opt4-2Δ::SAT1-FLIP</i>	diese Arbeit
OPT1234M3B	OPT1234M2B	<i>opt1-1Δ::FRT/opt1-2Δ::FRT</i> <i>opt23-1Δ::FRT/opt23-2Δ::FRT</i> <i>opt4-1Δ::SAT1-FLIP/opt4-2Δ::FRT</i>	diese Arbeit
OPT1234M4A	OPT1234M3A	<i>opt1-1Δ::FRT/opt1-2Δ::FRT</i> <i>opt23-1Δ::FRT/opt23-2Δ::FRT</i> <i>opt4-1Δ::FRT/opt4-2Δ::FRT</i>	diese Arbeit
OPT1234M4B	OPT1234M3B	<i>opt1-1Δ::FRT/opt1-2Δ::FRT</i> <i>opt23-1Δ::FRT/opt23-2Δ::FRT</i> <i>opt4-1Δ::FRT/opt4-2Δ::FRT</i>	diese Arbeit

Stamm	Ausgangsstamm	Genotyp ^a	Referenz
<i>opt12345Δ</i>-Quintuplemutanten			
OPT12345M1A	OPT1234M4A	<i>opt1-1Δ::FRT/opt1-2Δ::FRT</i> <i>opt23-1Δ::FRT/opt23-2Δ::FRT</i> <i>opt4-1Δ::FRT/opt4-2Δ::FRT</i> <i>opt5-1Δ::SAT1-FLIP/OPT5-2</i>	diese Arbeit
OPT12345M1B	OPT1234M4B	<i>opt1-1Δ::FRT/opt1-2Δ::FRT</i> <i>opt23-1Δ::FRT/opt23-2Δ::FRT</i> <i>opt4-1Δ::FRT/opt4-2Δ::FRT</i> <i>opt5-1Δ::SAT1-FLIP/OPT5-2</i>	diese Arbeit
OPT12345M2A	OPT12345M1A	<i>opt1-1Δ::FRT/opt1-2Δ::FRT</i> <i>opt23-1Δ::FRT/opt23-2Δ::FRT</i> <i>opt4-1Δ::FRT/opt4-2Δ::FRT</i> <i>opt5-1Δ::FRT/OPT5-2</i>	diese Arbeit
OPT12345M2B	OPT12345M1B	<i>opt1-1Δ::FRT/opt1-2Δ::FRT</i> <i>opt23-1Δ::FRT/opt23-2Δ::FRT</i> <i>opt4-1Δ::FRT/opt4-2Δ::FRT</i> <i>opt5-1Δ::FRT/OPT5-2</i>	diese Arbeit
OPT12345M3A	OPT12345M2A	<i>opt1-1Δ::FRT/opt1-2Δ::FRT</i> <i>opt23-1Δ::FRT/opt23-2Δ::FRT</i> <i>opt4-1Δ::FRT/opt4-2Δ::FRT</i> <i>opt5-1Δ::FRT/opt5-2Δ::SAT1-FLIP</i>	diese Arbeit
OPT12345M3B	OPT12345M2B	<i>opt1-1Δ::FRT/opt1-2Δ::FRT</i> <i>opt23-1Δ::FRT/opt23-2Δ::FRT</i> <i>opt4-1Δ::FRT/opt4-2Δ::FRT</i> <i>opt5-1Δ::FRT/opt5-2Δ::SAT1-FLIP</i>	diese Arbeit
OPT12345M4A	OPT12345M3A	<i>opt1-1Δ::FRT/opt1-2Δ::FRT</i> <i>opt23-1Δ::FRT/opt23-2Δ::FRT</i> <i>opt4-1Δ::FRT/opt4-2Δ::FRT</i> <i>opt5-1Δ::FRT/opt5-2Δ::FRT</i>	diese Arbeit
OPT12345M4B	OPT12345M3B	<i>opt1-1Δ::FRT/opt1-2Δ::FRT</i> <i>opt23-1Δ::FRT/opt23-2Δ::FRT</i> <i>opt4-1Δ::FRT/opt4-2Δ::FRT</i> <i>opt5-1Δ::FRT/opt5-2Δ::FRT</i>	diese Arbeit
<i>opt123Δ</i>-Triplemutanten, die die <i>OPT</i>-Gene unter der Kontrolle von P_{ADHI} exprimieren oder die ein Kontrollkonstrukt ohne <i>OPT</i>-Gen tragen.			
OPT123ME1A/B	OPT123M4A	<i>ADHI/adh1::P_{ADHI}-OPT1-1-caSAT1</i>	diese Arbeit
OPT123ME2A/B	OPT123M4A	<i>ADHI/adh1::P_{ADHI}-OPT2-caSAT1</i>	diese Arbeit
OPT123ME3A	OPT123M4A	<i>ADHI/adh1::P_{ADHI}-OPT3-1-caSAT1</i>	diese Arbeit
OPT123ME3B	OPT123M4A	<i>ADHI/adh1::P_{ADHI}-OPT3-2-caSAT1</i>	diese Arbeit
OPT123ME4A/B	OPT123M4A	<i>ADHI/adh1::P_{ADHI}-OPT4-2-caSAT1</i>	diese Arbeit
OPT123ME5A/B	OPT123M4A	<i>ADHI/adh1::P_{ADHI}-OPT5-caSAT1</i>	diese Arbeit
OPT123ME6A/B	OPT123M4A	<i>ADHI/adh1::P_{ADHI}-OPT6-1-caSAT1</i>	diese Arbeit
OPT123ME7A	OPT123M4A	<i>ADHI/adh1::P_{ADHI}-OPT7-1-caSAT1</i>	diese Arbeit
OPT123ME7B	OPT123M4A	<i>ADHI/adh1::P_{ADHI}-OPT7-2-caSAT1</i>	diese Arbeit
OPT123ME8A/B	OPT123M4A	<i>ADHI/adh1::P_{ADHI}-OPT8-1-caSAT1</i>	diese Arbeit

Stamm	Ausgangsstamm	Genotyp ^a	Referenz
OPT123MC1A	OPT123M4A	<i>ADH1/adh1::P_{ADH1}-caSAT1</i>	diese Arbeit
OPT123MC1B	OPT123M4B	<i>ADH1/adh1::P_{ADH1}-caSAT1</i>	diese Arbeit
<i>opt123Δ</i>-Triplemutanten, die <i>SAP2</i> unter der Kontrolle eines Tet-induzierbaren Promoters exprimieren, und dazugehörige Kontrollstämme.			
OPT123MSAP2ex4A	OPT123M4A	<i>ADH1/adh1::P_{Tet}-SAP2</i>	diese Arbeit
OPT123MSAP2ex4B	OPT123M4B	<i>ADH1/adh1::P_{Tet}-SAP2</i>	diese Arbeit
OPT123MGFPex4A	OPT123M4A	<i>ADH1/adh1::P_{Tet}-GFP</i>	diese Arbeit
OPT123MGFPex4B	OPT123M4B	<i>ADH1/adh1::P_{Tet}-GFP</i>	diese Arbeit
Reporterstämme, die <i>GFP</i> unter der Kontrolle von <i>P_{SAP2}</i> exprimieren.			
SCSAP2G1A/B	SC5314	<i>sap2-1::P_{SAP2-1}-GFP/SAP2-2</i>	diese Arbeit
OPT123MSAP2G1A	OPT123M4A	<i>opt123Δ/opt123Δ sap2-1::P_{SAP2-1}-GFP/SAP2-2</i>	diese Arbeit
OPT123MSAP2G1B	OPT123M4B	<i>opt123Δ/opt123Δ sap2-1::P_{SAP2-1}-GFP/SAP2-2</i>	diese Arbeit
OPT12345MSAP2G1A	OPT12345M4A	<i>opt12345Δ/opt12345Δ sap2-1::P_{SAP2-1}-GFP/SAP2-2</i>	diese Arbeit
OPT12345MSAP2G1B	OPT12345M4B	<i>opt12345Δ/opt12345Δ sap2-1::P_{SAP2-1}-GFP/SAP2-2</i>	diese Arbeit
Reporterstämme, die <i>GFP</i> unter der Kontrolle eines <i>OPT</i>-Promotors exprimieren.			
SCOPT1G22A	SC5314	<i>OPT1-1/opt1-2::P_{OPT1}-GFP</i>	diese Arbeit
SCOPT1G22B	SC5314	<i>opt1-1::P_{OPT1}-GFP/OPT1-2</i>	diese Arbeit
SCOPT2G22A	SC5314	<i>opt2-1::P_{OPT2}-GFP/OPT2-2</i>	diese Arbeit
SCOPT2G22B	SC5314	<i>OPT2-1/opt2-2::P_{OPT2}-GFP</i>	diese Arbeit
SCOPT3G22A	SC5314	<i>opt3-1::P_{OPT3}-GFP/OPT3-2</i>	diese Arbeit
SCOPT3G22B	SC5314	<i>OPT3-1/opt3-2::P_{OPT3}-GFP</i>	diese Arbeit
SCOPT4G22A	SC5314	<i>opt4-1::P_{OPT4}-GFP/OPT4-2</i>	diese Arbeit
SCOPT4G22B	SC5314	<i>OPT4-1/opt4-2::P_{OPT4}-GFP</i>	diese Arbeit
SCOPT5G22A	SC5314	<i>OPT5-1/opt5-2::P_{OPT5}-GFP</i>	diese Arbeit
SCOPT5G22B	SC5314	<i>opt5-1::P_{OPT5}-GFP/OPT5-2</i>	diese Arbeit
SCOPT6G22A	SC5314	<i>OPT6/opt6::P_{OPT6}-GFP</i>	diese Arbeit
SCOPT6G22B	SC5314	<i>opt6::P_{OPT6}-GFP/OPT6</i>	diese Arbeit
SCOPT7G22A	SC5314	<i>OPT7/opt7::P_{OPT7}-GFP</i>	diese Arbeit
SCOPT7G22B	SC5314	<i>opt7::P_{OPT7}-GFP/OPT7</i>	diese Arbeit
SCOPT8G22A	SC5314	<i>OPT8-1/opt8-2::P_{OPT8}-GFP</i>	diese Arbeit
SCOPT8G22B	SC5314	<i>opt8-1::P_{OPT8}-GFP/OPT8-2</i>	diese Arbeit
OPT123MG23A	OPT123M4A	<i>opt1-1Δ::FRT/opt1-2Δ::FRT opt23::P_{OPT2}-GFP/opt23Δ::FRT</i>	diese Arbeit

Stamm	Ausgangsstamm	Genotyp ^a	Referenz
OPT123MG23B	OPT123M4B	<i>opt1-1Δ::FRT/opt1-2Δ::FRT</i> <i>opt23::P_{OPT2}-GFP/opt23Δ::FRT</i>	diese Arbeit
OPT123MK22G23A	OPT123MK22A	<i>opt1-1Δ::FRT/opt1-2Δ::FRT</i> <i>OPT2-opt3Δ::FRT/opt23::P_{OPT2}-GFP</i>	diese Arbeit
OPT123MK22G23B	OPT123MK22B	<i>opt1-1Δ::FRT/opt1-2Δ::FRT</i> <i>OPT2-opt3Δ::FRT/opt23::P_{OPT2}-GFP</i>	diese Arbeit
Reporterstämme, die <i>ecaFLP</i> unter der Kontrolle eines <i>OPT</i>-Promotors exprimieren.			
OPT1FL1A1	CFI1	<i>OPT1-1/opt1-2::P_{OPT1}-ecaFLP</i>	diese Arbeit
OPT1FL1A2	CFI1	<i>OPT1-1/opt1-2::P_{OPT1}-ecaFLP</i>	diese Arbeit
OPT1FL1B1	CFI1	<i>opt1-1::P_{OPT1}-ecaFLP/OPT1-2</i>	diese Arbeit
OPT1FL1B2	CFI1	<i>opt1-1::P_{OPT1}-ecaFLP/OPT1-2</i>	diese Arbeit
OPT2FL1A	CFI1	<i>opt2-1::P_{OPT2}-ecaFLP/OPT2-2</i>	diese Arbeit
OPT2FL1B	CFI1	<i>opt2-1::P_{OPT2}-ecaFLP/OPT2-2</i>	diese Arbeit
OPT3FL1A1	CFI1	<i>opt3-1::P_{OPT3}-ecaFLP/OPT3-2</i>	diese Arbeit
OPT3FL1A2	CFI1	<i>opt3-1::P_{OPT3}-ecaFLP/OPT3-2</i>	diese Arbeit
OPT3FL1B1	CFI1	<i>OPT3-1/opt3-2::P_{OPT3}-ecaFLP</i>	diese Arbeit
OPT3FL1B2	CFI1	<i>OPT3-1/opt3-2::P_{OPT3}-ecaFLP</i>	diese Arbeit
OPT4FL1A	CFI1	<i>opt4-1::P_{OPT4}-ecaFLP/OPT4-2</i>	diese Arbeit
OPT4FL1B	CFI1	<i>OPT4-1/opt4-2::P_{OPT4}-ecaFLP</i>	diese Arbeit
OPT5FL1A1	CFI1	<i>OPT5-1/opt5-2::P_{OPT5}-ecaFLP</i>	diese Arbeit
OPT5FL1A2	CFI1	<i>OPT5-1/opt5-2::P_{OPT5}-ecaFLP</i>	diese Arbeit
OPT5FL1B1	CFI1	<i>opt5-1::P_{OPT5}-ecaFLP/OPT5-2</i>	diese Arbeit
OPT5FL1B2	CFI1	<i>opt5-1::P_{OPT5}-ecaFLP/OPT5-2</i>	diese Arbeit
OPT6FL1A	CFI1	<i>OPT6/opt6::P_{OPT6}-ecaFLP</i>	diese Arbeit
OPT6FL1B	CFI1	<i>opt6::P_{OPT6}-ecaFLP/OPT6</i>	diese Arbeit
OPT7FL1A	CFI1	<i>OPT7/opt7::P_{OPT7}-ecaFLP</i>	diese Arbeit
OPT7FL1B	CFI1	<i>opt7::P_{OPT7}-ecaFLP/OPT7</i>	diese Arbeit
OPT8FL1A	CFI1	<i>OPT8-1/opt8-2::P_{OPT8}-ecaFLP</i>	diese Arbeit
OPT8FL1B	CFI1	<i>opt8-1::P_{OPT8}-ecaFLP/OPT8-2</i>	diese Arbeit

Tabelle 2 In dieser Arbeit verwendete *C. albicans*-Stämme.^a Abgesehen von den aufgeführten Merkmalen, besitzen alle Stämme den Genotyp des Ausgangsstammes.^b *SATI-FLIP* bezeichnet die *SATI*-Flipper-Kassette.

3.3 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide (Tabelle 3) wurden über MWG-Biotech (Ebersberg, Deutschland) bezogen. Erkennungssequenzen von Restriktionsendonukleasen sind mit fettgedruckten Buchstaben hervorgehoben. Nukleotidsubstitutionen oder -ergänzungen, die für die Einführung von Restriktionsschnittstellen erforderlich waren, sind unterstrichen. T_A bezeichnet die Annealing-Temperatur bei der jeweiligen PCR. Die Sequenzier-Primer sind mit „S“ gekennzeichnet und sind zum Teil mit einem fluoreszierenden Molekül am 5'-Ende (IRD800) modifiziert.

Primer	Länge (nt)	T_A (°C)	Sequenz (5'→3')
ADH8	30	50	GGTGCTGAACCAA ACTGCA GTGAAGCTGAC
ADH11	32	50	GAACCTTTGATTT CCGCGG GATTTGACAACAGC
ADH13	37	60	<u>ATATAGGTACCGGGCC</u> ACTACCACTGCAGCTGCATC
ADH14	50	60	<u>TATATAGATCTATACTCGAG</u> TTTTTGTATTTGTTGTTGTTGTTGT ATGAC
M13 rev	18	S	CAGGAAACAGCTATGACC
M13 uni	18	S	TGTAACACGACGGCCAGT
MAL1	29	55	CATGCAAGCCAG GAT CCAATAATGATTGG
MAL2	33	55	GTTCACTCATT GTCGAC GATTATTAGTTAAACC
MAL3	29	55	CCCATGTTT GGATCC TATCCTTGGTGCAC
MAL4seq	30	S	IRD 800-GTTTGGTTTGTAGTGGGTTCTTTGTCCCG
MAL5seq	29	S	IRD 800-GGGCCTGGCTTGCATGACCCCAAGATGGC
OPT2	75	55	<u>ATATGTCGACGAAGTTCCTATACTTTCTAGAGAATAGGAACTTCT</u> <u>CGAGGTTTCTCACCTCCACTAATTACTGCC</u>
OPT5	29	55	CAAGTCAACGT AGGG CCCAAATTGAGACC
OPT6	27	51	TGGGCCATCTT CCGCGG TAAGCTGACG
OPT7	32	51	CTCATAGATTACA CGAG CTCTAGGTAGTGTTT
OPT8	39	55	<u>ATATAGTTCGACAGATCTATAAACATCACGTTTCTCTCCG</u>
OPT9seq	22	S	IRD 800-GAGAAACCTCCCGTTGACACTG
OPT10seq	21	S	IRD 800-CAACGAGCACCATGCCAAACC
OPT11seq	20	S	IRD 800-CCACACTGCTAATGGCTGGA
OPT12	28	S	GACCCAGTCACCTCCCACTTGGTTAATG
OPT12seq	28	S	IRD 800-GACCCAGTCACCTCCCACTTGGTTAATG
OPT13seq	26	S	IRD 800-CCAAGCCCGCAGACAAGGAATAGTTG
OPT14	28	55	CATAAATTGTGT GGGCC ATTTATGGCG
OPT15	33	55	CATAT CTCGAG TAAATTTTGCAAAAGGATGTTG

Primer	Länge (nt)	T _A (°C)	Sequenz (5'→3')
OPT16	32	55	GGTTATTTTGGACCC <u>CGCG</u> GTTGGTCACTTCCC
OPT17	34	55	TTGTTTAAACA <u>GAGCT</u> CTTTGATAAGGGACTTGG
OPT18	27	S	CTGGAGTACCCAATGTATTGGGTTTGC
OPT18seq	27	S	IRD 800-CTGGAGTACCCAATGTATTGGGTTTGC
OPT19	29	58	GACAACGATCACAC <u>CTGC</u> AGACTTTGAGGC
OPT20	29	58	GCCCAAATGCCTC <u>GAGCT</u> CTTTCAATATG
OPT21	25	S	CCTCATCAAACCTGTAGTGTCTGA
OPT22seq	30	58	IRD 800-CTGGTGCCGCATATGCCACAGATATCTTGC
OPT23	27	60	AAAAA <u>CTCGA</u> GGTGACACAAACGCGGC
OPT24	32	60	ATAGCATGTGT <u>GTCG</u> ACCGCCGTGGGTCTTGG
OPT25	36	60	<u>ATATAGGATCCTCGA</u> GTGCAGCCAGGAAAGTAATGG
OPT26	28	S	CCAATCCTCTTTCCATTGGTGAAGTTGC
OPT27	32	S	GGACAGCAATAGGTGCAGTGATTAATCAATTC
OPT28	25	S	GGGTTCCAGATTACTTATTCCAAGC
OPT29	27	S	GGGATGCATGTAAATCGTTTTGGAGAG
OPT30	32	S	CCAAGTTAATGGTGGTATTAAAGATTATTGTG
OPT31	27	S	GTACGAAGGTATGGATGGTAGTATGAC
OPT32	31	S	CATCATATTAACACACCATTTACTTTTAAAC
OPT33	31	S	CTCCCGCCTGTACAGGCAAATTTTGAAGCC
OPT34	28	S	GAACAAATGACCACTGAAGAGGCGGTTG
OPT35	27	S	GGACCGCAATTGGTGCTGTTATCAACC
OPT36	27	S	GGTTACTGGTTCAGTTGGTGGGTTAGG
OPT37	25	S	CCTACCCTGAAGTTCAGAAATGGGC
OPT38	28	S	CGGCATCGGTGTTGTGGGGGGTTATTGG
OPT39	28	S	GGAGGTATTAAAGATTATTGTGAACCTG
OPT39seq	28	S	IRD 800-GGAGGTATTAAAGATTATTGTGAACCTG
OPT41	32	55	ATAGGTAATAAG <u>GAGCT</u> CACTTGGGATATAG
OPT42	32	55	AATTCC <u>CGCG</u> GGTCGCTGCATTTTTATCCTCC
OPT43	29	55	GTTGGATGCCACT <u>CGA</u> GATGCACCAGATG
OPT44	35	55	<u>TAAAAGGGCCCCGCG</u> GAATCTTGAGATTGTTGATGG
OPT45	29	S	CCACTTTCTATTGGTGAAGTTGCTACTAC
OPT46	30	S	GGTATTATATGGACAGCAATAGGTGCAGTG
OPT47	22	S	CTTCATCACATTTGTTGCCTCA
OPT48	31	S	GAGATTGGTATGAATTATGACCAAATGTGGG
OPT49	24	S	GTATCATCTTTCATTCAATTGGGC
OPT50	33	55	CTAAGT <u>CGAC</u> AAATAATATGTCTACAGAGAAACC
OPT51	33	55	CAATACAACAG <u>GGATC</u> CAATCATGGGAAATGTCC

Primer	Länge (nt)	T _A (°C)	Sequenz (5' → 3')
OPT52	31	55	GCATATATTGGTAACCC <u>GAGCTC</u> ATTAGCTT
OPT53	30	55	CAGGAAGAGCAGG <u>CCGCGG</u> TTTCTCTGTAG
OPT54	31	55	GGATATTTGAATGCT <u>CGAGT</u> ACAGGCACCTG
OPT55	30	55	CTCTAATCTTAC <u>GGGCC</u> CGTTTAGTGATT
OPT56	26	S	GGCTGTTGTTGAACATGAAAACGATG
OPT57	24	S	GAAATTCAAAGTTTGGAAATACAC
OPT58	30	S	GGATTGAACCCAATCCCAAGTTTTGATATG
OPT59	28	S	CCTGAATGGGCATATCTTATCATTCTTG
OPT60	36	55	CCCTCCCAA <u>AGTTCGAC</u> AATGACGAAAAAGGACACG
OPT61	32	55	CAATAAGGGGG <u>GAGATCT</u> GGAAACCCTATGGG
OPT62	28	S	CTATATCAGAAGCAATTGAAATTATTCG
OPT63	29	S	CAAAAATCAATTTAAATCCTGGACCATGG
OPT64	26	S	GGATTGGGATTCAATCCAATCCCATC
OPT65	24	S	GCATCGACAATATGGTAGATATGC
OPT66	27	S	GTGATCCTCATCAAAGGATAATTTT
OPT67	29	S	CTCATTATCCTGATGTACCCGATTGGTGG
OPT68	35	S	<u>ATATAGGATCC</u> TGGGAAATGACCTTTTCTTAAACC
OPT69	30	55	GCAGTCTCAAC <u>GAGCTCT</u> ATTTAGACGAGG
OPT70	36	54	CAATCAC <u>GTCGAC</u> AATGTCCAAAGAGGCTGAATTTG
OPT71	30	54	CACAATGATACTG <u>AGATCT</u> CAACTCATGGC
OPT72	24	S	CAAATCGCATCACATTGGTGTGGC
OPT73	28	S	CATTGGATCTGGTCTTGGTGGAAATGGGG
OPT74	25	S	GGTACGCTATTCTTTTCTTATGTGC
OPT75	27	S	CCATTGTCAGTTACAACACTAATGCTG
OPT76	27	55	GATCCACCTT <u>GAGCT</u> CAAACCTTCAATG
OPT77	32	55	CAAATTCAGCCT <u>CCGCGG</u> ACATTATGATTGTG
OPT78	28	55	GCAACAATGG <u>CTCGAGT</u> GTGGAGAGATG
OPT79	29	55	CCCATTTCTCAG <u>GGCC</u> CGTCTCCACGAAG
OPT80	34	54	CTGGCTATTATT <u>CTCGAG</u> AATGACAATAGAGACG
OPT81	33	54	GACTCTAATGTAAAC <u>AGATCT</u> ATTTACCAATGC
OPT82	23	S	GTCCAGAGTATAGCTGTTCGAGT
OPT83	27	S	CCTATTTTGGCAATCATTATCGGTC
OPT84	28	S	CAACTAAAACAACGGTGATAGGAATTGC
OPT85	26	S	CGATATGTTTAGAATTCCAACCTGCAG
OPT86	26	55	CGATTACTGTAG <u>GAGCT</u> CCCAATTCGG
OPT87	33	55	GAGAGCCGTATTCC <u>GCGG</u> TATTTGATATCGTC
OPT88	32	55	CACTATGCTTTTAACT <u>CGAGT</u> GGGTGTTAAGC

Primer	Länge (nt)	T _A (°C)	Sequenz (5' → 3')
OPT89	28	55	CAGATTAGTTGT <u>GGGCC</u> CCAGGTATTCTC
OPT100	30	55	AAGT <u>GTCGAC</u> TATGGACAAAATAAGGGCAG
OPT101	30	55	TGTGTTTCTTC <u>AGATC</u> TTACCAGGAAGATG
OPT102	33	55	<u>ATATAGGATCCC</u> CAGGAAGATGGCCCAAATGCC
OPT103	32	S	GATCCGCGCACTTTGTTTTGGGCGCAGTTTGC
OPT104	30	S	GGTGTCTGTGACCCCTGTCATCAATTGGTTG
OPT105	30	S	GAAGCGGAATACAAAAAGTACTCCCCTTG
OPT108	29	55	CATAGT <u>TCGAC</u> ACTTATAATAAGTGTTAGG
OPT109	29	55	TGGGCCATCTTCTG <u>CAG</u> AGCTGACGAAG
OPT110	32	55	CTCATAGATTAC <u>CGAGCT</u> CTAGGATGTGTTT
OPT200	31	55	GCAAAATTTAC <u>GTCGAC</u> TATGGTTTTAAAAG
OPT201	31	55	CTCTTCAACATC <u>AGATC</u> CTCCTAAGGGAAATG
OPT202	43	55	CTTTTAAAACCATT <u>GTCGAC</u> GTAAATTTGCAAAAGGATGTTG
OPT203	33	55	CGGTCATTTCCCTG <u>CAG</u> AGTGTCGATGTTGAAG
OPT204	29	55	CTATTTGCATCTT <u>GAGCT</u> CGAAATAAACC
OPT300	31	55	CACAATAAAATACACTAG <u>GTCGAC</u> AATGGATG
OPT301	31	55	CTTCAATAAA <u>AGATC</u> TATGTCTAAGGGAAAGTG
OPT302	31	55	GTCTAATATAG <u>GGGCC</u> CGAACATTTATGTAC
OPT303	40	55	CATCCATT <u>GTCGAC</u> TAGTGTATTTTATTGTGTTATGGTAC
OPT304	31	55	CTTCCCTTAG <u>GTCAG</u> GTGTCATTATTGAAG
OPT400	30	55	CAAAC <u>TCGAG</u> AAAATGGAGGATAAAAATGC
OPT401	30	55	ATAATAAATCCATCT <u>AGATC</u> TTATCAAGGG
OPT402	21	S	GGTTTGAATGCTGGTATTGCC
OPT403	34	55	<u>ATATAGGATCC</u> AGGGAAATTACCACGTCTTGGTC
OPT404	34	55	GCATAACATAGAGCG <u>GGGCC</u> CAAGTTATAGGTAC
OPT405	41	55	CCTCCATT <u>GTCGAC</u> GTTTGTATGGTATCTTGTATGATATGG
OPT406	29	55	GGTAATTTCCCTG <u>CAG</u> AAGATGGAGATGG
OPT407	31	55	GATGACGTTGAC <u>GAGCT</u> CAGTGTTTAGTTG
OPT501	29	S	GGGGGGTTATTGGACCCAAGAAAGTTTTT
OPT502	34	55	<u>ATATAGGATCC</u> TGGGAAATGTCCAACCTTTGGAC
OPT503	31	55	CTCAATATCATAAGCAG <u>GGGCC</u> CTAGCTACGC
OPT504	39	55	GTAGACATT <u>GTCGAC</u> CGCAACTTAGACAATCCCTGTTATC
OPT505	28	55	GGACATTTCTG <u>CAG</u> ATTGTTTATTGTTG
OPT506	29	55	CAAAACCAACAG <u>GAGCT</u> CCATCTCTAATC
OPT600	27	55	GTATTCGTGTCC <u>GCGG</u> TTCGTCATTAG
OPT601	27	55	CGATACTGCTC <u>GAG</u> ATGGTTATATTGG
OPT602	34	55	CTTGAACAATT <u>GGGCC</u> CTATTGCTATAGTTAATC

Primer	Länge (nt)	T _A (°C)	Sequenz (5'→3')
OPT603	29	55	CTCTATCAAGGGCCCTTCATTTAATTCAG
OPT604	40	55	CGTCATTGTCGACTTTGGGAGGGACAATTCTAATAGAGGG
OPT605	32	55	GAAAAGGTCATTTCCCTGCAGGGTTCCGCCCC
OPT606	29	55	GCTATAGGAGCTCAACAAATATTTAAATGG
OPT700	31	55	CATTAGAGTAGGGCCCATATCCAAAAGCCCC
OPT701	41	55	GGACATTGTCGACGTGATTGTTTTGATATCACAAATAATAA
OPT702	28	55	GATGTTTTGCCATGACTGCAGCGTACAG
OPT703	28	55	GGAAGCAATTGGGAGCTCAGTTAGCAGG
OPT801	33	60	GACTCTAATGGATCCGTTTCTATTTACCAATGC
OPT802	25	S	GTTCAAGGCTAGTCACTGGTCAAGG
OPT803	27	55	GTCCATGATGGGCCCTGATTCAATTCG
OPT804	41	55	CTATTGTCATTGTCGACAATAATAGCCAGCTGGTAAGTAAT
OPT805	29	55	GTAAAGCATTGGTCTGCAGAAACGTTTAC
OPT806	28	55	CTAATATCAGAAAGTGAGCTCTAACAGG
SAP2ex1	34	50	ACCAGTCGACAATGTTTTTAAAGAATATTTTCAT
SAP2ex2	38	50	ACCCC GGATCC TTAGGTCAAGGCAGAAATACTGGAAGC
SAT1	31	55	GCCCGACGTCGCACTCGAGCGTCAAACTAG
SAT2	27	55	CTAGTGATTTCTGCAGGACCACCTTTG
SAT3seq	21	S	IRD 800-ACTTCATTTTCAATTCAGATC
SAT4seq	24	S	IRD 800-CGACGGCCAGTGAATTGTAATACG
SAT5seq	23	S	IRD 800-CGTTACATTGGTTCCTCTTCGTC

Tabelle 3 In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide.

3.4 Geräte und Chemikalien

Die für die vorliegende Arbeit verwendeten Geräte und deren Hersteller sind in Tabelle 4 aufgeführt. Die Hersteller bzw. Vertreiber von Chemikalien sind im Methodenteil mit angegeben. Alle nicht erwähnten Geräte, Chemikalien und Materialien wurden von den Firmen Amersham, Applichem, Biometra, Boehringer, Difco, Eppendorf, Gibco, Gilson, Greiner, Merck, MWG-Biotech, Oxoid, Peqlab, Pharmacia, Roth, Serva und Sigma geliefert.

Gerät	Hersteller bzw. Anbieter
Brutschränke	
für <i>E. coli</i> (37°C) (Typ B6200)	Heraeus
für <i>C. albicans</i> (30°C) (Modell 400)	Memmert
Digitalkamera Coolpix 4500	Nikon
Elektrophoresekammern	
Agarosegele (DNA Sub Cell GT/Mini Sub Cell GT)	Bio-Rad
Polyacrylamidgele (Mini Protean 3)	
Elektroporationsgerät (Easyject prima)	Equibio
Geldokumentationsanlage	Bio-Rad
Hybridisierungsöfen Shake 'n' Stack	Hybaid
Konfokales Laser Scanning Mikroskop (Zeiss LSM 510 + Zeiss Axiovert 100) ausgestattet mit Argon-Laser (488 nm) und entsprechendem Filter für GFP	Zeiss
Photometer (Unicam Ultrospec 3000)	Pharmacia Biotech
Schüttelinkubatoren	
für <i>E. coli</i> (37°C) Innova 4300	New Brunswick Scientific
für <i>C. albicans</i> (30°C) Certomat BS-1	B. Braun Biotech
Thermocycler Cyclone 25	Peqlab
UV-Crosslinker Sratlinker 1800	Stratagene
Vakuum-Blotter	Pharmacia Biotech
Zentrifugen	
Tischzentrifuge (Biofuge Pico)	Heraeus
Kühlzentrifuge (Megafuge 2.0R)	

Tabelle 4 In dieser Arbeit verwendete Geräte.

3.5 Mikrobiologische Methoden

3.5.1 Anzucht von *Escherichia coli*

E. coli-Zellen wurden in der Regel bei 37°C unter Schütteln (180 rpm) in LB-Flüssigmedium (1% Pepton aus Casein, 0.5% Hefeextrakt, 0.5% NaCl) inkubiert. Mit *E. coli* beimpfte LB-Agarplatten (1.5% Agar) wurden über Nacht im Inkubator bei 37°C bebrütet. Plasmidtragende *E. coli*-Stämme wurden sowohl im Flüssigmedium als auch auf Agarplatten unter Selektionsdruck kultiviert (100 µg/ml Ampicillin bzw. 30 µg/ml Chloramphenicol).

3.5.2 Anzucht von *Candida albicans*

Zur Kultivierung von *C. albicans* wurden unterschiedliche Medien verwendet. Generell wurde für das entsprechende Festmedium 1.5% Agar zugesetzt. Flüssigkulturen wurden bei 250 rpm und 30°C über Nacht im Schüttler inkubiert, während Kulturen auf Agarplatten in der Regel 2-3 Tage bei 30°C im Inkubator bebrütet wurden.

3.5.2.1 Vollmedium und SD-Medium

Als Vollmedium diente YPD-Medium (2% Pepton aus Casein, 1% Hefe-Extrakt, 2% Glucose). YPD-Übernachtulturen wurden überwiegend zur DNA-Isolierung, zur Transformation oder zum Überimpfen in andere Medien verwendet. In einigen Fällen wurde SD-Medium (0.67% YNB ohne Aminosäuren [Yeast Nitrogen Base; BIO 101, Vista, Calif.], 2% Glucose) zur Vorkultivierung verwendet.

3.5.2.2 Selektions- und Screeningmedien

Zur Selektion und Propagation Uridin-prototropher *C. albicans*-Transformanten wurde SD-Medium verwendet, dem 100 ml URA-drop out 10x [BIO 101] zugesetzt wurden. Zum Anzüchten Uridin-auxotropher *C. albicans*-Stämme wurde diesem Medium 100 µg/ml Uridin beigemischt.

Zur Selektion Nourseothricin-resistenter (Nou^R) Transformanten wurden den YPD-Agarplatten 200 µg/ml Nourseothricin (Werner Bioagents, Jena, Deutschland) zugesetzt. Die Anzucht Nourseothricin-resistenter Stämme im Flüssigmedium erfolgte in YPD-Medium mit 100 bzw. 200 µg/ml Nourseothricin. Um Nourseothricin-sensitive (Nou^S) Derivate, in denen

die *SATI*-Flipper-Kassette deletiert wurde, zu erhalten, wurden die Transformanten für 6 h in YPM-Medium (2% Pepton aus Casein, 1% Hefe-Extrakt, 2% Maltose) inkubiert. Das Screening dieser Zellen erfolgte anschließend auf YPD-Platten, die 20 bzw. 25 µg/ml Nourseothricin (je nach Aktivität und Charge des Nourseothricins) enthielten. Nourseothricin-resistente Stämme bildeten auf diesen Platten größere Kolonien als Nourseothricin-sensitive Derivate.

Zum Screening der *ecaFLP*-Reporterstämme nach *in vitro*-Experimenten wurden Minimalagarplatten mit 1,8 µg/ml Mycophenolsäure verwendet. Auf diesen Platten konnten MPA-resistente und -sensitive Klone anhand ihrer Koloniegröße unterschieden werden. Zur Kontrolle wurden in Einzelfällen große und kleine Kolonien auf Minimalagarplatten überimpft, die 10 µg/ml Mycophenolsäure enthielten und nur ein Wachstum MPA-resistenter Klone erlaubten.

3.5.2.3 Medien für die Wachstumstests

Als Basismedium für alle Wachstumstests diente YCB-Medium (2.34% YCB [Yeast Carbon Base, Difco, Heidelberg, Deutschland], pH 5.0). Je nach Versuch wurden unterschiedliche Arten von Stickstoffquellen zugesetzt. Um das Wachstum auf BSA als alleiniger Stickstoffquelle zu testen, wurde YCB-Medium mit 0.4% BSA (Bovine Serum Albumin, Sigma, Deisenhofen, Deutschland) verwendet. In Einzelfällen wurden 0.2% Hefeextrakt zugesetzt. Für die Wachstumsversuche mit Peptiden wurden anstelle von BSA folgende Oligopeptide (Bachem, Weil am Rhein, Deutschland) in einer Konzentration von 4 mg/ml verwendet: LSKL, LWMR, PGKAR, RRRRRR, das Tropoelastin-Fragment PGAIPG, RPPGF (Bradykinin [1-5]), RPPGFSP (Bradykinin [1-7]), RPPGFSP ([Des-ARG⁹,Leu⁸]-Bradykinin), DRVYIHP (Angiotensin I/II [1-7]) und DRVYIHPF (Angiotensin II). Bei Bedarf wurde der Proteaseinhibitor Pepstatin A (Sigma) in einer Konzentration von 5 µg/ml eingesetzt. Um das Tet-System zu induzieren, wurden 50 µg/ml Doxycyclin dem YCB-BSA-Medium zugesetzt.

3.5.2.4 Medien für Sensitivitäts-Assay

Für den Wachstumstest auf dem toxischen Peptid KLEth (synthetisiert von Biosyntan, Berlin, Deutschland) wurden SD-Pro Agarplatten (0.17% YNB ohne Aminosäuren und ohne Ammoniumsulfat [Yeast Nitrogen Base; BIO 101], 2% Glucose, 0.1% Prolin,

2% gewaschener Agar) verwendet. Ein Filter (BD Sensi-Disc, 6mm Durchmesser, Becton-Dickinson, Heidelberg, Deutschland) wurde auf dem Agar platziert und mit 20 µl des toxischen Peptids (95 mM) benetzt.

3.6 Molekularbiologische Methoden

Sofern nicht einzeln erwähnt, wurden molekulargenetische Methoden für die Klonierung von DNA-Fragmenten nach Standardprotokollen durchgeführt (Sambrook *et al.*, 1989). Dazu gehören unter anderem Phenolisieren von Plasmid-DNA, alkoholische Fällung, Spaltung mit Restriktionsendonukleasen und Ligation von DNA-Fragmenten.

3.6.1 Plasmidisolierung aus *E. coli*

Die Plasmidisolierung aus *E. coli*-Zellen erfolgte nach einem modifizierten Protokoll der alkalischen Lyse (Birnboim and Doly, 1979).

Zunächst wurden 1.5 ml einer *E. coli*-Übernachtskultur in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß abzentrifugiert (2 min, 13000 rpm). Anschließend wurde das Zell-Pellet in 100 µl Lösung 1 (50 mM Glucose, 10 mM EDTA pH 8.0, 25 mM Tris/HCl pH 7.5) resuspendiert und der Ansatz für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Abkühlen der Suspension auf Eis wurden zunächst 200 µl Lösung 2 (200 mM NaOH, 1% SDS) und nach kurzer Inkubation auf Eis schließlich 150 µl Lösung 3 (3 M NaAc) zugegeben. Der Ansatz wurde kräftig gemischt und für 5 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation (5 min, 13000 rpm) wurde der wässrige Überstand entnommen, um die darin enthaltene DNA einmal in 200 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) zu extrahieren und anschließend in 1 ml 100% Ethanol zu fällen. Nach erneuter Zentrifugation (10 min, 13000 rpm) wurde das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in 50 µl bidest H₂O aufgenommen (100-200 ng/µl DNA). Schließlich wurde der gelösten Plasmid-DNA 1 µl RNaseA (50 mg/ml) zugesetzt. Die Plasmid-DNA wurde bei -20°C aufbewahrt.

3.6.2 Polymerasekettenreaktion (PCR) und Reinigung der PCR-Produkte

Die Amplifizierung von bestimmten DNA-Sequenzen wurde nach der Methode von Saiki *et al.* (Saiki *et al.*, 1988) durchgeführt. Für PCR-Reaktionen wurden der Elongase-Enzym-Mix (Gibco/Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland), die Pfx-DNA-Polymerase (Invitrogen) oder die

Phusion-DNA-Polymerase (Finnzymes bzw. Invitrogen) verwendet. Die Enzyme wurden unter Beachtung der Herstellerangaben eingesetzt. In der Regel wurden je PCR-Reaktion 30 Amplifikations-Zyklen durchgeführt. Jeder Zyklus umfasste einen Denaturierungsschritt von 60 sec bei 95°C (Pfx: 15 sec bei 94°C; Phusion: 15 sec bei 98°C), eine Primer-Annealing-Phase von 60 sec (Pfx und Phusion: 30 sec) und eine Extensionszeit von 60 sec pro kb des zu amplifizierenden DNA-Fragments bei 68°C (Phusion: 30 sec/kb bei 72°C). Auf den letzten Amplifikations-Zyklus folgte ein Extensionsschritt von 10 min. Die Annealing-Temperaturen der verwendeten Primer sind in Tabelle 3 aufgelistet. Es wurde in den meisten Fällen ein 50 µl-PCR-Ansatz gewählt. Als Template wurden 1-2 ng Plasmid-DNA bzw. 0.1-1.0 µg chromosomaler *C. albicans*-DNA (meist aus SC5314) eingesetzt und mit je 2 µM Primer, je 0.2 mM der Desoxyribonukleotide ATP, CTP, GTP und TTP sowie der einfachen Konzentration des jeweiligen Puffersystems versetzt. Nach der PCR wurde in allen Fällen ein Aliquot (5 µl) auf ein 1%-Agarosegel aufgetragen, mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und nach Ethidiumbromid-Färbung unter UV-Licht betrachtet. Bei erfolgreicher PCR wurden die PCR-Produkte mittels eines PCR-Purification-Kits (Quiagen, Hilden, Deutschland) nach Herstellerangaben aufgereinigt. Dazu wurde zunächst die fünffache Menge an Binding-Buffer zum PCR-Produkt gegeben. Anschließend wurde das gesamte Volumen auf eine Reinigungssäule gegeben und 1 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Nach Entfernen der abzentrifugierten Lösung und einmaligem Waschen des PCR-Produkts mit Wash-Buffer wurde dieses mit 30 µl Wasser von der Säule eluiert.

3.6.3 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Generell wurden für Spaltungen von Plasmid-DNA 10-20 Units pro Restriktionsendonuklease eingesetzt. Dabei wurde darauf geachtet, dass die zugesetzten Enzyme 10% des Gesamtvolumens nicht überschritten. Als Reaktionspuffer diente ein 10x Spaltpuffer (330 mM Tris-Ac pH 7.9, 660 mM KAc, 100 mM MgAc, 5 mM DTT, 0.1% BSA), der in einfacher Konzentration allen Spaltansätzen zugesetzt wurde.

