

Aus dem Institut für Hygiene und Mikrobiologie  
der Universität Würzburg  
Vorstand: Professor Dr. med. Matthias Frosch

**KONSEQUENZEN**  
**PROGRESSIVER TRUNKIERENDER MUTATIONEN**  
**DES TRANSKRIPTIONSFAKTORS *RIM101***  
**IN *CANDIDA ALBICANS* FÜR WACHSTUM UND**  
**PH-ABHÄNGIGEN DIMORPHISMUS**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung  
der Doktorwürde der Medizinischen Fakultät  
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt von

**Daniel Zeller**  
aus Kloster Schöntal

Würzburg, Juni 2004

Referent: Professor Dr. med. M. Frosch  
Koreferent: Professor Dr. rer. nat. J. Morschhäuser  
Dekan: Professor Dr. med. S. Silbernagl

Tag der mündlichen Prüfung: 21.12.2004

Der Promovend ist Arzt.

*Meinen lieben Eltern*

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1 EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
1.1 Das Reich der Pilze – Einordnung von <i>Candida albicans</i>	1
1.2 Klinische Bedeutung – <i>C. albicans</i> als Erreger der Candidose	2
1.3 Klinische Methoden – Diagnostik und Therapie der Candidose	4
1.4 Virulenzfaktoren – Voraussetzungen für die Pathogenität	6
1.5 Untersuchungsmethoden – Molekulargenetik von <i>C. albicans</i>	9
1.6 Dimorphismus – Flexibilität zwischen Hefen und Hyphen	11
1.7 Der pH-Wert – Umweltsignal für Wachstum und Morphogenese	15
1.8 Zielsetzungen dieser Arbeit	20
<b>2 MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>22</b>
2.1 Verwendete Geräte	22
2.2 Verbrauchsmaterialien	23
2.3 Chemikalien, Enzyme, Medien und Reaktionskits (Bezugsquellen)	23
2.4 Lösungen und Puffer	24
2.5 Bakterienkulturen	27
2.6 Hefekulturen	28
2.7 Plasmide	31
2.8 Oligonukleotide	33
2.9 DNA-Präparation	35
2.10 RNA-Präparation aus <i>C. albicans</i>	40
2.11 Gelelektrophorese	42
2.12 Klonierungsmethoden	43
2.13 Transformation von Bakterien	44
2.14 Transformation von <i>Candida albicans</i>	48
2.15 Automatisierte DNA-Sequenzierung	51
2.16 Sequenzanalysen	52
2.17 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mit der AmpliTaq® DNA-Polymerase	52
2.18 RT-PCR mit dem SuperScript™ One-Step RT-PCR System	55
2.19 DNA-RNA-Hybridisierung	57