Für Kontrollspaltungen von Plasmid-DNA, beispielsweise zum Überprüfen von *E. coli*-Transformanten, wurden 2-4 µl (100-200 ng/µl) Plasmid-DNA mit je 1 µl der jeweiligen Restriktionsendonukleasen in einem 20 µl-Ansatz 1-2 h bei 37°C im Brutschrank oder auf einem Heizblock inkubiert. Für präparative Spaltungen mit anschließender Gelaufreinigung der Fragmente wurden 15 µl (für Vektoren) bzw. 25 µl (für Inserts) Plasmid-DNA mit jeweils 2 µl der entsprechenden Enzyme in einem 50 µl-Ansatz für 4-6 h bei 37°C inkubiert. Für die

Gewinnung linearer Fragmente aus 25 µl Plasmid-DNA für die Transformation von *C. albicans* und für die Spaltung von bereits aufgereinigten PCR-Produkten (30 µl) wurde analog zur präparativen Spaltung vorgegangen. Beides konnte nach anschließender Aufreinigung mittels Gelelektrophorese weiterverwendet werden. Als DNA-Größenstandard diente für die Agarose-Gelelektrophorese eine 1 kb DNA-Leiter (Gibco bzw. Invitrogen).

Für die Überprüfung von *C. albicans*-Transformanten mittels Southern-Hybridisierung musste chromosomale DNA von *C. albicans* gespalten werden. Generell wurden dafür 10 µg DNA eingesetzt, die in einem 30 µl-Restriktionsansatz mit 2 µl des jeweiligen Enzyms über Nacht bei 37°C inkubiert wurden.

3.6.4 Aufreinigung von DNA mittels Agarose-Gelelektrophorese

Die Spaltansätze von Plasmid- bzw. PCR-DNA wurden mit 1x Auftragepuffer (6x Puffer: 0.25% Bromphenolblau, 0.25% Xylencyanol, 25% Ficoll Typ 400) versetzt, bevor die Größenauftrennung der DNA-Fragmente auf 1%-Agarosegelen in 1x TAE-Puffer erfolgte (50x TAE-Stocklösung: 242 g Tris, 57.1 ml Eisessig, 100 ml 0.5 M EDTA pH 8.0, ad 1 l dest. H₂O).

Für die Elution von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen kam der „Gene Clean Kit“ (BIO 101) zum Einsatz. Der Kit wurde nach Herstellerangaben verwendet. Zunächst wurden die gewünschten Banden unter UV-Licht aus dem Ethidiumbromid-gefärbten Agarose-Gel ausgeschnitten. Nach Überführung des Gelstücks in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß wurde dieses in 400 µl NaJ-Lösung bei 50°C vollständig gelöst. Nach Zugabe von 7 µl Glasmilch erfolgte eine 5-minütige Inkubation auf Eis. In dieser Zeit bindet die DNA an die Glasmilch. Anschließend wurde der Ansatz dreimal in 200 µl eiskaltem „New-Wash-Buffer“ gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde das Glasmilch-Pellet mit bidest. H₂O versetzt und 5 min bei 50°C inkubiert. Nach anschließender Zentrifugation (2 min bei 13000 rpm) konnte der Überstand, der die DNA enthält, entfernt und weiterverwendet werden. Generell wurden Fragmente für Klonierungsarbeiten in 15 µl bidest. H₂O gelöst, während Fragmente für eine *C. albicans*-Transformation in 6 µl bidest H₂O gelöst wurden.

3.6.5 Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen

Kompetente *E. coli*-Zellen wurden nach der CaCl₂-Methode hergestellt. Dazu wurde eine *E. coli* Übernachtskultur 1:100 in 50 ml frischem LB-Medium verdünnt und bis zu einer OD

von etwa 0.7-0.9 unter Schütteln bei 37°C inkubiert. Alle nachfolgenden Schritte wurden auf Eis bzw. bei 4°C durchgeführt. Nachdem die Kulturen die richtige OD erreicht hatten, wurden sie in ein 50 ml-Greiner-Röhrchen überführt und 10 min bei 3000 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde daraufhin in 20 ml eiskalter 100 mM CaCl₂-Lösung resuspendiert. Nach 30-minütiger Inkubation auf Eis wurde der Ansatz 10 min bei 3000 rpm zentrifugiert und das Zellpellet in 2.5 ml eiskalter 100 mM CaCl₂-Lösung aufgenommen. Der Ansatz wurde letztlich mit sterilem Glycerin (86%) versetzt, so dass die Endkonzentration an Glycerin 15% betrug. Die Zellen wurden in Eppendorf-Reaktionsgefäße zu je 200 µl aliquotiert und bis zur Verwendung bei -80°C aufbewahrt.

3.6.6 Ligation und Transformation von Plasmid-DNA

Zur Ligation wurden gespaltene und gelaufgereinigte DNA-Fragmente verwendet. Ein 15 µl-Ligationsansatz bestand aus 1 µl Vektor-DNA, einer oder mehreren Insert-DNAs (je 5 µl) sowie 1x T4-DNA-Ligationspuffer (5x, Gibco) und 1 µl T4-DNA-Ligase (1U/µl, Gibco). Die Inkubation erfolgte bei Raumtemperatur über 2-4 h. In einigen Fällen wurde der „Quick Ligation Kit“ (New England Biolabs, Ipswich, MA) verwendet. Der Ligationsansatz erfolgte analog zu oben. Nur die Inkubationszeit betrug lediglich 10-15 min bei Raumtemperatur, da die Quick-Ligase in einer hohen Konzentration vorlag (400 U/µl).

Direkt im Anschluss an die Ligation erfolgte die Transformation der kompetenten *E. coli*-Zellen mittels Hitzeschock. Dazu wurden 8-12 µl des Ligationsansatzes mit 200 µl kompetenten Zellen, die vorher auf Eis aufgetaut wurden, vermischt und 30 min auf Eis inkubiert. Nach dem Hitzeschock für 90 sec bei 42°C und kurzem Abkühlen auf Eis (10 sec) wurde 1 ml LB-Medium hinzugegeben und 1 h bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Zellen 2 min bei 4000 rpm abzentrifugiert, auf Selektionsplatten (LB-Agar mit 100 µg/ml Ampicillin bzw. LB-Agar mit 30 µg/ml Chloramphenicol) ausplattiert und über Nacht bei 37°C bebrütet.

3.6.7 DNA-Sequenzierung

Vor der Verwendung der klonierten PCR-Produkte wurde deren Fehlerfreiheit durch DNA-Sequenzierungen überprüft. DNA-Sequenzierungen wurden nach der Kettenabbruch-Methode unter Verwendung von Didesoxynukleotiden durchgeführt (Sanger *et al.*, 1977). Sequenziert wurden unter anderem alle *OPT*-Gene, deren upstream- und downstream-Bereiche, der Selektionsmarker *caSAT1* und der Promotor des *MAL2*-Gens. Es wurden überwiegend

Universal- und Reverse-Primer verwendet. Bei längeren Fragmenten (z.B. *OPT*-Gene) wurden weitere Primer benötigt, die so gewählt wurden, dass sie jeweils einen Abstand von ca. 500 bp zueinander in der Sequenz des jeweiligen Gens aufweisen. Die Sequenzierungen wurden überwiegend von SeqLab (Sequence Laboratories Göttingen, Deutschland) durchgeführt. Dazu wurden 0.6-0.7 µg Plasmid und 20 pmol Primer eingesetzt. In Einzelfällen wurden einige Proben auch am hauseigenen Sequenziergerät „LI-COR model 4000 automated Sequencer“ (MWG-Biotech) sequenziert. In diesem Fall waren fluoreszenzmarkierte (IRD 800) Sequenzier-Primer (MWG-Biotech) und ein spezielles Protokoll zur Probenvorbereitung notwendig.

Unter Verwendung des „Thermo-Sequenase fluorescent labeled primer cycle sequencing kit with 7-deaza-dGTP“ (RPN 2438) von Amersham (Buckinghamshire, UK) wurden für jede Probe vier Sequenzieransätze mit den jeweiligen Didesoxynukleotidgemischen A, C, G und T angesetzt. Jedem Ansatz wurden 6 µl der Plasmid-DNA (ca. 500 ng) und 1 pmol des fluoreszenzmarkierten (IRD 800) Sequenzier-Primers zugesetzt. Die Sequenzierreaktionen erfolgten in einem Thermocycler mit 30 Zyklen. Jeder Zyklus beinhaltete die Schritte Denaturierung (30 s, 95°C), Primer-Annealing (30 s, Primer-abhängige Temperatur) und Polymerisation (30 s, 70°C). Die fluoreszenzmarkierten DNA-Produkte wurden anschließend in einem Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Auftrennung sowie die Analyse der erhaltenen Daten erfolgte mit dem Sequenziergerät „LI-COR model 4000 automated sequencer“ und der dazugehörigen Software.

3.6.8 Transformation von *C. albicans* durch Elektroporation

Für die Transformationen wurden in der Regel *C. albicans*-Stämme mit Wildtyp-Hintergrund verwendet. Die Transformanten, die nach der Elektroporation das aufgenommene DNA-Fragment mit dem Nourseothricin-Resistenzgen (*caSAT1*-Marker) ins Genom integriert hatten, konnten als Nourseothricin-resistente (Nou^R) Kolonien in Gegenwart von Nourseothricin von den sensitiven Ausgangsstämmen selektioniert werden. Für die Herstellung der *ecaFLP*-Reporterstämme wurde ein Uridin-auxotropher Ausgangsstamm (CFI1) verwendet, der einen von *FRT*-sites flankierten *MPA^R*-Marker im Genom integriert hat. Als Selektionsmarker wurde dementsprechend das *URA3*-Gen eingesetzt. Prototrophe Transformanten konnten auf Minimal-Agarplatten, die kein Uridin enthielten, vom *ura3*-negativen Ausgangsstamm (CFI1) selektioniert werden. Für die Transformation von *C. albicans* kamen ausschließlich lineare DNA-Fragmente zum Einsatz, die durch Restriktion

aus Plasmiden herausgespalten und gelaufgereinigt wurden. Die DNA-Fragmente waren von den 5`- und 3`-Bereichen des Zielgens flankiert, um die Kasette zielgerichtet durch homologe Rekombination chromosomal in den Ziellokus zu integrieren.

Vor der Transformation war es notwendig elektroporationskompetente *C. albicans*-Zellen herzustellen. Dies geschah mit der Lithiumacetat-Methode. Zunächst wurden 10 ml YPD-Medium mit einer Kolonie des zu transformierenden Stammes angeimpft und über Nacht unter Schütteln bei 30°C kultiviert. Am nächsten Tag wurde die Übernachtskultur 1:10000 in frisches YPD-Medium überimpft und bis zu einer OD von 1.2-2 unter Schütteln bei 30°C weiterinkubiert (über Nacht). Am darauf folgenden Tag wurde die Kultur in ein 50 ml-Greiner-Röhrchen überführt und abzentrifugiert (5 min, 4000 rpm, 4°C). Das Pellet wurde anschließend in 8 ml sterilem bidest. H₂O aufgenommen und nach Zugabe von 1 ml 10x TE-Puffer (100 mM Tris-Cl pH 7.5, 10 mM EDTA pH 7.5) und 1 ml 1 M Lithiumacetat pH 7.5 (mit Essigsäure eingestellt) für 60 min bei 30°C im Schüttler inkubiert. Nach Zugabe von 250 µl 1 M DTT wurde die Kultur für weitere 30 min im Schüttler bei 30°C inkubiert. Im Anschluss wurden 40 ml kaltes bidest. H₂O zugegeben und die Zellen wurden 5 min bei 4000 rpm und 4°C abzentrifugiert. Das Pellet wurde einmal mit 25 ml eiskaltem bidest. H₂O und einmal mit 5 ml eiskaltem 1 M Sorbitol gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde das Pellet in 100 µl eiskaltem 1 M Sorbitol aufgenommen.

Für die Transformation der kompetenten *C. albicans*-Zellen mittels Elektroporation (Köhler *et al.*, 1997) wurden 40 µl der Zellsuspension mit 5 µl der gelaufgereinigten DNA vermischt und in eine auf Eis vorgekühlte Elektroporationsküvette (0.2 cm Durchmesser, PeqLab, Erlangen, Deutschland) überführt. Die Elektroporation wurde mit einem Elektroporationsgerät (Equibio, Kent, UK) bei 1.8 kV durchgeführt.

Nach der Elektroporation wurde 1 ml 1 M Sorbitol zu den Zellen gegeben und diese in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Transformanten, bei denen das *URA3*-Gen als Selektionsmarker zum Einsatz kam, konnten direkt nach der Transformation (100 µl) auf Minimal-Agarplatten ausplattiert werden. Die Platten wurden in der Regel 2-3 Tage bei 30°C inkubiert. Wurde der *caSAT1*-Marker verwendet, wurden die Zellen nach der Transformation in YPD-Flüssigmedium überführt und 4-6 h bei 30°C inkubiert. Im Anschluss an die Inkubation konnten die Transformanten (100 µl) auf YPD-Platten, die 200 µg/ml Nourseothricin enthielten, ausplattiert werden. Eine 24-stündige Inkubation bei 30°C war ausreichend, um Nourseothricin-resistente Kolonien zu erhalten. In beiden Fällen wurde nach den angegebenen Inkubationszeiten Kolonien gepickt und erneut auf Selektionsplatten

ausgestrichen. Zur Deletion der *SATI*-Flipper-Kassette wurden korrekte Transformanten 6 h in YPM-Medium inkubiert und anschließend auf YPD-Platten, die 20 bzw. 25 µg/ml Nourseothricin enthielten, ausplattiert. Auf diesen Platten konnten resistente und sensitive Klone anhand ihrer Koloniegröße unterschieden werden.

3.6.9 Isolierung chromosomaler DNA aus *C. albicans*

Zur Isolierung chromosomaler DNA aus *C. albicans*-Zellen wurden je nach Bedarf zwei verschiedene Protokolle verwendet. Die mechanische Aufschlussmethode einerseits lieferte gegenüber der enzymatischen Methode andererseits schneller die DNA, wobei die Ausbeute geringer und die Qualität der DNA schlechter war.

In beiden Fällen wurden zunächst 10 ml YPD-Medium mit je einer Kolonie beimpft und über Nacht bei 30°C im Schüttler inkubiert. Bei der Anzucht Nourseothricin-resistenter Stämme mit integrierter *SATI*-Flipper-Kassette wurden zusätzlich 100 bzw. 200 µg/ml Nourseothricin dazugegeben, um eine vorzeitige Deletion des Markers zu vermeiden. Am darauf folgenden Tag wurden die YPD-Übernachtskulturen in Greiner-Röhrchen überführt und 5 min bei 4000 rpm zentrifugiert.

Bei der mechanischen Aufschlussmethode wurde das Zellpellet in 1 ml bidest. H₂O resuspendiert und in ein 2 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Nach kurzem Abzentrifugieren wurde das Pellet in 200 µl „Breaking Buffer“ (2% Triton X-100, 1% SDS, 100mM NaCl, 10mM Tris-Cl, 1mM EDTA) resuspendiert. Nach Zugabe von etwa 0.3 g Glasperlen (0.25-0.50 mm Durchmesser, Roth, Karlsruhe, Deutschland) sowie 200 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) wurde der ganze Ansatz für 5 min sehr stark gevortext. Nach Zugabe von 200 µl TE-Puffer (100mM Tris-Cl pH 8.0, 1mM EDTA) wurde nochmals für 45 sec gevortext, anschließend zentrifugiert (5 min, 13000 rpm) und der Überstand in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Durch Zugabe von 1 ml Isopropanol wurde die DNA gefällt. Nach Zentrifugation wurde das Pellet in 70% Ethanol gewaschen. Nach vollständigem Entfernen des Ethanols wurde das DNA-Pellet kurz an der Luft getrocknet, bevor die DNA in 20-50 µl bidest. H₂O gelöst wurde. Die DNA-Lösung wurde anschließend mit 1 µl RNaseA (50 mg/ml) für 30 min bei 37°C behandelt.

Bei der enzymatischen Methode der chromosomalen DNA-Isolierung wurde das Zellpellet aus der Übernachtskultur in 1 ml Sorbitol resuspendiert und in ein 2 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Nach kurzer Zentrifugation wurde das Pellet 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) resuspendiert und 45 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert (5 min bei 13000 rpm), in 800 µl Proteinase-Puffer (10 mM Tris-Cl pH 7.5, 50 mM EDTA pH 7.5, 0.5% SDS, 1 mg/ml Proteinase K) aufgenommen und für 30 min bei 60°C inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Extraktion der DNA durch Zugabe von 800 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1). Nach anschließender Zentrifugation (5 min bei 13000 rpm) wurde die obere wässrige Phase in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Durch Zugabe von 700 µl Isopropanol wurde die DNA ausgefällt, abzentrifugiert und einmal in 70% Ethanol gewaschen. Nach vollständigem Entfernen des Ethanols wurde das DNA-Pellet kurz an der Luft getrocknet und die DNA in 80-100 µl bidest. H₂O gelöst. Die DNA-Lösung wurde noch mit 2 µl RNaseA (50 mg/ml) versetzt und 30 min bei 37°C inkubiert, um die RNA aus der Lösung zu entfernen.

3.6.10 Southern-Hybridisierung

Mittels Southern-Hybridisierung wird die auf einem Agarosegel aufgetrennte DNA auf eine Nylonmembran übertragen (Southern, 1975), um anschließend mit markierten Sonden komplementäre DNA zu detektieren. Dazu wurden zunächst in einem 30 µl-Restriktionsansatz ca. 10 µg chromosomale *C. albicans*-DNA mit geeigneten Restriktionsendonukleasen über Nacht bei 37°C gespalten. Die anschließende Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte ebenfalls über Nacht auf einem 1%-Agarosegel bei 36-40 V in 1x TAE-Laufpuffer (50x TAE-Stocklösung: 242 g Tris, 57.1 ml Eisessig, 100 ml 0.5 M EDTA pH 8.0, ad 1 l dest H₂O). Zur späteren Größenbestimmung der hybridisierenden DNA-Fragmente wurde ein DNA-Größenmarker (1 kb-Leiter, Gibco bzw. Invitrogen) mit aufgetragen. Nach dem Färben des Gels mit Ethidiumbromid und Kontrolle der korrekten Auftrennung der DNA-Fragmente unter UV-Licht wurde die DNA unter Verwendung eines Vakuum-Blot-Geräts (Pharmacia/Amersham) vom Gel auf eine Nylonmembran (Schleicher und Schuell, Dassel, Deutschland) übertragen. Die Membran wurde zu diesem Zweck vorher kurz in dest. H₂O getaucht und anschließend 5 min in 20x SSC (0.3 M Na-Citrat, 3 M NaCl) geschwenkt. Nach dem Anlegen des Unterdrucks wurde die DNA vor dem eigentlichen Transfer jeweils 15 min mit drei verschiedenen Lösungen behandelt: Lösung A (250 mM HCl) zur Depurinierung der DNA, Lösung B (1.5 M NaCl, 0.5 M NaOH) zur Denaturierung der DNA und Lösung C (1.5 M NaCl, 0.5 M Tris-Cl pH 7.5) zur Neutralisierung. Anschließend erfolgte der eigentliche Transfer der DNA auf die Nylonmembran, indem das Gel 90 min mit 20x SSC überschichtet wurde. Im Anschluss wurde die Membran für je 30 sec

in 0.4 N NaOH bzw. in 0.2 M Tris-Cl pH7.5 geschwenkt. Die DNA konnte daraufhin mittels eines UV-Crosslinkers auf der Membran fixiert werden.

Die Hybridisierung der Membran erfolgte nach den Herstellerangaben des „ECL-labeling and detection-Kit“ (Amersham). Zur Vorhybridisierung wurde die Membran 1-2 h bei 42°C in ECL-Hybridisierungsmix inkubiert. Währenddessen konnte die DNA-Sonde (gelgereinigtes Fragment von 0.2-1 kb Länge, ca. 100 ng) mit Peroxidase gekoppelt werden und im Anschluss an die Vorhybridisierung zur Membran in das Hybridisierungsröhrchen gegeben werden. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 42°C. Am darauf folgenden Tag wurde die Membran 3x bei 42°C im Hybridisierungsröhrchen für 1x 20 min und 2x 10 min mit Waschpuffer I (6 M Harnstoff, 0.4% SDS, 0.5x SSC) sowie 2x bei Raumtemperatur in einer Schale mit Waschpuffer 2 (2x SSC) für je 5 min gewaschen. Für die Signaldetektion wurde die Membran für 1 min in einem Gemisch aus gleichen Volumenanteilen der Detektionslösung 1 und 2 geschwenkt und in Frischhaltefolie eingewickelt. Die ECL-Filme (Amersham Hyperfilm ECL) wurden je nach Signalstärke für 1-120 min exponiert.

Für eine Rehybridisierung der Membran mit einer anderen Sonde wurde in der Regel die Membran zusammen mit der Detektionslösung in eine Folie eingeschweißt und über Nacht liegen gelassen, bis das Signal vollständig abgeklungen war. Vor erneuter Verwendung wurde die Membran für 1 min mit 5x SSC gewaschen.

3.6.11 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Für den Nachweis der Sekretion von Sap2p in den *opt1Δ*-, *opt123Δ*- und *opt12345Δ*-Mutanten während des Wachstums unter *SAP2*-induzierenden Bedingungen wurden 10-20 µl Überstand einer YCB-BSA-HE-Übernachtskultur (Mehrfachmutanten: Inkubation über 48 h bei 30°C) auf einem Polyacrylamidgel (Maniatis *et al.*, 1982) aufgetrennt, um die typische Bande von Sap2p bzw. den Abbau des BSA im Medium nachzuweisen. Dazu wurden 10-20 µl Überstand mit 2-4 µl Probenpuffer (5x Probenpuffer: 1.1 g SDS, 0.41 g EDTA, 0.17 g NaH₂PO₄ x 2H₂O, 1.1 ml β-Mercaptoethanol, ad 10 ml dest H₂O, 20 mg Bromphenolblau in 10 ml 50% Glycerin) versetzt, 10 min bei 100°C inkubiert und zusammen mit 8 µl eines Protein-Größenmarkers (Rainbow Marker [Amersham] oder Precision Plus Protein Standards all blue [Bio-Rad, München, Deutschland]) auf ein 12% Polyacrylamidgel aufgetragen (Trenngel: 2.5 ml Lösung B [1.5 M Tris-Cl pH 8.8, 0.4% SDS], 4.0 ml Gelstock (30% Acrylamid-/ 0.8% Bisacrylamid-Stammlösung [Roth]), 50 µl 10% APS, 5 µl Temed, ad 10 ml dest H₂O); Sammelgel: 1.25 ml Lösung C

[0.5 M Tris-Cl pH 6.8, 0.4% SDS], 0.65 ml Gelstock, 25 µl 10% APS, 5 µl Temed, ad 5 ml dest H₂O). Die Auftrennung der Proteine im Gel erfolgte bei 25 mA für 1 h in 1x SDS-Laufpuffer. Im Anschluss wurde das Gel mit Coomassie-Brilliant-Blau oder Colloidal Coomassie dye gefärbt und die entsprechenden Banden konnten detektiert werden. Für die Färbung mit Coomassie-Brilliant-Blau wurde das Gel für 1-2 h in der Färbelösung (0.2% Coomassie-Brilliant-Blue R250 [Serva, Heidelberg, Deutschland], 40% Methanol, 10% Essigsäure) inkubiert, dann zweimal mit Entfärber (40% Methanol, 10% Essigsäure) für je 20 min bzw. 40 min entfärbt. Für die Färbung mit Colloidal Coomassie dye (40 ml Stocklösung (0.1% Coomassie-Brilliant-Blue R250 [Serva], 85% Phosphorsäure, 0.75 M Ammoniumsulfat) + 10 ml Ethanol) wurde das Gel über Nacht unter Schütteln gefärbt und anschließend zweimal mit dest. H₂O gewaschen.

3.6.12 Nachweis der GFP-Expression mittels Fluoreszenzmikroskopie und Durchflusszytometrie

Die Fluoreszenz von *C. albicans*-Zellen, die das *GFP*-Reporter gen unter der Kontrolle der *OPT*-Promotoren oder des *SAP2*-Promotors exprimieren, wurde mithilfe eines konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops nachgewiesen (Zeiss LSM 510 + Zeiss Axiovert 100, Jena, Deutschland). Dazu wurde ein Aliquot (2-5 µl) einer Übernachtskultur (YPD, YCB-BSA und YCB-BSA-HE) auf einen Objektträger aufgetropft und mit einem Deckgläschen bedeckt. Die Bilder wurden mit einem 63x Ölimmersionsobjektiv und mithilfe eines Argonlasers (488 nm) und den entsprechenden Filtern für GFP und Durchlicht aufgenommen.

Alternativ wurden die *GFP*-Expressionen einiger *C. albicans*-Stämme mittels einer FACS-Analyse nachgewiesen. Dazu wurden YPD-Übernachtskulturen der Stämme 1:100 in frischem YPD und YCB-BSA verdünnt. Nach 8 h Wachstum wurden die Zellen abzentrifugiert und 2x in PBS gewaschen. Nach Verdünnung der Zellen (1:2) wurden diese in ein FACS-Röhrchen überführt und analysiert. Um die Induktion der *OPT*-Gene durch verschiedene Peptide zu testen, wurden YPD-Übernachtskulturen 1:100 in YCB-Medium verdünnt, welchem das entsprechende Peptid zugesetzt war. Die Analyse erfolgte analog nach 10 h und 20 h Wachstum. Zur Analyse wurde ein FACSCalibur-System verwendet, welches mit einem Argon-Laser (488 nm) ausgestattet war (Becton Dickinson). Die Fluoreszenz wurde über den FL1-Kanal mit einem 530 nm-Bandpass-Filter gemessen. Es wurden jeweils 50000 Zellen bei niedrigem Durchfluss analysiert. Die durchschnittliche Fluoreszenz wurde anschließend mit der dazugehörigen Software ermittelt (CellQuest Pro).

4 Ergebnisse

4.1 Identifikation einer *Candida albicans*-Genfamilie, die für Oligopeptidtransporter (OPT) codiert

In früheren Arbeiten wurde diskutiert, dass Oligopeptide, die durch basale Sap-Aktivität entstehen, als Induktoren für eine *SAP2*-Expression dienen könnten. Diese Oligopeptide könnten an spezifische Rezeptoren auf der Zelloberfläche binden, die dann über einen Signalweg eine *SAP2*-Expression induzieren (Lerner and Goldman, 1993). Oligopeptidtransporter könnten somit neben ihrer Transportfunktion auch die Rolle eines solchen Sensors übernehmen und damit für die Induktion der *SAP2*-Expression verantwortlich sein. Es wurde bisher ein Gen (*OPT1*) in *C. albicans* identifiziert, das einen Oligopeptidtransporter codiert (Lubkowitz et al., 1997). Ausgehend von dieser *OPT1*-Sequenz konnte in der vorliegenden Arbeit anhand einer BLAST-Suche in der Genomsequenz des *C. albicans*-Wildtypstammes SC5314 (<http://www-sequence.stanford.edu/group/candida>) eine Vielzahl offener Leseraster identifiziert werden, deren Genprodukte Ähnlichkeit zu Opt1p aufweisen. Durch genauere Betrachtung konnten die identifizierten und zum Teil auch unvollständigen Leseraster bestimmten Genen zugeordnet werden. Dies führte zum Ergebnis, dass die *OPT*-Genfamilie in *C. albicans* aus acht Mitgliedern besteht, die auf vier verschiedenen Chromosomen lokalisiert sind (Tabelle 5). In Abhängigkeit der abnehmenden Ähnlichkeiten der Produkte dieser Gene zu Opt1p wurden die Gene als *OPT2*-*OPT8* bezeichnet. Die Ergebnisse dieser *in silico* Analyse wurden experimentell bestätigt, indem alle acht *OPT*-Gene kloniert und sequenziert wurden. Mit Ausnahme der Gene *OPT2* und *OPT5* führte dies zusätzlich zur Identifizierung weiterer polymorpher Allele, die nicht in der veröffentlichten Genomsequenz vorhanden waren. In Tabelle 5 sind alle identifizierten *OPT*-Gene, deren genomische Lokalisierung, Allelunterschiede und Restriktionspolymorphismen aufgelistet. Aufgrund der Restriktionspolymorphismen war in allen Fällen eine Unterscheidung beider Allele im Wildtyp SC5314 möglich. Alle erhaltenen Daten wurden durch unabhängige PCR-Reaktionen und Sequenzierungen bestätigt.

Gen	ORF	Genomische Lokalisierung		Anzahl der Aminosäuren	Allelunterschiede		
		Contigs	Chromosom		Nukleotide ^a	Aminosäuren	Restriktionspolymorphismen ^b
<i>OPT1</i>	19.2602	19-10251	R	783	35 ^c	5	<i>HindIII</i> cod, <i>HindIII</i> down
	19.10133	19-20251					
<i>OPT2</i>	19.3746	19-10190	R	929	-	-	<i>SpeI</i> down
	19.11231	19-20190					
<i>OPT3</i>	19.3749	19-10190	R	905	86	8	<i>SpeI</i> up
	19.11233	19-20190					
<i>OPT4</i>	19.2292	19-1887	R	904	74	13	<i>EcoRI</i> up, <i>EcoRV</i> cod, <i>NdeI</i> cod
	19.3718	19-10190					
	19.11202	19-20190					
	19.176	19-10040					
	19.7809	19-20040					
<i>OPT5</i>	19.5121	19-10218	2	921	-	-	<i>NsiI</i> up, <i>NsiI</i> down
	19.12587	19-20218					
	19.1347	19-10111					
	19.8927	19-20111					
<i>OPT6</i>	19.4655	19-10212	4	945	12	8	<i>ClaI</i> up, <i>ClaI</i> down
	19.12125	19-20212					
<i>OPT7</i>	19.5673	19-10231	4	747	5	1	<i>EcoRI</i> down
	19.13118	19-20231					
<i>OPT8</i>	19.5770	19-10233	6	718	7	-	<i>BglII</i> cod
	19.13192	19-20233					

Tabelle 5 *OPT*-Gene und die von ihnen codierten Proteine.

^a Nur die Nukleotidunterschiede innerhalb der codierenden Region sind berücksichtigt.

^b Restriktionspolymorphismen in der upstream (up), downstream (down) oder in der codierenden (cod) Region wurden genutzt, um beide Allele jedes Gens durch Southern-Hybridisierung zu unterscheiden.

^c Das *OPT1-2*-Allel enthält zusätzlich ein Intron mit 58 bp Länge, das nicht im *OPT1-1*-Allel vorhanden ist.

OPT1

Wie aus Tabelle 5 ersichtlich, besitzt der Wildtyp SC5314 zwei polymorphe Allele für das *OPT1*-Gen. Beide Allele unterscheiden sich innerhalb der codierenden Region um 35 Nukleotide. Fünf davon führen zum Austausch von Aminosäuren. Zusätzlich enthält das *OPT1-2*-Allel ein Intron der Länge 58 bp, welches im *OPT1-1*-Allel nicht vorhanden ist. Die Sequenz der beiden identischen ORFs 19.2602 und 19.10133 ist ein Gemisch aus beiden

klonierten Allelen. Diese Sequenz hat mehr Ähnlichkeit zu *OPT1-1* (vier Nukleotide Unterschied) als zu *OPT1-2*.

OPT2

Die beiden identischen ORFs 19.3746 und 19.11231 entsprechen dem *OPT2*-Gen, dessen Genprodukt 48% Ähnlichkeit zu Opt1p aufweist (Abbildung 1). Die Tatsache, dass die klonierten *OPT2*-Gene identisch mit den beiden ORFs sind, deutet darauf hin, dass es keine polymorphen *OPT2*-Allele im Stamm SC5314 gibt.

OPT3

Das *OPT3*-Gen befindet sich 3.3 kb downstream von *OPT2* und läuft in die gleiche Richtung (Abbildung 2). Opt3p zeigt hohe Ähnlichkeit zu Opt2p (96%), was darauf hinweist, dass beide Gene durch Tandemduplikation entstanden sind (Abbildung 1). Der Stamm SC5314 enthält zwei polymorphe *OPT3*-Allele, die sich durch 86 Nukleotidunterschiede innerhalb der codierenden Region unterscheiden. Acht davon resultieren in Aminosäure-Austauschen (Tabelle 5). Die beiden klonierten *OPT3*-Allele sind identisch mit den ORFs 19.3749 (*OPT3-1*) und 19.11233 (*OPT3-2*).

OPT4

Das *OPT4*-Gen ist 47 kb upstream von *OPT2* lokalisiert und läuft in die entgegengesetzte Richtung (Abbildung 2). Wie aus Tabelle 5 ersichtlich unterscheiden sich die beiden klonierten *OPT4*-Allele durch 74 Nukleotide in der codierenden Region. 13 Nukleotidaustausche führen zum Austausch von Aminosäuren. Ein vollständiges ORF (19.2292) konnte in der Genomsequenz von *C. albicans* identifiziert werden. Dieses ORF besteht aus dem N-Terminus des *OPT4-1*-Allels und aus dem C-Terminus des *OPT4-2*-Allels. Zusätzlich weist die Genomsequenz einige abgeschnittene ORFs auf verschiedenen Contigs auf. Die identischen ORFs 19.3718 und 19.11202 am Ende der Contigs 19-10190 und 19-20190 entsprechen dem N-Terminus (Aminosäuren 1-436) des *OPT4-2*-Allels, während die identischen ORFs 19.176 und 19.7809 am Ende der Contigs 19-10040 und 19-20040 dem C-Terminus (Aminosäuren 466-904) des *OPT4-1*-Allels entsprechen. Das klonierte *OPT4-2*-Allel enthält zusätzlich vier Aminosäure-Austausche, die in keinem der identifizierten ORFs aus der Genomsequenz vorhanden sind. Die Proteine, die von den *OPT4*-Allelen codiert werden, sind Opt2p und Opt3p sehr ähnlich (zwischen 92 und 96%; Abbildung 1).

OPT5

Die beiden identischen ORFs 19.5121 und 19.12587 entsprechen dem *OPT5*-Gen. Zusätzlich wurden zwei abgeschnittene ORFs (19.1347 und 19.8927) am Ende der Contigs 19-10111 und 19-20111 identifiziert, die dem C-Terminus von *OPT5* (Aminosäuren 792-921) entsprechen. Es konnte nur ein *OPT5*-Allel kloniert werden, welches zu 100% mit diesen ORFs übereinstimmte, was darauf hinweist, dass beide *OPT5* Allele im SC5314 identisch sind. Die *OPT5*-Allele können allerdings anhand von *NsiI*-Restriktionspolymorphismen (Tabelle 5) in den flankierenden Regionen unterschieden werden. Das codierte Protein hat eine Ähnlichkeit von etwa 80% zu Opt2p-Opt4p (Abbildung 1).

OPT6

Es wurden zwei polymorphe *OPT6*-Allele kloniert, welche zwölf Nukleotidunterschiede innerhalb der codierenden Region aufweisen. In acht Fällen führt der Austausch eines Nukleotids zum Austausch der Aminosäure (Tabelle 5). Die zwei identischen ORFs 19.4655 und 19.12125 sind ein Gemisch der *OPT6-1*- und *OPT6-2*-Allele. Die durch diese Allele codierten Proteine zeigen eine Ähnlichkeit zu Opt2p-Opt5p von 58% (Abbildung 1).

OPT7

Die beiden klonierten polymorphen *OPT7*-Allele unterscheiden sich in der codierenden Region durch fünf Nukleotide. Ein Nukleotidaustausch führt zu einem Aminosäureaustausch (Tabelle 5). Die beiden identischen ORFs 19.5673 und 19.13118 entsprechen dem *OPT7-1*-Allel. Opt7p zeigt eine Ähnlichkeit von nur 37-38% zu allen Opt1p-Opt6p (Abbildung 1).

OPT8

Die *C. albicans*-Genomsequenz enthält ein Gen (identische ORFs 19.5770 und 19.13192), dessen Genprodukt 32% Ähnlichkeit zu Opt1p, aber keine erkennbare Ähnlichkeit zu den anderen Opt-Proteinen zeigt (Abbildung 1). Jedoch zeigt das als *OPT8* bezeichnete Gen eine hohe Ähnlichkeit zu *YGL114w* von *Saccharomyces cerevisiae*, das in der Literatur als mögliches Mitglied einer Oligopeptidtransporterfamilie beschrieben wird (Yen *et al.*, 2001). Allerdings finden sich auch Hinweise darauf, dass *YGL114w* möglicherweise nicht für einen Oligopeptidtransporter codiert (Wiles *et al.*, 2006). Deswegen ist die Aufnahme dieses Gens in die *OPT*-Genfamilie als vorläufig anzusehen. Zusätzlich zum *OPT8-1*-Allel, welches identisch mit den ORFs 19.5770 und 19.13192 ist, wurde ein zweites *OPT8*-Allel kloniert, das

sich von *OPT8-1* durch sieben Nukleotide in der codierenden Region unterscheidet. Keiner dieser Nukleotidaustausche führt zu einem Aminosäureaustausch (Tabelle 5).

Pseudogene

Des Weiteren konnten in der *C. albicans* Genomsequenz einige unvollständige Leseraster mit Ähnlichkeit zu den *OPT*-Genen identifiziert werden. Etwa 25 kb downstream vom *OPT1*-Gen befindet sich ein Leseraster (identische ORFs 19.2584 und 19.10116), welches mit dem C-Terminus von *OPT1* (Aminosäuren 534-783) fast identisch ist (Abbildung 2). Dieses unvollständige Leseraster enthält zusätzlich das Intron, das im Allel *OPT1-2* vorkommt. Dem Leseraster gehen zum einen eine *OPT1*-Sequenz in umgekehrter Orientierung (Aminosäuren 434-531 von Opt1p) und zum anderen eine *OPT1*-Sequenz in richtiger Orientierung (Aminosäuren 362-429 von Opt1p) voraus. Jedoch fehlen der N-Terminus von *OPT1* und der Upstream-Bereich völlig. Deswegen wurde dieses Pseudogen ψ *OPT1* genannt.

Ein anderer Bereich von etwa 0,8 kb Länge, der hohe Ähnlichkeit zu den Genen *OPT2-OPT4* zeigt (80% auf Aminosäureebene), befindet sich auf den Contigs 19-10161 und 19-20161. Allerdings befinden sich in diesem Bereich zahlreiche Stoppcodons, was darauf hinweist, dass es sich hierbei ebenfalls um ein Pseudogen handelt.

Ähnlichkeiten der Proteine und Lokalisierung der *OPT*-Gene im Genom

Die nachfolgenden beiden Abbildungen geben einen Überblick über die Ähnlichkeiten und Identitäten von Opt1p-Opt8p (Abbildung 1) bzw. über die Verteilung der *OPT*-Gene im Genom von *C. albicans* (Abbildung 2).

	Opt1p	Opt2p	Opt3p	Opt4p	Opt5p	Opt6p	Opt7p	Opt8p
Opt1p		37.2	36.2	35.6	34.6	32.5	28.3	22.1
Opt2p	48.3		93.7	90.0	74.1	46.4	27.4	
Opt3p	47.1	95.9		92.3	74.8	45.0	26.7	
Opt4p	46.4	92.9	95.0		74.4	45.8	27.5	
Opt5p	46.2	79.6	80.4	80.2		46.9	27.3	
Opt6p	43.8	58.0	58.0	57.9	58.4		26.9	
Opt7p	38.0	38.0	37.8	37.7	37.8	37.3		
Opt8p	31.9							

Abbildung 1 Ähnlichkeiten (links unten) und Identitäten (rechts oben) von Opt1p-Opt8p aus *C. albicans*. Zur Vereinfachung sind jeweils nur die Proteine aufgeführt, die vom Allel 1 codiert werden. Allelunterschiede siehe Tabelle 5.

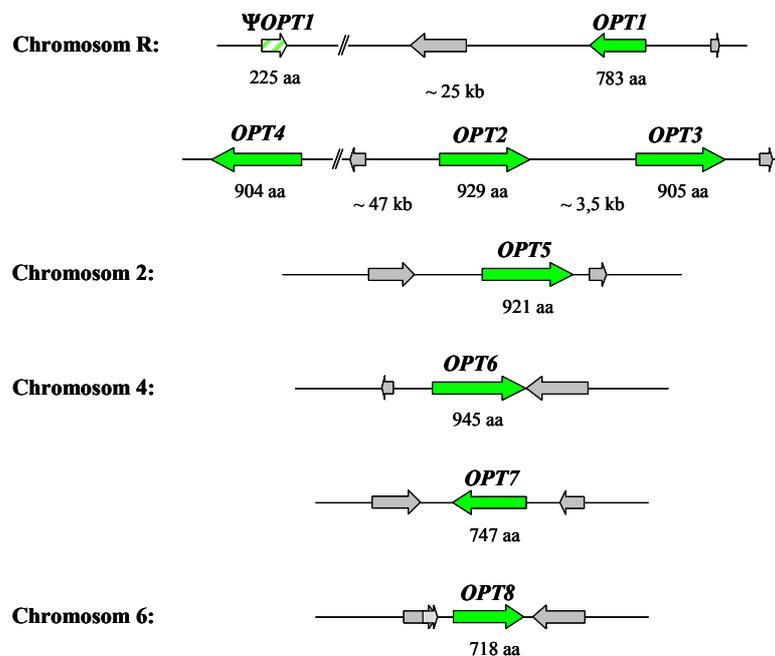


Abbildung 2 Verteilung der *OPT*-Gene im Genom von *C. albicans* mit Angabe der Größe der jeweiligen Proteine. Die grünen Pfeile entsprechen den einzelnen *OPT*-Genen. Die grauen Pfeile repräsentieren benachbarte ORFs. Das ψ *OPT1*-Pseudogen ist schraffiert dargestellt.

4.2 Etablierung eines neuartigen Selektionssystems im *C. albicans*-Wildtyp-Hintergrund

Um zu untersuchen, ob die vorhergesagten Oligopeptidtransporter, die von den *OPT*-Genen codiert werden, für *C. albicans* notwendig sind, um Proteine als alleinige Stickstoffquelle zu verwerten, wurde eine Reihe von knock-out-Mutanten hergestellt, denen bestimmte *OPT*-Gene fehlen. Bis zum Beginn dieser Arbeit wurden zur Konstruktion von knock-out-Mutanten meist Auxotrophie-Marker eingesetzt. Die Konstruktion von Mutanten setzte demnach auxotrophe Ausgangsstämme voraus. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Selektionssystem etabliert, das es mithilfe eines dominanten Selektionsmarkers erlaubt, knock-out-Mutanten im Wildtyp-Hintergrund herzustellen. Zudem ist es mit diesem System möglich, den Selektionsmarker zu recyceln und ihn erneut einzusetzen, um das zweite Allel des gleichen Genes bzw. weitere Gene im gleichen Stamm zu inaktivieren.

4.2.1 Design der SAT1-Flipper-Kassette

Als Selektionsmarker dient in diesem System ein Gen, das Resistenz gegen Nourseothricin verleiht. Nourseothricin gehört zur Gruppe der Streptothricine und wird von *Streptomyces noursei* (Krügel *et al.*, 1988) produziert. Dieses Antibiotikum hemmt die Synthese ribosomaler Proteine und induziert ein Miscoding. In der Natur finden sich mehrere Nourseothricin-Resistenzgene. Das *sat-1*-Gen vom bakteriellen Transposon Tn1825 aus *E. coli* z.B. codiert für eine Streptothricin-Acetyltransferase, die durch Inaktivierung des Antibiotikums Resistenz gegen Nourseothricin verleiht. Von Åshild Vik (Harvard Medical School, Boston, USA) wurde mir freundlicherweise das Plasmid pA83 zur Verfügung gestellt, das den an *C. albicans* angepassten Nourseothricin-Resistenzmarker *caSAT1* enthält. Zur Herstellung von *caSAT1* wurde zunächst das *sat-1*-Gen aus *E. coli* an den ungewöhnlichen Codongebrauch von *C. albicans* angepasst. Dazu wurde das CTG-Codon im *sat-1*-ORF durch CTC ersetzt. CTG wird von *C. albicans* als Serin anstelle von Leucin übersetzt (Santos and Tuite, 1995). Das veränderte *sat-1*-ORF wurde schließlich mit dem Promotor und den ersten 15 Codons des *C. albicans*-*ACT1*-Gens (inklusive Intron) und der Transkriptions-Terminatorsequenz des *C. albicans*-*URA3*-Gens fusioniert.

Um diesen Selektionsmarker nach der genomischen Integration wieder verwenden zu können, wurde *caSAT1* anstelle des *CdMPA^R*-Markers in die *CdMPA^R*-Flipper-Kassette pSFI3 (Bader, 2005) integriert. Dazu wurde mit den Primern SAT1 und SAT2 ein [*Xho*I-*Pst*I]-Fragment aus pA83 amplifiziert, welches dem *caSAT1*-Marker entspricht, und zusammen mit einem

[*EcoRI-SalI*] [*3'caFLP-T_{ACT1}*]-Fragment aus pSFU1 (Morschhäuser et al., 1999) in das *EcoRI/PstI*-gespaltene Plasmid pSFI3 (Abbildung 3) integriert. Das entstandene Plasmid wurde pSFS1 genannt. Als Nächstes wurde der *SAP2-1*-Promotor in pSFS1 durch den induzierbaren Promotor des *MAL2*-Gens ersetzt. Dazu wurde mit den Primern MAL1 und MAL2 ein [*BamHI-SalI*]-Fragment, das den *MAL2*-Promotor (Pos. -555 bis -8) enthält, aus genomischer DNA des Wildtyps SC5314 amplifiziert. Dieses Fragment wurde anstelle des [*BamHI-SalI*]-Fragments, das den *SAP2-1*-Promotor enthält, in pSFS1 kloniert. Das daraus resultierende Plasmid wurde pSFS2 genannt. Da der eingesetzte *MAL2*-Promotor eine basale Aktivität aufwies, wurde das Plasmid pSFS3 konstruiert, das einen verlängerten *MAL2*-Promotor (Pos. -1975 bis -8; P_{MAL2^*}) enthält. Dazu wurde mit den Primern MAL3 und MAL2 ein [*BamHI-SalI*]-Promotorfragment amplifiziert und anstelle des [*BamHI-SalI*]-Fragments mit P_{MAL2} in pSFS2 kloniert. Letztendlich enthält die *SAT1*-Flipper-Kassette neben dem *caSAT1*-Marker das *caFLP*-Rekombinasegen unter der Kontrolle eines induzierbaren Promotors und ist flankiert von den Erkennungssequenzen der FLP-Rekombinase (*FRT*-sites).

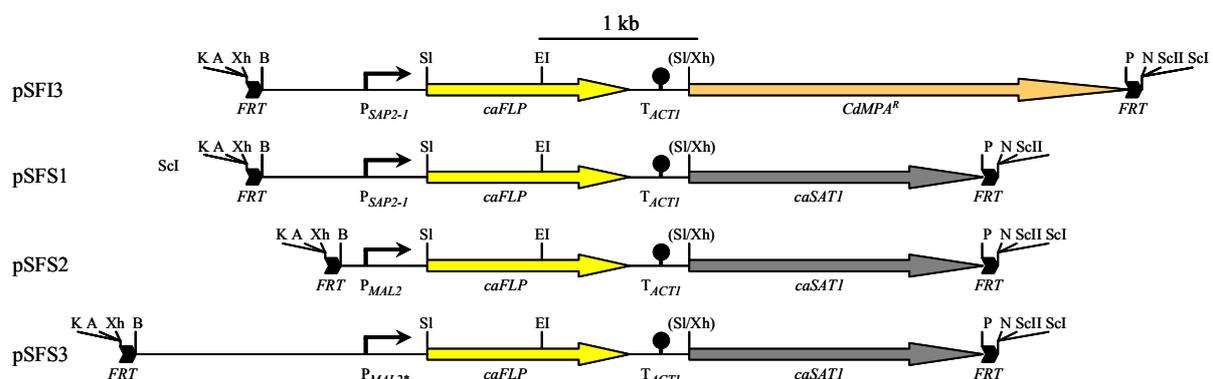


Abbildung 3 Aufbau der *SAT1*-Flipper-Kassette aus Plasmid pSFS2 und Derivate. Das *C. albicans*-adaptierte *FLP*-Gen (*caFLP*) ist durch einen gelben, der Nourseothricin-Resistenzmarker (*caSAT1*) durch einen grauen und der Mycophenolsäure-Resistenzmarker (*CdMPA^R*) durch einen orangenen Pfeil dargestellt. Die Promotoren (P_{SAP2-1} , P_{MAL2} und P_{MAL2^*}) werden durch abgewinkelte Pfeile repräsentiert, während die Transkriptions-Terminations-Sequenz (T_{ACT1}) durch den Kreis veranschaulicht wird. Es sind nur relevante Restriktionsschnittstellen angegeben. Die eingeklammerten Schnittstellen wurden bei der Klonierung zerstört: A, *Apal*; B, *BamHI*; EI, *EcoRI*; K, *KpnI*; N, *NotI*; P, *PstI*; SI, *SalI*; ScI, *SacI*; ScII, *SacII*; Xh, *XhoI*.

4.2.2 Funktionsweise des *SAT1*-Flippers

Auf beiden Seiten der *SAT1*-Flipper-Kassette befinden sich Restriktionsschnittstellen, die jeweils nur einmal in der Kassette vorkommen und dazu verwendet werden können, flankierende Sequenzen des Zielgens zu klonieren. Die daraus resultierende Deletionskassette

erlaubt eine Inaktivierung des Zielgens durch homologe Rekombination (Abbildung 4). *C. albicans* Transformanten, die die Kasette ins Genom integriert haben, können in Gegenwart von Nourseothricin selektioniert werden (Nou^R). Um den Selektionsmarker wieder zu recyceln, ist es ausreichend die Transformanten einige Stunden in YPM-Medium wachsen zu lassen. In diesem Medium wird der *MAL2*-Promotor induziert und es findet eine Expression der FLP-Rekombinase statt. Diese rekombiniert die beiden im *SATI*-Flipper enthaltenen *FRT*-sites und schneidet somit die *SATI*-Flipper-Kasette aus dem Genom. Allerdings besitzt der *MAL2*-Promotor eine basale Aktivität, wodurch ein Markerrecycling auch in YPD-Medium ohne Selektionsdruck möglich ist. Da die resultierenden Stämme wieder sensitiv gegenüber Nourseothricin sind (Nou^S), kann der gleiche Selektionsmarker nun für eine weitere Deletionsrunde verwendet werden, um das zweite noch intakte Allel des gleichen Gens zu inaktivieren. Am Ende liegen homozygote Nullmutanten vor, die sich vom Wildtyp SC5314 nur durch das Fehlen des Zielgens unterscheiden. Die Funktionsweise des *SATI*-Flippers ist in Abbildung 4 schematisch dargestellt.

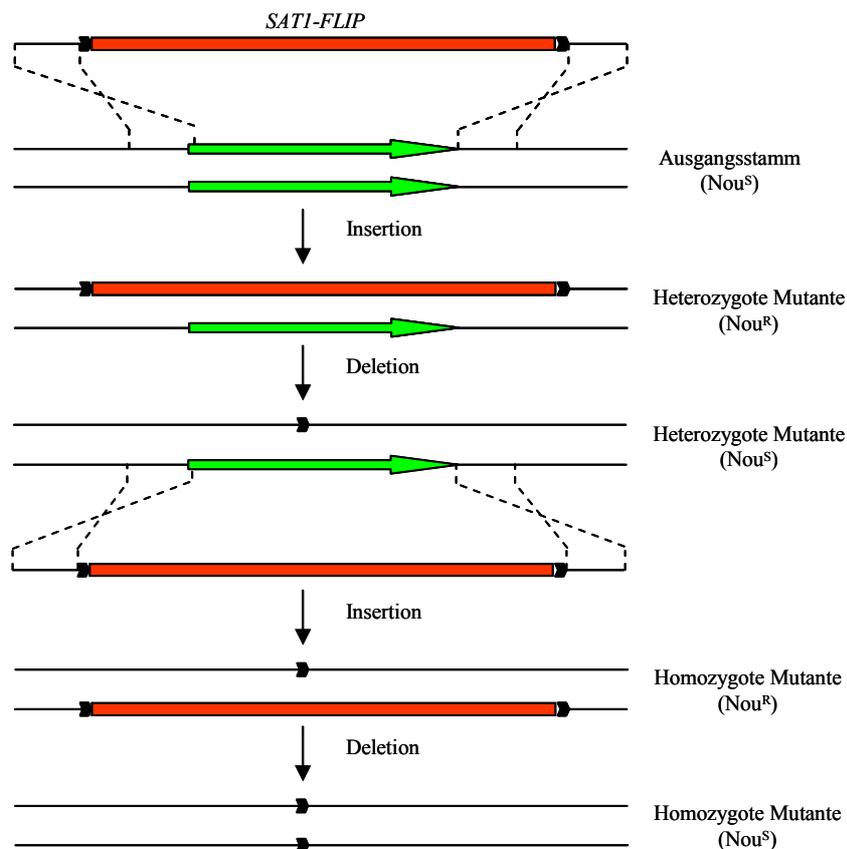


Abbildung 4 Sequenzielle Inaktivierung der Allele eines Zielgens mithilfe des *SATI*-Flippers. Funktionsweise der Mutagenese-Strategie.

4.3 Konstruktion von *opt1* Δ -Nullmutanten im Wildtyp-Hintergrund

4.3.1 Design der Deletionskassette

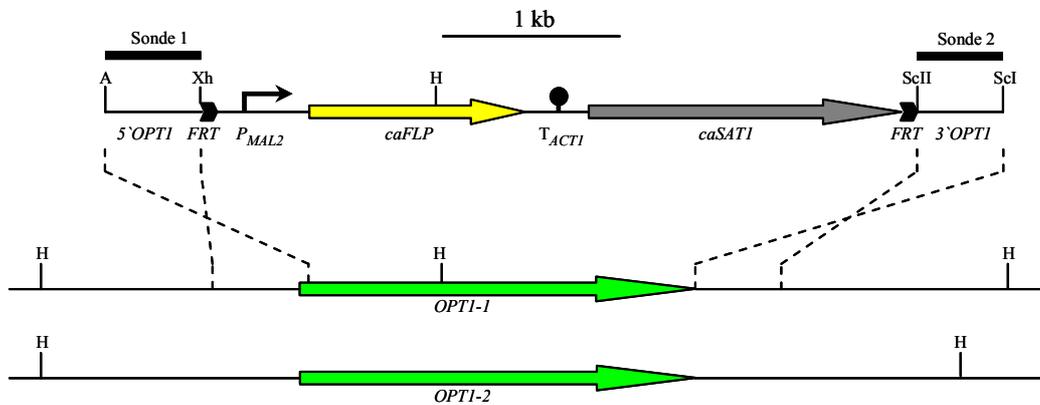


Abbildung 5 Aufbau der Deletionskassette aus Plasmid pOPT1M3. Die codierende Region von *OPT1* wird nach homologer Rekombination durch den *SAT1*-Flipper ersetzt. Die codierende Region von *OPT1* ist durch grüne Pfeile dargestellt, die upstream- und downstream-Regionen durch schwarze Linien. Die Sonden, die bei der Southern-Hybridisierung verwendet wurden, um die korrekte Integration des *SAT1*-Flippers zu überprüfen, sind als dicke Balken eingezeichnet. Es sind nur relevante Schnittstellen dargestellt: A, *ApaI*; H, *HindIII*; ScI, *SacI*; ScII, *SacII*; Xh, *XhoI*.

Abbildung 5 zeigt die Deletionskassette pOPT1M3, mit der über homologe Rekombination eine Deletion des *OPT1*-Gens im Wildtyp SC5314 möglich war. Zur Konstruktion dieses Plasmids wurde der upstream-Bereich des Gens (-523 bis +43) mit den Primern OPT5 und OPT2 aus genomischer DNA des Wildtyps amplifiziert. OPT5 enthält eine *ApaI*-site, OPT2 eine *XhoI*-site. Das *ApaI/XhoI*-gespaltene PCR-Produkt wurde zusammen mit dem *SacII/SacI*-gespaltenen PCR-Produkt, das der downstream-Region des Gens (+2348 bis +2868) entspricht und mit den Primern OPT6 (*SacII*-site) und OPT7 (*SacI*-site) amplifiziert wurde, an beide Seiten des *SAT1*-Flippers (pSFS2) kloniert. Mit dem Insert ([*ApaI-SacI*]-Fragment) des entstandenen Plasmids pOPT1M3 war es möglich, im Wildtyp SC5314 das *OPT1*-Gen im Bereich von +44 bis +2347 über homologe Rekombination zu deletieren. Alle Nukleotidpositionen beziehen sich auf das Startcodon des *OPT1-1*-Allels, das kein Intron enthält.

4.3.2 Transformation des Wildtyps SC5314

Um das *OPT1*-Gen zu deletieren, wurde der Wildtyp-Stamm SC5314 mit dem [*ApaI-SacI*]-Fragment aus dem Plasmid pOPT1M3 transformiert. Nourseothricin-resistente Transformanten, bei denen die Deletionskassette über homologe Rekombination ins Genom integriert wurde, konnten in Gegenwart von Nourseothricin selektioniert werden. Dazu wurden die Transformanten nach der Elektroporation 4 h in YPD-Medium kultiviert und anschließend auf Platten ausplattiert, die 200 µg/ml Nourseothricin enthielten (Abbildung 6A). Am nächsten Tag konnten bereits Nourseothricin-resistente Transformanten gepickt und ausgestrichen werden. Nach DNA-Isolierung wurden die Stämme über Southern-Hybridisierung analysiert. Mit Hilfe des vorhandenen *HindIII*-Restriktionspolymorphismus und unter Einsatz der in Abbildung 5 angegebenen Sonden konnten beide *OPT1*-Allele unterschieden werden.

Zwei verschiedene Transformanten, die die *SATI*-Flipper-Kassette in je einem anderen Allel des *OPT1*-Gens integriert hatten (OPT1M1A/B), wurden zwecks Markerdeletion für sechs Stunden in YPM-Medium inkubiert. In diesem Medium findet eine Induktion des *MAL2*-Promotors statt, woraufhin die FLP-Rekombinase exprimiert wird, die dann die beiden *FRT*-sites rekombiniert. Dadurch wird die *SATI*-Flipper-Kassette mit dem Resistenzmarker aus dem Genom geschnitten. Die resultierenden Stämme sind wieder Nourseothricin-sensitiv. Um nun zwischen Nourseothricin-resistenten und Nourseothricin-sensitiven Stämmen unterscheiden zu können, wurde ein Screening-System etabliert. Dazu wurden die Zellen nach sechsständiger Inkubation in YPM-Medium in geeigneter Verdünnung auf YPD-Platten ausplattiert, die 20 bzw. 25 µg/ml Nourseothricin (je nach Aktivität und Charge des Nourseothricins) enthielten (Abbildung 6B). Auf diesen Platten wuchsen Nourseothricin-resistente Zellen normal, während Nourseothricin-sensitive Zellen kleinere Kolonien bildeten. Die kleineren Kolonien wurden gepickt und zusätzlich auf Platten mit hoher Konzentration an Nourseothricin ausgestrichen, um sicher zu stellen, dass die Zellen sensitiv gegenüber Nourseothricin waren. Nach DNA-Isolierung und Überprüfung über Southern-Hybridisierung konnten die erhaltenen Stämme (heterozygote Mutanten OPT1M2A/B) für die zweite Runde der Insertion/Deletion eingesetzt werden, um das zweite noch verbleibende Allel von *OPT1* zu inaktivieren. Abbildung 6 zeigt Transformations- (A) und Screeningplatten (B) mit 200 µg/ml bzw. 25 µg/ml Nourseothricin. Außerdem sind Platten mit 100 µg/ml Nourseothricin abgebildet, auf denen Nourseothricin-resistente (Nou^R) und Nourseothricin-sensitive (Nou^S) Stämme in Gegenwart von Nourseothricin kultiviert wurden (C).

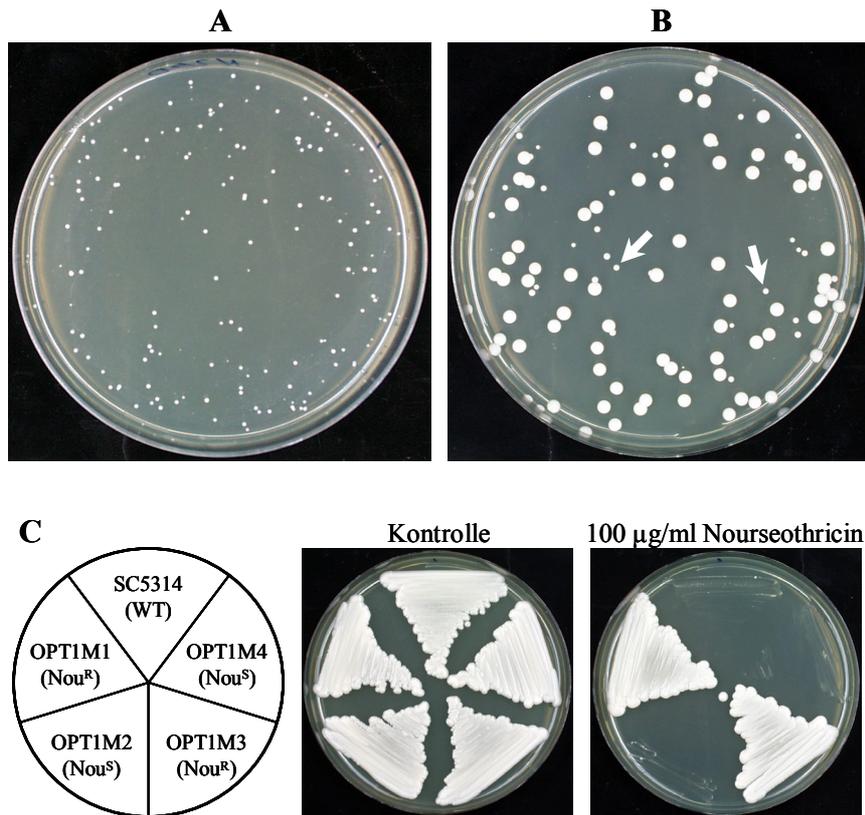


Abbildung 6 Selektion von Nourseothricin-resistenten (Nou^R) *C. albicans* Transformanten und Screening auf Nourseothricin-sensitive (Nou^S) Derivate, in denen der *SATI*-Flipper durch FLP-vermittelte Rekombination herausgeschnitten wurde. (A) *C. albicans* Wildtyp SC5314 wurde mit dem Insert von pOPT1M3 transformiert. Das Insert enthält die *SATI*-Flipper-Kassette mit flankierenden Regionen von *OPT1*. 100 μl elektroporierter Zellen wurden auf einer YPD-Agarplatte, die 200 $\mu\text{g/ml}$ Nourseothricin enthielt, ausplattiert und für einen Tag bei 30°C inkubiert. (B) Große Nourseothricin-resistente und kleine Nourseothricin-sensitive Kolonien (Pfeile) auf YPD-Platten, die 25 $\mu\text{g/ml}$ Nourseothricin enthielten. Die Platte wurde zwei Tage bei 30°C inkubiert. (C) Wachstum des Ausgangsstamms SC5314 (WT) und der heterozygoten und homozygoten *opt1* Δ -Mutanten mit (Nou^R) oder ohne *SATI*-Flipper (Nou^S) auf YPD-Platten ohne (Kontrolle) und mit 100 $\mu\text{g/ml}$ Nourseothricin.

4.3.3 Reintegration intakter Kopien des *OPT1*-Gens in die *opt1* Δ -Mutanten

Um intakte Kopien der beiden *OPT1*-Allele an den entsprechenden Originallokus der *opt1* Δ -Nullmutanten zu reintegrieren, wurde mit den Primern OPT5 und OPT8 das komplette Leseraster des Gens sowie die upstream (0.52 kb) und downstream (0.44 kb) liegenden Bereiche aus genomischer DNA des Wildtyps SC5314 amplifiziert. OPT5 enthält eine *ApaI*-site, OPT8 eine *SalI*-site. Das *ApaI/SalI*-gespaltene PCR-Produkt enthält den Bereich von -523 bis +2795 in Bezug auf das Startcodon von *OPT1-1*. Die Sequenzierung mehrerer unabhängiger PCR-Produkte zeigte, dass sich beide *OPT1*-Allele im Wildtyp SC5314 deutlich unterscheiden. Bemerkenswert ist, dass *OPT1-2* ein Intron mit 58 bp zwischen den Codons 542 und 543 enthält, welches im *OPT1-1*-Allel nicht gefunden werden konnte. Das

erhaltene [*ApaI-SalI*]-Fragment wurde anstelle des [*ApaI-XhoI*]-Fragments (5'-*OPT1*) in pOPT1M3 integriert. Die dadurch entstandenen Plasmide wurden pOPT1K1A (*OPT1-1*) und pOPT1K1B (*OPT1-2*) genannt (Abbildung 7). Die *opt1Δ*-Nullmutanten OPT1M4A/B wurden mit dem [*ApaI-SacI*]-Fragment aus pOPT1K1A/B transformiert. Bei den beiden erhaltenen Transformanten OPT1MK1A/B wurde anschließend durch FLP-vermittelte Deletion der Marker entfernt, was zu den beiden Komplementanten OPT1MK2A/B führte. Alle Schritte wurden mittels Southern-Hybridisierung kontrolliert (Abbildung 8).

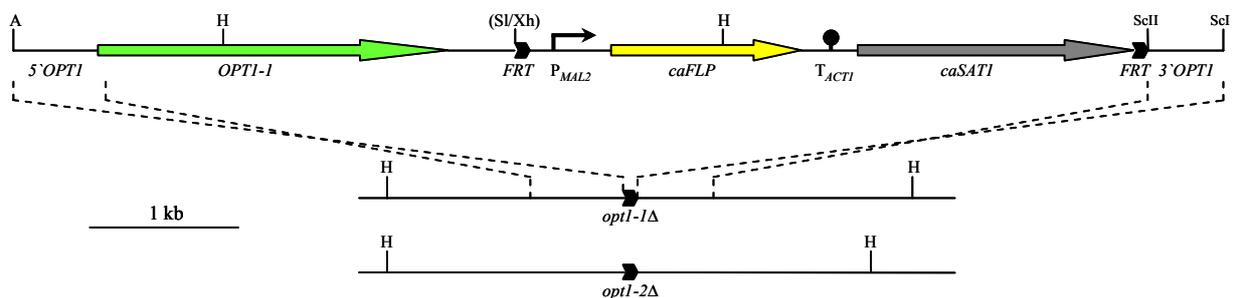


Abbildung 7 Aufbau der Kasette aus Plasmid pOPT1K1A, die für die Reintegration einer intakten Kopie des *OPT1-1*-Allels in den inaktivierten *opt1-1Δ*-Lokus verwendet wurde. Die Reintegration von *OPT1-2* in den *opt1-2Δ*-Lokus erfolgte analog mit Plasmid pOPT1K1B. Es sind nur relevante Schnittstellen eingezeichnet: A, *ApaI*; H, *HindIII*; ScI, *SacI*; ScII, *SacII*; Sl, *SalI*; Xh, *XhoI*.

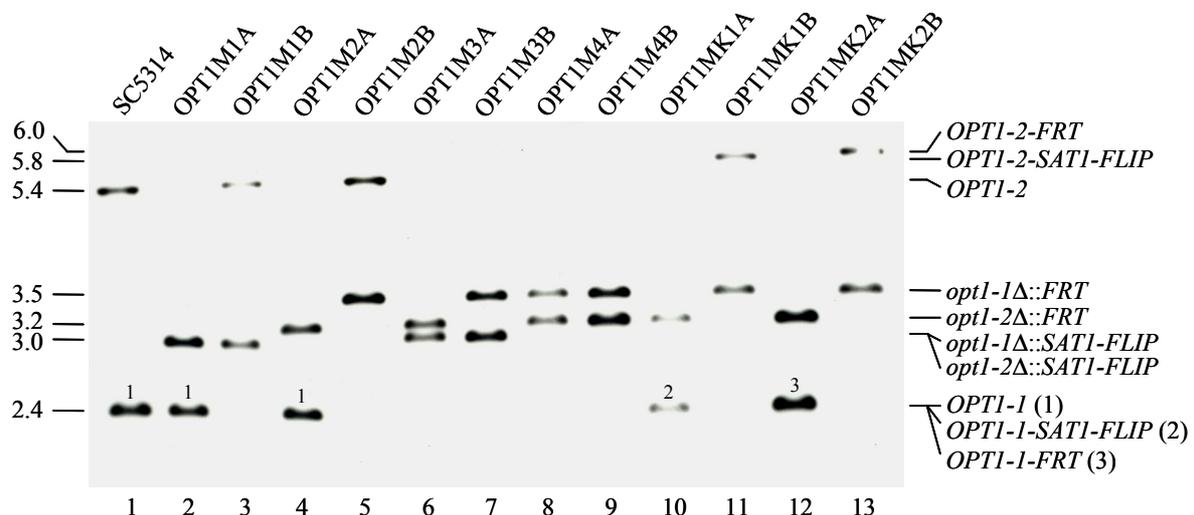


Abbildung 8 Southern-Hybridisierung *HindIII*-verdauter DNA des Ausgangsstamms SC5314 und der Mutanten. Es wurde eine 5'-*OPT1*-spezifische Sonde (Sonde 1) verwendet. Die Größen der hybridisierten Fragmente (in kb) sind auf der linken Seite des Blots aufgetragen, rechts sind die genotypischen Zuordnungen zu sehen. Die Fragmente, die den *OPT1-1*, *OPT1-1-SAT1-FLIP* und den *OPT1-1-FRT* Allelen entsprechen, sind gleich groß und deshalb mit 1-3 durchnummeriert.

Abbildung 8 zeigt eine Southern-Hybridisierung *Hind*III-gespaltener DNA aller Stämme mit der 5'-*OPT1*-Sonde ([*Apa*I-*Xho*I]-Fragment aus pOPT1M3). Spur 1 zeigt den Wildtyp SC5314. Durch die *Hind*III-Restriktionspolymorphismen finden sich zwei Banden bei 2.4 kb (Allel 1) bzw. 5.4 kb (Allel 2). Nach der Integration der *SAT1*-Flipper-Kassette ([*Apa*I-*Sac*I]-Fragment aus pOPT1M3) verschwindet je eine wildtypische Bande und eine neue Bande bei etwa 3.0 kb erscheint (OPT1M1A/B, Spuren 2 + 3). Von insgesamt 16 analysierten Transformanten zeigten 15 eine korrekte Integration der Deletionskassette ins Genom. In vier Fällen wurde *OPT1-1*, in elf Fällen wurde *OPT1-2* inaktiviert. Die leichte Tendenz zur Integration ins *OPT1-2*-Allel kann mit der Tatsache erklärt werden, dass die klonierten flankierenden Sequenzen in der Deletionskassette aus diesem Allel stammten. Nach FLP-vermittelter Deletion der *SAT1*-Flipper-Kassette verschwindet die Bande bei 3.0 kb wieder und eine neue Bande erscheint bei etwa 3.2 kb (Allel 2 zuerst inaktiviert) bzw. 3.5 kb (Allel 1 zuerst inaktiviert). Bei diesen Stämmen handelt es sich um heterozygote Mutanten, bei denen jeweils ein anderes Allel des *OPT1*-Gens fehlt (OPT1M2A/B, Spuren 4 + 5). Nach der zweiten Integrationsrunde verschwindet jeweils die verbliebene wildtypische Bande und eine neue Bande bei 3.0 kb erscheint (OPT1M3A/B, Spuren 6 + 7). Nach erneuter FLP-vermittelter Deletion des Markers verschwindet die Bande bei 3.0 kb wieder und analog zur ersten Runde erscheint bei etwa 3.2 kb (Allel 1 zuerst inaktiviert) bzw. 3.5 kb (Allel 2 zuerst inaktiviert) eine neue Bande. Bei den nun vorliegenden Stämmen handelt es sich um homozygote *opt1Δ*-Nullmutanten (OPT1M4A/B; Spuren 8 + 9). Nach der Reintegration von *OPT1-1* in die homozygote *opt1Δ*-Mutante OPT1M4A verschwindet die Bande bei 3.5 kb und die wildtypische Bande bei 2.4 kb erscheint wieder (OPT1MK1A, Spur 10). Nach der Markerdeletion liegt die Bande unverändert bei 2.4 kb vor, da die Markerdeletion mit dieser Sonde nicht erkennbar ist (OPT1MK2A, Spur 12). Eine Überprüfung mit der 3'-*OPT1*-Sonde ([*Sac*II-*Sac*I]-Fragment aus pOPT1M3) bestätigte die korrekte Deletion des Markers. Nach der Reintegration von *OPT1-2* in die homozygote *opt1Δ*-Mutante OPT1M4B verschwindet die Bande bei 3.2 kb und eine neue Bande erscheint bei etwa 5.8 kb (OPT1MK1B, Spur 11), welche nach der FLP-vermittelten Markerdeletion auf 6.0 kb anwächst (OPT1MK2B, Spur 13). Bei den beiden letzten Stämmen handelt es sich um die Komplementanten, bei denen jeweils eines der beiden *OPT1*-Allele an seinen Originalloкус integriert wurde.

4.3.4 Phänotypische Analysen der *opt1*Δ-Nullmutanten

Heterologe Expressionsstudien in *S. cerevisiae* zeigten, dass Opt1p von *C. albicans* in der Lage ist Peptide mit einer Länge von vier oder fünf Aminosäuren zu transportieren. Zudem wurden *S. cerevisiae*-Mutanten, die nicht fähig sind Di- und Tripeptide zu transportieren, durch die Expression von *CaOPT1* sensitiv gegenüber dem Peptid KLEth, das das toxische Methionin-Analogon Ethionin enthält (Lubkowitz *et al.*, 1997). Aus diesem Grund wurde die Sensitivität der *opt1*Δ-Nullmutanten auf KLEth getestet. Dazu wurden 100 µl einer YPD-Übernachtskultur aller Stämme auf SD-Prolin Agar ausplattiert und ein mit KLEth (95 mM) getränkter Filter auf dem Agar platziert. Nach 18 h bei 30°C wurde das Wachstum der Stämme in der Nähe des Filters kontrolliert (Abbildung 9).

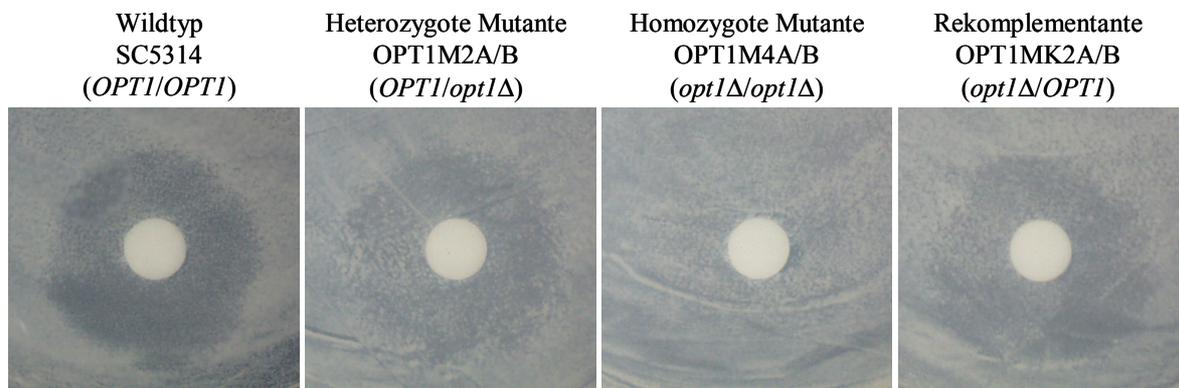


Abbildung 9 Die Sensitivität des *C. albicans*-Wildtyps SC5314, der heterozygoten (OPT1M2A/B) und homozygoten (OPT1M4A/B) Mutanten und der komplementierten Stämme (OPT1MK2A/B) auf das toxische Peptid KLEth. Die Platten wurden 18 h bei 30°C inkubiert und anschließend fotografiert. Identische Resultate wurden mit unabhängig konstruierten Mutanten erzielt.

In Abbildung 9 ist deutlich zu sehen, dass der Wildtyp SC5314 sensitiv gegenüber dem toxischen Peptid KLEth war. Dies ist am Bereich um den Filter zu erkennen, in dem aufgrund des toxischen Peptides kein Wachstum möglich war. Ein Bereich von ähnlicher Größe war auch im Falle der beiden heterozygoten Mutanten (OPT1M2A/B) zu erkennen. Allerdings konnte in diesem Bereich ein erhöhtes Wachstum festgestellt werden, was auf eine verzögerte Aufnahme des Peptides hinweist. Wenn beide Allele von *OPT1* deletiert sind (OPT1M4A/B), war ein uneingeschränktes Wachstum in Gegenwart des toxischen Peptides möglich. Dies deutet darauf hin, dass Opt1p unter den getesteten Bedingungen den größten Anteil am Transport oder sogar den gesamten Transport dieses Peptides in die Zelle übernimmt. Die Reintegration von *OPT1-1* oder *OPT1-2* (OPT1MK2A/B) resultierte in einer

Wachstumsdichte ähnlich der der heterozygoten Mutanten. Ein Gen-Dosis-Effekt ist somit deutlich erkennbar.

Weiterhin wurde die Fähigkeit der *opt1Δ*-Nullmutanten getestet, auf BSA als alleiniger Stickstoffquelle zu wachsen. Hierzu wurden Wachstumskurven der Mutanten in YCB-BSA erstellt. Abbildung 10A zeigt deutlich, dass sich das Wachstumsverhalten der Mutanten nicht vom Wildtyp SC5314 unterschied.

Zusätzlich wurden die Überstände von YCB-BSA Übernachtskulturen des Wildstammes SC5314, der *opt1Δ*-Mutanten (OPT1M4A/B) sowie einer *sap2Δ*-Mutante (S2FI6A) auf ein 12%-SDS-Gel aufgetragen, um zu überprüfen, ob das BSA im Medium proteolytisch abgebaut werden konnte. Wie in Abbildung 10B deutlich zu erkennen ist, konnte das BSA vom Wildtyp wie auch von den *opt1Δ*-Mutanten abgebaut werden, was darauf hinweist, dass in den Mutanten Sap2p normal sekretiert wurde. Die *sap2Δ*-Mutante hingegen ist nicht in der Lage Sap2p zu sekretieren und konnte folglich das BSA im Medium nicht abbauen. Deswegen war auch kein Wachstum dieser Mutante in YCB-BSA-Medium möglich. Auf dem Gel in Abbildung 10B ist in der Spur der *sap2Δ*-Mutante auf Höhe von Sap2p eine Bande zu erkennen. Diese Bande ist lediglich auf unspezifische Abbauprodukte von BSA zurückzuführen und stellt nicht Sap2p dar.

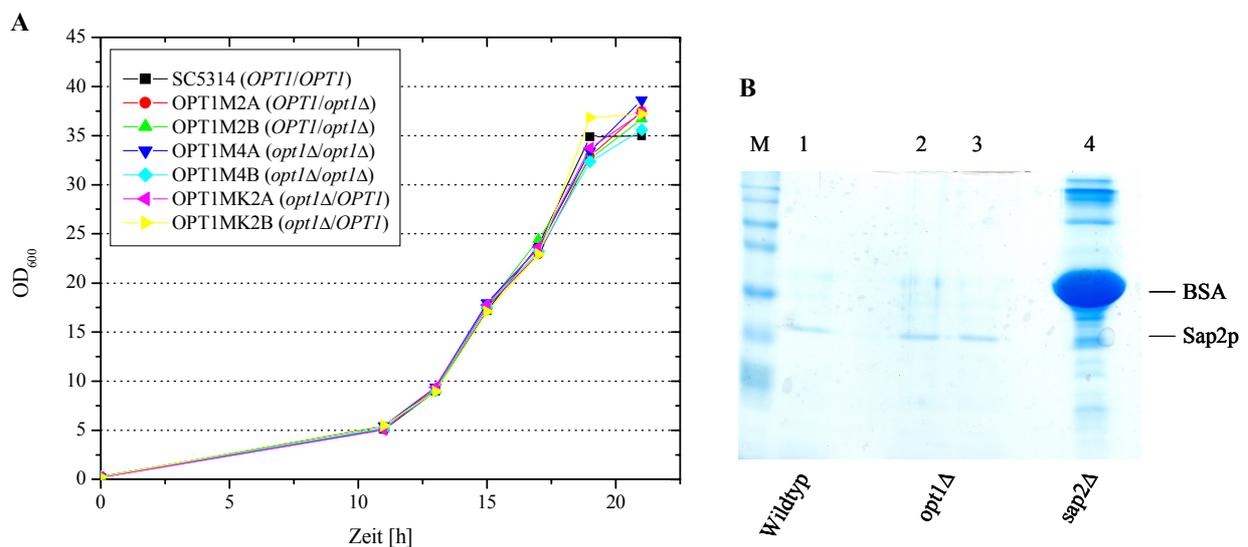


Abbildung 10 (A) Wachstumskurven des *C. albicans*-Wildtyps SC5314, der heterozygoten (OPT1M2A/B) und homozygoten (OPT1M4A/B) Mutanten und der komplementierten Stämme (OPT1MK2A/B) auf BSA als alleiniger Stickstoffquelle. (B) Proteingel: Aufgetragen wurden jeweils 10 μ l Überstand der Übernachtskulturen in YCB-BSA von SC5314 (Wildtyp; Spur 1), der *opt1Δ*-Mutanten (OPT1M4A/B; Spuren 2+3) und einer *sap2Δ*-Mutante (S2FI6A; Spur 4).

4.4 Konstruktion von weiteren Einzelmutanten im Wildtyp-Hintergrund (*opt23Δ-opt8Δ*-Mutanten)

Nachdem die *opt1Δ*-Nullmutanten keinen Wachstumsdefekt in YCB-BSA aufwiesen (Abbildung 10A) und um der Frage nachzugehen, welchen Anteil die übrigen *OPT*-Gene am Wachstum von *C. albicans* auf BSA als alleiniger Stickstoffquelle haben, wurden diese ebenfalls inaktiviert. Dazu wurden Stämme konstruiert, in denen jeweils andere *OPT*-Gene (*opt23Δ-opt8Δ*-Mutanten) deletiert wurden. Dabei wurden *OPT2* und *OPT3* gemeinsam deletiert, da sie sich in unmittelbarer Nachbarschaft zueinander befinden (Abbildung 2).

4.4.1 Konstruktion von Plasmiden zur Inaktivierung der *OPT2*- und *OPT3*-Gene im Wildtyp SC5314

Wie bereits beschrieben wurde, zeigen die tandemartig angeordneten *OPT2*- und *OPT3*-Gene eine sehr hohe Ähnlichkeit zueinander, und da sie sich in unmittelbarer Nachbarschaft zueinander befinden, wurden beide Gene gleichzeitig deletiert. Die Region zwischen *OPT2* und *OPT3* wurde zusammen mit den Genen deletiert. Diese Region enthält zwei kurze überlappende hypothetische ORFs, die aber nicht als Gene betrachtet wurden, da sie keine signifikanten Ähnlichkeiten mit anderen Proteinen in der Datenbank aufweisen. Eines dieser hypothetischen ORFs kommt zudem nur auf einem der beiden homologen Chromosomen vor. Zur Konstruktion der Deletionskassette, mit der die Gene *OPT2* und *OPT3* inaktiviert werden konnten, wurden die flankierenden Sequenzen in pOPT1M3 durch die *OPT2*-upstream- und *OPT3*-downstream-Regionen ersetzt. Zunächst wurde mit den Primern OPT14 und OPT15 die upstream-Region des *OPT2*-Gens amplifiziert. Durch die beiden Primer wurden eine *ApaI*-site und eine *XhoI*-site eingeführt. Das *ApaI/XhoI*-gespaltene PCR-Produkt enthält die *OPT2*-upstream-Region von -314 bis -7 in Bezug auf das Startcodon von *OPT2* und konnte anstelle des 5' *OPT1*-Fragments in das *ApaI/XhoI*-gespaltene pOPT1M3 kloniert werden. Im nun vorliegenden Plasmid pOPT23M1 wurde das [*SacII-SacI*]-Fragment (3' *OPT1*) durch die downstream-Region des *OPT3*-Gens ersetzt. Diese wurde mit den Primern OPT16 und OPT17 amplifiziert. OPT16 enthält eine *SacII*-site, OPT17 eine *SacI*-site. Das *SacII/SacI*-gespaltene PCR-Produkt enthält den *OPT3*-downstream-Bereich von +2701 bis +3121 in Bezug auf das Startcodon von *OPT3* und wurde in das *SacII/SacI*-gespaltene pOPT23M1 anstelle von 3' *OPT1* kloniert. Das [*ApaI-SacI*]-Fragment des nun vorliegenden Plasmids pOPT23M2 wurde zur Deletion der Gene *OPT2* und *OPT3* im Wildtyp SC5314 verwendet (Abbildung 11).

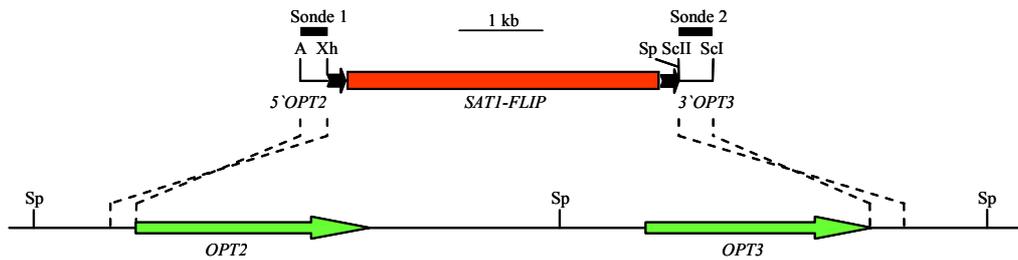


Abbildung 11 Aufbau der Deletionskassette aus Plasmid pOPT23M2, die dazu verwendet wurde, die Gene *OPT2* und *OPT3* zu deletieren. Unterhalb der Deletionskassette ist die Struktur des *OPT2-OPT3*-Lokus im Wildtyp SC5314 dargestellt. Die codierenden Regionen von *OPT2* und *OPT3* sind mit grünen Pfeilen dargestellt. Die upstream- und downstream-Regionen und der Bereich zwischen *OPT2* und *OPT3* sind durch schwarzen Linien gekennzeichnet. Die Sonden, die bei der Southern-Hybridisierung verwendet wurden, um die korrekte Integration des *SATI*-Flippers zu überprüfen, sind als dicke Balken dargestellt. Es sind nur relevante Schnittstellen eingezeichnet: A, *Apa*I; ScI, *Sac*I; ScII, *Sac*II; Sp, *Spe*I, Xh, *Xho*I.

4.4.2 Konstruktion von Plasmiden zur Inaktivierung der *OPT4-OPT8*-Gene im Wildtyp SC5314

Um die Gene *OPT4-OPT8* im Wildtyp SC5314 zu deletieren, wurden ähnliche Konstrukte wie pOPT23M2 angefertigt. Bei diesen Plasmiden ist jeweils die *SATI*-Flipper-Kassette von upstream- und downstream-Regionen der jeweiligen *OPT*-Gene flankiert. Tabelle 6 gibt einen Überblick über die eingesetzten Primer, die eingeführten Schnittstellen und die Konstruktion der Deletionskassetten, die dazu verwendet wurden *OPT4-OPT8* im Wildtyp SC5314 zu deletieren.