2.20 Induktion der Keimschlauchbildung von <i>C. albicans</i>	60
2.21 Isolierung von <i>phr2Δ</i> -Revertanten	60
<b>3 ERGEBNISSE</b>	<b>61</b>
3.1 Mutationsanalyse in Revertanten	61
3.1.1 Isolierung von <i>phr2Δ</i> -Suppressormutanten	61
3.1.2 Morphologische Untersuchung der <i>phr2Δ</i> -Revertanten	62
3.1.3 Expression von <i>PHR1</i> in den <i>phr2Δ</i> -Suppressormutanten	62
3.1.4 Analyse von <i>RIM101</i> -Mutationen in den <i>phr2Δ</i> -Revertanten	63
3.2 Progressive Trunkierung von <i>RIM101</i>	65
3.2.1 Konstruktion <i>RIM101</i> -trunkierter <i>phr2Δ</i> -Stämme	65
3.2.2 Transkriptionsnachweis der trunkierten <i>RIM101</i> -Allele mittels RT-PCR	68
3.2.3 Untersuchung der <i>RIM101</i> -trunkierten Stämme auf Wachstum	70
3.2.4 <i>PHR1</i> -Induktion in den gewonnenen Stämmen	71
3.2.5 Untersuchung der Zellmorphologie	73
3.3 Untersuchung zur Funktion von <i>RIM101</i> bei der <i>SAP</i> -Induktion	76
3.3.1 Konstruktion eines Reportersystems	78
3.3.2 Untersuchung der konstruierten Stämme	80
<b>4 DISKUSSION</b>	<b>82</b>
4.1 In <i>RIM101</i> trennen sich die Wege	82
4.2 Ausgangspunkt: Homologe Proteine zu <i>C.-albicans</i> -Rim101p	83
4.2.1 PacC in <i>Aspergillus nidulans</i>	83
4.2.2 Rim101p in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	87
4.3 Rim101p in <i>C. albicans</i> und Konsequenzen C-terminaler Trunkierungen	91
4.3.1 Die <i>phr2Δ</i> -Suppressormutationen	91
4.3.2 Gezielte angrenzende Mutationen erzeugen Imitate der Revertanten	93
4.3.3 Upstream-gerichtete Progression auf Kosten der Filamentierung	93
4.3.4 Kein Wachstum bei weiterer 5'-Progression	95
4.4 Der pH-Wert, <i>RIM101</i> und die <i>SAP</i> -Familie	96
4.5 Synthese: Hypothetisches Modell der <i>RIM101</i> -Funktion in <i>C. albicans</i>	97
<b>5 ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>105</b>
<b>6 LITERATURANGABEN</b>	<b>108</b>