Primer	Schnittstellen	Konstruktion	Plasmid
OPT41	<i>SacI</i> -site bei -416	<i>SacI/SacII</i> -gespaltenes PCR-Produkt in <i>SacI/SacII</i> -gespaltenes Plasmid pSFS3	pOPT4M1
OPT42	<i>SacII</i> -site bei +27		
OPT43	<i>XhoI</i> -site bei +2663	<i>XhoI/ApaI</i> -gespaltenes PCR-Produkt in <i>XhoI/ApaI</i> -gespaltenes Plasmid pOPT4M1	pOPT4M2
OPT44	<i>ApaI</i> -site bei +3091		
OPT52	<i>SacI</i> -site bei -431	<i>SacI/SacII</i> -gespaltenes PCR-Produkt in <i>SacI/SacII</i> -gespaltenes Plasmid pOPT23M2 (anstelle 3' <i>OPT3</i>)	pOPT5M1
OPT53	<i>SacII</i> -site bei +19		
OPT54	<i>XhoI</i> -site bei +2711	<i>XhoI/ApaI</i> -gespaltenes PCR-Produkt in <i>XhoI/ApaI</i> -gespaltenes Plasmid pOPT5M1 (anstelle 5' <i>OPT2</i>)	pOPT5M2
OPT55	<i>ApaI</i> -site bei +3155		
OPT69	<i>SacI</i> -site bei -298	<i>SacI/SacII</i> -gespaltenes PCR-Produkt in <i>SacI/SacII</i> -gespaltenes Plasmid pOPT23M2 (anstelle 3' <i>OPT3</i>)	pOPT6M1
OPT600	<i>SacII</i> -site bei +12		
OPT601	<i>XhoI</i> -site bei +2795	<i>XhoI/ApaI</i> -gespaltenes PCR-Produkt in <i>XhoI/ApaI</i> -gespaltenes Plasmid pOPT6M1 (anstelle 5' <i>OPT2</i>)	pOPT6M2
OPT602	<i>ApaI</i> -site bei +3199		
OPT76	<i>SacI</i> -site bei -317	<i>SacI/SacII</i> -gespaltenes PCR-Produkt in <i>SacI/SacII</i> -gespaltenes Plasmid pOPT23M2 (anstelle 3' <i>OPT3</i>)	pOPT7M1
OPT77	<i>SacII</i> -site bei +8		
OPT78	<i>XhoI</i> -site bei +2211	<i>XhoI/ApaI</i> -gespaltenes PCR-Produkt in <i>XhoI/ApaI</i> -gespaltenes Plasmid pOPT7M1 (anstelle 5' <i>OPT2</i>)	pOPT7M2
OPT79	<i>ApaI</i> -site bei +2517		
OPT86	<i>SacI</i> -site bei -380	<i>SacI/SacII</i> -gespaltenes PCR-Produkt in <i>SacI/SacII</i> -gespaltenes Plasmid pOPT23M2 (anstelle 3' <i>OPT3</i>)	pOPT8M1
OPT87	<i>SacII</i> -site bei +30		
OPT88	<i>XhoI</i> -site bei +2132	<i>XhoI/ApaI</i> -gespaltenes PCR-Produkt in <i>XhoI/ApaI</i> -gespaltenes Plasmid pOPT8M1 (anstelle 5' <i>OPT2</i>)	pOPT8M2
OPT89	<i>ApaI</i> -site bei +2425		

Tabelle 6 Primer, eingeführte Schnittstellen und Konstruktionsweisen der Deletionskassetten und deren Vorstufen, um die Gene *OPT4-OPT8* im Wildtyp SC5314 zu deletieren. Die Angaben beziehen sich immer auf das Startcodon des jeweiligen Gens.

Zu beachten ist, dass bei pOPT4M2 die verlängerte Version des *MAL2*-Promotors (P_{MAL2^*} , ca. 2 kb) zum Einsatz kam (Abbildung 12). Da das verlängerte Promotorfragment allerdings keine entscheidenden Vorteile brachte, wurde für die Plasmide pOPT5M2-pOPT8M2 wieder auf die ursprüngliche Version des *SAT1*-Flippers zurückgegriffen. Ein weiterer Unterschied der Plasmide pOPT4M2-pOPT8M2 zu pOPT1M3/pOPT23M2 ist die umgekehrte Orientierung des *SAT1*-Flippers innerhalb der Plasmide (Abbildung 12). Dies wurde ursprünglich konstruiert, um eine uninduzierte Deletion der *SAT1*-Flipper-Kassette aufgrund einer Expression des *caFLP*-Gens durch den Promotor des Zielgens zu verhindern. Allerdings war die Orientierung der *SAT1*-Flipper-Kassette in Bezug auf die Stabilität der Integration im Genom nicht von Bedeutung, da der *MAL2*-Promotor eine basale Aktivität aufwies und nicht vollständig reprimiert war. In allen Fällen wurde das [*ApaI*-*SacI*]-Fragment zur Transformation von SC5314 verwendet, um das entsprechende Zielgen über homologe Rekombination zu inaktivieren. Transformation, Selektion, Markerdeletion und Screening verliefen in allen Fällen analog zur Herstellung der *opt1Δ*-Nullmutanten. Die Mutanten wurden nach jeder Transformations- und Deletionsrunde durch Southern-Hybridisierung mit Sonden des upstream- und downstream-Bereiches des jeweiligen Gens überprüft. Tabelle 7 gibt einen Überblick über alle Deletionskassetten mit Angabe der Bezeichnung der Mutanten und des Genotyps. Abbildung 12 zeigt alle Deletionskassetten grafisch.

Deletionskassette	Mutanten	Genotyp
pOPT1M3	OPT1M4A/B	<i>opt1Δ/opt1Δ</i>
pOPT23M2	OPT23M4A/B	<i>opt23Δ/opt23Δ</i>
pOPT4M2	OPT4M4A/B	<i>opt4Δ/opt4Δ</i>
pOPT5M2	OPT5M4A/B	<i>opt5Δ/opt5Δ</i>
pOPT6M2	OPT6M4A/B	<i>opt6Δ/opt6Δ</i>
pOPT7M2	OPT7M4A/B	<i>opt7Δ/opt7Δ</i>
pOPT8M2	OPT8M4A/B	<i>opt8Δ/opt8Δ</i>

Tabelle 7 Überblick über alle Deletionskassetten, die dazu verwendet wurden *OPT1-OPT8* im Wildtyp SC5314 zu deletieren, mit Angabe der Bezeichnungen der Mutanten und des Genotyps.

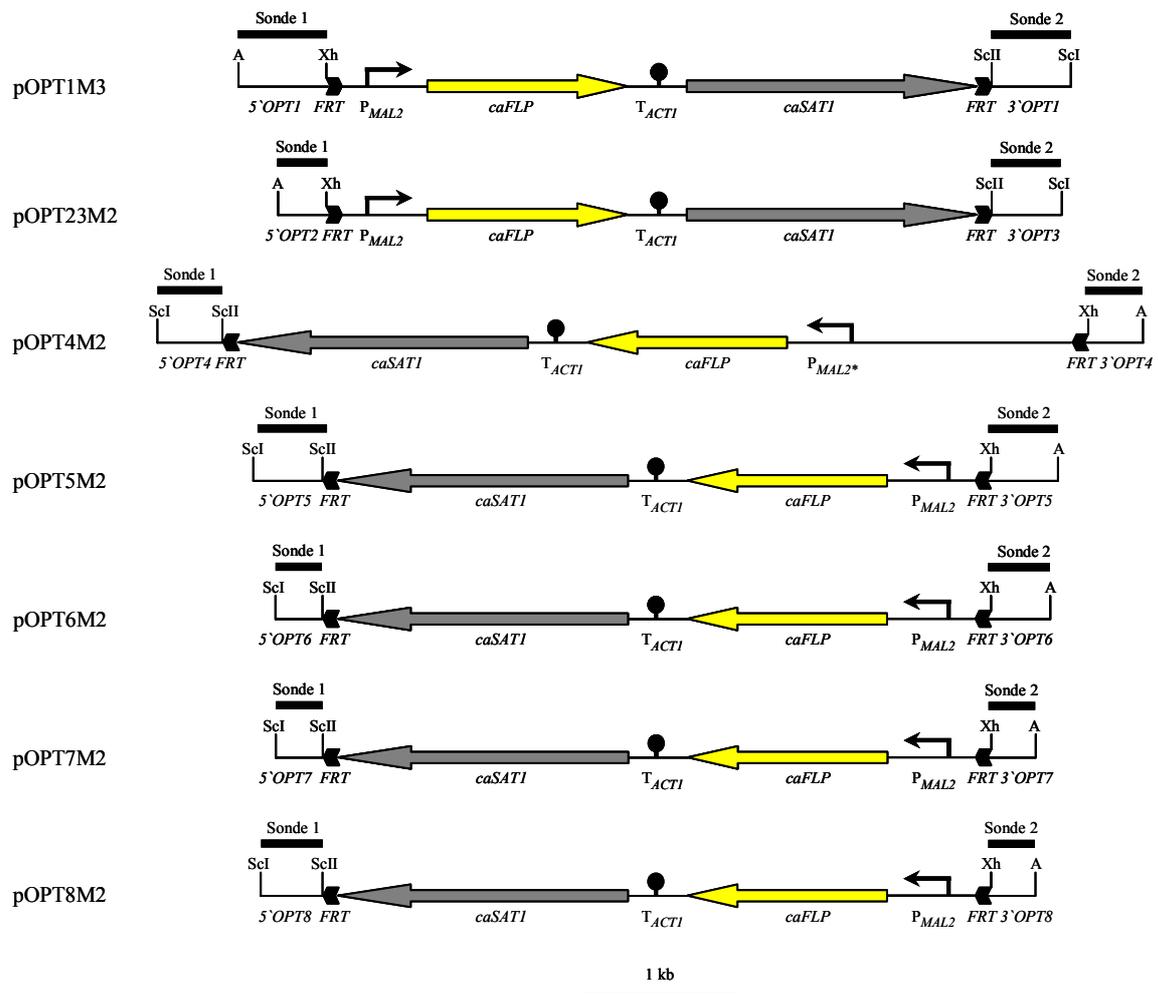


Abbildung 12 Übersicht aller Deletionskassetten, die verwendet wurden, um die Gene *OPT1*-*OPT8* im Wildtyp SC5341 zu deletieren. Die upstream- und downstream-Regionen der einzelnen *OPT*-Gene sind durch schwarze Linien gekennzeichnet. Die Sonden, die zur Überprüfung der Transformanten mittels Southern-Hybridisierung verwendet wurden, sind als dicke Balken dargestellt. Es sind nur relevante Schnittstellen eingezeichnet: A, *Apa*I; ScI, *Sac*I; ScII, *Sac*II; Xh, *Xho*I.

4.4.3 Phänotypische Analyse der *opt23Δ-opt8Δ*-Nullmutanten

Das Wachstumsverhalten aller Einzelmutanten wurde auf BSA als alleiniger Stickstoffquelle untersucht. Dazu wurden YPD-Übernachtskulturen der Stämme 1:100 in YCB-BSA verdünnt und 18 h bei 30°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die optische Dichte aller Kulturen bei 600 nm gemessen. Wie in Abbildung 13 deutlich zu erkennen ist, erreichten fast alle getesteten Einzelmutanten ähnliche OD₆₀₀-Werte nach 18 h Wachstum wie der Wildtyp. Eine Ausnahme stellen die *opt23Δ*-Mutanten dar, die etwas schwächer als der Wildtyp gewachsen waren. Da diesen Mutanten Opt2p und Opt3p fehlen, könnte das etwas langsamere Wachstum auf eine verlangsamte Aufnahme von Oligopeptiden durch andere Transporter zurückzuführen sein. Im Falle der *sap2Δ*-Mutante konnte auf BSA als alleiniger Stickstoffquelle, wie erwartet, kaum ein Wachstum festgestellt werden. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass kein einzelnes *OPT*-Gen für das Wachstum von *C. albicans* auf BSA notwendig ist. Die Oligopeptidtransporter, die von den einzelnen *OPT*-Genen codiert werden, übernehmen folglich zumindest teilweise redundante Funktionen in der Aufnahme von Peptiden und/oder bei der Induktion der *SAP2*-Expression oder sie spielen gar keine Rolle dabei.

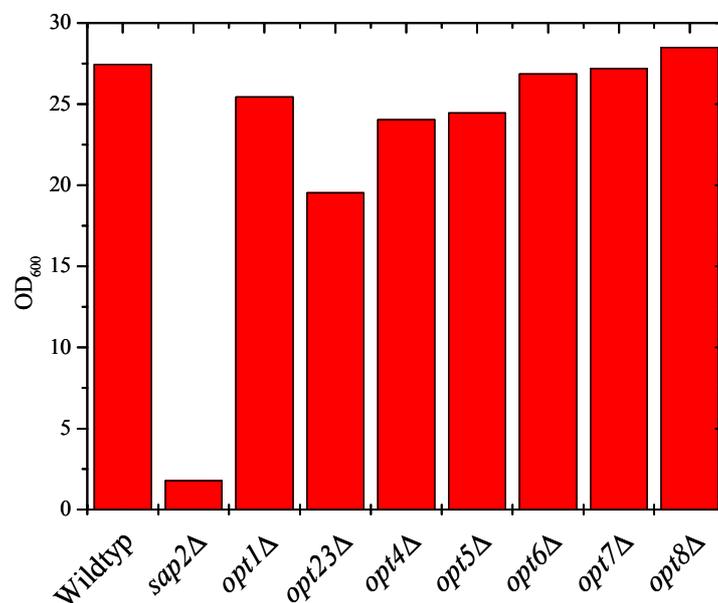


Abbildung 13 Optische Dichte des Wildtyps SC5314, der *sap2Δ*-Mutante und aller Einzelmutanten *opt1Δ-opt8Δ*. YPD-Übernachtskulturen wurden 1:100 in YCB-BSA verdünnt und 18 h bei 30°C inkubiert. Anschließend wurde die optische Dichte der Kulturen bei 600 nm gemessen. Die Grafik stellt eine Zusammenfassung aus zwei unterschiedlichen Experimenten dar. Angegeben ist jeweils der Mittelwert zweier unabhängig konstruierter Mutanten. Verwendete Stämme: SC5314 (Wildtyp), SAP2MS4B (*sap2Δ*), OPT1M4A/B (*opt1Δ*), OPT23M4A/B (*opt23Δ*), OPT4M4A/B (*opt4Δ*), OPT5M4A/B (*opt5Δ*), OPT6M4A/B (*opt6Δ*), OPT7M4A/B (*opt7Δ*), OPT8M4A/B (*opt8Δ*).

4.5 Konstruktion von *opt123Δ*-Triplemutanten

Da die *opt1Δ-opt8Δ*-Mutanten keinen Wachstumsdefekt auf BSA als alleiniger Stickstoffquelle aufwiesen und alle Ergebnisse darauf hindeuteten, dass die Oligopeptidtransporter zumindest teilweise redundante Funktionen bei der Peptidaufnahme übernehmen, wurden *opt123Δ*-Triplemutanten konstruiert, um deren Wachstum auf BSA als alleiniger Stickstoffquelle zu untersuchen.

4.5.1 Herstellung der *opt123Δ*-Triplemutanten

Die Konstruktion der *opt123Δ*-Triplemutanten erfolgte analog zur Konstruktion der *opt23Δ*-Mutanten. Dazu wurden die *opt1Δ*-Nullmutanten (OPT1M4A/B) mit dem [*ApaI-SacI*]-Fragment aus pOPT23M2 transformiert (Abbildung 11). Nach zwei Runden der Integration und Deletion der *SAT1*-Flipper-Kassette lagen homozygote *opt123Δ*-Triplemutanten (OPT123M4A/B) vor.

4.5.2 Konstruktion von Plasmiden für die Reintegration von *OPT2* und *OPT3* in die *opt123Δ*-Triplemutanten

Nachdem die *opt123Δ*-Triplemutanten konstruiert worden waren, wurden intakte Kopien der drei Gene *OPT1*, *OPT2* und *OPT3* einzeln in die *opt123Δ*-Mutanten am jeweiligen Originallokalus reintegriert. Die Reintegration von *OPT1* konnte analog zur Komplementation der *opt1Δ*-Nullmutanten durchgeführt werden (s. Abbildung 7). In den beiden anderen Fällen mussten neue Plasmide konstruiert werden. Zunächst wurden die ORFs der beiden Gene *OPT2* und *OPT3* einschließlich der jeweiligen upstream- und downstream-Regionen amplifiziert. Im Falle des *OPT3*-Gens wurde ein größerer Bereich (etwa 1250 bp) der upstream-Region amplifiziert, da der gesamte Promotor des *OPT3*-Gens mit reintegriert werden musste. Der Original-Promotorbereich des *OPT3*-Gens war durch die Deletion beider Gene verloren gegangen. Das *OPT2*-Gen inklusive flankierender Bereiche wurde mit den Primern OPT14 und OPT23 erhalten. Durch die beiden Primer wurden eine *ApaI*-site und eine *XhoI*-site eingeführt. Das *ApaI/XhoI*-gespaltene PCR-Produkt enthält die Region von -314 bis +3335 in Bezug auf das Startcodon von *OPT2*. Das gespaltene PCR-Produkt wurde anschließend in den *ApaI/XhoI*-gespaltenen Vektor pKSII kloniert. Dieses Plasmid wurde pOPT2 genannt. Nach Sequenzierung des [*ApaI-XhoI*]-Fragments aus pOPT2 wurde dieses anstelle des 5`*OPT2*-Fragments in das *ApaI/XhoI*-gespaltene Plasmid pOPT23M2 kloniert.

Das [*ApaI-SacI*]-Fragment des erhaltenen Plasmids pOPT23K2 wurde schließlich dazu verwendet, *OPT2* in die *opt123Δ*-Triplemutanten am Originalloкус zu reintegrieren (Abbildung 14).

Das *OPT3*-Gen inklusive flankierender Bereiche wurde mit den Primern OPT24 und OPT25 amplifiziert. Durch die beiden Primer wurden eine *SalI*-site und eine *BamHI*-site eingeführt. Das *SalI/BamHI*-gespaltene PCR-Produkt enthält die Region von -1254 bis +3374 in Bezug auf das Startcodon von *OPT3*. Das gespaltene PCR-Produkt wurde anschließend in den *SalI/BamHI*-gespaltenen Vektor pKSII kloniert, was zu pOPT3 führte. Durch Sequenzierungen von PCR-Produkten aus unabhängigen PCR-Reaktionen konnten zwei unterschiedliche Allele des *OPT3*-Gens identifiziert werden. pOPT3A enthält Allel *OPT3-1*, während pOPT3B Allel *OPT3-2* enthält. Bevor das *OPT3*-Gen in die *opt123Δ*-Triplemutanten am Originalloкус reintegriert werden konnte, musste das [*ApaI-XhoI*]-Fragment mit dem 5' *OPT2*-Bereich aus pOPT23M2 in die *ApaI/SalI*-gespaltenen Plasmide pOPT3A und pOPT3B kloniert werden. Die entstandenen Plasmide wurden pOPT31A (*OPT3-1*) bzw. pOPT31B (*OPT3-2*) genannt. Nun konnten die [*ApaI-XhoI*]-Fragmente mit der upstream-Region des *OPT2*-Gens und dem gesamten *OPT3*-Gen aus pOPT31A und pOPT31B anstelle des 5' *OPT2*-Fragments in das *ApaI/XhoI*-gespaltene pOPT23M2 kloniert werden. Die [*ApaI-SacI*]-Fragmente der resultierenden Plasmide pOPT23K3A (*OPT3-1*) und pOPT23K3B (*OPT3-2*) wurden nun dazu verwendet, um die beiden Allele des *OPT3*-Gens in die *opt123Δ*-Triplemutanten am Originalloкус zu reintegrieren (Abbildung 14).

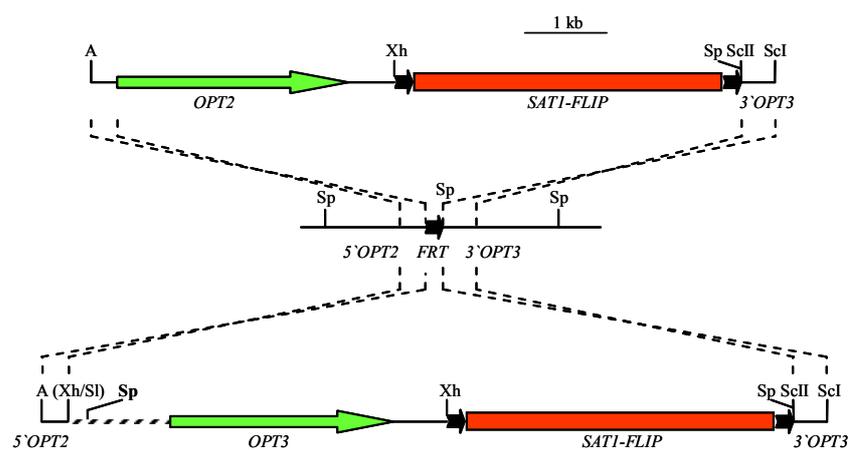


Abbildung 14 Aufbau der Kassetten aus pOPT23K2 (oben) und pOPT23K3A/B (unten), die für die Reintegration intakter Kopien von *OPT2* und *OPT3-1/OPT3-2* in den inaktivierten *opt23Δ*-Lokus der *opt123Δ*-Mutanten verwendet wurden. Die *OPT3* upstream-Region ist schraffiert dargestellt, um sie von der 5' *OPT2*-Region unterscheiden zu können. Es sind nur relevante Restriktionsschnittstellen angegeben: A, *ApaI*; ScI, *SacI*; ScII, *SacII*; Sl, *SalI*; Sp, *SpeI*; Xh, *XhoI*.

4.5.3 Phänotypische Analyse der *opt123Δ*-Triplemutanten

4.5.3.1 Wachstumstest in YCB-BSA

Zunächst wurden mit den *opt123Δ*-Triplemutanten und den jeweiligen Komplementanten Wachstumstests in YCB-BSA durchgeführt. Dazu wurden YPD-Übernachtskulturen der Stämme 1:100 in YCB-BSA verdünnt und 18 h bei 30°C inkubiert. Wie Abbildung 15 zeigt, hat die *opt123Δ*-Triplemutante einen sehr starken Wachstumsdefekt in diesem Medium, der vergleichbar mit dem der *sap2Δ*-Nullmutante ist. Nach Übernachtskultivierung ist kaum ein Wachstum festzustellen, was darauf hindeutet, dass mindestens einer dieser drei deletierten Oligopeptidtransporter für ein normales Wachstum von *C. albicans* auf BSA als alleiniger Stickstoffquelle benötigt wird. Tatsächlich verhilft eine Reintegration einer intakten Kopie von *OPT1*, *OPT2* oder *OPT3* in die *opt123Δ*-Mutanten diesen wieder zum Wachstum. Somit ist eines dieser drei Gene für *C. albicans* ausreichend, um auf BSA als alleiniger Stickstoffquelle wachsen zu können.

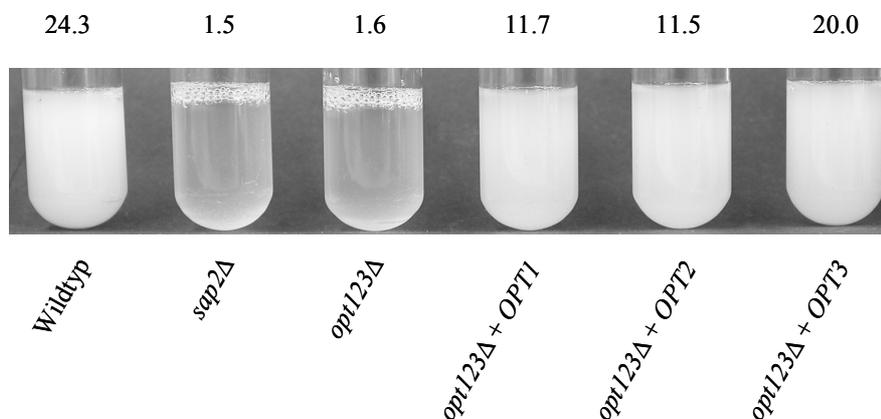


Abbildung 15 Wachstum des Wildtyps SC5314, der *sap2Δ*-Mutante, der *opt123Δ*-Triplemutante und der komplementierten Stämme in YCB-BSA. Übernachtskulturen in YPD-Medium wurden 1:100 in YCB-BSA verdünnt, 18 h bei 30°C kultiviert und anschließend fotografiert. Die optische Dichte bei 600 nm ist jeweils über dem Röhrchen angegeben. Folgende Stämme wurden verwendet: SC5314 (Wildtyp), SAP2MS4B (*sap2Δ*), OPT123M4A/B (*opt123Δ*), OPT123MK12A/B (*opt123Δ* + *OPT1*), OPT123MK22A/B (*opt123Δ* + *OPT2*) und OPT123MK32A/B (*opt123Δ* + *OPT3*). Die beiden unabhängig konstruierten Serien der *opt123Δ*-Mutanten und der komplementierten Stämmen verhielten sich gleich. Nur jeweils ein Stamm ist gezeigt.

4.5.3.2 Expression des *GFP*-Gens unter der Kontrolle des *SAP2*-Promotors in den Triplemutanten

Um nun der Frage nachzugehen, ob das schlechte Wachstum der Triplemutanten in Gegenwart von BSA als alleiniger Stickstoffquelle auf eine mangelnde Induktion des *SAP2*-Gens zurückzuführen ist, wurden weitere Versuche durchgeführt. Wird *SAP2* nicht induziert, können die Triplemutanten aufgrund fehlender Sap2p-Sekretion das BSA im Medium nicht abbauen und somit nicht als Stickstoffquelle verwerten. Um dies zu überprüfen, wurde zunächst ein P_{SAP2-1} -*GFP*-Reporterkonstrukt angefertigt, das in den Wildtyp und in die Triplemutanten integriert wurde, um die Induktion von *SAP2* in diesen Stämmen in Gegenwart von BSA als alleiniger Stickstoffquelle zu überprüfen.

Um das *GFP*-Gen unter der Kontrolle des *SAP2-1*-Promotors in SC5314 und in den Triplemutanten zu exprimieren, wurde das Plasmid pSAP2G1 konstruiert. Dazu wurde das [*ApaI*-*NcoI*] [P_{SAP2-1} -5' *GFP*]-Fragment aus pGFP55 (Staub, 2001) zusammen mit dem [*NcoI*-*PstI*] [3' *GFP*-*T_{ACT1}*-*caSAT1*]-Fragment aus pGFP72 (Yang-Nim Park) in das *ApaI/PstI*-gespaltene pGFP55 kloniert, was zum Plasmid pSAP2G1 führte. Das Insert dieses Plasmids ([*XbaI*-*HindIII*]-Fragment) wurde über homologe Rekombination in den *SAP2-1*-Lokus des Wildtyps und der *opt123Δ*-Triplemutanten integriert (Abbildung 16). Das Konstrukt wurde deshalb in den *SAP2-1*- und nicht in den *SAP2-2*-Lokus integriert, da zur Induktion von P_{SAP2-1} unbedingt ein intaktes *SAP2-2*-Allel vorhanden sein muss (Staub, 2001).

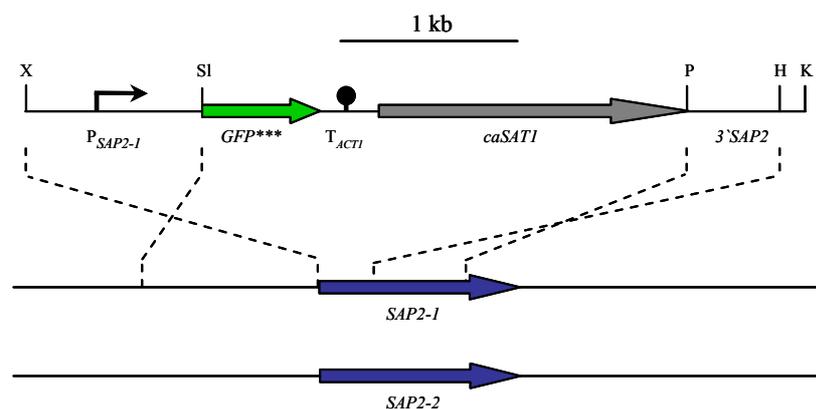


Abbildung 16 Aufbau der P_{SAP2-1} -*GFP*-Expressionskassette aus Plasmid pSAP2G1, die verwendet wurde, um das *GFP*-Gen unter der Kontrolle des *SAP2-1*-Promotors im Wildtyp SC5314 und in den *opt123Δ*-Triplemutanten zu exprimieren. Es sind nur relevante Schnittstellen eingezeichnet: H, *HindIII*; K, *KpnI*; P, *PstI*; Sl, *SalI*; X, *XbaI*.

Die *GFP*-Expression der erhaltenen Stämme SCSAP2G1A/B (P_{SAP2-1} -*GFP*-Expressionskassette im Wildtyp) und OPT123MSAP2G1A/B (P_{SAP2-1} -*GFP*-Expressionskassette in den Triplemutanten) wurde mithilfe des Fluoreszenzmikroskops unter

verschiedenen Wachstumsbedingungen kontrolliert (Abbildung 17). Dazu wurden YPD-Übernachtskulturen 1:100 in YCB-BSA-HE verdünnt und 18 h bei 30°C inkubiert. Die Zugabe des Hefeextraktes war notwendig, da die Stämme ansonsten aufgrund ihres Wachstumsdefekts auf BSA als alleiniger Stickstoffquelle nicht gewachsen wären. Dies hat keinen Einfluss auf die Expression von *SAP2*, da *SAP2* durch BSA auch in Gegenwart von Hefeextrakt induziert wird (Staub et al., 2002). Am nächsten Tag wurden etwa 3 µl Kultur auf einen Objektträger gegeben und unter dem Mikroskop betrachtet.

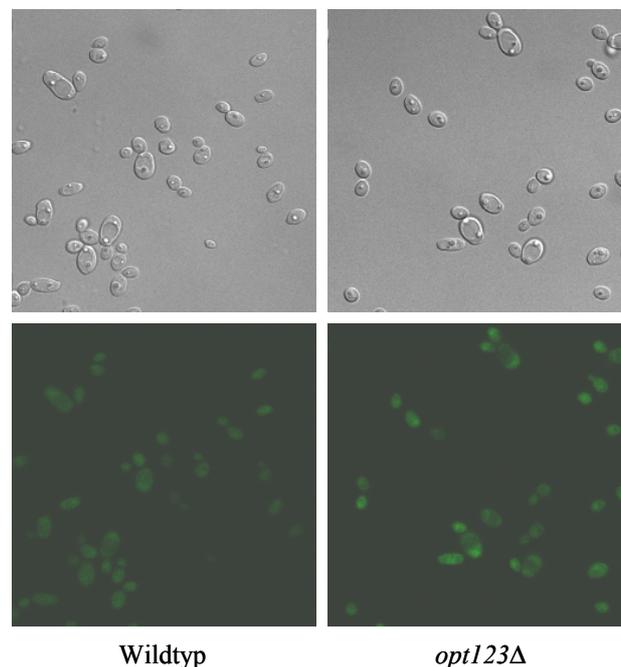


Abbildung 17 Expression der P_{SAP2-1} -GFP-Reporterfusion im Wildtyp- und *opt123Δ*-Hintergrund. Übernachtskulturen der Stämme in YPD-Medium wurden 1:100 in frischem YCB-BSA-HE verdünnt und 18 h bei 30°C inkubiert, um die *SAP2*-Expression zu induzieren. Gezeigt werden die Phasenkontrast- (obere Reihe) und die entsprechenden Fluoreszenzbilder (untere Reihe). Verwendete Stämme: SCSAP2G1A/B (Wildtyp) und OPT123MSAP2G1A/B (*opt123Δ*). Die jeweils unabhängig konstruierten Reporterstämme verhielten sich gleich, nur jeweils einer von ihnen ist gezeigt.

Wie an den Fluoreszenzbildern in Abbildung 17 deutlich zu erkennen ist, wird *GFP* in Gegenwart von BSA als alleiniger Stickstoffquelle in der *opt123Δ*-Triplemutante ähnlich stark wie im Wildtyp exprimiert. Dies weist darauf hin, dass *SAP2* in den Triplemutanten normal induziert wird. Eine Expression von *GFP* in YPD-Medium konnte bei keinem der Stämme beobachtet werden.

4.5.3.3 Nachweis von Sap2p im Überstand der *opt123Δ*-Triplemutanten in YCB-BSA-Medium

Wie im vorangegangenen Versuch gezeigt, wurde *SAP2* in den *opt123Δ*-Triplemutanten normal induziert. Mit folgendem Versuch wurde überprüft, ob sich Sap2p nun auch im Überstand einer YCB-BSA-Kultur der Triplemutanten nachweisen lässt. Dazu wurde eine YPD-Übernachtskultur der Stämme 1:100 in YCB-BSA-HE überimpft und zwei Tage bei 30°C inkubiert. 18 µl des Überstandes wurden nach Zentrifugation der Kulturen auf ein 12%-SDS-Gel aufgetragen.

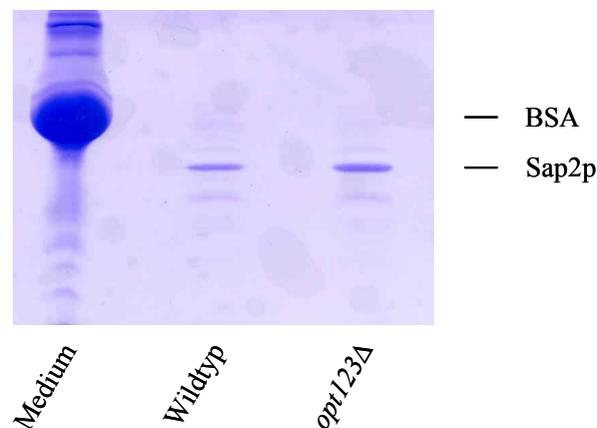


Abbildung 18 Expression von Sap2p im Wildtyp und in der *opt123Δ*-Triplemutante. Die Stämme SC5314 (Wildtyp) und OPT123M4A/B (*opt123Δ*) wurden nach Vorkultivierung in YPD zwei Tage in YCB-BSA-HE bei 30°C inkubiert. Anschließend wurde der Überstand mittels SDS-PAGE analysiert. Das Wachstumsmedium wurde zum Vergleich mit aufgetragen. Die Banden von BSA und Sap2p sind entsprechend gekennzeichnet. Die beiden unabhängig konstruierten Triplemutanten verhielten sich gleich, nur jeweils ein Stamm ist gezeigt.

In Abbildung 18 ist deutlich zu erkennen, dass die *opt123Δ*-Triplemutante ähnliche Mengen an Sap2p wie der Wildtyp SC5314 produzierte. Das BSA im Medium wurde durch die Triplemutante demnach ähnlich effizient degradiert wie durch den Wildtyp, was wiederum darauf hindeutet, dass die Expression und Sekretion von Sap2p in den *opt123Δ*-Triplemutanten normal induziert wird.

4.5.3.4 Expression des *SAP2*-Gens unter der Kontrolle des Tetracyclin-induzierbaren Promotors in den Triplemutanten

Schließlich wurde untersucht, ob der Wachstumsdefekt der *opt123Δ*-Triplemutanten auf BSA durch eine zusätzliche Expression von *SAP2* aufgehoben werden kann. Für diesen Zweck wurde mir freundlicherweise von Peter Staib das Plasmid pSAP2ex4 zur Verfügung gestellt. In diesem Plasmid steht das *SAP2-I*-Gen unter der Kontrolle eines Tetracyclin-induzierbaren Promotors (P_{Tet}). In Gegenwart von Doxycyclin wird P_{Tet} induziert und *SAP2-I* exprimiert. Dieses Konstrukt wurde bereits erfolgreich eingesetzt, um den Wachstumsdefekt einer *sap2Δ*-Mutante auf BSA als alleiniger Stickstoffquelle durch Zugabe von Doxycyclin zu kompensieren. Das Insert dieses Plasmids ([*SacII*-*ApaI*]-Fragment) wurde chromosomal in die Triplemutanten OPT123M4A/B integriert (Abbildung 19), um zu überprüfen, ob eine externe Induktion der *SAP2*-Expression ein normales Wachstum der Triplemutanten auf BSA als alleiniger Stickstoffquelle ermöglicht.

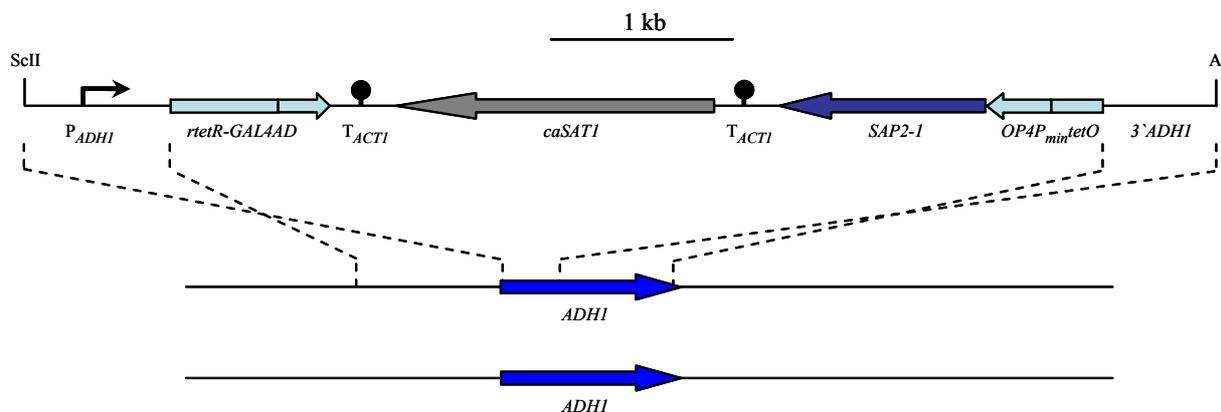


Abbildung 19 Aufbau der P_{Tet} -*SAP2-I*-Expressionskassette aus Plasmid pSAP2ex4, die dafür verwendet wurde, um *SAP2-I* unter der Kontrolle des Tet-induzierbaren Promotors in den *opt123Δ*-Triplemutanten zu exprimieren. Nur relevante Schnittstellen sind dargestellt: A, *ApaI*; ScII, *SacII*.

Die erhaltenen Stämme OPT123MSAP2ex4A/B wurden nach YPD-Vorkultivierung in YCB-BSA-Medium mit (50 μ g/ml) und ohne Doxycyclin bei 30°C kultiviert. Die Expression der zusätzlichen Kopie von *SAP2-I* komplementierte allerdings nicht den Wachstumsdefekt der Triplemutanten in YCB-BSA-Medium.

Die vorangegangenen Versuche demonstrierten eindeutig, dass das schlechte Wachstum der *opt123Δ*-Triplemutanten auf BSA als alleiniger Stickstoffquelle nicht auf eine fehlende Induktion der *SAP2*-Expression zurückzuführen ist. So zeigten die P_{SAP2-1} -*GFP*-Reporterstämme eine Fluoreszenz in Gegenwart von BSA als alleiniger Stickstoffquelle, was darauf hindeutet, dass *SAP2* normal induziert wurde. Auch konnte im Überstand von Kulturen der Triplemutanten in YCB-BSA-HE Sap2p in gleichen Mengen nachgewiesen werden wie beim Wildtyp, was eindeutig beweist, dass *SAP2* in diesen Stämmen in Gegenwart von BSA als alleiniger Stickstoffquelle exprimiert wurde. Weiterhin hob die Expression einer zusätzlichen *SAP2-1*-Kopie unter der Kontrolle des Tet-induzierbaren Promotors den Wachstumsdefekt der *opt123Δ*-Triplemutanten auf BSA nicht auf.

Zusammenfassend kann eine fehlende *SAP2*-Induktion als Ursache für den Wachstumsdefekt der Triplemutanten auf BSA ausgeschlossen werden. Der Wachstumsdefekt der *opt123Δ*-Mutanten ist deshalb vermutlich darauf zurückzuführen, dass die Mutanten nicht in der Lage sind, die proteolytischen Abbauprodukte von BSA effizient aufzunehmen.

4.6 Untersuchung der Expressionsmuster der *OPT*-Gene *in vitro*

Wie bereits gezeigt, können die verbleibenden *OPT*-Gene das Fehlen von *OPT1-OPT3* nicht kompensieren (Abbildung 15). Dies weist darauf hin, dass entweder Opt4p-Opt8p nicht effizient genug die BSA-Abbauprodukte von BSA transportieren können oder dass die Gene *OPT4-OPT8* unter diesen Bedingungen nicht exprimiert werden. Um zwischen diesen beiden Möglichkeiten zu unterscheiden, wurden die Expressionsmuster der *OPT*-Gene untersucht. Da die hohe Ähnlichkeit der Gene *OPT2-OPT4* keine Unterscheidung deren Transkripte durch Northern-Hybridisierung erlauben würde, wurden Reporterstämme konstruiert, die das *GFP*-Gen jeweils unter der Kontrolle eines der 16 Promotoren der acht *OPT*-Gene exprimierten. Diese Stämme wurden mittels Fluoreszenzmikroskopie und Durchflusszytometrie analysiert.

4.6.1 Konstruktion von P_{OPT} -*GFP*-Reporterplasmiden

Um das *GFP*-Reportergen unter die Kontrolle des *OPT1*-Promotors zu bringen, wurde ein [*ApaI-SalI*]-Fragment mit den Primern OPT5 und OPT108 aus Plasmid pOPT1M3 amplifiziert. Dieses Fragment enthält *OPT1-2*-Sequenzen von -523 bis -8 in Bezug auf das Startcodon und wurde vor das *GFP*-Gen in das *ApaI/SalI*-gespaltene Plasmid pNIM1 (Park and Morschhäuser, 2005) kloniert. Das daraus resultierende Plasmid wurde pOPT1G21 genannt. Das *OPT1-2* downstream-Fragment wurde mit den Primern OPT109 und OPT110 ebenfalls aus pOPT1M3 amplifiziert. Das PCR-Produkt, das *OPT1-2*-Sequenzen von +2352 bis +2868 in Bezug auf das Startcodon des *OPT1-1*-Allels enthält, wurde mit *PstI/SacI* gespalten und in das *PstI/SacI*-gespaltene pOPT1G21 hinter den *caSAT1* Selektionsmarker kloniert, was zum Plasmid pOPT1G22 führte. Der Stamm SC5314 wurde schließlich mit dem [*ApaI-SacI*]-Fragment aus pOPT1G22 transformiert (Abbildung 20). Die Integration erfolgte über homologe Rekombination in den *OPT1*-Originalloкус. Es wurden zwei Transformanten weiter verwendet, die das Konstrukt in je einem anderen *OPT1*-Allel tragen (SCOPT1G22A/B).

Um das *GFP*-Gen von den Promotoren der anderen sieben *OPT*-Gene exprimieren zu lassen, wurden zunächst die upstream- und downstream-Regionen dieser Gene mit den in Tabelle 8 aufgelisteten Primern aus genomischer DNA von SC5314 amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden anschließend anstelle der flankierenden *OPT1*-Sequenzen in das Plasmid pOPT1G22 kloniert, was zu den Plasmiden pOPT2G22, pOPT3G22, pOPT4G22, pOPT5G22, pOPT6G22, pOPT7G22 und pOPT8G22 führte. Der Stamm SC5314 wurde jeweils mit dem

[*ApaI-SacI*]-Fragment der Plasmide transformiert. Es wurden nach Überprüfung mit Southern-Hybridisierung je zwei Transformanten verwendet, die das *GFP*-Gen in je einem anderen Allel tragen.

Primerpaar	Bereich	Plasmid	Transformanten
OPT5/OPT108	P _{OPT1-2}	pOPT1G22	SCOPT1G22A/B
OPT109/OPT110	<i>OPT1-2</i> downstream		
OPT14/OPT202	P _{OPT2}	pOPT2G22	SCOPT2G22A/B
OPT203/OPT204	<i>OPT2</i> downstream		
OPT302/OPT303	P _{OPT3}	pOPT3G22	SCOPT3G22A/B
OPT304/OPT117	<i>OPT3-1</i> downstream		
OPT404/OPT405	P _{OPT4-1}	pOPT4G22	SCOPT4G22A/B
OPT406/OPT407	<i>OPT4-2</i> downstream		
OPT503/OPT504	P _{OPT5}	pOPT5G22	SCOPT5G22A/B
OPT505/OPT506	<i>OPT5</i> downstream		
OPT603/OPT604	P _{OPT6}	pOPT6G22	SCOPT6G22A/B
OPT605/OPT606	<i>OPT6</i> downstream		
OPT700/OPT701	P _{OPT7}	pOPT7G22	SCOPT7G22A/B
OPT702/OPT703	<i>OPT7</i> downstream		
OPT803/OPT804	P _{OPT8}	pOPT8G22	SCOPT8G22A/B
OPT805/OPT806	<i>OPT8</i> downstream		

Tabelle 8 Übersicht über die eingesetzten Primer, die jeweiligen Plasmide und Transformanten.

In Abbildung 20 ist beispielhaft die Integration des Inserts von pOPT1G22 in den *OPT1*-Originallokalus von SC5314 dargestellt. Die Integration der Inserts der Plasmide pOPT2G22-pOPT8G22 erfolgte analog.

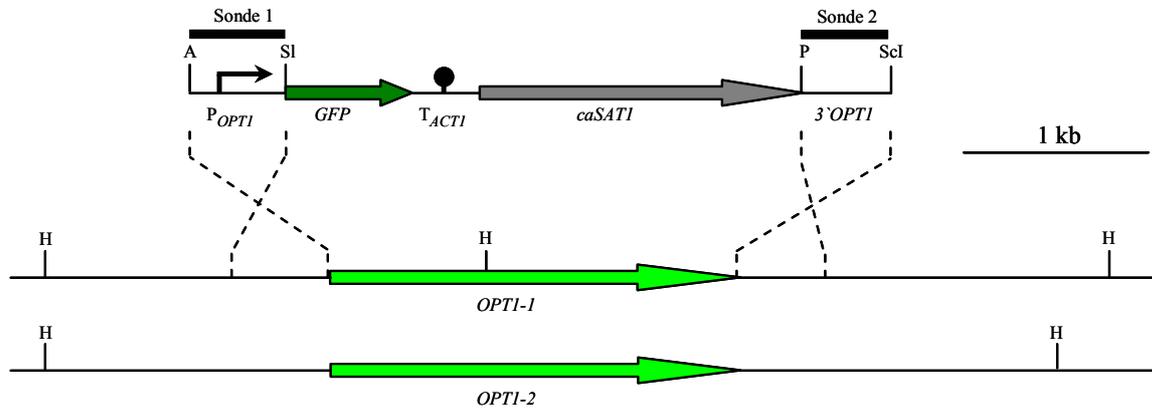


Abbildung 20 Struktur einer *GFP*-Expressionskassette, die dazu verwendet wurde, um *GFP* unter der Kontrolle aller 16 *OPT*-Promotoren im Wildtyp SC5314 zu exprimieren. Die Abbildung zeigt das Plasmid pOPT1G22 mit P_{OPT1} -*GFP*-Fusion und die Integration in den *OPT1*-Lokus. Analoge Plasmide wurden für alle *OPT*-Promotoren konstruiert: pOPT2G22 (*OPT2*), pOPT3G22 (*OPT3*), pOPT4G22 (*OPT4*), pOPT5G22 (*OPT5*), pOPT6G22 (*OPT6*), pOPT7G22 (*OPT7*), pOPT8G22 (*OPT8*). Nur relevante Schnittstellen sind dargestellt: A, *ApaI*; H, *HindIII*; P, *PstI*; ScI, *SacI*; S1, *Sall*.

4.6.2 Analyse der P_{OPT} -*GFP*-Reporterstämme mittels Fluoreszenzmikroskopie und Durchflusszytometrie

Die konstruierten Reporterstämme SCOPT1G22A/B - SCOPT8G22A/B wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet und zusätzlich mittels Durchflusszytometrie analysiert. Dazu wurden die Reporterstämme aus einer YPD-Übernachtskultur 1:100 in YCB-BSA verdünnt und über Nacht (Fluoreszenzmikroskopie) bzw. für 8 h (Durchflusszytometrie) bei 30°C inkubiert. Bevor die Zellen im Durchflusszytometer verwendet werden konnten, wurden sie zweimal in PBS gewaschen und für die Messung 1:2 mit PBS verdünnt. Beide Methoden führten zum gleichen Ergebnis. Keiner der Reporterstämme zeigte eine detektierbare *GFP*-Expression in YPD-Medium, was darauf hindeutet, dass die *OPT*-Gene, wie auch *SAP2*, nur basal oder überhaupt nicht im Vollmedium exprimiert werden (Abbildung 22). Im Gegensatz dazu wurden einige *OPT*-Gene exprimiert, wenn die Reporterstämme in YCB-BSA-Medium kultiviert wurden (Abbildung 21 und Abbildung 22). Die stärkste Fluoreszenz zeigten die Reporterstämme mit P_{OPT3} -*GFP* Fusion, gefolgt von den Stämmen mit P_{OPT1} -*GFP*-Fusion. Auch die Reporterstämme, die die P_{OPT5} -*GFP*-Fusion tragen, zeigten eine schwache aber

erkennbare Fluoreszenz (Abbildung 22). Somit wird *OPT3* am stärksten in Gegenwart von BSA als alleiniger Stickstoffquelle induziert, gefolgt von *OPT1* und *OPT5*. Die jeweilige Fluoreszenz konnte bereits nach 6-stündiger Inkubation in YCB-BSA beobachtet werden, stieg dann im zeitlichen Verlauf weiter an und blieb auch nach Übernachtwachstum deutlich erkennbar. Diese Ergebnisse demonstrieren eindeutig, dass einzelne Mitglieder der *OPT*-Genfamilie differentiell exprimiert werden.

Die Tatsache, dass der *OPT2*-Promotor nicht erkennbar im YCB-BSA-Medium induziert wurde, obwohl eine Reintegration eines *OPT2*-Gens an dessen Originallokus in der Triplemutante deren Wachstumsdefekt in YCB-BSA aufhob, deutet an, dass *OPT2* evtl. nur in Abwesenheit von *OPT1* und *OPT3* hochreguliert wird. Dies wurde später noch weiter untersucht. Die Beobachtung, dass *OPT5* nur schwach und *OPT4* bzw. *OPT6-OPT8* nicht-detectierbar exprimiert wurden, stimmt mit den Ergebnissen überein, dass *OPT4-OPT8* nicht das Fehlen von *OPT1-OPT3* in der Triplemutante kompensieren konnten.

Abbildung 21 zeigt die Fluoreszenz- und Phasenkontrastaufnahmen aller Reporterstämmen in Gegenwart von BSA als alleiniger Stickstoffquelle, während Abbildung 22 die Daten der FACS-Analyse der Reporterstämmen in YPD und YCB-BSA zeigt.

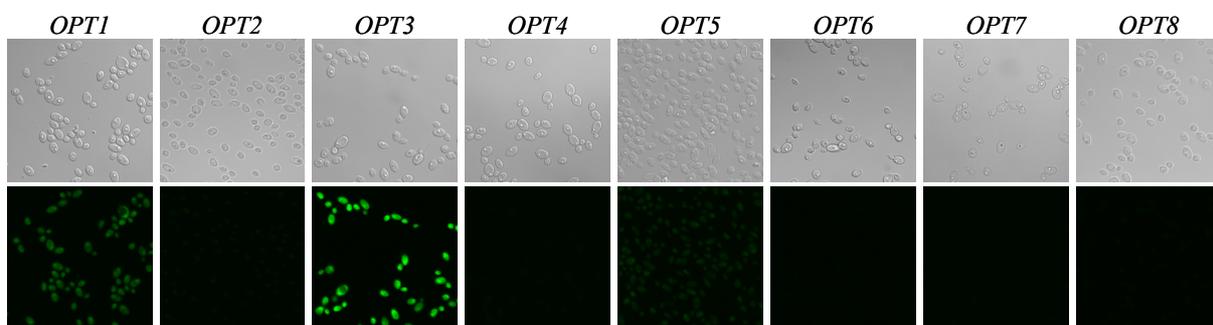


Abbildung 21 Expression des *GFP*-Reportergens unter der Kontrolle aller *OPT*-Promotoren.

Zellen aus einer YPD-Vorkultur wurden 1:100 in YCB-BSA verdünnt und über Nacht kultiviert. Gezeigt sind Phasenkontrast- und die entsprechenden Fluoreszenzaufnahmen der Stämme. Zellen aus der YPD-Vorkultur zeigten keine erkennbare Fluoreszenz.

Verwendete Stämme: SCOPT1G22A/B (*OPT1*), SCOPT2G22A/B (*OPT2*), SCOPT3G22A/B (*OPT3*), SCOPT4G22A/B (*OPT4*), SCOPT5G22A/B (*OPT5*), SCOPT6G22A/B (*OPT6*), SCOPT7G22A/B (*OPT7*), SCOPT8G22A/B (*OPT8*). Nur einer der zwei unabhängig konstruierten Stämme für jedes *OPT*-Gen ist gezeigt.

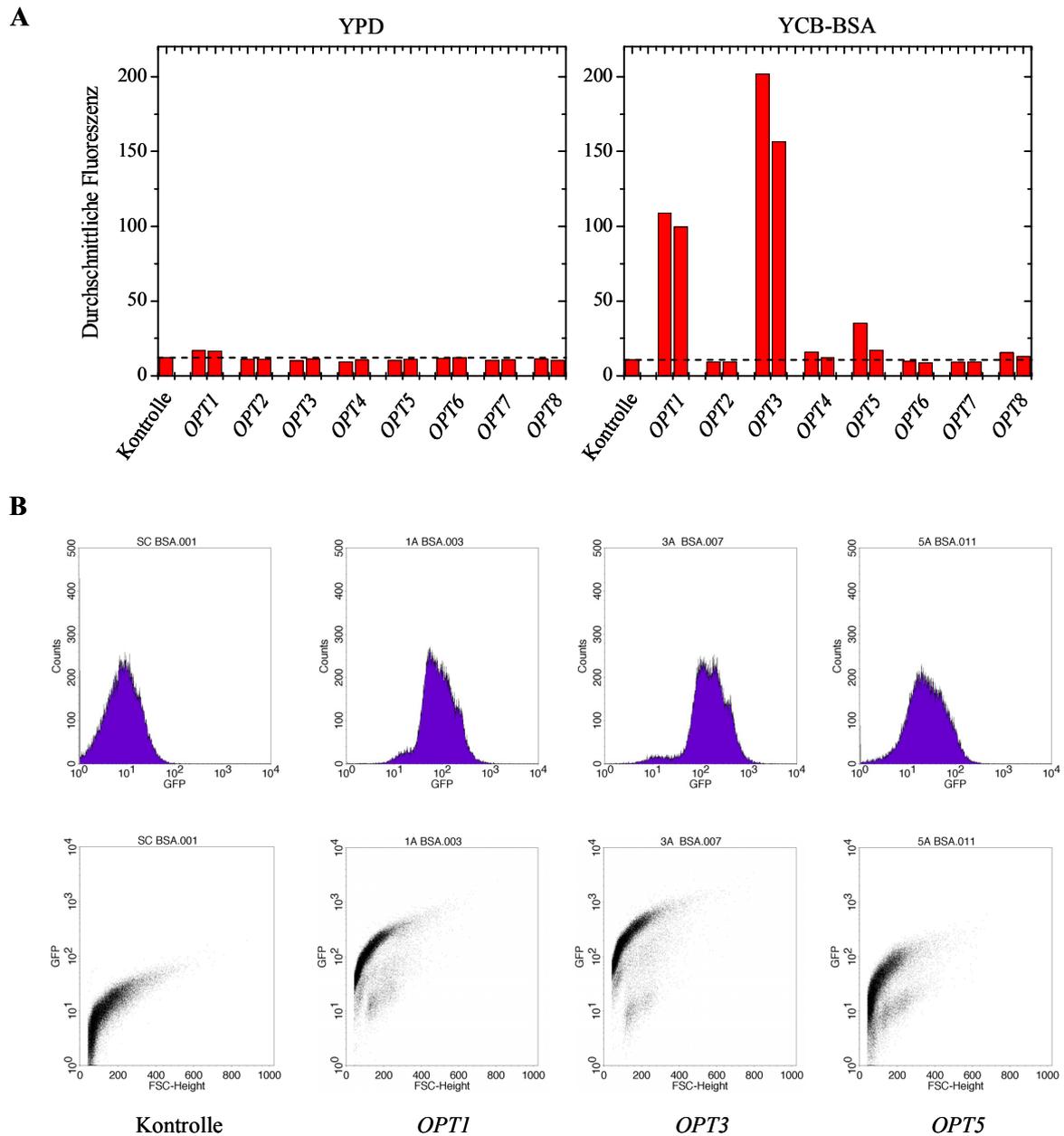


Abbildung 22 Expression des *GFP*-Reportergens unter der Kontrolle aller *OPT*-Promotoren.

(A) Zellen einer YPD-Vorkultur wurden 1:100 in YPD (links) oder YCB-BSA (rechts) verdünnt, 8 h bei 30°C inkubiert und anschließend einer FACS-Analyse unterzogen. Die durchschnittliche Fluoreszenz jeder Zellpopulation ist dargestellt. Jeweils der erste Balken zeigt die Ergebnisse für die A-Reihe, der jeweils zweite Balken die Ergebnisse der B-Reihe der Reporterstämmen. SC5314, der kein *GFP* enthält, wurde als Negativkontrolle verwendet.

Verwendete Stämme: SC5314 (Kontrolle), SCOPT1G22A/B (*OPT1*), SCOPT2G22A/B (*OPT2*), SCOPT3G22A/B (*OPT3*), SCOPT4G22A/B (*OPT4*), SCOPT5G22A/B (*OPT5*), SCOPT6G22A/B (*OPT6*), SCOPT7G22A/B (*OPT7*), SCOPT8G22A/B (*OPT8*).

(B) Originaldaten aus der FACS-Analyse. Stämme nach 8-stündiger Inkubation in YCB-BSA. Dotplots (FSC ↔ GFP) und Histogramme (GFP ↔ Counts). Verwendete Stämme: SC5314 (Kontrolle), SCOPT1G22A (*OPT1*), SCOPT3G22A (*OPT3*), SCOPT5G22A (*OPT5*).

4.6.3 Untersuchung der Induktion ausgewählter *OPT*-Gene durch Peptide bestimmter Zusammensetzung

Im Folgenden wurde untersucht, ob die Gene, die im YCB-BSA-Medium erkennbar exprimiert wurden (*OPT1*, *OPT3*, *OPT5* und *SAP2*), auch durch Peptide induziert werden konnten. Dazu wurden die entsprechenden *GFP*-Reporterstämme nach YPD-Vorkultur in einem YCB-Medium inkubiert, in dem BSA durch kommerziell erhältliche Peptide (4 mg/ml) definierter Länge und Sequenz ausgetauscht wurde. Das Messen der Fluoreszenz erfolgte am Durchflusszytometer. Wie in Abbildung 23 zu erkennen, induzieren alle drei getesteten Peptide (LWMR, PGKAR und RPPGFSPL) die Expression von *OPT1* und *OPT3*. Aber weder *OPT5* noch *SAP2* konnten durch diese Peptide erkennbar induziert werden. Auffällig war, dass LWMR und RPPGFSPL *OPT3* besser als *OPT1* induzieren konnten, wobei es sich bei PGKAR genau anders herum verhielt. Zusätzlich konnten Unterschiede in der Fluoreszenz in Abhängigkeit von der Zeit beobachtet werden. Im Falle von PGKAR war die Fluoreszenz nach 20 h niedriger als nach 10 h, bei den beiden anderen Peptiden verhielt es sich umgekehrt. Dies könnte Hinweise darauf geben, in welcher Phase des Wachstums welche *OPT*-Gene induziert werden.

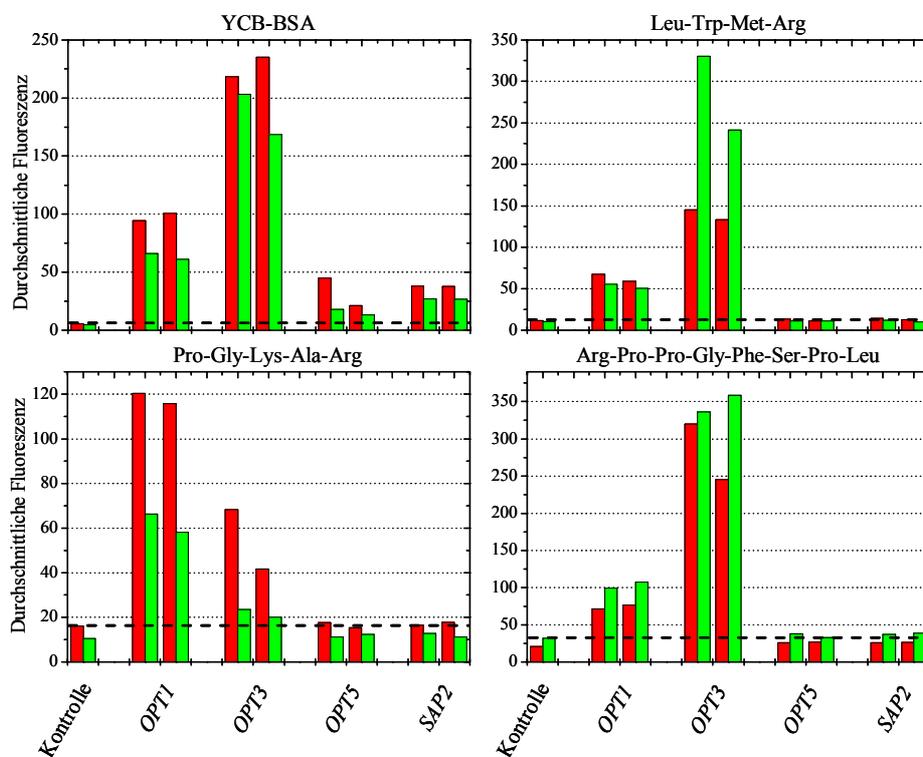


Abbildung 23 Expression des *GFP*-Reportergens unter der Kontrolle aller *OPT*-Gene. Zellen aus YPD-Übernachtskulturen der angegebenen Reporterstämme wurden 1:100 in YCB verdünnt. Als Stickstoffquelle diente jeweils das angegebene Peptid. Die Inkubation erfolgte bei 30°C. Die durchschnittliche Fluoreszenz wurde nach 10 h (rote Balken) und nach 20 h (grüne Balken) mittels Durchflusszytometrie bestimmt.

4.6.4 Untersuchung der Induktion von *OPT2* in Abwesenheit von *OPT1* und *OPT3*

Die Tatsache, dass der *OPT2*-Promotor nicht erkennbar im YCB-BSA-Medium induziert wurde, obwohl eine Reintegration eines *OPT2*-Gens an dessen Originalloкус in der Triplemutante deren Wachstumsdefekt in YCB-BSA aufhob, deutet an, dass *OPT2* nur in Abwesenheit von *OPT1* und *OPT3* hochreguliert wird.

Um dieser Möglichkeit nachzugehen, wurden weitere *GFP*-Reporterstämme konstruiert. Zunächst wurde das Plasmid pOPT2G23 hergestellt. Dazu wurde der 3' *OPT3*-Bereich aus pOPT3G22 ([*PstI*-*SacI*]-Fragment) anstelle des 3' *OPT2*-Bereichs in das Plasmid pOPT2G22 kloniert. Das erhaltene Plasmid pOPT2G23 wurde als [*ApaI*-*SacI*]-Fragment in die Triplemutanten OPT123M4A/B (*opt123Δ*) integriert. Zusätzlich wurde das *GFP*-Expressionskonstrukt in die Komplementanten OPT123MK22A/B (*opt123Δ* + *OPT2*) integriert, um die resultierenden Stämme auch ohne Hefeextrakt auf BSA wachsen lassen zu können.

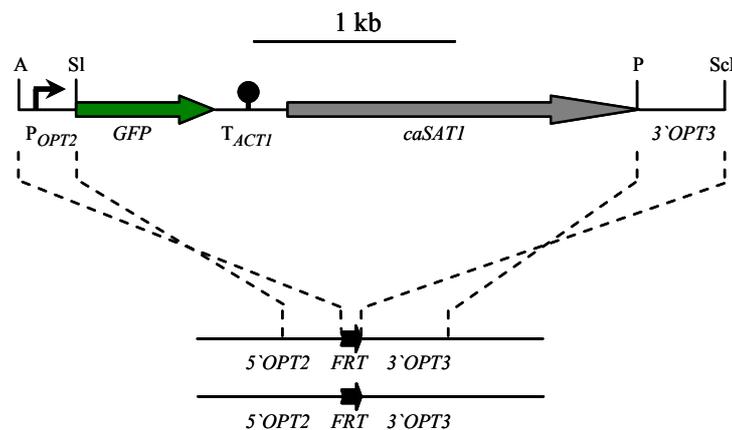


Abbildung 24 Struktur der *GFP*-Expressionskassette pOPT2G23, die dazu verwendet wurde, um *GFP* unter der Kontrolle des *OPT2*-Promotors in den Triplemutanten (*opt123Δ*) und in den Komplementanten (*opt123Δ* + *OPT2*) zu exprimieren. Zu beachten ist, dass bei den Komplementanten (*opt123Δ* + *OPT2*) in das zweite Allel eine intakte Kopie des *OPT2*-Gens integriert wurde, welche in den Triplemutanten (*opt123Δ*) fehlt. Nur relevante Schnittstellen sind gezeigt: A, *ApaI*; P, *PstI*; ScI, *SacI*; SI, *Sall*.

Die erhaltenen Stämme OPT123MG23A/B (*opt123Δ*) und OPT123MK22G23A/B (*opt123Δ* + *OPT2*) wurden aus einer Übernachtskultur in YPD-Medium 1:100 in YCB-BSA (OPT123MK22G23A/B) bzw. in YCB-BSA-HE (OPT123MG23A/B) verdünnt. Nach 18-stündiger Inkubation bei 30°C wurden die Stämme unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Bei keinem der vier Stämme konnte eine Fluoreszenz beobachtet werden, was

darauf hinweist, dass *OPT2* auch in Abwesenheit von *OPT1* und *OPT3* nicht detektierbar induziert wird. Die Beobachtung, dass eine Reintegration des *OPT2*-Gens an dessen Originallokus in der Triplemutante deren Wachstumsdefekt in YCB-BSA aufhob, könnte dennoch mit posttranskriptionellen Kontrollmechanismen erklärt werden, die mit dem vorliegenden Reportersystem nicht greifbar sind. Möglicherweise sind für die *OPT2*-Induktion auch Sequenzen nötig, die im Reporterkonstrukt fehlen.

4.7 Untersuchung der Expressionsmuster der *OPT*-Gene mithilfe des *ecaFLP*-Reportergens

Mit den P_{OPT} -*GFP*-Reporterstämmen war es möglich das Expressionsmuster der *OPT*-Gene *in vitro* zu untersuchen. Untersuchungen im Tiermodell sind mit diesen Reporterstämmen zwar prinzipiell möglich, doch sehr unpraktikabel. Einfacher gestaltet es sich, wenn das *ecaFLP*-Gen als Reporter im Tiermodell eingesetzt wird (Staib et al., 1999). In diesem Reportersystem steht das *ecaFLP*-Rekombinasegen unter der Kontrolle des Zielgenpromotors. Das Reporterkonstrukt wird chromosomal in eines der beiden wildtypischen Allele des Zielgens in einem Stamm integriert, der ein von *FRT* (*FLP* recombination target)-sites flankiertes MPA^R -Resistenzgen im Genom integriert hat (CF11). Eine Induktion des Zielgens führt zu einer Expression der *FLP*-Rekombinase und somit durch *FLP*-vermittelte Rekombination der *FRT*-sites zu einer irreversiblen Deletion des MPA^R -Markers aus dem Genom dieser Zelle. Als Folge der Deletion ist diese Zelle sensitiv gegenüber Mycophenolsäure. Auf entsprechenden Indikatorplatten (Abbildung 25) mit geringer Konzentration an *MPA* bilden *MPA*-sensitive (MPA^S) Zellen kleinere Kolonien im Vergleich zu Zellen, in denen das Zielgen nicht aktiviert wurde und die weiterhin *MPA*-resistent (MPA^R) sind. Durch phänotypische Untersuchung großer und kleiner Kolonien auf den Indikatorplatten lässt sich leicht der Prozentsatz an kleinen Kolonien und somit an Zellen bestimmen, die im Untersuchungszeitraum das Zielgen aktiviert hatten. Die Funktionsweise dieses Reportersystems ist schematisch in Abbildung 25 dargestellt.

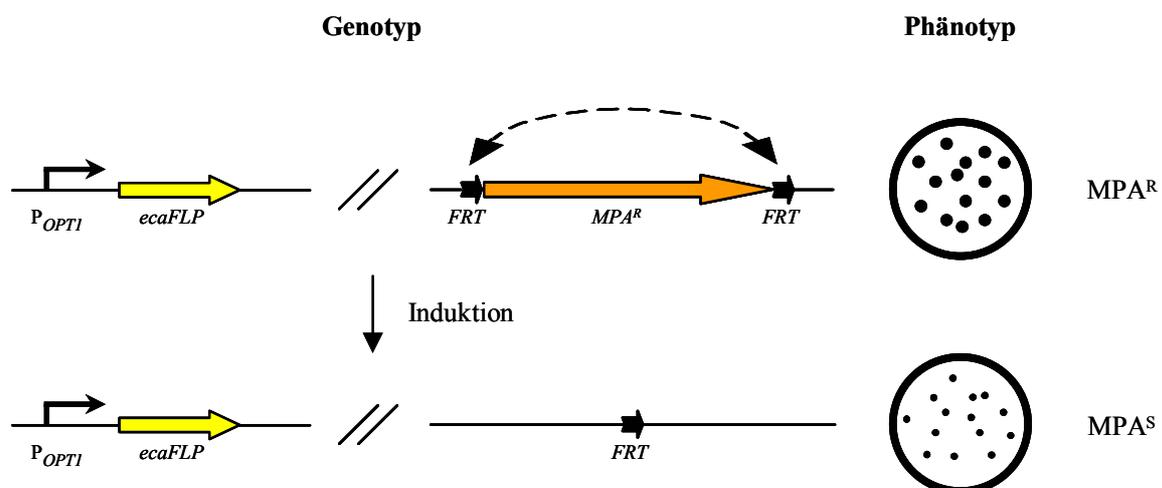


Abbildung 25 Funktionsweise des Reportersystems am Beispiel von P_{OPTI} . Erklärung siehe Text.

Ein weiterer Vorteil dieses Systems ist, dass auch eine vorübergehende Geninduktion nachweisbar ist, da der Markerverlust aus dem Genom einer Zelle als irreversibles Ereignis an ihre Nachkommen weitervererbt wird. So kann auch zu einem späteren Zeitpunkt durch Analyse der Nachkommenzellen die Induktion des Zielgens nachgewiesen werden. In einem *in vivo* Infektionsmodell können so die Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten oder aus verschiedenen Organen reisoliert werden und nach Ausplattieren auf Indikatorplatten eine Induktion des Zielgens *in vivo* und somit im Infektionsverlauf belegt werden.

Die folgenden Stämme wurden für eine spätere Verwendung in Infektionsmodellen konstruiert. Im Rahmen dieser Arbeit wurden keine Tierversuche mit diesem Reportersystem durchgeführt. Dennoch wurde die Verwendbarkeit des Systems *in vitro* getestet.

4.7.1 Konstruktion von P_{OPT} -*ecaFLP*-Reporterplasmiden

Zunächst wurden Plasmide konstruiert, bei denen das *ecaFLP*-Rekombinasegen unter der Kontrolle der jeweiligen *OPT*-Promotoren steht. Dazu konnten die Promotor- und 3'-Bereiche der *OPT*-Gene aus den Plasmiden pOPT1G22-pOPT8G22 verwendet werden. Als Selektionsmarker dient in diesem System anstelle von *caSAT1 URA3*, da der verwendete Stamm CF11 *ura3*-negativ ist. Zur Konstruktion der Plasmide wurde das [*SalI-SpeI*]-[5' *ecaFLP*]-Fragment aus pTET24 zusammen mit dem [*SpeI-PstI*]-[3' *ecaFLP*-*ACT1T-URA3*]-Fragment aus pTET24 in die *SalI/PstI*-gespaltenen Plasmide pOPT1G22-pOPT8G22 kloniert. Die entstandenen Plasmide wurden entsprechend pOPT1FL1-pOPT8FL1 genannt. Insgesamt wurden *GFP* und *caSAT1* gegen *ecaFLP* und *URA3* ausgetauscht. Die Inserts dieser Plasmide wurden über homologe Rekombination chromosomal in das jeweilige *OPT*-Gen des Stammes CF11 integriert (Abbildung 26), was zu den Stämmen OPT1FL1A/B-OPT8FL1A/B führte. Mit Ausnahme der beiden Stämme OPT2FL1A/B (je in Allel 1 integriert) wurden in allen Fällen die P_{OPT} -*ecaFLP*-Fusionen in die zwei unterschiedlichen Allele der Zielgene integriert.

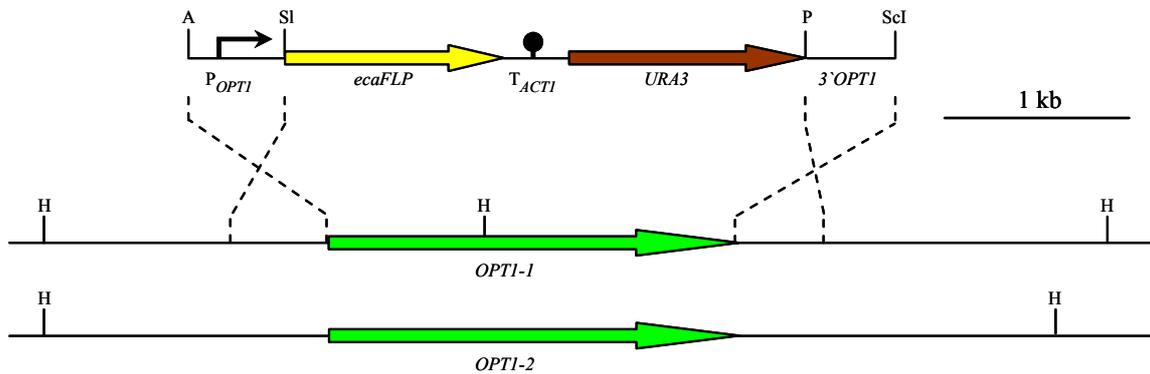


Abbildung 26 Struktur einer *ecaFLP*-Expressionskassette, die dazu verwendet wurde, um *ecaFLP* unter der Kontrolle der *OPT*-Promotoren im Stamm CFI1 zu exprimieren. Die Abbildung zeigt das Plasmid pOPT1FL1 mit P_{OPT1} -*ecaFLP*-Fusion und die Integration in den *OPT1*-Lokus. Analoge Plasmide wurden für alle *OPT*-Promotoren konstruiert: pOPT2FL1 (*OPT2*), pOPT3FL1 (*OPT3*), pOPT4FL1 (*OPT4*), pOPT5FL1 (*OPT5*), pOPT6FL1 (*OPT6*), pOPT7FL1 (*OPT7*), pOPT8FL1 (*OPT8*). Nur relevante Schnittstellen sind angegeben: A, *Apa*I; H, *Hind*III; P, *Pst*I; Scl, *Sac*I; Sl, *Sal*I.

4.7.2 Analyse der P_{OPT} -*ecaFLP*-Reporterstämme

Bevor die Reporterstämme im Tiermodell zum Einsatz kommen, sollten sie *in vitro* getestet werden. Dazu wurde eine YPD-Übernachtskultur aller Stämme 1:100 in YCB-BSA verdünnt. Nach 20 h Wachstum wurden die Stämme in entsprechender Verdünnung auf MPA-Indikatorplatten (1.8 μ g/ml MPA) ausplattiert. Die YPD-Übernachtskultur wurde ebenfalls auf den Indikatorplatten ausplattiert, um sicherzustellen, dass die Stämme MPA-resistent waren, bevor sie ins BSA-Medium überführt wurden. Nach dreitägiger Inkubation der Indikatorplatten bei 30°C wurde der prozentuale Anteil von kleinen Kolonien an der Gesamtzellzahl bestimmt.

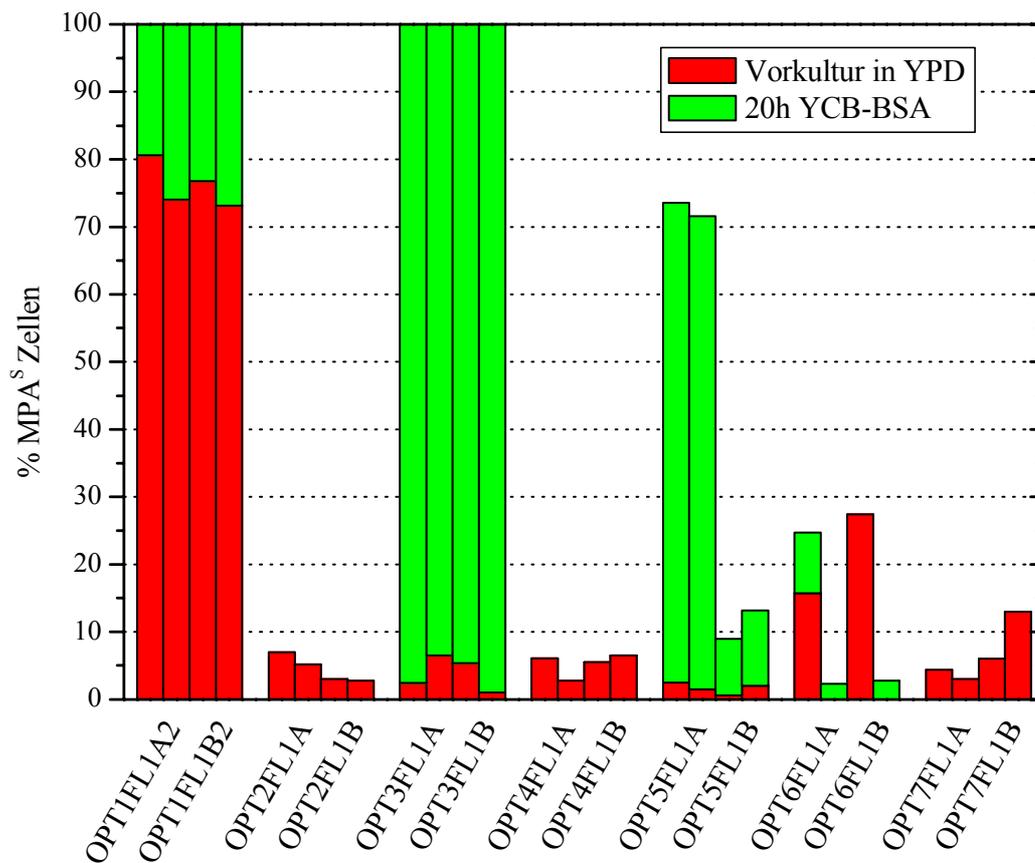


Abbildung 27 Prozentsatz kleiner und somit MPA-sensitiver Zellen auf Indikatorplatten, die 1.8 $\mu\text{g/ml}$ Mycophenolsäure enthielten. Die Zellen wurden nach YPD-Vorkultur 1:100 in YCB-BSA verdünnt, 20 h bei 30°C inkubiert und anschließend in geeigneter Verdünnung auf Indikatorplatten ausplattiert. Die roten Balken entsprechen dem Prozentsatz kleiner Zellen aus der YPD-Vorkultur, die grünen Balken dem Prozentsatz kleiner Zellen aus der YCB-BSA-Kultur. Es sind pro Stamm jeweils zwei unabhängige Experimente dargestellt. Verwendete Stämme: OPT1FL1A2/B2 (*OPT1*), OPT2FL1A/B (*OPT2*), OPT3FL1A/B (*OPT3*), OPT4FL1A/B (*OPT4*), OPT5FL1A/B (*OPT5*), OPT6FL1A/B (*OPT6*), OPT7FL1A/B (*OPT7*).

Abbildung 27 fasst die Ergebnisse der Versuche mit den Stämmen OPT1FL1A2/B2 - OPT7FL1A/B zusammen. Pro Stamm sind jeweils zwei unabhängige Experimente dargestellt. Die roten Balken repräsentieren den Prozentsatz MPA-sensitiver Zellen in der YPD-Vorkultur. Mit Ausnahme von *OPT1* gab es kaum eine Induktion der *OPT*-Gene in YPD-Medium. Dies bestätigt die Ergebnisse aus der FACS-Analyse und der Fluoreszenzmikroskopie, wo ebenfalls keine Induktion der *OPT*-Gene in YPD festgestellt werden konnte. Im Falle der Stämme mit P_{OPT1} -*ecaFLP*-Reporterkonstrukt (OPT1FL1A2/B2) waren stets ca. 70% aller Zellen in der YPD-Übernachtskultur MPA-sensitiv (Abbildung 27). Da in der FACS-Analyse dagegen keine Induktion von P_{OPT1} in YPD festgestellt werden

konnte, lässt dies auf eine transiente Induktion des *OPT1*-Promotors im YPD-Medium schließen, die ausreichend ist, um *ecaFLP* zu exprimieren. Aus diesem Grund können die *P_{OPT1}-ecaFLP*-Reporterstämme nicht im Tiermodell eingesetzt werden. In einigen Experimenten waren auch 15-25% der Zellen mit *P_{OPT6}-ecaFLP*-Reporterkonstrukt (*OPT6FL1A/B*) in der YPD-Übernachtskultur MPA-sensitiv (Abbildung 27). Eine Verwendung dieser Stämme im Tiermodell ist nur nach gründlichem Screening der YPD-Kultur möglich, um sicher zu gehen, dass die im Tiermodell verwendeten Zellen alle MPA-resistent sind. Die Stämme mit *P_{OPT8}-ecaFLP*-Reporterkonstrukt (*OPT8FL1A/B*) lieferten stets bis zu 100% MPA-sensitive Zellen nach YPD-Übernachtskultivierung. Diese Stämme können ebenfalls nicht im Tiermodell eingesetzt werden, da wohl *P_{OPT8}*, ähnlich wie *P_{OPT1}*, in YPD transient induziert wird.

Die grünen Balken stellen den Prozentsatz an MPA-sensitiven Zellen nach 20-stündiger Kultivierung in YCB-BSA dar. Im Falle von *OPT1* und *OPT3* sind 100% aller Zellen nach 20 h in YCB-BSA MPA-sensitiv, was bedeutet, dass die *OPT1*- und *OPT3*-Promotoren sehr stark in Gegenwart von BSA als alleiniger Stickstoffquelle angeschaltet waren und somit eine *FLP*-vermittelte Markerdeletion stattgefunden hat. Im Falle von *OPT5* konnten reproduzierbare Unterschiede in der Induktion der Promotoren der beiden Allele festgestellt werden, was ebenfalls in der FACS-Analyse erkennbar war. So wurde der Promotor des *OPT5-1*-Allels deutlich besser induziert als der Promotor des *OPT5-2*-Allels.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Ergebnisse sehr gut mit den Ergebnissen aus der FACS-Analyse und der Fluoreszenzmikroskopie übereinstimmen. Da die Stämme *in vitro* reproduzierbare Ergebnisse lieferten, können *OPT2FL1A/B* - *OPT7FL1A/B* nun auch im Tiermodell eingesetzt werden.

4.8 Überexpression aller *OPT*-Gene unter Kontrolle des konstitutiven *ADH1*-Promotors

Wie bereits gezeigt wurde, konnten die *opt123Δ*-Triplemutanten nicht auf BSA als alleiniger Stickstoffquelle wachsen. Somit tragen *Opt4p-Opt8p* unter den getesteten Bedingungen nicht zum Wachstum von *C. albicans* auf BSA bei. Um nun zu überprüfen, ob *OPT4-OPT8* keine Oligopeptidtransporter codieren oder ob die Gene unter den getesteten Bedingungen lediglich nicht exprimiert wurden, wurde untersucht, ob die putativen Oligopeptidtransporter *Opt4p-Opt8p* ein Wachstum der Triplemutanten auf BSA als alleiniger Stickstoffquelle ermöglichen, wenn deren Gene unter einem aktiven Promotor exprimiert werden. Für diesen Zweck wurden alle acht *OPT*-Gene unter die Kontrolle des konstitutiv exprimierten *ADH1*-Promotors gestellt und in den *ADH1*-Lokus der *opt123Δ*-Triplemutante *OPT123M4A* integriert.

4.8.1 Konstruktion von Plasmiden, in denen alle *OPT*-Gene unter der Kontrolle des konstitutiv exprimierten *ADH1*-Promotors stehen

Zunächst wurde eine Expressionskassette konstruiert, die nur einmal vorkommende Restriktionsschnittstellen enthält und es dadurch erlaubt alle *OPT*-ORFs zu klonieren (Abbildung 28). Dazu wurde das *ADH1*-Promotorfragment (P_{ADH1}) mit den Primern *ADH13* und *ADH14* (Bereich von -212 bis -4 in Bezug auf das Startcodon) aus genomischer DNA von SC5314 amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde an den eingeführten Schnittstellen *KpnI* und *BglII* gespalten und vor T_{ACT1} anstelle des 5`*CBF1*-Fragments in das *KpnI/BglII*-gespaltene Plasmid pSAT3 (Manjitha Sengupta) kloniert. Das Insert dieses Plasmids pADH1E1 wurde anschließend in den Vektor pBC SK+ (Stratagene) kloniert, was zum Plasmid pADH1E2 führte. Die codierenden Regionen aller *OPT*-Gene wurden mit den in folgender Tabelle aufgelisteten Primern amplifiziert. Die eingeführten Schnittstellen wurden so gewählt, dass sie mit der im Plasmid pADH1E2 enthaltenen *XhoI*- bzw. *BglII*-Schnittstelle kompatibel waren. Zusätzlich wurde darauf geachtet, dass die Schnittstellen nicht im Leseraster der jeweiligen *OPT*-Gene vorkommen.

Primerpaar	Schnittstellen	Gen	Plasmid
OPT100/OPT101	<i>SalI/BglII</i>	<i>OPT1</i>	pOPT1E1 (Allel <i>OPT1-1</i>)
OPT200/OPT201	<i>SalI/BglII</i>	<i>OPT2</i>	pOPT2E1 (Gen <i>OPT2</i>)
OPT300/OPT301	<i>SalI/BglII</i>	<i>OPT3</i>	pOPT3E1A (Allel <i>OPT3-1</i>) pOPT3E1B (Allel <i>OPT3-2</i>)
OPT400/OPT401	<i>XhoI/BglII</i>	<i>OPT4</i>	pOPT4E1 (Allel <i>OPT4-2</i>)
OPT50/OPT51	<i>SalI/BamHI</i>	<i>OPT5</i>	pOPT5E1 (Gen <i>OPT5</i>)
OPT60/OPT61	<i>SalI/BglII</i>	<i>OPT6</i>	pOPT6E1A (Allel <i>OPT6-1</i>) pOPT6E1B (Allel <i>OPT6-2</i>)
OPT70/OPT71	<i>SalI/BglII</i>	<i>OPT7</i>	pOPT7E1A (Allel <i>OPT7-1</i>) pOPT7E1B (Allel <i>OPT7-2</i>)
OPT80/OPT81	<i>XhoI/BglII</i>	<i>OPT8</i>	pOPT8E1A (Allel <i>OPT8-1</i>) pOPT8E1B (Allel <i>OPT8-2</i>)

Tabelle 9 Übersicht über die jeweiligen Primerpaare, die eingeführten Schnittstellen, die amplifizierten Leseraster und die entsprechenden Plasmide.