## **7 ANHANG**

**120**

7.1 Abkürzungsverzeichnis

120

**DANKE**

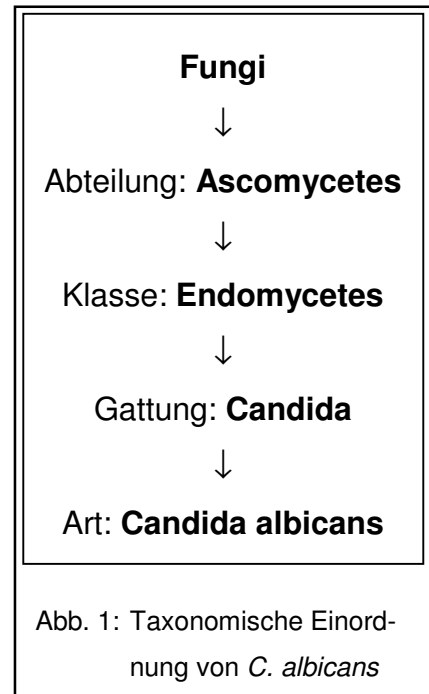
**LEBENS LAUF**

**KONGRESSBEITRÄGE**

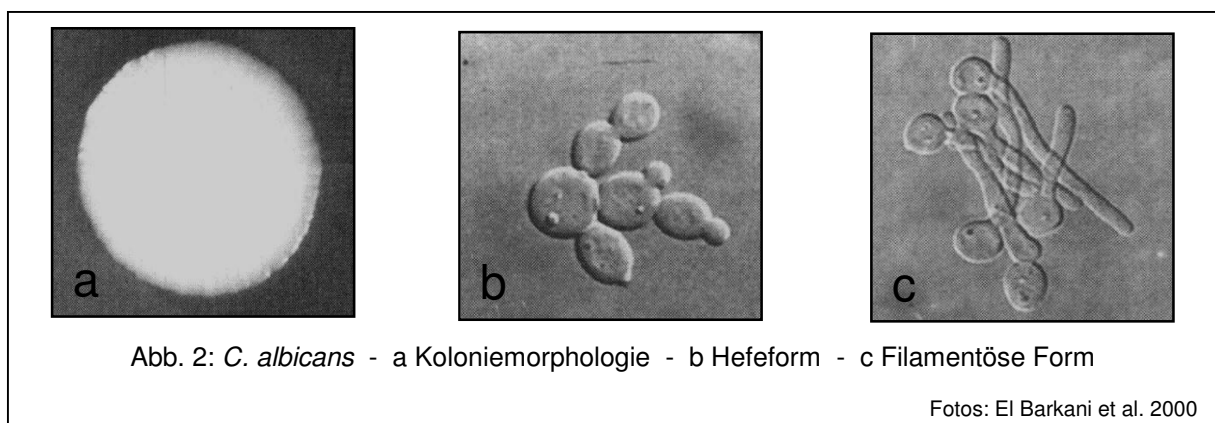
## 1 EINLEITUNG

### 1.1 Das Reich der Pilze – Einordnung von *Candida albicans*

*Candida albicans* ist ein Hefepilz (Sprosspilz) aus der Klasse der Endomyceten, welche zur Abteilung der Ascomyceten gehört (Hoog und Guarro 1995; siehe Abb. 1). Die Gattung *Candida* beinhaltet mehr als 150 Arten, von denen etwa 20 Spezies Infektionen beim Menschen hervorrufen können (Odds 1988; Kwon-Chung und Bennett 1992). Neben *C. albicans*, die für ca. 50% der Candidosen verantwortlich ist, sind unter den humanpathogenen Arten vor allem *C. glabrata* (10 - 15% der Candidosen), *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* und *C. lusitaniae* zu erwähnen (Viscoli et al. 1999; Rennert et al. 2000; Pfaller et al. 1999).



Der Name „*Candida albicans*“ (lat.: die weiße Weiße) beschreibt pleonastisch die auffallend helle, weiß glänzende Koloniemorphologie dieser Spezies (s. Abb. 2a). Der Phänotyp der einzelnen *Candida*-Zelle ist von verschiedenen Umweltfaktoren abhängig (s. Kap. 1.4); man unterscheidet die sprossende Hefeform (Abb. 2b) von der filamentierenden (keimschlauchbildenden) Zelle (Abb. 2c).



*C. albicans* ist ein eukaryontischer Einzeller und besitzt ein diploides Genom, dessen insgesamt ca. 33 Mbp genomische DNA sich auf 2 x 8 Chromosomen verteilt (Doi et al. 1992).

## 1.2 Klinische Bedeutung – *C. albicans* als Erreger der Candidose

Wie epidemiologische Untersuchungen zeigen, hat der Anteil der Pilze als Erreger nosokomialer Infektionen innerhalb der letzten zwei Jahrzehnte eine deutliche Zunahme erfahren (Odds 1988; Fridkin und Jarvis 1996; Ellis et al. 2000). Hierfür sind hauptsächlich opportunistische Keime verantwortlich, die, wie ihr Name schon ausdrückt, nur bei abwehrschwachen Individuen pathogen in Erscheinung treten. Die wichtigsten und für diesen Anstieg maßgeblich verantwortlichen Spezies sind *Candida albicans* (mit Abstand am häufigsten) und *Aspergillus fumigatus*; für HIV-positive Patienten stellen insbesondere *Pneumocystis carinii* und *Cryptococcus neoformans* eine große Bedrohung dar (Kerridge 1993; Walsh und Groll 1999; Ellis et al. 2000). Studien zufolge sind *Candida spp.* der vierthäufigste Erreger der nosokomialen Sepsis (Edmond et al. 1999; Walsh und Groll 1999).

Beim gesunden Menschen kommt *C. albicans* in der Regel als harmloser Kommensale im Verdauungstrakt vor. Im Gleichgewicht mit einer intakten Immunabwehr kann es normalerweise nicht zu einem Schleimhautbefall im parasitären Sinne oder gar zu einer disseminierten Candidose kommen. Ganz andere Voraussetzungen findet man bei Menschen, deren Immunsystem entweder durch angeborene bzw. erworbene Immundefizite oder durch gezielte iatrogene Immunsuppression geschwächt und dadurch insuffizient ist. Hier ist *C. albicans* nicht nur in der Lage, lokal begrenzte Schleimhautinfektionen, am häufigsten der Mundhöhle (Mundsoor) oder der Vagina (Vaginitis), hervorzurufen, sondern kann von kolonisierten Epithelien wie z. B. von der Darmmukosa aus die Tunica mucosa penetrieren und unter Zerstörung des Epithels schließlich in die Blutbahn gelangen (Odds 1994). Eine solche Fungämie kann über erneute Adhäsion und Penetration von Endothelzellen im schlimmsten Fall eine disseminierte Candidose verursachen mit Manifestationen in lebenswichtigen Organen, besonders in Leber und Nieren (Odds 1994; Walsh et al. 1995). Mit einer Mortalitätsrate von über 35% ist die systemische Candidainfektion eine gefürchtete Komplikation bei der Behandlung immunsupprimierter und immundefizienter Menschen (Viscoli et al. 1999; Rennert et al. 2000).