Die *SalI*- bzw. *XhoI*-Schnittstellen wurden direkt vor das Startcodon der jeweiligen Gene eingeführt. Dementsprechend wurden die *BglII*- bzw. *BamHI*-Schnittstellen direkt nach dem Stoppcodon eingeführt. Die erhaltenen PCR-Produkte wurden anschließend an den eingeführten Schnittstellen gespalten und als [*SalI-BglII*]-, [*XhoI-BglII*]- bzw. [*SalI-BamHI*]-Fragment zwischen P_{ADHI} und T_{ACT1} in den *XhoI/BglII*-gespaltenen Vektor pADH1E2 kloniert (Abbildung 28). Die Namen der erhaltenen Plasmide sind in obiger Tabelle aufgelistet. Alle Plasmide konnten als [*ApaI-SacII*]-Fragment nach Transformation der *opt123Δ*-Triplemutante OPT123M4A über homologe Rekombination in den *ADHI*-Lokus integriert werden.

Mit jeweils zwei unabhängigen Transformanten wurde weitergearbeitet. Tabelle 10 zeigt eine Auflistung aller konstruierten Stämme und deren Ausgangsplasmide. Transformiert wurde in allen Fällen die *opt123Δ*-Triplemutante OPT123M4A (Ausnahme OPT123MC1B: hier wurde OPT123M4B transformiert).

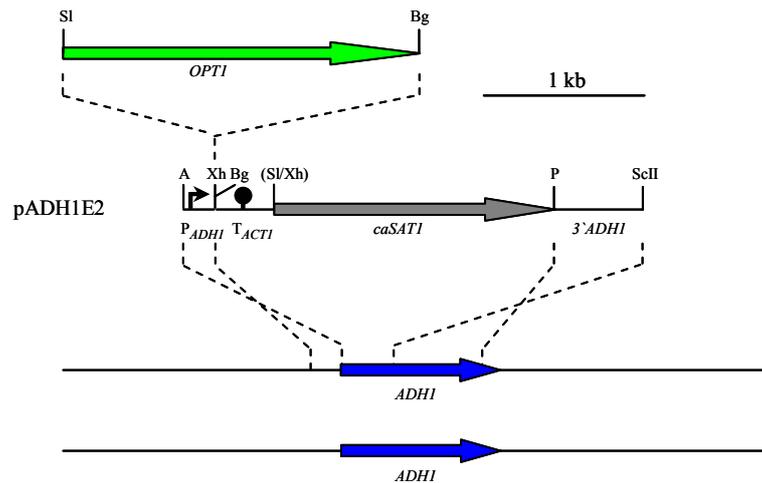


Abbildung 28 Aufbau einer Expressionskassette, die dazu verwendet wurde, um alle *OPT*-Gene unter der Kontrolle des konstitutiven *ADHI*-Promotors in der *opt123Δ*-Triplemutante OPT123M4A zu exprimieren. Die Abbildung zeigt das Plasmid pADH1E2, in welches zwischen P_{ADHI} und T_{ACT1} alle *OPT*-Gene kloniert werden konnten (Beispiel: *OPT1*). Bezeichnung der resultierenden Plasmide: pOPT1E1 (*OPT1*), pOPT2E1 (*OPT2*), pOPT3E1A (*OPT3-1*), pOPT3E1B (*OPT3-2*), pOPT4E1 (*OPT4-2*), pOPT5E1 (*OPT5*), pOPT6E1A (*OPT6-1*), pOPT6E1B (*OPT6-2*), pOPT7E1A (*OPT7-1*), pOPT7E1B (*OPT7-2*), pOPT8E1A (*OPT8-1*), pOPT8E1B (*OPT8-2*). Nur relevante Schnittstellen sind dargestellt: A, *Apa*I; Bg, *Bgl*III; P, *Pst*I; ScII, *Sac*II; Sl, *Sal*I; Xh, *Xho*I.

Stamm	Plasmid	Fusion
OPT123MC1A/B	pADH1E2	P_{ADHI} (Kontrolle)
OPT123ME1A/B	pOPT1E1	P_{ADHI} - <i>OPT1-1</i>
OPT123ME2A/B	pOPT2E1	P_{ADHI} - <i>OPT2</i>
OPT123ME3A1/A2	pOPT3E1A/B	P_{ADHI} - <i>OPT3-1</i>
OPT123ME3B1/B2		P_{ADHI} - <i>OPT3-2</i>
OPT123ME4A/B	pOPT4E1	P_{ADHI} - <i>OPT4-2</i>
OPT123ME5A/B	pOPT5E1	P_{ADHI} - <i>OPT5</i>
OPT123ME6A/B	pOPT6E1	P_{ADHI} - <i>OPT6-1</i>
OPT123ME7A	pOPT7E1A/B	P_{ADHI} - <i>OPT7-1</i>
OPT123ME7B		P_{ADHI} - <i>OPT7-2</i>
OPT123ME8A/B	pOPT8E1	P_{ADHI} - <i>OPT8-1</i>

Tabelle 10 Übersicht über alle Stämme, die intakte Kopien der *OPT*-Gene im *ADHI*-Lokus integriert haben. Als Ausgangsstamm diente die *opt123Δ*-Triplemutante OPT123M4A.

4.8.2 Wachstumstests mit allen *OPT*-überexprimierenden Stämmen auf BSA

Für diesen Wachstumstest wurden die Stämme in SD-Medium vorkultiviert und 1:100 in YCB-BSA überimpft. Nach 18 h und 42 h Wachstum wurden die optischen Dichten der Kulturen bei 600 nm bestimmt. In Abbildung 29 sind die gemessenen Werte aller Stämme nach 18 h und 42 h aufgetragen.

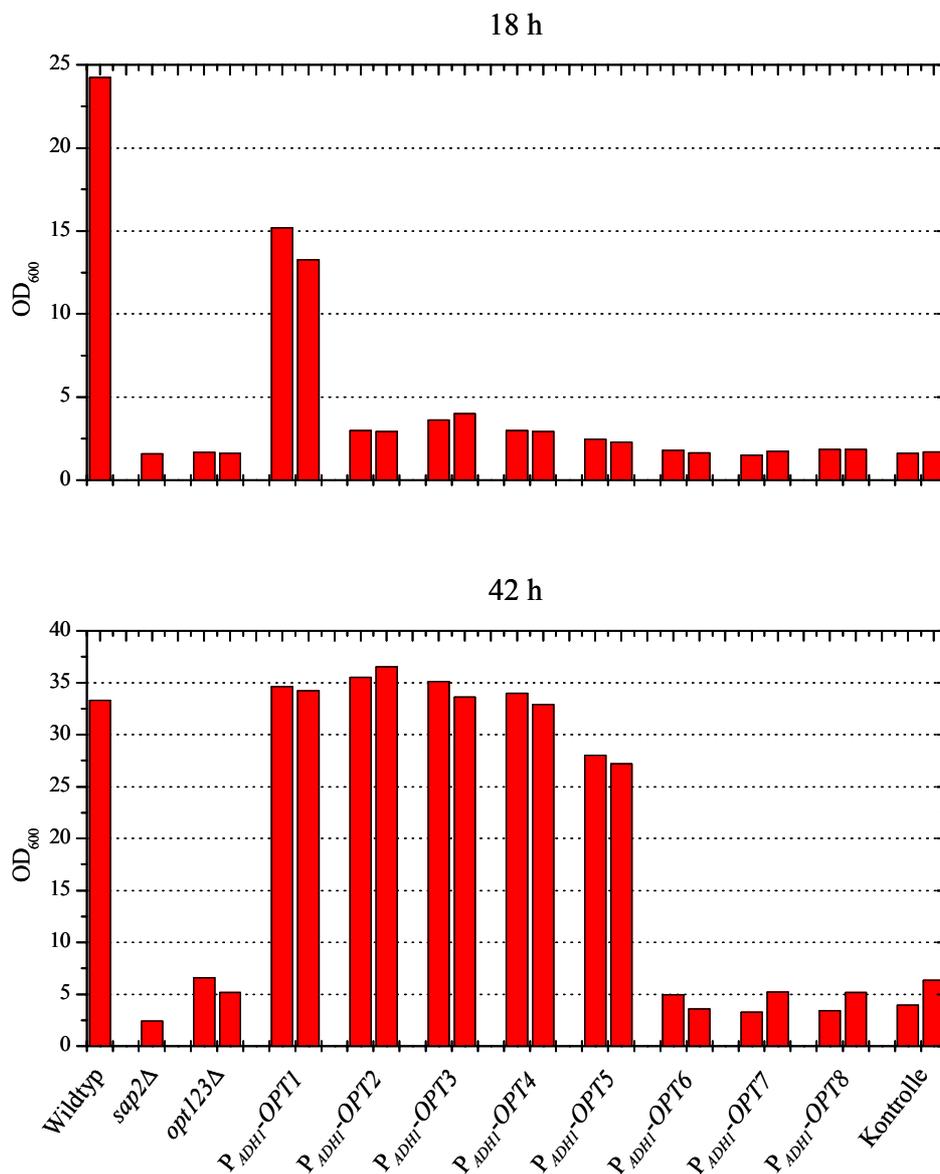


Abbildung 29 Wachstum des Wildtyps SC5314, einer *sap2Δ*-Mutante, der *opt123Δ*-Triplemutanten und *opt123Δ*-Mutanten, die einzelne *OPT*-Gene unter der Kontrolle des *ADHI*-Promotors exprimieren, in YCB-BSA. Der Kontrollstamm enthält ein Kontrollkonstrukt ohne *OPT*-Gen. Zellen aus einer SD-Vorkultur wurden 1:100 in YCB-BSA-Medium verdünnt und bei 30°C inkubiert. Dargestellt ist die optische Dichte der Kulturen nach 18 h und 42 h Wachstum. Folgende Stämme wurden verwendet: SC5314 (Wildtyp), SAP2MS4B (*sap2Δ*), OPT123M4A/B (*opt123Δ*), OPT123ME1A/B (*P_{ADHI}-OPT1*), OPT123ME2A/B (*P_{ADHI}-OPT2*), OPT123ME3A/B (*P_{ADHI}-OPT3*), OPT123ME4A/B (*P_{ADHI}-OPT4*), OPT123ME5A/B (*P_{ADHI}-OPT5*), OPT123ME6A/B (*P_{ADHI}-OPT6*), OPT123ME7A/B (*P_{ADHI}-OPT7*), OPT123ME8A/B (*P_{ADHI}-OPT8*), OPT123MC1A/B (Kontrolle).

Wie erwartet ermöglicht die Expression von *OPT1-OPT3* unter der Kontrolle des *ADHI*-Promotors ein Wachstum der *opt123Δ*-Triplemutanten in YCB-BSA (Abbildung 29). Die Stämme wuchsen allerdings weniger gut als der Wildtyp und benötigten zudem mehr Zeit, um eine ähnliche optische Dichte zu erzielen. Eine Überexpression von *OPT4* und *OPT5* hob ebenfalls den Wachstumsdefekt der Triplemutanten auf, was darauf hindeutet, dass Opt4p und Opt5p funktionelle Oligopeptidtransporter sind (Abbildung 29). Im Vergleich zu den Genen *OPT1-OPT5* zeigte eine Expression der restlichen *OPT*-Gene unter der Kontrolle des *ADHI*-Promotors kein erhöhtes Wachstum der Triplemutanten.

4.8.3 Konstruktion von *opt1234Δ*-Quadruple- und *opt12345Δ*-Quintuplemutanten

Nach längerer Kultivierung der Triplemutanten zeigten auch diese ein erhöhtes Wachstum verglichen mit der *sap2Δ*-Nullmutante, die nicht in der Lage ist das BSA im Medium abzubauen (Abbildung 29; 42 h). Wenn man die *opt123Δ*-Triplemutanten schließlich über drei Tage in YCB-BSA bei 30°C kultivierte, hatten sie eine ähnliche optische Dichte wie der Wildtyp nach einem Tag erreicht (Abbildung 31). Die Vermutung lag nahe, dass das langsame Wachstum der Triplemutanten in YCB-BSA auf die Aufnahme der Peptide durch andere Transporter der Genfamilie (vor allem Opt4p und Opt5p) zurückzuführen ist. Um den Anteil dieser Transporter am Wachstum von *C. albicans* zu untersuchen, wurden Quadruple- und Quintuplemutanten hergestellt und untersucht. In den Quadruplemutanten wurden die Gene *OPT1-OPT4* deletiert, während in den Quintuplemutanten die Gene *OPT1-OPT5* inaktiviert wurden. Dazu wurde analog zu den *opt4Δ*- und *opt5Δ*-Mutanten vorgegangen und die Gene *OPT4* und *OPT5* der Reihe nach ausgehend von den *opt123Δ*-Mutanten OPT123M4A/B deletiert, was zu den *opt1234Δ*-Quadruplemutanten OPT1234M4A/B und den *opt12345Δ*-Quintuplemutanten OPT12345M4A/B führte. Jeder einzelne Schritt wurde mittels Southern-Hybridisierung überprüft.

In Abbildung 30 ist die Southern-Hybridisierung genomischer DNA des Wildtyps SC5314 (Spur 1), heterozygoter und homozygoter *opt1Δ*-Einzelmutanten (Spuren 2-5), *opt123Δ*-Triplemutanten (Spuren 6-9), *opt1234Δ*-Quadruplemutanten (Spuren 10-13) und *opt12345Δ*-Quintuplemutanten (Spuren 14-17) mit den jeweiligen Sonden aus der upstream-Region dargestellt.

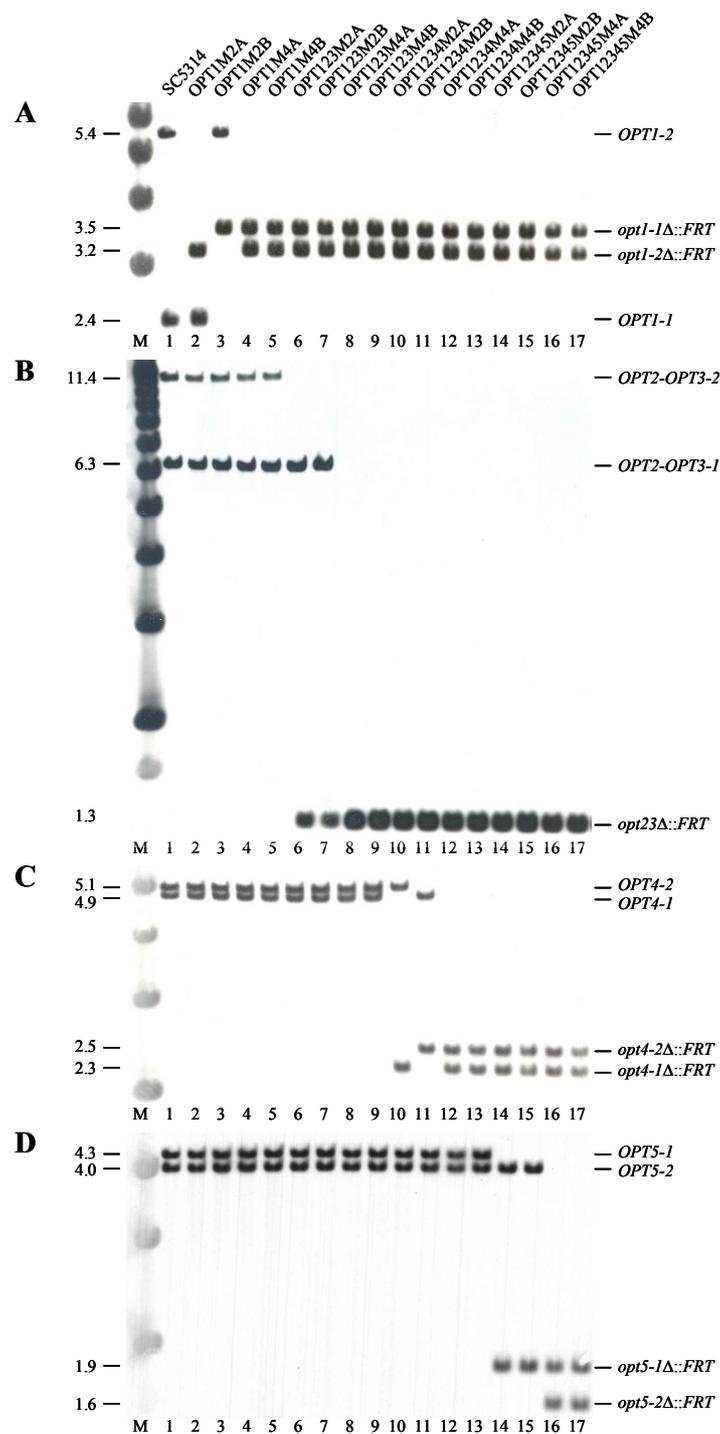


Abbildung 30 Southern-Hybridisierung genomischer DNA des Wildtyps SC5314 (Spur 1) und heterozygoter und homozygoter *opt1Δ*-Einzelmutanten (Spuren 2-5), *opt123Δ*-Triplemutanten (Spuren 6-9), *opt1234Δ*-Quadruplemutanten (Spuren 10-13) und *opt12345Δ*-Quintuplemutanten (Spuren 14-17) mit Sonden der (A) *OPT1*-, (B) *OPT2*-, (C) *OPT4*- und (D) *OPT5*-upstream-Regionen. Ein Aliquot des markierten Markers wurde in allen Fällen mithybridisiert, um den DNA-Größenmarker sichtbar zu machen. Die Korrektheit aller Stämme wurde zusätzlich mit den entsprechenden Sonden aus den downstream-Regionen der jeweiligen Gene sichergestellt. Die genomische DNA wurde mit Restriktionsenzymen verdaut, die es aufgrund von Restriktionspolymorphismen erlauben die beiden Allele des jeweiligen Gens zu unterscheiden: *HindIII* für *OPT1* (A), *SpeI* für *OPT2-OPT3* (B), *EcoRI* für *OPT4* (C) und *NsiI/XhoI* für *OPT5* (D). Zur besseren Übersicht werden nur die hetero- und homozygoten Mutanten gezeigt, bei denen die *SAT1*-Flipper-Kassette deletiert wurde. Die Größe der hybridisierten Fragmente (in kb) sind links angegeben und die entsprechenden Allele auf der rechten Seite. Die polymorphe *SpeI*-Schnittstelle in der Region zwischen *OPT2* und *OPT3* geht mit der Deletion von *OPT2-OPT3* verloren.

In Abbildung 30A ist der Restriktionsverdau genomischer DNA aller oben erwähnten Stämme mit *HindIII* zu sehen. Als Sonde wurde die *OPT1*-upstream-Region verwendet ([*ApaI-XhoI*]-Fragment aus pOPT1M3). Einzelheiten siehe Abbildung 8 und Kapitel 4.3.3.

In Abbildung 30B ist der Restriktionsverdau mit *SpeI* zu sehen. Als Sonde wurde die upstream-Region von *OPT2* eingesetzt ([*ApaI-XhoI*]-Fragment aus pOPT23M2). Auch hier finden sich aufgrund einer polymorphen *SpeI*-site in der Region zwischen den Genen *OPT2* und *OPT3* zwei Banden beim Wildtyp (Spur 1). Die Bande für *OPT2-OPT3-1* läuft bei etwa 6.3 kb, die für *OPT2-OPT3-2* befindet sich bei 11.4 kb. In beiden heterozygoten Mutanten ist zunächst *OPT2-OPT3-2* deletiert, wodurch die wildtypische Bande bei 11.4 kb verschwindet und ein neue bei 1.3 kb erscheint (*opt23Δ*; Spuren 6+7). Nach der Deletion des verbliebenen Allels *OPT2-OPT3-1* verschwindet auch die letzte wildtypische Bande bei 6.3 kb und nur die Bande bei 1.3 kb bleibt zurück (Spuren 8-17). Da sich die polymorphe *SpeI*-site zwischen den Genen befindet und mit der Deletion beider Allele verloren geht, ist nun keine Unterscheidung der Allele mehr möglich.

Abbildung 30C zeigt den Restriktionsverdau der genomischen DNA mit *EcoRI*. Als Sonde kam die upstream-Region von *OPT4* zum Einsatz ([*SacI-SacII*]-Fragment aus pOPT4M2). Die wildtypischen Allele (Spuren 1-9) zeigen aufgrund einer polymorphen *EcoRI*-site in der upstream-Region von *OPT4* zwei Banden. Allel *OPT4-1* läuft bei etwa 4.9 kb, Allel *OPT4-2* bei 5.1 kb. Nach der Deletion von *OPT4-1* verschwindet die wildtypische Bande bei 4.9 kb und eine neue Bande bei etwa 2.3 kb erscheint (*opt4-1Δ*; Spur 10). Durch die Deletion von *OPT4-2* verschwindet entsprechend die Bande bei 5.1 kb und eine neue Bande bei 2.5 kb erscheint (*opt4-2Δ*; Spur 11). In den homozygoten Mutanten sind beide wildtypischen Allele inaktiviert und nur die Banden bei 2.3 kb (*opt4-1Δ*) und 2.5 kb (*opt4-2Δ*; Spuren 12-17) sind vorhanden.

Abbildung 30D zeigt den Restriktionsverdau mit *NsiI/XhoI*. Als Sonde wurde die upstream-Region von *OPT5* verwendet ([*SacI-SacII*]-Fragment aus pOPT5M2). Da sich in der upstream-Region von *OPT5* eine polymorphe *NsiI*-site befindet, lassen sich die beiden wildtypischen *OPT5*-Allele unterscheiden (Spuren 1-13). Die Banden der beiden Allele finden sich bei 4.3 kb (Allel *OPT5-1*) und 4.0 kb (Allel *OPT5-2*). In beiden heterozygoten Mutanten ist zunächst *OPT5-1* deletiert, wodurch die wildtypische Bande bei 4.3 kb verschwindet und eine neue Bande bei etwa 1.9 kb erscheint (*opt5-1Δ*; Spuren 14+15). Nach der Inaktivierung des verbliebenen *OPT5-2*-Allels verschwindet auch die zweite wildtypische Bande bei 4.0 kb und eine neue Bande bei etwa 1.6 kb kommt zum Vorschein (*opt5-2Δ*; Spuren 16+17).

Zusätzlich zur dargestellten Southern-Hybridisierung mit den Sonden aus dem upstream-Bereich der jeweiligen Gene, wurden alle Stämme mit Sonden aus der downstream-Region der Gene überprüft. Zudem wurden nach jeder Deletionsrunde die Mehrfachmutanten in den bereits deletierten Genloki überprüft, um auszuschließen, dass andere im Genom verbliebene *FRT*-sites miteinander rekombinieren (Abbildung 30). Der Restriktionsverdau bei der Überprüfung der Einzelmutanten zeigt ein analoges Bild.

4.8.4 Wachstumstest mit den Mehrfachmutanten auf BSA

Um nun das Wachstum aller Mehrfachmutanten miteinander zu vergleichen, wurden die *opt123Δ*-, *opt1234Δ*- und *opt12345Δ*-Mutanten nach Vorkultivierung in SD-Medium 1:100 in YCB-BSA verdünnt und drei Tage bei 30°C kultiviert, was einer Zeit entspricht in der die Triplemutanten eine ähnliche optische Dichte wie der Wildtyp erreichen. Wie Abbildung 31 zeigt, war das Wachstum der Quadruplemutanten verglichen mit dem Wachstum der Triplemutanten deutlich reduziert. Eine weitere Verlangsamung des Wachstums war im Falle der Quintuplemutanten zu erkennen. Diese Ergebnisse bestätigen die Annahme, dass Opt4p und Opt5p ebenfalls an der Peptidaufnahme beteiligt sind und funktionelle Oligopeptidtransporter darstellen.

Allerdings sind selbst die Quintuplemutanten noch deutlich besser als die *sap2Δ*-Nullmutante gewachsen, was vermuten lässt, dass die Quintuplemutanten über Mechanismen verfügen, die es ihnen ermöglichen BSA-Abbauprodukte für das Wachstum zu verwerten. So kommen zum einen Opt6p-Opt8p in Frage, die andere Aufgaben als Opt1p-Opt5p übernehmen könnten und die BSA-Abbauprodukte somit nur wenig effizient transportieren. Zum anderen wäre denkbar, dass beim BSA-Abbau durch Sap2p auch Di-/Tripeptide oder sogar Aminosäuren freigesetzt werden. Diese könnten durch Di-/Tripeptidtransporter bzw. Aminosäure-Permeasen aufgenommen werden und dadurch ein Wachstum der Quintuplemutanten ermöglichen. Letzteres wird dadurch bekräftigt, dass kürzlich gezeigt wurde, dass durch Sap-Aktivität ebenfalls Aminosäuren entstehen können (Martinez and Ljungdahl, 2005).

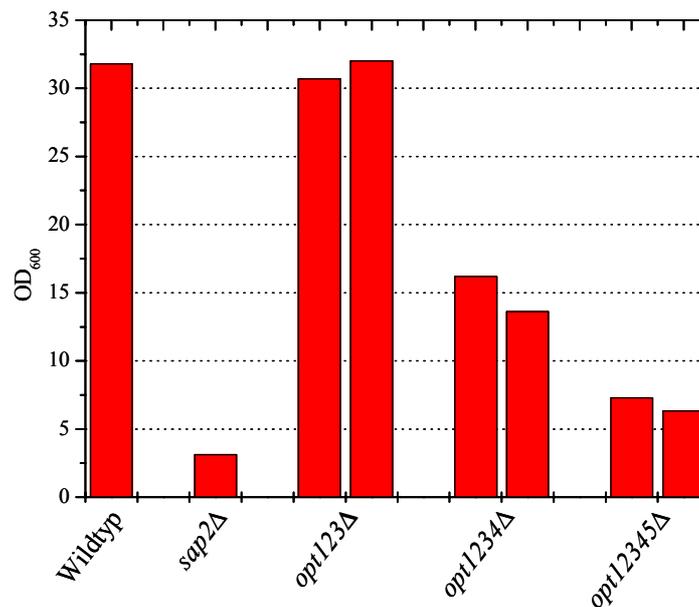


Abbildung 31 Wachstum des Wildtyps SC5314, einer *sap2Δ*-Mutante, der *opt123Δ*-Triplemutanten, der *opt1234Δ*-Quadruplemutanten und der *opt12345Δ*-Quintuplemutanten in YCB-BSA-Medium. Zellen aus einer SD-Vorkultur wurden 1:100 in YCB-BSA verdünnt und 77 h bei 30°C inkubiert. Verwendete Stämme: SC5341 (Wildtyp), SAPMS4B (*sap2Δ*), OPT123M4A/B (*opt123Δ*), OPT1234M4A/B (*opt1234Δ*), OPT12345M4A/B (*opt12345Δ*).

4.8.5 Wachstumstests mit allen *OPT*-überexprimierenden Stämmen auf Tetrapeptiden definierter Zusammensetzung

Die Evolution einer Genfamilie, die für Oligopeptidtransporter in *C. albicans* codiert, weist darauf hin, dass die einzelnen Mitglieder dieser Genfamilie nicht nur differentiell reguliert werden, sondern sich auch funktionell in ihrer Substratpräferenz voneinander unterscheiden können. Dies wurde untersucht, indem die Triplemutanten, die die einzelnen *OPT*-Gene unter der Kontrolle des *ADHI*-Promotors exprimieren, in einem Medium kultiviert wurden, das Tetrapeptide definierter Sequenz (LSKL und LWMR) als alleinige Stickstoffquelle enthielt. Anhand der optischen Dichte nach 18 h und 42 h ließen sich Aussagen über die Substratpräferenz der einzelnen Transporter treffen (Abbildung 32). Zu beachten ist, dass die unterschiedlichen Oligopeptidtransporter nicht notwendigerweise auf gleichem Niveau exprimiert werden und dass Wachstumsunterschiede auch durch Unterschiede in der Menge der exprimierten Transporter zustande kommen können, obwohl die zusätzlichen Kopien der *OPT*-Gene alle vom gleichen Promotor exprimiert werden.

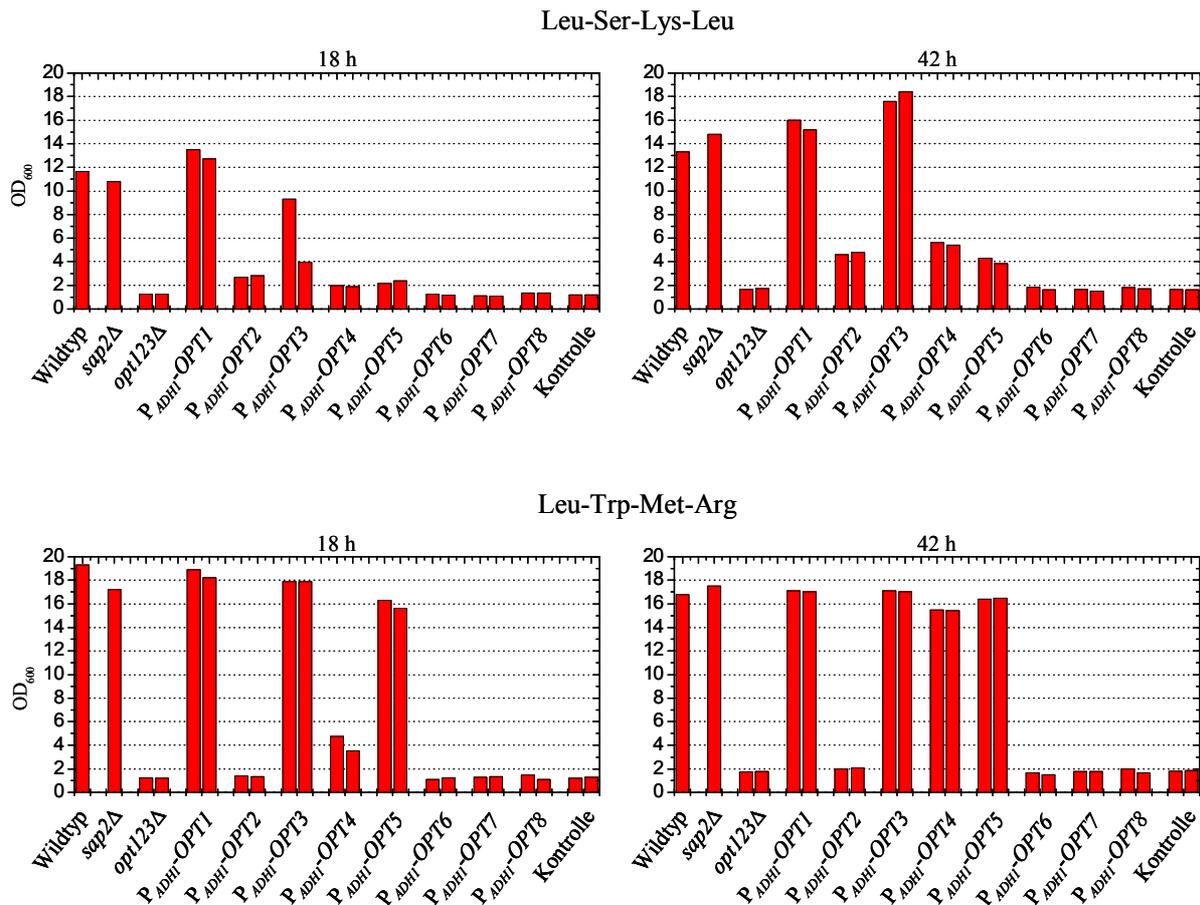


Abbildung 32 Wachstum des Wildtyps SC5314, einer *sap2Δ*-Mutante, der *opt123Δ*-Triplemutanten und *opt123Δ*-Mutanten, die einzelne *OPT*-Gene unter der Kontrolle des *ADHI*-Promotors exprimieren, auf Tetrapeptiden definierter Zusammensetzung. Der Kontrollstamm enthält ein Kontrollkonstrukt ohne *OPT*-Gene. Zellen aus einer SD-Vorkultur wurden 1:100 in einem Medium verdünnt, das das entsprechende Tetrapeptid als alleinige Stickstoffquelle enthält, und bei 30°C inkubiert. Dargestellt ist die optische Dichte der Kulturen nach 18 h und 42 h Wachstum. Folgende Stämme wurden verwendet: SC5314 (Wildtyp), SAP2MS4B (*sap2Δ*), OPT123M4A/B (*opt123Δ*), OPT123ME1A/B (*P_{ADHI}-OPT1*), OPT123ME2A/B (*P_{ADHI}-OPT2*), OPT123ME3A/B (*P_{ADHI}-OPT3*), OPT123ME4A/B (*P_{ADHI}-OPT4*), OPT123ME5A/B (*P_{ADHI}-OPT5*), OPT123ME6A/B (*P_{ADHI}-OPT6*), OPT123ME7A/B (*P_{ADHI}-OPT7*), OPT123ME8A/B (*P_{ADHI}-OPT8*), OPT123MC1A/B (Kontrolle). Der jeweils erste Balken entspricht der A-Reihe, der jeweils zweite Balken der B-Reihe.

Abbildung 32 zeigt die optische Dichte aller Stämme nach 18 h und 42 h Wachstum in einem Medium mit den Tetrapeptiden LSKL bzw. LWMR als alleiniger Stickstoffquelle. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass sich die Oligopeptidtransporter von *C. albicans* in ihrer Substratpräferenz unterscheiden. Auf den ersten Blick wird deutlich, dass das Tetrapeptid LWMR für die Stämme, die *OPT3*, *OPT4* und *OPT5* exprimieren, ein viel besseres Substrat war als LSKL. Genau das Gegenteil war der Fall für die Stämme, die *OPT2* exprimieren. In diesem Fall konnten die Stämme nur auf LSKL wachsen, nicht aber auf LWMR. Sap2p war nicht notwendig für die Stämme, um auf den Tetrapeptiden wachsen zu können, da die *sap2Δ*-

Nullmutante genauso gut wie der Wildtyp SC5314 gewachsen war (Abbildung 32). Ähnlich wie im YCB-BSA-Medium war es den Stämmen, die *OPT6*, *OPT7* und *OPT8* exprimieren, ebenfalls nicht möglich auf den Tetrapeptiden als alleiniger Stickstoffquelle zu wachsen. Diese Stämme verhielten sich wie die Triplemutanten und wie die Stämme mit integriertem Kontrollkonstrukt. Die Daten deuten zusätzlich an, dass die Allelunterschiede einiger *OPT*-Gene ebenfalls funktionelle Konsequenzen haben. So war zum Beispiel der Stamm, der *OPT3-1* exprimiert, nach 18 h deutlich dichter auf LSKL gewachsen als der Stamm, der *OPT3-2* exprimiert (Abbildung 32, 18 h). Nach 42 h hingegen waren beide Stämme gleich dicht gewachsen. Dies wurde mit weiteren unabhängigen Transformanten verifiziert.

4.8.6 Wachstumstests mit allen *OPT*-überexprimierenden Stämmen auf Peptiden definierter Länge und Zusammensetzung

Im Vergleich zu den Di-/Tripeptidtransportern, die Peptide mit zwei oder drei Aminosäuren transportieren, wird beschrieben, dass Oligopeptidtransporter für gewöhnlich Tetra- und Pentapeptide aufnehmen (Hauser *et al.*, 2001). In dieser Arbeit wurde daher zusätzlich untersucht, ob die Oligopeptidtransporter auch längere Peptide transportieren können. Dazu wurden der Wildtyp, die *opt123Δ*-Triplemutanten und die *sap2Δ*-Mutante in einem YCB-Medium kultiviert, das kommerziell erhältliche Peptide mit fünf, sechs, sieben und acht Aminosäuren als alleiniger Stickstoffquelle enthielt. Eine Beschränkung auf diese Stämme war notwendig, da die hier getesteten Peptide sehr teuer sind.

Der Wildtyp SC5314 war in der Lage auf den Pentapeptiden (RPPGF und PGKAR), den Heptapeptiden (RPPGFSP und DRVYIHP) und den Oktapeptiden (RPPGFSP und DRVYIHPF) als alleiniger Stickstoffquelle zu wachsen, während die *opt123Δ*-Triplemutanten viel schlechter oder gar nicht gewachsen waren (Abbildung 33). Mit Ausnahme von DRVYIHP wurden die Peptide vor der Aufnahme vermutlich nicht abgebaut, da die Zugabe des Proteaseinhibitors Pepstatin A das Wachstum des Wildtyps auf diesen Peptiden nicht beeinflusste und die *sap2Δ*-Mutante genauso gut gewachsen war wie der Wildtyp (Abbildung 33). Pepstatin A inhibiert alle SAPs, die für die extrazelluläre proteolytische Aktivität von *C. albicans* verantwortlich gemacht werden (Naglik *et al.*, 2003). Somit war Sap2p nicht notwendig, um auf diesen Peptiden als alleiniger Stickstoffquelle wachsen zu können. Es wurden auch zwei Hexapeptide getestet (6xArg und PGAIPG), auf denen der Wildtyp allerdings nicht wachsen konnte. Diese Ergebnisse weisen stark darauf hin, dass die

Oligopeptidtransporter in *C. albicans* auch längere Peptide (bis zu mindestens acht Aminosäuren) transportieren können.

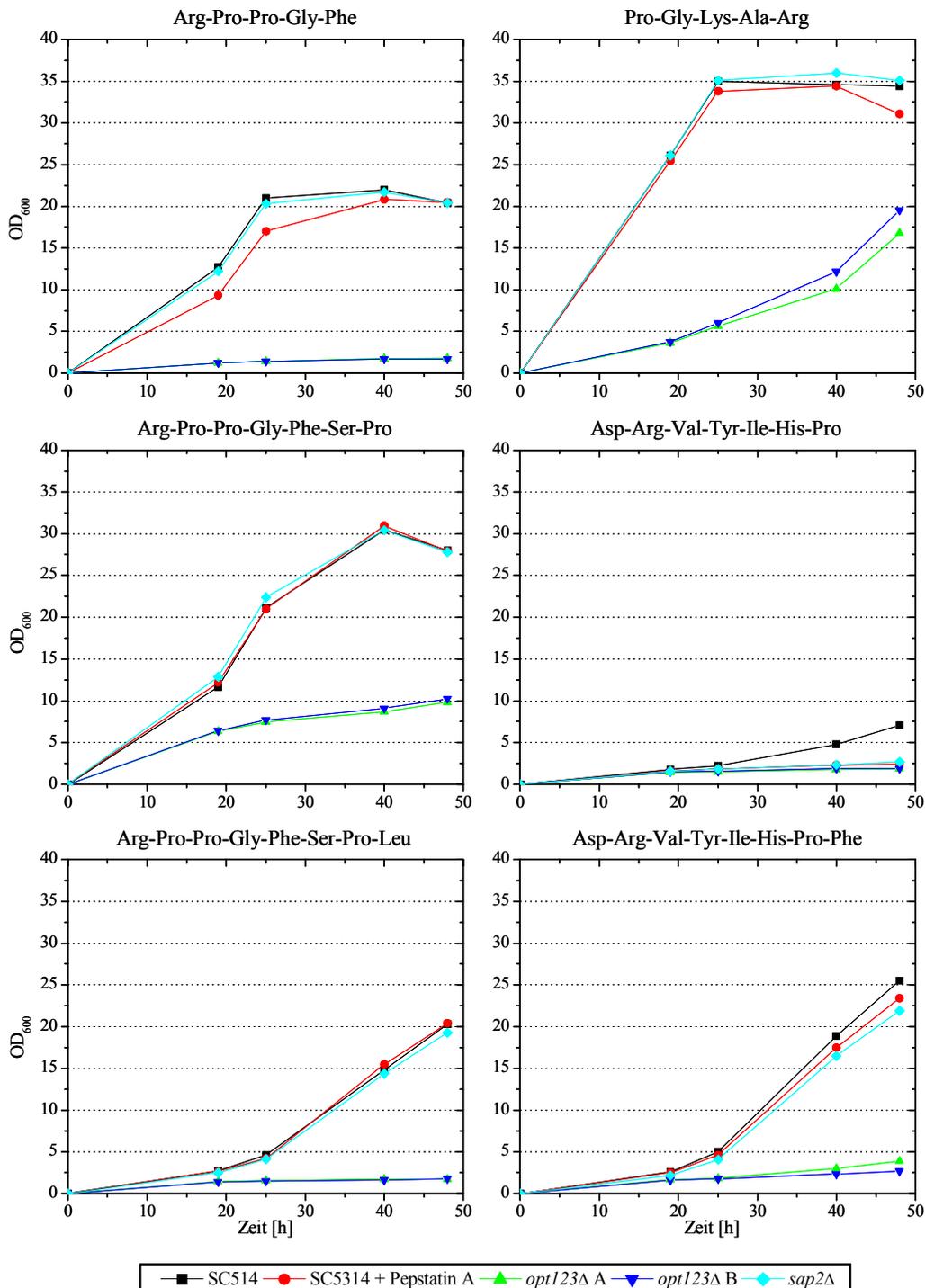


Abbildung 33 Wachstum des Wildtyps SC514 (schwarz), einer *sap2Δ*-Mutante SAP2MS4B (türkis) und der *opt123Δ*-Triplemutanten OPT123M4A/B (grün und blau) in einem Medium, das jeweils die angegebenen Peptide als alleinige Stickstoffquelle enthält. Das Wachstum des Wildtyps auf diesen Peptiden wurden auch in Gegenwart von 5 µg/ml Pepstatin A (rot) überprüft. Die Zugabe von Pepstatin A sollte extrazelluläre Proteasen inhibieren. Zellen einer SD-Vorkultur wurden 1:100 im jeweiligen Medium verdünnt und bei 30°C inkubiert. Die optische Dichte der Kulturen wurde zu den angegebenen Zeiten ermittelt.

Zusammenfassend lässt sich aus diesen Wachstumstests ableiten, dass die Gene *OPT1-OPT5* für funktionelle Oligopeptidtransporter codieren, da sie unter der Kontrolle des *ADHI*-Promotors den Wachstumsdefekt der *opt123Δ*-Triplemutanten kompensieren konnten (Abbildung 29). Zudem gibt es Unterschiede in der Substratpräferenz der einzelnen Oligopeptidtransporter, was am unterschiedlichen Wachstum der Stämme auf verschiedenen Tetrapeptiden deutlich zu erkennen war (Abbildung 32). Schließlich konnte gezeigt werden, dass die Oligopeptidtransporter nicht nur Tetra- und Pentapeptide transportieren können, sondern auch Peptide mit bis zu mindestens acht Aminosäuren Länge (Abbildung 33).

5 Diskussion

In den letzten Jahren wurden beachtliche Fortschritte in der Aufklärung von Virulenzmechanismen von *C. albicans* und anderen humanpathogenen Pilzen gemacht. So wurden z.B. Adhäsine, sekretorische hydrolytische Enzyme und andere Virulenzfaktoren identifiziert, die alle zu einer erfolgreichen Infektion beitragen (Calderone and Fonzi, 2001). Um die Pathogenität von Pilzen allerdings vollständig zu verstehen, ist auch ein Einblick erforderlich, wie diese Organismen ihren Bedarf an Nährstoffen innerhalb des Wirtes sicherstellen. Da *C. albicans* nahezu alle Bereiche des menschlichen Körpers kolonisiert und infiziert (Odds, 1988), muss *C. albicans* in der Lage sein, die Kohlenstoff- und Stickstoffquellen der unterschiedlichen Wirtsnischen zu verwerten. Eine länger bekannte Eigenschaft von *C. albicans* ist die Fähigkeit Aspartylproteasen zu sekretieren, die es dem Pilz ermöglichen Proteine als Stickstoffquelle zu verwerten (Staib, 1965). Da es sich bei diesen Aspartylproteasen um Endoproteasen mit einer breiten Substratspezifität handelt (Monod et al., 2002), sind die Abbauprodukte Peptide verschiedener Länge und Zusammensetzung, die in die Zelle aufgenommen werden müssen, um ein Wachstum in Abwesenheit anderer Stickstoffquellen sicherzustellen. In Pilzen sind zwei Arten von Peptidtransportsystemen bekannt: ein Di-/Tripeptidtransportsystem und ein Oligopeptidtransportsystem (Hauser et al., 2001). Diese Arbeit befasst sich mit den Oligopeptidtransportern, da sie möglicherweise nicht nur für den Transport von Peptiden, die durch den proteolytischen Abbau von Proteinen entstehen, verantwortlich sind, sondern auch als Sensoren für längere extrazelluläre Peptide fungieren. Es wird angenommen, dass diese Peptide als Induktoren für die Expression der Proteasen dienen könnten (Lerner and Goldman, 1993). Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine große Familie von *OPT*-Genen identifiziert und es schien möglich, dass ein oder mehrere Mitglieder dieser Genfamilie Sensorfunktionen übernimmt, wie es auch für andere Mitglieder von Transporterfamilien beschrieben wird (Özcan et al., 1996; Didion et al., 1998; Lorenz and Heitman, 1998; Iraqui et al., 1999; Klasson et al., 1999; Donaton et al., 2003). Frühere Arbeiten zeigten, dass die *SAP2*-Expression notwendig ist, damit *C. albicans* in einem Medium wachsen kann, das Proteine als alleinige Stickstoffquelle enthält (Hube et al., 1994; Staib et al., 2002). So könnte die Inaktivierung eines solchen Sensors dazu führen, dass das *SAP2*-Gen nicht exprimiert wird und infolgedessen die entsprechende Mutante nicht auf Proteinen als alleiniger Stickstoffquelle wachsen kann.

5.1 Identifizierung einer Genfamilie von Oligopeptidtransportern

Die *OPT*-Genfamilie in *C. albicans* besteht aus acht Genen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine große Familie von acht *OPT*-Genen identifiziert, die auf vier verschiedenen Chromosomen lokalisiert sind. In Abhängigkeit der abnehmenden Ähnlichkeit der Genprodukte zu Opt1p wurden die Gene als *OPT2-OPT8* bezeichnet. Beide Allele aller acht Gene wurden kloniert und sequenziert. In sechs von acht Fällen wurden polymorphe Allele identifiziert, die zum Teil nicht in der veröffentlichten *C. albicans*-Genomsequenz vorhanden waren. Lediglich für *OPT2* und *OPT5* konnten keine polymorphen Allele identifiziert werden, wenn auch durch Restriktionspolymorphismen in der upstream- und downstream-Region jeweils eine Unterscheidung beider Allele möglich war. Auf Aminosäureebene unterschieden sich z.B. die *OPT3*-Allele durch acht Aminosäuren, was auch zu einem Unterschied in der Substratpräferenz der beiden Genprodukte führte. So konnte gezeigt werden, dass Triplemutanten, die das Gen *OPT3-1* unter der Kontrolle des *ADH1*-Promotors exprimierten nach 18 h viel besser auf LSKL als alleiniger Stickstoffquelle gewachsen waren als Stämme, die *OPT3-2* unter den gleichen Bedingungen exprimierten.

Die *OPT*-Genfamilien aus *S. cerevisiae* und *A. thaliana*

C. albicans besitzt somit eine viel größere Familie von Oligopeptidtransportern als der in der Regel nicht-pathogene Hefepilz *S. cerevisiae*, der drei Gene (*OPT1*, *OPT2*, *YGL114w*) besitzt, die nachweislich oder mutmaßlich für Oligopeptidtransporter codieren. Allerdings wurde kürzlich berichtet, dass *YGL114w*, das hohe Ähnlichkeit zu *OPT8* aus *C. albicans* aufweist, wohl nicht für einen Oligopeptidtransporter codiert, da sich Ygl114wp strukturell völlig von den anderen Oligopeptidtransportern unterscheidet. Zudem ist *YFL114w* selbst unter der Kontrolle eines starken Promotors nicht in der Lage Peptidtransport zu ermöglichen (Wiles et al., 2006).

Eine ähnlich große Familie von Oligopeptidtransportern wie bei *C. albicans* findet man bei der Pflanze *Arabidopsis thaliana*, die zur Familie der Brassicaceae (Kreuzblütler) gehört und bei der neun Gene (*AtOPT1-AtOPT9*) identifiziert wurden, die für Oligopeptidtransporter codieren. Die physiologische Rolle der *A. thaliana*-Oligopeptidtransporter ist noch nicht geklärt, aber es wird vermutet, dass sie unterschiedliche funktionelle Rollen übernehmen, da sie ein gewebespezifisches Expressionsmuster zeigen (Koh et al., 2002). So ergaben quantitative RT-PCR-Analysen, dass *AtOPT2/AtOPT4* in allen Geweben der Pflanze gleichmäßig exprimiert werden, während *AtOPT3* am stärksten in Blüten, Blättern und

Wurzel, *AtOPT6/AtOPT7* am stärksten in Blüten und Wurzel und *AtOPT1/AtOPT5* am stärksten in der Blüte exprimiert werden. Weiterhin wurde die biochemische Funktion der verschiedenen *AtOptp* untersucht. Dazu wurden zunächst deren cDNA hinter einen konstitutiv exprimierten Promotor (*ADH*) kloniert. Das Konstrukt wurde dann in einen Leucin-auxotrophen *S. cerevisiae* Stamm transformiert. Die Transportaktivität der einzelnen Transporter wurde ermittelt, indem verschiedene Leucin-haltige Tetra- und Pentapeptide darauf getestet wurden, ob sie ein prototrophes Wachstum der Stämme ermöglichen. Die Stämme konnten nur wachsen, wenn die Zellen diese Peptide transportieren und verwerten konnten. Die Versuche zeigten, dass von den sieben getesteten *AtOptp* (*AtOpt1p-AtOpt7p*) fünf als funktionelle Pentapeptid-Transporter fungierten (*AtOpt1p, 4p, 5p, 6p, 7p*), wobei *AtOpt4p* zusätzlich Tetrapeptide transportierte. Es wurde berichtet, dass *Opt1p* aus *S. cerevisiae* Leu-enkephalin (YGGFL), Met-Enkephalin (YGGFM; (Hauser *et al.*, 2000)) und Glutathion (Bourbouloux *et al.*, 2000) transportieren kann. Im Falle von *AtOpt1p-AtOpt7p* konnte diese Beobachtung allerdings nicht gemacht werden. Auch waren *AtOpt1p-AtOpt7p* nicht in der Lage, ausgewählte Di- und Tripeptide zu transportieren (Koh *et al.*, 2002). Antisense-silencing von *AtOPT2* (Song *et al.*, 1997) und T-DNA Mutationen von *AtOPT3* (Stacey *et al.*, 2002) führten zu einem starken Defekt in der Samen- und Embryonalentwicklung von *A. thaliana*, was darauf hinweist, dass die Oligopeptidtransporter zusätzlich am Transport von wichtigen Wachstumsregulatoren beteiligt sein könnten.

5.2 Etablierung des *SAT1-Flippers* zur Gendeletion in SC5314

In der vorliegenden Arbeit wurden zunächst alle acht *OPT*-Gene einzeln inaktiviert, um deren Rolle bei der Induktion der *SAP2*-Expression und bei der Aufnahme der proteolytischen Abbauprodukte von *Sap2p* zu untersuchen. Für diesen Zweck wurde ein neues Gendeletionssystem etabliert, das es erlaubt, Gene direkt im Wildtyp SC5314 zu deletieren. In diesem System kommt ein neuer dominanter an *C. albicans* angepasster Selektionsmarker, *caSAT1*, zum Einsatz, der Resistenz gegen Nourseothricin verleiht. Dieses Antibiotikum, welches als Komplex der Streptothricine F und D von *Streptomyces noursei* produziert wird, hemmt die Synthese ribosomaler Proteine und induziert ein Miscoding. Das *sat-1*-Gen stammt ursprünglich aus *E. coli* und codiert für eine Streptothricin-Acetyltransferase (SAT), die durch Übertragung eines Acetylrestes auf Nourseothricin dieses inaktiviert.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass das als *SAT1-Flipper* bezeichnete Gendeletionssystem eine sehr effiziente Methode ist, um homozygote knock-out-Mutanten im

C. albicans-Wildtyp zu konstruieren. Dabei umgeht der *SATI*-Flipper alle Probleme, die durch die Verwendung auxotropher Ausgangsstämme entstehen können.

Der in diesem System verwendete Nourseothricin-Resistenzmarker *caSATI* ist dem zweiten verfügbaren dominanten Selektionsmarker für *C. albicans* (MPA^R) überlegen. Dieser MPA^R -Marker verleiht Resistenz gegen Mycophenolsäure (MPA). Ein Nachteil beim Einsatz des MPA^R -Markers ist, dass die Selektion MPA-resistenter Transformanten fünf bis sieben Tage in Anspruch nimmt. Ein weiteres Problem ergibt sich aus der Tatsache, dass der MPA^R -Marker ein mutiertes Derivat des *C. albicans-IMH3*-Gens ist, das für das Zielenzym der Mycophenolsäure, die Inosin-Monophosphat-Dehydrogenase, codiert. Dadurch hat in vielen Fällen ein großer Teil der MPA-resistenten Transformanten den MPA^R -Marker gegen das genomische *IMH3*-Gen ausgetauscht und nicht den MPA^R -Marker im Zielgenlocus integriert (Wirsching et al., 2000b). Deswegen müssen in der Regel eine große Anzahl von Transformanten untersucht werden, um Klone zu identifizieren, die den MPA^R -Marker wie gewünscht im Zielgenlocus integriert haben und somit ein Allel des Zielgens inaktiviert haben. Mit dem *SATI*-Flipper erhält man dagegen bereits nach 24 h Transformanten, die zum größten Teil die *SATI*-Flipper-Kassette korrekt im Zielgenlocus integriert haben.

Ein ähnlicher Nourseothricin-Resistenzmarker (SAT-1) wurde auch von einer anderen Gruppe beschrieben (Roemer et al., 2003). Diese Gruppe exprimiert ebenfalls das *sat-1*-Gen aus *E. coli* unter der Kontrolle des *C. albicans ACT1*-Promotors. Allerdings benutzten sie den SAT-1-Marker zusammen mit dem *HIS3*-Marker, um beide wildtypischen Allele des Zielgens in einem Histidin-auxotrophen Stamm zu deletieren. Nourseothricin wurde in einer Konzentration von 400 µg/ml eingesetzt und der Selektion der Transformanten ging eine Vorkultivierung auf YPD-Agarplatten über Nacht voraus, um den SAT-1-Marker zu exprimieren bevor die Kolonien auf Selektionsplatten überstempelt wurden. Nourseothricin-resistente Transformanten erhielt man nach 48 h. Im Falle des *SATI*-Flippers dieser Arbeit gestaltet sich die Selektion Nourseothricin-resistenter Transformanten einfacher. Eine Vorkultivierung elektrotransformierter Zellen für 4 h in flüssigem YPD-Medium war ausreichend, um die Expression des *caSATI*-Markers zu ermöglichen. Die Zellen konnten direkt im Anschluss auf Selektionsplatten, die 200 µg/ml Nourseothricin enthielten, ausplattiert werden und Nourseothricin-resistente Transformanten konnten nach 24 h isoliert werden. Nach mehreren Tagen Inkubation wurden spontan-resistente untransformierte Zellen entdeckt, die allerdings nicht die Resistenz von Zellen, die den *SATI*-Flipper integriert haben, erreichten und somit leicht von diesen unterschieden werden konnten.

Kürzlich wurde ein ähnliches Selektionssystem wie der *SATI*-Flipper vorgestellt (Shen *et al.*, 2005). Bei diesem System handelt es sich um den so genannten *caNATI*-Flipper, der analog zum hier vorgestellten Flipper-System anstelle des *sat-1*-Gens aus *E. coli* das an *C. albicans* angepasste Resistenzgen *nat1* aus *Streptomyces noursei* enthält. Auch mit diesem System waren eine effiziente Deletion des Zielgens und ein Markerrecycling möglich. Die Selektion der Transformanten wurde über 1-2 Tage auf YPD-Platten mit 450 µg/ml Nourseothricin durchgeführt.

In einer anderen Arbeit wurde ein weiterer dominanter Selektionsmarker für den Einsatz in *C. albicans* beschrieben (Seyfang and Jin, 2004). Dabei handelt es sich um den *Hyg_{Calb}*-Marker, der Resistenz gegen Hygromycin B verleiht. Die Autoren passten im Rahmen dieser Arbeit das *Hyg*-Resistenzgen durch mehrfache site-spezifische Mutagenese an den Codongebrauch von *C. albicans* an und konnten den Marker erfolgreich einsetzen, um ein Allel eines Gens, das einen putativen Transporter codiert (*CaTP*), im Wildtyp SC5314 zu inaktivieren.

Da drei unabhängige dominante Selektionsmarker (*caSAT1*, *MPA^R* und *Hyg_{Calb}*) für *C. albicans* verfügbar sind, ist es möglich beide Allele eines Zielgens in einem prototrophen Stamm zu inaktivieren und die resultierende homozygote Mutante zu komplementieren, ohne den Marker recyceln zu müssen. Allerdings bringt die Möglichkeit den Marker zu recyceln einige Vorteile mit sich. Ein entscheidender Vorteil ist, dass sich die homozygoten Mutanten nach dem Markerrecycling lediglich durch das Fehlen des Zielgens vom Ausgangsstamm unterscheiden. Obwohl bis jetzt keine Effekte des *MPA^R*-Markers oder des *caSAT1*-Markers auf den Phänotyp von *C. albicans* bekannt sind, ist es nur von Vorteil, wenn spezifische Nullmutanten keine Selektionsmarker enthalten, die auch im wildtypischen Kontrollstamm nicht vorhanden sind. Zudem ist es durch ein Markerrecycling möglich, Mutanten zu konstruieren, in denen mehrere Gene deletiert wurden. Das Markerrecycling ist außerdem unter Verwendung des *SATI*-Flippers unkompliziert und benötigt keine zusätzlichen toxischen Verbindungen, wie FOA, das verwendet wird, um *ura3*-negative Derivate mit der *URA3*-blaster-Methode zu erhalten. Wenn man alle Vorteile zusammen nimmt, stellt der *SATI*-Flipper ein optimales Werkzeug dar, um zielgerichtet Gene in *C. albicans* zu inaktivieren.

5.3 Funktionelle Analyse der *OPT*-Genfamilie

Die Einzelmutanten *opt1Δ-opt8Δ* zeigen keinen Wachstumsdefekt in BSA-Medium

Die konstruierten *opt1Δ-opt8Δ*-Einzelmutanten konnten ohne Probleme und ähnlich wie der Wildtyp SC5314 auf BSA als alleiniger Stickstoffquelle wachsen. Dies weist darauf hin, dass kein einzelnes *OPT*-Gen allein für den Transport von Oligopeptiden und/oder für die Induktion von *SAP2* verantwortlich ist. Versuche mit einem toxischen Peptid zeigten eine Resistenz der *opt1Δ*-Mutanten gegenüber KLEth, was darauf hindeutet, dass unter den getesteten Bedingungen Opt1p den größten Anteil am Transport dieses Tetrapeptides übernimmt. Dies deckt sich mit früheren Ergebnissen. Lubkowitz und Kollegen zeigten, dass eine vorher gegen KLEth resistente *S. cerevisiae ptr2*-Mutante nach Integration des *CaOPT1*-Gens sensitiv gegenüber KLEth wurde (Lubkowitz *et al.*, 1997).

Die *opt123Δ*-Triplemutanten sind nicht in der Lage auf BSA als alleiniger Stickstoffquelle zu wachsen

Die Wachstumstests der Einzelmutanten auf BSA als alleiniger Stickstoffquelle deuteten darauf hin, dass die Oligopeptidtransporter zumindest teilweise redundante Funktionen beim Peptidtransport übernehmen. Aus diesem Grund wurden *opt123Δ*-Triplemutanten konstruiert. Die *opt123Δ*-Triplemutanten zeigten einen schweren Wachstumsdefekt in einem Medium mit BSA als alleiniger Stickstoffquelle. Übernachtskulturen der *opt123Δ*-Triplemutanten in YCB-BSA wiesen die gleiche optische Dichte wie eine *sap2Δ*-Mutante auf, die praktisch nicht in diesem Medium wachsen kann, da sie mangels Sap2p nicht in der Lage ist das BSA im Medium abzubauen. Eine Reintegration einer intakten Kopie von *OPT1*, *OPT2* oder *OPT3* war ausreichend, um das Wachstum der Triplemutanten in YCB-BSA wieder herzustellen. Allerdings konnten die Triplemutanten im Gegensatz zur *sap2Δ*-Mutante sehr langsam in diesem Medium wachsen. Nach längerer Inkubation (77 h) waren die Triplemutanten bis auf Wildtyp-Niveau herangewachsen. Für dieses langsame Wachstum waren unter anderem Opt4p und Opt5p verantwortlich, da durch schrittweise Deletion der Gene *OPT4* und *OPT5* die Wachstumsfähigkeit der entsprechenden *opt1234Δ*-Quadruple- und *opt12345Δ*-Quintuplemutanten weiter eingeschränkt wurde. Allerdings konnten die Quintuplemutanten immer noch etwas besser als die *sap2Δ*-Mutante auf BSA wachsen. Dies kann auf verschiedene Faktoren zurückgeführt werden. So könnten z.B. Opt6p-Opt8p an dem Restwachstum beteiligt sein. Es ist vorstellbar, dass diese Transporter Oligopeptide sehr ineffizient transportieren und daher sehr viel Zeit benötigen. Auch könnte nach sehr langer

Inkubation das BSA im Medium zu Di-/Tripeptiden und sogar zu Aminosäuren abgebaut werden oder zerfallen. Diese Abbauprodukte könnten von Transportern der PTR-Familie oder von Aminosäure-Permeasen aufgenommen werden, um ein Wachstum zu ermöglichen. *C. albicans* besitzt zwei Gene, die für Di-/Tripeptidtransporter codieren. Dabei handelt es sich um *PTR2* (Basrai *et al.*, 1995) und um ein weiteres Gen (orf 19.6937), das mehr Ähnlichkeit zu *PTR2* aus *S. cerevisiae* hat und *PTR22* genannt wurde (unveröffentlichte Ergebnisse). Prinzipiell deutet der Wachstumsdefekt der *opt123Δ*-Triple-, *opt1234Δ*-Quadruple- und der *opt12345Δ*-Quintuplemutanten in YCB-BSA jedoch darauf hin, dass durch den proteolytischen Abbau von BSA größtenteils längere Peptide entstehen, die nicht von den Di-/Tripeptidtransportern aufgenommen werden können.

Die Oligopeptidtransporter sind nicht in der Lage die *SAP2*-Expression zu induzieren

Wie bereits beschrieben wurde, waren die Mehrfachmutanten nicht in der Lage auf BSA als alleiniger Stickstoffquelle zu wachsen. Dieser Defekt war allerdings nicht auf das Unvermögen der Mutanten, die Proteaseexpression zu induzieren, zurückzuführen. So konnte gezeigt werden, dass der *SAP2*-Promotor sowohl in den *opt123Δ*- als auch in den *opt12345Δ*-Mutanten in gleichem Maße wie im Wildtyp induziert wurde. Dies wurde mittels einer *P_{SAP2-1}-GFP*-Fusion untersucht, die in den Wildtyp SC5314 und in die Triple- und Quintuplemutanten integriert wurde (Abbildung 17 und Daten nicht gezeigt). In allen drei Fällen konnte eine ähnlich starke Fluoreszenz nach 18 h Wachstum in YCB-BSA-HE beobachtet werden, was bedeutet, dass der *SAP2*-Promotor in allen Fällen gleich stark induziert wurde. Daher kann davon ausgegangen werden, dass die OPTs nicht an der Regulation der *SAP2*-Expression beteiligt sind. Untermuert wird dies durch die Tatsache, dass im Überstand von Übernachtskulturen in YCB-BSA-HE vom Wildtyp SC5314, der Triple- und Quintuplemutanten vergleichbare Mengen an Sap2p gefunden wurden (Abbildung 18 und Daten nicht gezeigt). Auch ließ sich der Wachstumsdefekt der Triplemutanten nicht durch eine gezielte Expression von *SAP2* mithilfe des Tetracyclin-induzierbaren Promotors P_{Tet} kompensieren.

Da auch *opt67Δ*-Doppelmutanten keinen Wachstumsdefekt in YCB-BSA zeigten (Daten nicht gezeigt), deuten alle Ergebnisse darauf hin, dass die Oligopeptidtransporter nicht als Peptidsensoren fungieren und nicht für die Induktion der *SAP2*-Expression benötigt werden. Tatsächlich wurde kürzlich beschrieben, dass geringe Konzentrationen von Aminosäuren durch Sap-Aktivität entstehen können und diese die *SAP2*-Expression über ein Sensorsystem

induzieren (Martinez and Ljungdahl, 2005). Die Anwesenheit von extrazellulären Aminosäuren wird durch den SPS-Sensor in der Zytoplasmamembran wahrgenommen und das Signal wird durch proteolytische Aktivierung des Transkriptionsfaktors Stp1p übertragen. Das aktivierte Stp1p gelangt in den Zellkern und induziert daraufhin die Expression von *SAP2*, *PTR2*, *OPT1* und *OPT3* (Martinez and Ljungdahl, 2005). In früheren Studien hingegen wurde berichtet, dass Peptide mit mindestens acht Aminosäuren eine Proteaseexpression induzierten, während die meisten kleineren Peptide dies nicht taten (Lerner and Goldman, 1993). Denkbar wäre allerdings, dass in letzteren Experimenten die Peptide abgebaut wurden und somit wiederum Aminosäuren verantwortlich für die Induktion der *SAP2*-Expression waren. Peptide, die in diesen Experimenten nicht induzierend wirkten, stellten evtl. kein Substrat für die Proteasen dar, weshalb keine Aminosäuren zur Induktion freigesetzt werden konnten.

***OPT1*, *OPT3* und *OPT5* werden zusammen mit *SAP2* in Gegenwart von BSA exprimiert**

Die *opt123Δ*-Triplemutanten zeigten einen starken Wachstumsdefekt auf BSA als alleiniger Stickstoffquelle, der nicht durch Opt4p-Opt8p kompensiert werden konnte. Dies deutet an, dass Opt4p-Opt8p entweder die Sap2p-Abbauprodukte von BSA nicht effizient transportieren können oder unter den getesteten Bedingungen nicht exprimiert werden.

Um zwischen diesen beiden Möglichkeiten zu unterscheiden, wurde das Expressionsmuster der *OPT*-Gene mithilfe von P_{OPT} -*GFP*-Fusionen untersucht. Sowohl unter dem Fluoreszenzmikroskop als auch durch FACS-Analyse konnte beobachtet werden, dass *OPT1*, *OPT3* und *OPT5* zusammen mit *SAP2* in YCB-BSA-Medium induziert wurden. Dabei wurde *OPT3* am stärksten induziert, gefolgt von *OPT1* und *OPT5*, das kaum induziert wurde. Mit Ausnahme von *OPT5* entspricht dies genau den Genen, die durch den aktivierten Transkriptionsfaktor Stp1p aufgrund mikromolarer Konzentrationen an Aminosäuren im Außenmedium induziert werden (Martinez and Ljungdahl, 2005). Deshalb könnten es tatsächlich extrazelluläre Aminosäuren in mikromolarer Konzentration anstelle von Peptiden sein, die von *C. albicans* wahrgenommen werden und über den SPS-Sensor die Anwesenheit von Proteinen im Medium signalisieren. Daraufhin wird die Expression von Komponenten induziert, die für die Verwertung dieser Stickstoffquelle notwendig sind, die sekretorische Aspartylprotease Sap2p und die Oligopeptidtransporter. Hohe Konzentrationen an Aminosäuren im Außenmedium reprimieren allerdings die Expression dieser Gene. Dafür sprechen auch die Beobachtungen, dass die *OPT*-Gene und *SAP2* in Vollmedium, in dem

Stickstoffquellen und Aminosäuren reichlich vorhanden sind, nicht exprimiert wurden. Für die Reporterstämme konnte in YPD-Medium keine Fluoreszenz beobachtet werden.

Allerdings konnte unter den getesteten Bedingungen keine Induktion von *OPT2* in YCB-BSA festgestellt werden, obwohl eine Reintegration von *OPT2* in den Originallokus der Triplemutante deren Wachstumsdefekt aufhob. Zunächst wurde vermutet, dass *OPT2* nur in der Abwesenheit von *OPT1* und *OPT3* hochreguliert wird, um deren Fehlen zu kompensieren. Um dieser Möglichkeit nachzugehen, wurde ein P_{OPT2} -GFP-Reporterkonstrukt in die Triplemutanten integriert. Allerdings konnte mit den erhaltenen Stämmen auch keine Fluoreszenz in BSA-Medium detektiert werden, was darauf hindeutet, dass *OPT2* auch in Abwesenheit von *OPT1* und *OPT3* auf BSA als alleiniger Stickstoffquelle nicht induziert wird. Womöglich findet eine Hochregulierung von *OPT2* aber auf posttranskriptioneller Ebene statt, die mit dem benutzten Reportersystem nicht greifbar ist. Auch ist vorstellbar, dass im *OPT2*-Gen Sequenzen vorhanden sind, die für die Regulation wichtig sind und die aber im Reporterkonstrukt fehlen.

Eine differentielle Expression einzelner Mitglieder einer Genfamilie von *C. albicans* wurde schon in früheren Experimenten beobachtet (Staib et al., 2000b). So waren *SAP5* und *SAP6* stark aktiviert während der Infektion der Ösophagusschleimhaut in einem entsprechenden Mausmodell. Für *SAP1-SAP4* konnte in diesem Mausmodell dagegen kaum eine Induktion festgestellt werden. In einem Peritonitis-Mausmodell war bereits 30 min nach der Beimpfung mit *C. albicans* das *SAP5*-Gen signifikant induziert, während *SAP2* und *SAP6* erst nach 48 h induziert wurden. In einem Mausmodell disseminierter Candidiasis war die Aktivierung der *SAP*-Gene abhängig von der Infektionsdosis. So wurde *SAP2* bei höherer Infektionsdosis stärker induziert als bei niedriger Dosis. Genau das Gegenteil war der Fall bei *SAP5* und *SAP6*, die beide durch niedrigere Infektionsdosen stärker induziert wurden (Staib et al., 2000b).

Einzelne Mitglieder der *OPT*-Genfamilie können durch Tetra-, Penta- und Oktapeptide induziert werden

Zusätzlich wurde die Induktion der Gene, die in YCB-BSA exprimiert wurden (*OPT1*, *OPT3*, *OPT5* und *SAP2*), durch die Peptide LWMR, PGKAR und RPPGFSPL untersucht. Nach 10 h bzw. 20 h Wachstum konnte in allen Fällen nur eine Induktion von *OPT1* und *OPT3*, nicht aber von *OPT5* und *SAP2* festgestellt werden. Auffällig war, dass *OPT3* besser durch LWMR und RPPGFSPL induziert werden konnte, während *OPT1* eindeutig von PGKAR besser

induziert wurde. Auch gab es Unterschiede im Expressionsniveau in Abhängigkeit von der Zeit. So war die Expression der Gene mit LWMR und RPPGFSPL als Stickstoffquelle jeweils nach 20 h höher als nach 10 h. Das Gegenteil war der Fall mit PGKAR als Stickstoffquelle. Dies deutet an, in welcher Phase des Wachstums auf den jeweiligen Peptiden als alleiniger Stickstoffquelle, welche *OPT*-Gene induziert werden. Dennoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass mikromolare Konzentrationen von Aminosäuren in den erworbenen Peptiden vorhanden waren, die sich für die Induktion der Gene verantwortlich zeigten.

Untersuchung der Genexpression mithilfe eines *ecaFLP*-Reportersystems

In den beiden vorangegangenen Kapiteln wurde das Expressionsmuster der *OPT*-Gene *in vitro* unter bestimmten Wachstumsbedingungen diskutiert. Das dort eingesetzte Reportersystem eignet sich nur bedingt für *in vivo* Untersuchungen im Mausmodell, da mit *GFP*-Reporterkonstrukten z.B. transiente Induktionen von Promotoren *in vivo* nur mit großem Aufwand nachzuweisen sind. Ein derartiges Reportersystem wurde in der Vergangenheit dennoch erfolgreich eingesetzt, um die Expression von *SAP1-SAP6* in einem Mausmodell vaginaler Candidose zu untersuchen (Taylor et al., 2005). Mit einem *ecaFLP*-Reportersystem gestaltet es sich einfacher, Expressionsmuster von Genen *in vivo* zu untersuchen. Dieses Reportersystem wurde ebenfalls schon erfolgreich in *C. albicans* eingesetzt, um das Expressionsmuster einzelner Mitglieder der *SAP*-Genfamilie während einer Infektion in verschiedenen Mausmodellen zu analysieren (Staib et al., 2000b). In den hier eingesetzten *ecaFLP*-Reporterkonstrukten steht das an *C. albicans* adaptierte Gen für die FLP-Rekombinase (*ecaFLP*) unter der Kontrolle der einzelnen *OPT*-Promotoren. Wird während einer Infektion mit den jeweiligen Reporterstämmen der jeweilige *OPT*-Promotor induziert, wird die FLP-Rekombinase exprimiert und der im Genom integrierte *MPA^R*-Marker durch Rekombination der beiden flankierenden *FRT*-sites aus dem Genom geschnitten. Da dieser Vorgang irreversibel ist, wird das Ereignis auf die Nachkommenzellen weitervererbt, wodurch auch kurzfristige Aktivierungen von Promotoren nachweisbar sind. Die erhaltenen Stämme sind nun sensitiv gegenüber Mycophenolsäure, während die Zellen, in denen das Zielgen nicht aktiviert wurde, weiterhin resistent sind. Plattiert man die Zellen auf geeignete Indikatorplatten mit geringer Konzentration an Mycophenolsäure aus, können die resistenten Zellen normal wachsen, während die sensitiven Zellen sehr kleine Kolonien bilden. Der Prozentsatz an kleinen Kolonien auf diesen Platten gibt einen Hinweis darauf, wie viele Zellen der untersuchten Population den Marker verloren haben, und somit auf die Stärke der

Induktion des jeweiligen *OPT*-Promotors. Jede Kolonie ist aus einer Zelle hervorgegangen, somit ist eine Untersuchung auf Einzelzellebene möglich. Da das Rekombinationsereignis an die Nachkommenzellen weitervererbt wird, eignet sich dieses Reportersystem hervorragend für *in vivo* Studien. Nach erfolgreicher Infektion von Mäusen können die Zellen aus den Organen und zu verschiedenen Zeitpunkten wiedergewonnen und auf Indikatorplatten ausplattiert werden. Die Bestimmung des Prozentsatzes an kleinen Kolonien gibt schließlich an, welches *OPT*-Gen *in vivo* exprimiert wurde. Allerdings kommt es nur zu einer Deletion des Markers, wenn genügend FLP-Rekombinase exprimiert wird, d.h. die Induktion des Zielgens muss über einen bestimmten Schwellenwert erfolgen. Somit erhält man aus den Experimenten mit diesem System eine „ja/nein“-Antwort, ob ein Zielgen induziert wurde oder nicht. Ob ein Gen wieder abgeschaltet oder mehrfach induziert wird, kann mit diesem System nicht ermittelt werden.

Bevor die Reporterstämme im Mausmodell eingesetzt werden, sollten die Stämme *in vitro* getestet werden. Idealerweise sollten *C. albicans*-Zellen aus einer Vorkultur, mit der die Mäuse infiziert werden, MPA-resistent sein. Nur so kann nach Reisolation der Zellen aus der Maus von MPA-sensitiven Zellen auf eine Aktivität des jeweiligen Promotors *in vivo* geschlossen werden. Um die Reporterstämme *in vitro* zu testen, wurden sie nach Vorkultivierung in YPD-Medium über Nacht in YCB-BSA inkubiert und auf Indikatorplatten ausplattiert. Im YPD-Medium war mit Ausnahme von P_{OPT1} , P_{OPT6} und P_{OPT8} kein weiterer Zielgenpromotor induziert. P_{OPT1} war wohl während der Kultivierung in YPD transient aktiviert, wodurch bei ca. 70% aller Zellen der MPA^R -Marker deletiert wurde. Ähnlich verhält es sich bei P_{OPT8} . Die jeweiligen Reporterstämme waren nach Kultivierung in YPD stets bis zu 100% MPA-sensitiv. Diese Reporterstämme eignen sich demnach nicht für den Einsatz im Mausmodell. Die Reporterstämme mit $P_{OPT6-ecaFLP}$ -Fusion waren in einigen, aber nicht allen, YPD-Vorkulturen zu 15-25% MPA-sensitiv. Diese Reporterstämme eignen sich daher nur bedingt zum Einsatz im Mausmodell, d.h. die Stämme sollten nur nach sorgfältigem Screening der Vorkultur im Mausmodell eingesetzt werden.

Im YCB-BSA-Medium wurde ein ähnliches Expressionsmuster der *OPT*-Gene wie mit den *GFP*-Reporterstämmen ermittelt. So waren *OPT1* und *OPT3* sehr stark induziert (100% MPA-sensitive Kolonien), während *OPT5* nur schwach induziert war. Der Unterschied zwischen *OPT5-1* und *OPT5-2*, wie er auch im Durchflusszytometer reproduzierbar erkennbar war, konnte mit diesem System bestätigt werden. So scheint tatsächlich *OPT5-1* etwas stärker in YCB-BSA induziert zu sein als *OPT5-2*. Somit bestätigen diese Ergebnisse die Daten, die

durch das *GFP*-Reportersystem erhalten wurden. Allerdings konnte mit den *GFP*-Reporterstämmen ein Unterschied in der Induktionsstärke von P_{OPT1} und P_{OPT3} in Gegenwart von BSA als alleiniger Stickstoffquelle festgestellt werden, was mit diesem System aufgrund der hohen Sensitivität nicht möglich war.

In Zukunft sollen diese Reporterstämmen in verschiedenen Mausmodellen zum Einsatz kommen, um zu untersuchen, welche *OPT*-Gene zu welchen Zeitpunkten der Infektion aktiv sind. Auch lassen sich mit diesem System Wirtsnischen identifizieren, in denen die *OPT*-Gene induziert werden.

Die Oligopeptidtransporter können Peptide mit bis zu mindestens acht Aminosäuren transportieren

Weiterhin wurde gezeigt, dass die Oligopeptidtransporter der *OPT*-Genfamilie Peptide, die länger als fünf Aminosäuren sind, transportieren können. So konnten der Wildtyp SC5314 und eine *sap2Δ*-Mutante auf Peptiden mit sieben (RPPGFSP) oder acht Aminosäuren (RPPGFSPPL und DRVYIHPF) als alleiniger Stickstoffquelle wachsen, während die *opt123Δ*-Triplemutanten dies nicht konnten. Die Tatsache, dass die *sap2Δ*-Mutante und der Wildtyp SC5314 in Gegenwart von Pepstatin A auf diesen Peptiden wachsen konnten, weist darauf hin, dass die Peptide vor der Aufnahme in die Zelle nicht abgebaut werden müssen. Pepstatin A ist ein Inhibitor aller sekretorischen Aspartatproteasen, die für alle extrazellulären proteolytischen Aktivitäten von *C. albicans* verantwortlich gemacht werden (Naglik *et al.*, 2003). Allerdings wurden kürzlich zwei neue Klassen extrazellulärer Proteasen in *C. albicans* identifiziert. Dabei handelt es sich um eine Metallo- und um eine Serinprotease. Die Serinprotease war dabei über einen großen pH-Bereich aktiv und war in der Lage menschliche Serumproteine und Komponenten der extrazellulären Matrix abzubauen. In YCB-BSA-Medium konnten die Autoren allerdings nur eine Aktivität von Aspartatproteasen und nicht von Metallo- oder Serinproteasen beobachten (dos Santos *et al.*, 2006). Dennoch kann nun nicht mehr vollständig ausgeschlossen werden, dass die Peptide im vorliegenden Experiment vor der Aufnahme abgebaut wurden. Trotzdem deuten die Ergebnisse an, dass der Umfang an Substraten, die durch die Oligopeptidtransporter aufgenommen werden, deutlich größer ist als in früheren Arbeiten angenommen (Hauser *et al.*, 2001).

Da in dieser Arbeit Peptide mit maximal acht Aminosäuren eingesetzt wurden, sollten zukünftige Experimente zeigen, ob auch Peptide mit mehr als acht Aminosäuren transportiert werden. Dabei kann man den bisherigen Versuchsansatz unberührt lassen und nur die Peptide

gegen längere ersetzen. Dabei sollten auch geeignete Inhibitoren für Metallo- und Serinproteasen verwendet werden.

***OPT1-OPT5* codieren für funktionelle Oligopeptidtransporter**

In der vorliegenden Arbeit wurde weiterhin untersucht, ob die Gene *OPT4-OPT8* den Wachstumsdefekt der *opt123Δ*-Triplemutanten dann kompensieren können, wenn sie unter der Kontrolle eines starken, konstitutiv exprimierten Promotors stehen. Dazu wurden alle *OPT*-Gene unter die Kontrolle des *ADHI*-Promotors gestellt und in den *ADHI*-Lokus der *opt123Δ*-Triplemutante integriert. Das Wachstum der erhaltenen Stämme in Gegenwart von BSA als alleiniger Stickstoffquelle wurde anschließend mit dem der Triplemutanten, die ein Kontrollkonstrukt ohne *OPT*-Gen enthielten, verglichen. Nach 42-stündigem Wachstum erreichten die Stämme, die *OPT1-OPT5* unter der Kontrolle des *ADHI*-Promotors exprimieren, eine ähnlich hohe Wachstumsdichte wie der Wildtyp, wenn auch durch langsames Wachstum. Die Triplemutanten, die ein Kontrollkonstrukt oder *OPT6-OPT8* unter der Kontrolle des *ADHI*-Promotors integriert hatten, waren auch nach dieser Zeit kaum gewachsen. Dies deutet stark darauf hin, dass zumindest *OPT1-OPT5* von *C. albicans* funktionelle Oligopeptidtransporter codieren, die die proteolytischen Abbauprodukte von BSA transportieren können. Dieses Ergebnis deckt sich mit den Ergebnissen bisheriger Versuche. So wies z.B. die Komplementation der Triplemutanten mit *OPT1*, *OPT2* oder *OPT3* im entsprechenden Originalloкус bereits daraufhin, dass Opt1p-Opt3p funktionelle Oligopeptidtransporter darstellen. Weiterhin ergaben sich Hinweise darauf, dass auch Opt4p und Opt5p funktionelle Oligopeptidtransporter sind, aus der Tatsache, dass die Deletion von *OPT4* und *OPT5* in den Triplemutanten den Wachstumsdefekt der entsprechenden Mutanten auf BSA als alleiniger Stickstoffquelle deutlich verstärkte. Für Opt6p-Opt8p konnte in keinem der bisherigen Versuche eine Transportaktivität nachgewiesen werden. Dennoch könnten diese Gene für Oligopeptidtransporter codieren, die nur ganz spezielle Substrate aufnehmen können oder andere spezifische Funktionen übernehmen. So könnten sie z.B. nicht in der Plasmamembran lokalisiert sein, sondern vielleicht in der Vakuole. Um dieser Möglichkeit nachzugehen, sollte in der vorliegenden Arbeit auch die Lokalisation der Oligopeptidtransporter in der Zelle untersucht werden. Dazu wurden die Leseraster der *OPT*-Gene mit dem Leseraster des *GFP*-Gens fusioniert und unter der Kontrolle des *ADHI*-Promotors in den *opt123Δ*-Triplemutanten exprimiert. Allerdings waren die Fusionsproteine nicht funktionell, weshalb keine weiteren Untersuchungen möglich waren.

Die Oligopeptidtransporter der *OPT*-Genfamilie zeigen Unterschiede in der Substratpräferenz

In weiteren Versuchen wurden Wachstumstests mit allen Stämmen, die die *OPT*-Gene unter der Kontrolle des *ADHI*-Promotors im *opt123Δ*-Hintergrund exprimieren, auf Tetrapeptiden mit bestimmter Zusammensetzung (LSKL und LWMR) als alleiniger Stickstoffquelle durchgeführt. Dabei wurden Unterschiede in der Substratpräferenz der einzelnen Oligopeptidtransporter beobachtet. Generell lässt sich sagen, dass LWMR ein besseres Substrat als LSKL für die Stämme war, die *OPT3*, *OPT4* und *OPT5* exprimieren. Für Stämme, die *OPT2* exprimieren, verhielt es sich umgekehrt, denn sie konnten auf LSKL wachsen, wenn auch sehr schlecht, während auf LWMR kein Wachstum feststellbar war. Kein großer Unterschied im Wachstum auf beiden Tetrapeptiden konnte für die Stämme festgestellt werden, die *OPT1* exprimieren. Für die restlichen Stämme, die *OPT6*, *OPT7* und *OPT8* exprimieren, konnte, wie auf BSA, kein Wachstum beobachtet werden. Interessanterweise gab es Unterschiede im Wachstum auf LSKL bei den Stämmen, die *OPT3-1* und *OPT3-2* exprimieren. Diese beiden polymorphen Allele des gleichen Gens unterscheiden sich in 86 Nukleotidaustauschen, die in acht Aminosäureaustauschen resultieren. So konnte der Stamm, der *OPT3-1* exprimiert, auf LSKL nach 18 h deutlich besser wachsen als der Stamm, der *OPT3-2* exprimiert. Dieser Unterschied konnte mit einem zweiten Satz an Stämmen bestätigt werden. Nach 42 h allerdings war dieser Unterschied verschwunden und beide Stämme waren ähnlich stark gewachsen. Dies zeigt eindeutig, dass leichte Unterschiede in der DNA-Sequenz zweier Allele zu deutlichen funktionellen Unterschieden führen können. Für die Aufnahme beider Tetrapeptide war *SAP2* nicht notwendig, da eine *sap2Δ*-Mutante genauso gut gewachsen war wie der Wildtyp. Somit wurden die Peptide vermutlich direkt von den Oligopeptidtransportern aufgenommen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Oligopeptidtransporter, neben ihrer differentiellen Regulierung, auch funktionell breit gefächert sind. Dies stellt sicher, dass eine Vielzahl unterschiedlichster Peptide in effizienter Weise in die Zelle aufgenommen werden kann. Die Evolution der *OPT*-Genfamilie könnte demnach zusammen mit der *SAP*-Genfamilie zu einer optimalen Anpassung von *C. albicans* an seinen Wirt beigetragen haben, indem beide Familien es dem Pilz ermöglichen auf Proteinen zu wachsen, wenn andere Stickstoffquellen fehlen.

Die Quintuplemutanten zeigen im Mausmodell einer disseminierten Candidiasis keinen Virulenzdefekt

Um festzustellen, ob die Oligopeptidtransporter für eine erfolgreiche Infektion in einem Mausmodell einer disseminierten Candidiasis notwendig sind, wurden mit den *opt12345Δ*-Quintuplemutanten erste Tierversuche (intravenöse Infektion) durchgeführt. Allerdings verhielten sich die *opt12345Δ*-Quintuplemutanten in diesem Mausmodell ähnlich virulent wie der Wildtyp SC5314 (K. Schröppel, persönliche Information), was andeutet, dass die Oligopeptidtransporter für eine erfolgreiche Infektion über den Blutkreislauf nicht benötigt werden. So kann man annehmen, dass in den Wirtsnischen dieses Tiermodells *C. albicans* Zugriff auf andere Stickstoffquellen hat und nicht auf die Aufnahme von Oligopeptiden angewiesen ist. Tatsächlich wird diskutiert, dass *C. albicans* während einer systemischen Infektion Aminosäuren als Stickstoffquelle verwertet, die im Blut reichlich vorhanden sind (Martinez and Ljungdahl, 2004).

In *C. albicans* Zellen, die von Makrophagen phagozytiert wurden, beobachtete man eine Hochregulation von *OPT2*, *OPT3* und *OPT4* (Lorenz *et al.*, 2004). Genau diese drei *OPT*-Gene sind auch in opaque-Zellen, verglichen mit white-Zellen, hochreguliert (Tsong *et al.*, 2003). Dies deutet an, dass die Oligopeptidtransporter an der Virulenz und sogar am Mating beteiligt sein könnten, denn Zellen der opaque-Phase sind die einzige Form von *C. albicans*, die zum Mating befähigt sind (Soll *et al.*, 2003). Zwei OPTs in anderen Spezies, Isp4p in *S. pombe* und Mtd1p in *S. commune*, wurden ursprünglich durch Experimente entdeckt, die dazu dienten Proteine zu identifizieren, die am Mating beteiligt sind (Sato *et al.*, 1994; Lengeler and Kothe, 1999). Bedingungen, unter denen Pilze sich paaren, sind gleichzeitig auch Bedingungen mit minimalstem Nährstoffangebot. In der Vergangenheit wurde deshalb die Möglichkeit, dass die OPTs am Mating beteiligt sind, schnell mit dem Argument abgetan, dass die Gene einfach aufgrund des Nährstoffmangels hochreguliert wurden. Nun liegen experimentelle Daten für drei *OPT*-Gene vor, die sowohl in opaque-Zellen als auch in Zellen, die durch Makrophagen phagozytiert wurden, hochreguliert sind. Deshalb kann eine Beteiligung der OPTs am Mating oder an der Virulenz von *C. albicans* nicht ausgeschlossen werden (Wiles *et al.*, 2006).

In Zukunft sollte durch den Einsatz weiterer Mausmodelle geklärt werden, ob es Wirtsnischen gibt, in denen die Oligopeptidtransporter, aufgrund des dort herrschenden Nährstoffangebotes, für eine erfolgreiche Infektion notwendig sind.

5.4 Abschließende Wertung und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Familie von acht Genen identifiziert, von denen zumindest *OPT1-OPT5* für funktionelle Oligopeptidtransporter codieren. Zudem wurde eine differentielle Regulation einzelner Mitglieder der *OPT*-Genfamilie nachgewiesen. Außerdem wurde gezeigt, dass der Wachstumsdefekt der Mehrfachmutanten in Gegenwart von BSA als alleiniger Stickstoffquelle nicht auf eine mangelnde Induktion der *SAP2*-Expression zurückzuführen ist. Somit lieferte die Arbeit einen wesentlichen Beitrag zur Aufklärung der *SAP2*-Induktion, indem eine Möglichkeit der Induktion ausgeschlossen werden konnte. Alles weist nun darauf hin, dass Aminosäuren in mikromolarer Konzentration für eine Induktion der *SAP2*-Expression verantwortlich sind (Martinez and Ljungdahl, 2005). Schließlich konnte gezeigt werden, dass die Oligopeptidtransporter unterschiedliche Substratpräferenzen aufweisen und in der Lage sind, Peptide mit bis zu mindestens acht Aminosäuren Länge zu transportieren. Somit ist der Umfang an Peptiden, die transportiert werden, größer als bisher angenommen (Hauser *et al.*, 2001). Zusammenfassend liefert diese Arbeit einen wichtigen Beitrag, um besser verstehen zu können, wie *C. albicans* Proteine als alleinige Stickstoffquelle verwerten kann.

Ziel in der Zukunft sollte es sein, durch Deletion der übrigen *OPT*-Gene in den Quintuplemutanten, *opt12345678Δ*-Mutanten zu konstruieren, in denen keine *OPT*-Gene mehr vorhanden sind. Weiterhin könnten Stämme mit jeweils einem *OPT*-Gen konstruiert werden, indem in diese *opt12345678Δ*-Mutanten einzelne *OPT*-Gene reintegriert werden. Mit den resultierenden Stämmen könnten die Substratpräferenzen der einzelnen Oligopeptidtransporter näher bestimmt werden.

Da das *ecaFLP*-Reportersystem erfolgreich *in vitro* getestet wurde, kann das System nun auch *in vivo* eingesetzt werden, um das Expressionsmuster der *OPT*-Gene in unterschiedlichen Mausmodellen zu untersuchen. Dies liefert Hinweise darauf, in welchen Wirtsnischen und zu welchem Zeitpunkt welche *OPT*-Gene aktiv sind. Auch sollten die Mehrfachmutanten in allen verfügbaren Mausmodellen getestet werden, um zu klären, ob es Wirtsnischen gibt, in denen die Oligopeptidtransporter aufgrund des jeweiligen Nährstoffangebotes für eine Infektion essentiell sind. Die Identifizierung solcher Wirtsnischen wird zu einem besseren Verständnis führen, wie sich *C. albicans* an seinen Wirt anpasst.

Weiterhin sollte zusätzlich der Anteil des PTR-Systems an der Verwertung von Peptiden als alleiniger Stickstoffquelle untersucht werden. So könnte durch Deletion des *PTR2*- und *PTR22*-Gens in den *opt12345Δ*-Mutanten analysiert werden, ob *Ptr2p* und *Ptr22p* für das

Restwachstum der Quintuplemutanten verantwortlich sind. Zusätzlich sollten durch eine Expression der beiden *PTR*-Gene unter dem *ADHI*-Promotor in den Quintuplemutanten die Substratpräferenzen der beiden Di-/Tripeptidtransporter näher bestimmt werden.

Alle diese Versuche werden verstärkt dazu beitragen, besser zu verstehen, wie *C. albicans* Proteine als Stickstoffquelle verwerten kann.

6 Literaturverzeichnis

- Alagramam, K., Naider, F., and Becker, J.M.** (1995). A recognition component of the ubiquitin system is required for peptide transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* **15**, 225-234.
- 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.
- Andreasson, C., and Ljungdahl, P.O.** (2002). Receptor-mediated endoproteolytic activation of two transcription factors in yeast. *Genes Dev* **16**, 3158-3172.
- Andreasson, C., and Ljungdahl, P.O.** (2004). The N-terminal regulatory domain of Stp1p is modular and, fused to an artificial transcription factor, confers full Ssy1p-Ptr3p-Ssy5p sensor control. *Mol Cell Biol* **24**, 7503-7513.
- Bachmair, A., and Varshavsky, A.** (1989). The degradation signal in a short-lived protein. *Cell* **56**, 1019-1032.
- Bachmair, A., Finley, D., and Varshavsky, A.** (1986). In vivo half-life of a protein is a function of its amino-terminal residue. *Science* **234**, 179-186.
- Bader, T.** (2005). Dissertation. Funktionelle Analysen virulenzrelevanter und essentieller Gene in *Candida albicans*. Institut für Molekulare Infektionsbiologie, Bayerische Julius-Maximilians-Universität, Würzburg.
- Bain, J.M., Stubberfield, C., and Gow, N.A.** (2001). Ura-status-dependent adhesion of *Candida albicans* mutants. *FEMS Microbiol Lett* **204**, 323-328.
- Banerjee, A., Ganesan, K., and Datta, A.** (1991). Induction of secretory acid proteinase in *Candida albicans*. *J Gen Microbiol* **137**, 2455-2461.
- Barnes, D., Lai, W., Breslav, M., Naider, F., and Becker, J.M.** (1998). PTR3, a novel gene mediating amino acid-inducible regulation of peptide transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* **29**, 297-310.
- Bartel, B., Wunning, I., and Varshavsky, A.** (1990). The recognition component of the N-end rule pathway. *Embo J* **9**, 3179-3189.
- Basrai, M.A., Zhang, H.L., Miller, D., Naider, F., and Becker, J.M.** (1992). Toxicity of oxalysine and oxalysine-containing peptides against *Candida albicans*: regulation of peptide transport by amino acids. *J Gen Microbiol* **138**, 2353-2362.

- Basrai, M.A., Lubkowitz, M.A., Perry, J.R., Miller, D., Krainer, E., Naider, F., and Becker, J.M.** (1995). Cloning of a *Candida albicans* peptide transport gene. *Microbiology* **141**, 1147-1156.
- Bernard, F., and Andre, B.** (2001). Genetic analysis of the signalling pathway activated by external amino acids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* **41**, 489-502.
- Birnboim, H.C., and Doly, J.** (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**, 1513-1523.
- Bourbouloux, A., Shahi, P., Chakladar, A., Delrot, S., and Bachhawat, A.K.** (2000). Hgt1p, a high affinity glutathione transporter from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **275**, 13259-13265.
- Brand, A., MacCallum, D.M., Brown, A.J., Gow, N.A., and Odds, F.C.** (2004). Ectopic expression of URA3 can influence the virulence phenotypes and proteome of *Candida albicans* but can be overcome by targeted reintegration of URA3 at the RPS10 locus. *Eukaryot Cell* **3**, 900-909.
- Braun, B.R., and Johnson, A.D.** (1997). Control of filament formation in *Candida albicans* by the transcriptional repressor TUP1. *Science* **277**, 105-109.
- Braun, B.R., Kadosh, D., 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.
- 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.
- Brega, E., Zufferey, R., and Mamoun, C.B.** (2004). *Candida albicans* Csy1p is a nutrient sensor important for activation of amino acid uptake and hyphal morphogenesis. *Eukaryot Cell* **3**, 135-143.
- Brown, A.J., and Gow, N.A.** (1999). Regulatory networks controlling *Candida albicans* morphogenesis. *Trends Microbiol* **7**, 333-338.
- Brown, D.H., Jr., Giusani, A.D., Chen, X., and Kumamoto, C.A.** (1999). Filamentous growth of *Candida albicans* in response to physical environmental cues and its regulation by the unique CZF1 gene. *Mol Microbiol* **34**, 651-662.
- Buffo, J., Herman, M.A., and Soll, D.R.** (1984). A characterization of pH-regulated dimorphism in *Candida albicans*. *Mycopathologia* **85**, 21-30.
- Byrd, C., Turner, G.C., and Varshavsky, A.** (1998). The N-end rule pathway controls the import of peptides through degradation of a transcriptional repressor. *Embo J* **17**, 269-277.
- Calderone, R.A., and Fonzi, W.A.** (2001). Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends Microbiol* **9**, 327-335.

- Calderone, R.A., and Gow, N.A.** (2002). Host recognition by *Candida* species. In: R.A. Calderone [ed.], *Candida and Candidiasis*. American Society for Microbiology Press, Washington DC., 67-86.
- Calderone, R.A., Cihlar, R.L., Lee, D.D., Hoberg, K., and Scheld, W.M.** (1985). Yeast adhesion in the pathogenesis of endocarditis due to *Candida albicans*: studies with adherence-negative mutants. *J Infect Dis* **152**, 710-715.
- Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W.W., and Prasher, D.C.** (1994). Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* **263**, 802-805.
- Cheng, S., Nguyen, M.H., Zhang, Z., Jia, H., Handfield, M., and Clancy, C.J.** (2003). Evaluation of the roles of four *Candida albicans* genes in virulence by using gene disruption strains that express URA3 from the native locus. *Infect Immun* **71**, 6101-6103.
- Chu, S., DeRisi, J., Eisen, M., Mulholland, J., Botstein, D., Brown, P.O., and Herskowitz, I.** (1998). The transcriptional program of sporulation in budding yeast. *Science* **282**, 699-705.
- Cole, M.F., Bowen, W.H., Zhao, X.J., and Cihlar, R.L.** (1995). Avirulence of *Candida albicans* auxotrophic mutants in a rat model of oropharyngeal candidiasis. *FEMS Microbiol Lett* **126**, 177-180.
- 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.
- Cotter, G., and Kavanagh, K.** (2000). Adherence mechanisms of *Candida albicans*. *Br J Biomed Sci* **57**, 241-249.
- Csank, C., Schroppel, 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.
- Curie, C., Panaviene, Z., Loulergue, C., Dellaporta, S.L., Briat, J.F., and Walker, E.L.** (2001). Maize yellow stripe1 encodes a membrane protein directly involved in Fe(III) uptake. *Nature* **409**, 346-349.
- Cutler, J.E.** (1991). Putative virulence factors of *Candida albicans*. *Annu Rev Microbiol* **45**, 187-218.
- de Repentigny, L., Aumont, F., Bernard, K., and Belhumeur, P.** (2000). Characterization of binding of *Candida albicans* to small intestinal mucin and its role in adherence to mucosal epithelial cells. *Infect Immun* **68**, 3172-3179.
- Didion, T., Regenber, B., Jorgensen, M.U., Kielland-Brandt, M.C., and Andersen, H.A.** (1998). The permease homologue Ssy1p controls the expression of amino acid and peptide transporter genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* **27**, 643-650.

- Dohmen, R.J., Madura, K., Bartel, B., and Varshavsky, A.** (1991). The N-end rule is mediated by the UBC2(RAD6) ubiquitin-conjugating enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 7351-7355.
- Donaton, M.C., Holsbeeks, I., Lagatie, O., Van Zeebroeck, G., Crauwels, M., Winderickx, J., and Thevelein, J.M.** (2003). The Gap1 general amino acid permease acts as an amino acid sensor for activation of protein kinase A targets in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* **50**, 911-929.
- dos Santos, A.L., de Carvalho, I.M., da Silva, B.A., Portela, M.B., Alviano, C.S., and de Araujo Soares, R.M.** (2006). Secretion of serine peptidase by a clinical strain of *Candida albicans*: influence of growth conditions and cleavage of human serum proteins and extracellular matrix components. *FEMS Immunol Med Microbiol* **46**, 209-220.
- Einsele, H., Heesemann, J., Roggenkamp, A., Hengel, H., and Koszinowski, U.** (2000). Infektionen bei Immunsuppression. In: *Klinische Infektiologie* (Hrsg.: Marre, R., Mertens, T.; Trautmann, M., Vanek E.), Urban & Fischer Verlag, München Jena: 811-835.
- Engelmann, E.** (1999). Sproßpilze. In: *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie* (Hrsg.: Hahn, H., Falke, D., Kauffman, S., Ullmann U.), Springer Verlag Berlin Heidelberg New York: 701-710.
- Fei, Y.J., Romero, M.F., Krause, M., Liu, J.C., Huang, W., Ganapathy, V., and Leibach, F.H.** (2000). A novel H(+)-coupled oligopeptide transporter (OPT3) from *Caenorhabditis elegans* with a predominant function as a H(+) channel and an exclusive expression in neurons. *J Biol Chem* **275**, 9563-9571.
- 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.
- Finlay, B.B., and Falkow, S.** (1989). Common themes in microbial pathogenicity. *Microbiol Rev* **53**, 210-230.
- Fonzi, W.A., and Irwin, M.Y.** (1993). Isogenic strain construction and gene mapping in *Candida albicans*. *Genetics* **134**, 717-728.
- Forsberg, H., and Ljungdahl, P.O.** (2001). Genetic and biochemical analysis of the yeast plasma membrane Ssy1p-Ptr3p-Ssy5p sensor of extracellular amino acids. *Mol Cell Biol* **21**, 814-826.
- Gaber, R.F., Ottow, K., Andersen, H.A., and Kielland-Brandt, M.C.** (2003). Constitutive and hyperresponsive signaling by mutant forms of *Saccharomyces cerevisiae* amino acid sensor Ssy1. *Eukaryot Cell* **2**, 922-929.
- Georgopapadakou, N.H.** (1998). Antifungals: mechanism of action and resistance, established and novel drugs. *Curr Opin Microbiol* **1**, 547-557.
- Germaine, G.R., and Tellefson, L.M.** (1981). Effect of pH and human saliva on protease production by *Candida albicans*. *Infect Immun* **31**, 323-326.

- 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.
- Goldman, R.C., Frost, D.J., Capobianco, J.O., Kadam, S., Rasmussen, R.R., and Abad-Zapatero, C.** (1995). Antifungal drug targets: *Candida* secreted aspartyl protease and fungal wall beta-glucan synthesis. *Infect Agents Dis* **4**, 228-247.
- Hagting, A., Kunji, E.R., Leenhouts, K.J., Poolman, B., and Konings, W.N.** (1994). The di- and tripeptide transport protein of *Lactococcus lactis*. A new type of bacterial peptide transporter. *J Biol Chem* **269**, 11391-11399.
- Hauser, M., Donhardt, A.M., Barnes, D., Naider, F., and Becker, J.M.** (2000). Enkephalins are transported by a novel eukaryotic peptide uptake system. *J Biol Chem* **275**, 3037-3041.
- Hauser, M., Narita, V., Donhardt, A.M., Naider, F., and Becker, J.M.** (2001). Multiplicity and regulation of genes encoding peptide transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Membr Biol* **18**, 105-112.
- Homma, M., Chibana, H., and Tanaka, K.** (1993). Induction of extracellular proteinase in *Candida albicans*. *J Gen Microbiol* **139 Pt 6**, 1187-1193.
- Hoyer, L.L.** (2001). The ALS gene family of *Candida albicans*. *Trends Microbiol* **9**, 176-180.
- Hube, B.** (1996). *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases. *Curr Top Med Mycol* **7**, 55-69.
- Hube, B., Monod, M., Schofield, D.A., 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.
- Hube, B., Sanglard, D., Odds, F.C., Hess, D., Monod, M., Schafer, W., Brown, A.J., and Gow, N.A.** (1997). Disruption of each of the secreted aspartyl proteinase genes *SAP1*, *SAP2*, and *SAP3* of *Candida albicans* attenuates virulence. *Infect Immun* **65**, 3529-3538.
- Iraqui, I., Vissers, S., Bernard, F., de Craene, J.O., Boles, E., Urrestarazu, A., and Andre, B.** (1999). Amino acid signaling in *Saccharomyces cerevisiae*: a permease-like sensor of external amino acids and F-Box protein Grr1p are required for transcriptional induction of the *AGP1* gene, which encodes a broad-specificity amino acid permease. *Mol Cell Biol* **19**, 989-1001.
- Island, M.D., Perry, J.R., Naider, F., and Becker, J.M.** (1991). Isolation and characterization of *S. cerevisiae* mutants deficient in amino acid-inducible peptide transport. *Curr Genet* **20**, 457-463.
- Jorgensen, M.U., Bruun, M.B., Didion, T., and Kielland-Brandt, M.C.** (1998). Mutations in five loci affecting GAP1-independent uptake of neutral amino acids in yeast. *Yeast* **14**, 103-114.

- Joshi, K.R., Solanki, A., and Prakash, P.** (1993). Morphological identification of *Candida* species on glucose agar, rice extract agar and corn meal agar with and without Tween-80. *Indian J Pathol Microbiol* **36**, 48-52.
- Kaminishi, H., Miyaguchi, H., Tamaki, T., Suenaga, N., Hisamatsu, M., Mihashi, I., Matsumoto, H., Maeda, H., and Hagihara, Y.** (1995). Degradation of humoral host defense by *Candida albicans* proteinase. *Infect Immun* **63**, 984-988.
- Kilian, M., Mestecky, J., and Russell, M.W.** (1988). Defense mechanisms involving Fc-dependent functions of immunoglobulin A and their subversion by bacterial immunoglobulin A proteases. *Microbiol Rev* **52**, 296-303.
- Kimura, L.H., and Pearsall, N.N.** (1980). Relationship between germination of *Candida albicans* and increased adherence to human buccal epithelial cells. *Infect Immun* **28**, 464-468.
- King, R.D., Lee, J.C., and Morris, A.L.** (1980). Adherence of *Candida albicans* and other *Candida* species to mucosal epithelial cells. *Infect Immun* **27**, 667-674.
- Kirsch, D.R., and Whitney, R.R.** (1991). Pathogenicity of *Candida albicans* auxotrophic mutants in experimental infections. *Infect Immun* **59**, 3297-3300.
- Klasson, H., Fink, G.R., and Ljungdahl, P.O.** (1999). Ssy1p and Ptr3p are plasma membrane components of a yeast system that senses extracellular amino acids. *Mol Cell Biol* **19**, 5405-5416.
- Koh, S., Wiles, A.M., Sharp, J.S., Naider, F.R., Becker, J.M., and Stacey, G.** (2002). An oligopeptide transporter gene family in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **128**, 21-29.
- Köhler, G.A., 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 signaling components have defects in hyphal development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 13223-13228.
- Kota, J., and Ljungdahl, P.O.** (2005). Specialized membrane-localized chaperones prevent aggregation of polytopic proteins in the ER. *J Cell Biol* **168**, 79-88.
- Krügel, H., Fiedler, G., Haupt, I., Sarfert, E., and Simon, H.** (1988). Analysis of the nourseothricin-resistance gene (*nat*) of *Streptomyces noursei*. *Gene* **62**, 209-217.
- Kullberg, B.J., and Oude Lashof, A.M.** (2002). Epidemiology of opportunistic invasive mycoses. *Eur J Med Res* **7**, 183-191.
- Kurtz, M.B., and Marrinan, J.** (1989). Isolation of *hem3* mutants from *Candida albicans* by sequential gene disruption. *Mol Gen Genet* **217**, 47-52.
- Lay, J., Henry, L.K., Clifford, J., Koltin, Y., Bulawa, C.E., and Becker, J.M.** (1998). Altered expression of selectable marker URA3 in gene-disrupted *Candida albicans* strains complicates interpretation of virulence studies. *Infect Immun* **66**, 5301-5306.

- 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 U S A* **93**, 13217-13222.
- Lehrer, N., Segal, E., Cihlar, R.L., and Calderone, R.A.** (1986). Pathogenesis of vaginal candidiasis: studies with a mutant which has reduced ability to adhere in vitro. *J Med Vet Mycol* **24**, 127-131.
- Leibach, F.H., and Ganapathy, V.** (1996). Peptide transporters in the intestine and the kidney. *Annu Rev Nutr* **16**, 99-119.
- Lengeler, K.B., and Kothe, E.** (1999). Mated: a putative peptide transporter of *Schizophyllum commune* expressed in dikaryons. *Curr Genet* **36**, 159-164.
- Lerner, C.G., and Goldman, R.C.** (1993). Stimuli that induce production of *Candida albicans* extracellular aspartyl proteinase. *J Gen Microbiol* **139**, 1643-1651.
- Leuker, C.E., Hahn, A.M., and Ernst, J.F.** (1992). beta-Galactosidase of *Kluyveromyces lactis* (Lac4p) as reporter of gene expression in *Candida albicans* and *C. tropicalis*. *Mol Gen Genet* **235**, 235-241.
- Liu, H., Styles, C.A., and Fink, G.R.** (1993). Elements of the yeast pheromone response pathway required for filamentous growth of diploids. *Science* **262**, 1741-1744.
- 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.
- Lorenz, M.C., and Heitman, J.** (1998). The MEP2 ammonium permease regulates pseudohyphal differentiation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo J* **17**, 1236-1247.
- Lorenz, M.C., Bender, J.A., and Fink, G.R.** (2004). Transcriptional response of *Candida albicans* upon internalization by macrophages. *Eukaryot Cell* **3**, 1076-1087.
- Louria, D.B., and Brayton, R.G.** (1964). Behavior of *Candida* Cells within Leukocytes. *Proc Soc Exp Biol Med* **115**, 93-98.
- Lubkowitz, M.A., Hauser, L., Breslav, M., Naider, F., and Becker, J.M.** (1997). An oligopeptide transport gene from *Candida albicans*. *Microbiology* **143**, 387-396.
- Lubkowitz, M.A., Barnes, D., Breslav, M., Burchfield, A., Naider, F., and Becker, J.M.** (1998). *Schizosaccharomyces pombe* isp4 encodes a transporter representing a novel family of oligopeptide transporters. *Mol Microbiol* **28**, 729-741.
- Madhani, H.D., and Fink, G.R.** (1997). Combinatorial control required for the specificity of yeast MAPK signaling. *Science* **275**, 1314-1317.

- Maniatis, T., Fritsch, E.F., and Sambrook, J.** (1982). Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Martin, G.S., Mannino, D.M., Eaton, S., and Moss, M.** (2003). The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med* **348**, 1546-1554.
- Martinez, P., and Ljungdahl, P.O.** (2004). An ER packaging chaperone determines the amino acid uptake capacity and virulence of *Candida albicans*. *Mol Microbiol* **51**, 371-384.
- Martinez, P., and Ljungdahl, P.O.** (2005). Divergence of Stp1 and Stp2 transcription factors in *Candida albicans* places virulence factors required for proper nutrient acquisition under amino acid control. *Mol Cell Biol* **25**, 9435-9446.
- Maschmeyer, G., and Ruhnke, M.** (2004). Update on antifungal treatment of invasive *Candida* and *Aspergillus* infections. *Mycoses* **47**, 263-276.
- McCarthy, P.J., Nisbet, L.J., Boehm, J.C., and Kingsbury, W.D.** (1985). Multiplicity of peptide permeases in *Candida albicans*: evidence from novel chromophoric peptides. *J Bacteriol* **162**, 1024-1029.
- McKerrow, J.H., Sun, E., Rosenthal, P.J., and Bouvier, J.** (1993). The proteases and pathogenicity of parasitic protozoa. *Annu Rev Microbiol* **47**, 821-853.
- Milewski, S., Andruskiewicz, R., and Borowski, E.** (1988). Substrate specificity of peptide permeases in *Candida albicans*. *FEMS Microbiol Lett* **50**, 73-78.
- Monod, M., Togni, G., Hube, B., and Sanglard, D.** (1994). Multiplicity of genes encoding secreted aspartic proteinases in *Candida* species. *Mol Microbiol* **13**, 357-368.
- 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.
- Monod, M., Capoccia, S., Lechenne, B., Zaugg, C., Holdom, M., and Jousson, O.** (2002). Secreted proteases from pathogenic fungi. *Int J Med Microbiol* **292**, 405-419.
- Montazeri, M., and Hedrick, H.G.** (1984). Factors affecting spore formation in a *Candida albicans* strain. *Appl Environ Microbiol* **47**, 1341-1342.
- Moran, G., Sullivan, D., Morschhäuser, J., and Coleman, D.** (2002). The *Candida dubliniensis* CdCDR1 gene is not essential for fluconazole resistance. *Antimicrob Agents Chemother* **46**, 2829-2841.
- 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.
- 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.** (2003). *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. *Microbiol Mol Biol Rev* **67**, 400-428, table of contents.
- Navarro-Garcia, F., Sanchez, M., Nombela, C., and Pla, J.** (2001). Virulence genes in the pathogenic yeast *Candida albicans*. *FEMS Microbiol Rev* **25**, 245-268.
- Negredo, A., Monteoliva, L., Gil, C., Pla, J., and Nombela, C.** (1997). Cloning, analysis and one-step disruption of the ARG5,6 gene of *Candida albicans*. *Microbiology* **143** (Pt 2), 297-302.
- Newport, G., and Agabian, N.** (1997). KEX2 influences *Candida albicans* proteinase secretion and hyphal formation. *J Biol Chem* **272**, 28954-28961.
- Odds, F.C.** (1988). *Candida* and candidosis: a review and bibliography. Bailliere Tindallm, London, United Kingdom.
- Odds, F.C.** (1994). Pathogenesis of *Candida* infections. *J Am Acad Dermatol* **31**, S2-5.
- Ogrydziak, D.M.** (1993). Yeast extracellular proteases. *Crit Rev Biotechnol* **13**, 1-55.
- Ohama, T., Suzuki, T., Mori, M., Osawa, S., Ueda, T., Watanabe, K., and Nakase, T.** (1993). Non-universal decoding of the leucine codon CUG in several *Candida* species. *Nucleic Acids Res* **21**, 4039-4045.
- Ollert, M.W., Sohnchen, R., Korting, H.C., Ollert, U., Brautigam, S., and Brautigam, W.** (1993). Mechanisms of adherence of *Candida albicans* to cultured human epidermal keratinocytes. *Infect Immun* **61**, 4560-4568.
- Özcan, S., Dover, J., Rosenwald, A.G., Wölfl, S., and Johnston, M.** (1996). Two glucose transporters in *Saccharomyces cerevisiae* are glucose sensors that generate a signal for induction of gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 12428-12432.
- Park, Y.N., and Morschhäuser, J.** (2005). Tetracycline-inducible gene expression and gene deletion in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* **4**, 1328-1342.
- Payne, J.W., and Shallow, D.A.** (1985). Studies on drug targeting in the pathogenic fungus *Candida albicans*: peptide transport mutants resistant to polyoxins, nikkomycins and bacilysins. *FEMS Microbiol Lett* **28**, 55-60.
- Perry, J.R., Basrai, M.A., Steiner, H.Y., Naidler, F., and Becker, J.M.** (1994). Isolation and characterization of a *Saccharomyces cerevisiae* peptide transport gene. *Mol Cell Biol* **14**, 104-115.

- 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.
- 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.
- 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.
- Roman, G., Meller, V., Wu, K.H., and Davis, R.L.** (1998). The *opt1* gene of *Drosophila melanogaster* encodes a proton-dependent dipeptide transporter. *Am J Physiol* **275**, C857-869.
- Rüchel, R.** (1986). Cleavage of immunoglobulins by pathogenic yeasts of the genus *Candida*. *Microbiol Sci* **3**, 316-319.
- Rüchel, R., Uhlemann, K., and Boning, B.** (1983). Secretion of acid proteinases by different species of the genus *Candida*. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg [A]* **255**, 537-548.
- Saier, M.H., Jr., Eng, B.H., Fard, S., Garg, J., Haggerty, D.A., Hutchinson, W.J., Jack, D.L., Lai, E.C., Liu, H.J., Nusinew, D.P., Omar, A.M., Pao, S.S., Paulsen, I.T., Quan, J.A., Sliwinski, M., Tseng, T.T., Wachi, S., and Young, G.B.** (1999). Phylogenetic characterization of novel transport protein families revealed by genome analyses. *Biochim Biophys Acta* **1422**, 1-56.
- 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 a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487-491.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T.** (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. 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 U S A* **74**, 5463-5467.
- 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.
- Sato, S., Suzuki, H., Widyastuti, U., Hotta, Y., and Tabata, S.** (1994). Identification and characterization of genes induced during sexual differentiation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Curr Genet* **26**, 31-37.
- Schweizer, A., Rupp, S., Taylor, B.N., Rollinghoff, M., and Schroppel, K.** (2000). The TEA/ATTS transcription factor CaTec1p regulates hyphal development and virulence in *Candida albicans*. *Mol Microbiol* **38**, 435-445.

- Seyfang, A., and Jin, J.H.** (2004). Multiple site-directed mutagenesis of more than 10 sites simultaneously and in a single round. *Anal Biochem* **324**, 285-291.
- Shen, J., Guo, W., and Köhler, J.R.** (2005). CaNAT1, a heterologous dominant selectable marker for transformation of *Candida albicans* and other pathogenic *Candida* species. *Infect Immun* **73**, 1239-1242.
- Sobel, J.D.** (1988). Pathogenesis and epidemiology of vulvovaginal candidiasis. *Ann N Y Acad Sci* **544**, 547-557.
- Sobel, J.D.** (1992). Pathogenesis and treatment of recurrent vulvovaginal candidiasis. *Clin Infect Dis* **14 Suppl 1**, S148-153.
- Soll, D.R.** (1997). Gene regulation during high-frequency switching in *Candida albicans*. *Microbiology* **143 (Pt 2)**, 279-288.
- Soll, D.R., Morrow, B., and Srikantha, T.** (1993). High-frequency phenotypic switching in *Candida albicans*. *Trends Genet* **9**, 61-65.
- Soll, D.R., Lockhart, S.R., and Zhao, R.** (2003). Relationship between switching and mating in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* **2**, 390-397.
- Song, W., Koh, S., Czako, M., Marton, L., Drenkard, E., Becker, J.M., and Stacey, G.** (1997). Antisense expression of the peptide transport gene *AtPTR2-B* delays flowering and arrests seed development in transgenic *Arabidopsis* plants. *Plant Physiol* **114**, 927-935.
- Sonneborn, A., Bockmuhl, D.P., and Ernst, J.F.** (1999a). Chlamydospore formation in *Candida albicans* requires the *Efg1p* morphogenetic regulator. *Infect Immun* **67**, 5514-5517.
- Sonneborn, A., Tebarth, B., and Ernst, J.F.** (1999b). 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.
- Spellig, T., Bottin, A., and Kahmann, R.** (1996). Green fluorescent protein (GFP) as a new vital marker in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. *Mol Gen Genet* **252**, 503-509.
- Srikantha, T., Klapach, A., Lorenz, W.W., Tsai, L.K., Laughlin, L.A., Gorman, J.A., and Soll, D.R.** (1996). The sea pansy *Renilla reniformis* luciferase serves as a sensitive bioluminescent reporter for differential gene expression in *Candida albicans*. *J Bacteriol* **178**, 121-129.
- Staab, J.F., and Sundstrom, P.** (1998). Genetic organization and sequence analysis of the hypha-specific cell wall protein gene *HWP1* of *Candida albicans*. *Yeast* **14**, 681-686.

- Staab, J.F., Bradway, S.D., Fidel, P.L., and Sundstrom, P.** (1999). Adhesive and mammalian transglutaminase substrate properties of *Candida albicans* Hwp1. *Science* **283**, 1535-1538.
- Stacey, G., Koh, S., Granger, C., and Becker, J.M.** (2002). Peptide transport in plants. *Trends Plant Sci* **7**, 257-263.
- Staib, F.** (1965). Serum-proteins as nitrogen source for yeastlike fungi. *Sabouraudia* **4**, 187-193.
- Staib, P.** (2001). Dissertation. Analyse der Expression einer Virulenzgenfamilie von *Candida albicans* während der Infektion. Institut für Molekulare Infektionsbiologie, Bayerische Julius-Maximilians-Universität, Würzburg.
- Staib, P., Morschhäuser, J., and Hacker, J.** (2000a). Pilze: Erreger-Wirtsbeziehung, Allgemeine Pathogenese. In: *Klinische Infektiologie* (Hrsg.: Marre, R., Mertens, T.; Trautmann, M., Vanek E.), Urban & Fischer Verlag, München Jena: 28-33.
- Staib, P., Kretschmar, M., Nichterlein, T., Hof, H., and Morschhäuser, J.** (2000b). Differential activation of a *Candida albicans* virulence gene family during infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 6102-6107.
- Staib, P., Moran, G.P., Sullivan, D.J., Coleman, D.C., and Morschhäuser, J.** (2001). Isogenic strain construction and gene targeting in *Candida dubliniensis*. *J Bacteriol* **183**, 2859-2865.
- Staib, P., Kretschmar, M., Nichterlein, T., Hof, H., and Morschhäuser, J.** (2002). Host versus in vitro signals and intrastrain allelic differences in the expression of a *Candida albicans* virulence gene. *Mol Microbiol* **44**, 1351-1366.
- 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.
- 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.
- 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.
- Sundstrom, P., Cutler, J.E., and Staab, J.F.** (2002). Reevaluation of the role of HWP1 in systemic candidiasis by use of *Candida albicans* strains with selectable marker URA3 targeted to the ENO1 locus. *Infect Immun* **70**, 3281-3283.
- Taylor, B.N., Staib, P., Binder, A., Biesemeier, A., Sehna, M., Rollinghoff, M., Morschhäuser, J., and Schroppel, K.** (2005). Profile of *Candida albicans*-secreted aspartic proteinase elicited during vaginal infection. *Infect Immun* **73**, 1828-1835.

- Togni, G., Sanglard, D., Quadroni, M., Foundling, S.I., and Monod, M.** (1996). Acid proteinase secreted by *Candida tropicalis*: functional analysis of preproregion cleavages in *C. tropicalis* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* **142** (Pt 3), 493-503.
- 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.
- Tsuchimori, N., Sharkey, L.L., Fonzi, W.A., French, S.W., Edwards, J.E., Jr., and Filler, S.G.** (2000). Reduced virulence of HWP1-deficient mutants of *Candida albicans* and their interactions with host cells. *Infect Immun* **68**, 1997-2002.
- Turner, G.C., Du, F., and Varshavsky, A.** (2000). Peptides accelerate their uptake by activating a ubiquitin-dependent proteolytic pathway. *Nature* **405**, 579-583.
- Varshavsky, A.** (1996). The N-end rule: functions, mysteries, uses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 12142-12149.
- Velculescu, V.E., Zhang, L., Zhou, W., Vogelstein, J., Basrai, M.A., Bassett, D.E., Jr., Hieter, P., Vogelstein, B., and Kinzler, K.W.** (1997). Characterization of the yeast transcriptome. *Cell* **88**, 243-251.
- Watts, H.J., Cheah, F.S., Hube, B., Sanglard, D., and Gow, N.A.** (1998). Altered adherence in strains of *Candida albicans* harbouring null mutations in secreted aspartic proteinase genes. *FEMS Microbiol Lett* **159**, 129-135.
- 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.
- Wiles, A.M., Naider, F., and Becker, J.M.** (2006). Transmembrane domain prediction and consensus sequence identification of the oligopeptide transport family. *Res Microbiol* **157**, 395-406.
- 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.
- Wilson, R.B., Davis, D., Enloe, B.M., and Mitchell, A.P.** (2000). A recyclable *Candida albicans* URA3 cassette for PCR product-directed gene disruptions. *Yeast* **16**, 65-70.
- Wirsching, S., Michel, S., and Morschhäuser, J.** (2000a). 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.
- Wirsching, S., Michel, S., Köhler, G., and Morschhäuser, J.** (2000b). Activation of the multiple drug resistance gene MDR1 in fluconazole-resistant, clinical *Candida albicans* strains is caused by mutations in a trans-regulatory factor. *J Bacteriol* **182**, 400-404.

- Wirsching, S., Moran, G.P., Sullivan, D.J., Coleman, D.C., and Morschhäuser, J.** (2001). MDR1-mediated drug resistance in *Candida dubliniensis*. *Antimicrob Agents Chemother* **45**, 3416-3421.
- Yadan, J.C., Gonneau, M., Sarthou, P., and Le Goffic, F.** (1984). Sensitivity to nikkomycin Z in *Candida albicans*: role of peptide permeases. *J Bacteriol* **160**, 884-888.
- Yang, C.Y., Dantzig, A.H., and Pidgeon, C.** (1999). Intestinal peptide transport systems and oral drug availability. *Pharm Res* **16**, 1331-1343.
- Yen, M.R., Tseng, Y.H., and Saier, M.H., Jr.** (2001). Maize Yellow Stripe1, an iron-phytosiderophore uptake transporter, is a member of the oligopeptide transporter (OPT) family. *Microbiology* **147**, 2881-2883.

7 Anhang

7.1 Erklärungen

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

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

Würzburg im Juli 2006

Oliver Reuß

7.2 Publikationen und Tagungsbeiträge

Publikationen

Reuß, O., Vik, Á., Kolter, R., and Morschhäuser, J. (2004). The *SATI* flipper, an optimized tool gene disruption in *Candida albicans*. *Gene* **341**: 119-127.

Reuß, O., and Morschhäuser J. (2006). A family of oligopeptide transporters is required for growth of *Candida albicans* on proteins. *Mol Microbiol* **60** (3): 795-812.

Tagungsbeiträge

Reuß, O., Vik, Á., Kolter, R., und Morschhäuser, J. Der *SATI*-Flipper, ein neues Werkzeug zur Gendeletion in *Candida albicans*-Wildstämmen. Tagung der DGHM Fachgruppe „Eukaryontische Krankheitserreger“, 26.-27.2.2004, Innsbruck, Österreich. Vortrag.

Reuß, O., und Morschhäuser, J. Funktionelle Analyse von Oligopeptidtransportern in *Candida albicans*. Tagung der DGHM Fachgruppe „Eukaryontische Krankheitserreger“, 25.-26.2.2005, Jena. Vortrag.

Reuß, O., and Morschhäuser, J. A gene family encoding oligopeptide transporters is required for growth of *Candida albicans* on proteins. DGHM/VAAM-Tagung, 25.-28.9.2005, Göttingen. Vortrag.

Reuß, O., and Morschhäuser, J. A family of oligopeptide transporters is required for growth of *Candida albicans* on proteins. ASM Conference, *Candida* and *Candidiasis* (8th), 13.-17.3.2006, Denver, Colorado, USA. Vortrag.

Reuß, O., Vik, Á., Kolter, R., and Morschhäuser, J. The *SATI* flipper, an optimized tool for gene disruption in *Candida albicans*. ASM Conference, *Candida* and *Candidiasis* (7th), March 18-22 2004, Austin, Texas, USA. Poster.

Reuß, O., Vik, Á., Kolter, R., and Morschhäuser, J. The *SATI* flipper, an optimized tool for gene disruption in *Candida albicans*. 56. Jahrestagung der DGHM, 26.-29.9.2004, Münster. Poster.

Reuß, O., and Morschhäuser, J. Oligopeptide transporters as potential regulators of proteinase secretion in *Candida albicans*. New Trends in Infectious Disease Research, Joint Ph.D. Students Meeting of the Collaborative Research Centers SFB 630 & SFB 544, 10.-12.11.2004, Würzburg. Poster.

Reuß, O., and Morschhäuser, J. A gene family encoding oligopeptide transporters is required for growth of *Candida albicans* on proteins. FEBS Advanced Lecture Course on Human Fungal Pathogens, 21.-28.5.2005, La Colle sur Loup, Frankreich. Poster.

Reuß, O., and Morschhäuser, J. A family of oligopeptide transporters is required for growth of *Candida albicans* on proteins. International Symposium, Novel Agents against Infectious Diseases, An Interdisciplinary Approach, 12.-15.2.2006, Würzburg. Poster.

7.3 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Oliver Rainer Reuß
Wohnort	97723 Oberthulba, Schlossgarten 5
Geburtstag	13.09.1976
Geburtsort	Bad Kissingen
Eltern	Michael Reuß Edeltraud Reuß, geb. Schärpf

Schulbildung

09/1983 - 07/1987	Grundschule Thulba
09/1987 - 06/1996	Frobenius-Gymnasium Hammelburg
06/1996	Abschluss: Abitur

Zivildienst

08/1996 - 08/1997	im Rettungsdienst des Bayerischen Roten Kreuzes, Bad Kissingen
-------------------	--

Studium

11/1997 - 01/2002	Studium der Biologie (Diplom) an der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg
	Diplomprüfung in den Fächern Biotechnologie, Biochemie und Zoologie (mit Schwerpunkt Zell- und Entwicklungsbiologie) experimentelle Diplomarbeit im Fach Biotechnologie bei Prof. Dr. U. Zimmermann, Titel: „Elektroporation von Zellen: Untersuchung des Einflusses lipophiler Anionen auf eukaryotische Zellen mittels Elektrorotation, Dielektrophorese und Ladungspulstechnik“
01/2002	Abschluss: Diplom

Wissenschaftliche Anstellungen

02/2002 - 04/2002	Lehrstuhl für Biotechnologie der Universität Würzburg bei Prof. Dr. U. Zimmermann
05/2002 - 07/2006	Institut für Molekulare Infektionsbiologie der Universität Würzburg in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. J. Morschhäuser; in dieser Zeit Anfertigung der Dissertation

Würzburg, Juli 2006