In der Gruppe der nicht-iatrogen Abwehrgeschwächten sind an erster Stelle AIDS-Patienten anzuführen, deren Zahl global, vor allem aber in den sog. Entwicklungsländern, rapide steigt. So sind weltweit gegenwärtig mehr als 38



Millionen Menschen mit HIV infiziert bei über 5 Millionen Neuinfektionen pro Jahr (UNAIDS Report für 2003). Die oropharyngeale Candidose ist die häufigste Infektionskrankheit bei HIV-Patienten, von der etwa 90% der Personen betroffen sind bei hohen Rückfallquoten (Hood und Denning 1996).

Auch bei Leukämien und anderen malignen Erkrankungen findet man oft *Candida*-Infektionen (Guiot et al. 1994); systemische Pilzinfektionen stellen etwa 25% der infektionsbedingten Todesursachen von Leukämiekranken dar (De Pauw und Meunier 1999). Neben der Abwehrschwächung durch die Neoplasie selbst ist hier ursächlich vor allem auch an die immunsuppressive und epithelschädigende Wirkung von Chemotherapeutika zu denken (De Pauw und Meunier 1999).

Eine medikamentöse Immunsuppression ist bei Transplantationspatienten unumgänglich, weil Abstoßungsreaktionen nur auf diese Weise verhindert werden können. Da die Suppression systemisch geschieht, verschiebt sich hierbei die Balance zwischen Abwehr und Erreger sehr schnell zugunsten von Opportunisten wie *C. albicans* (Walsh und Groll 1999). Ähnliche unerwünschte Wirkungen hat die Behandlung von Autoimmunerkrankungen, z. B. mit systemischen Glukokortikoidgaben. Aber auch lokal angewandt, beispielsweise als Kortikoid-Sprays bei Asthmatikern, fördern solche Therapeutika die Entstehung einer Schleimhaut-Candidose (Ellepola und Samaranayake 2001).

Allgemein begünstigende Faktoren für eine Candidose sind lokale Milieuveränderungen im Gastrointestinaltrakt, wie sie etwa bei ausschließlicher parenteraler Ernährung auftreten (Paganini et al 2002), oder in der Vagina, wo hierfür vor allem Störungen im hormonellen Haushalt verantwortlich gemacht werden (Ferrer 2000; Mardh et al. 2002). Als prädisponierend für die vaginale Candidose gelten die Schwangerschaft und die Einnahme oraler Kontrazeptiva mit hohem Östrogenanteil (Ferrer 2000). Etwa 75% aller Frauen erleiden so in ihrer Lebenszeit mindestens eine Episode einer vulvovaginalen Candidose, bis zu 10% sogar rezidivierend (Mardh et al. 2002).

Außerdem kann die Langzeitbehandlung mit Breitspektrum-Antibiotika zu einer Übernahme der bakteriellen Nischen unter anderem durch *Candida spp.* und somit zu einer erhöhten Kolonisation führen (Paganini et al. 2002). Auch ein Diabetes mellitus begünstigt die Entstehung einer Candidose (Guggenheimer et al. 2000).

### 1.3 Klinische Methoden – Diagnostik und Therapie der Candidose

Die mikrobiologische **Diagnostik** hat nicht nur die Aufgabe, eine Organ- oder disseminierte Candidose allgemein als solche zu erkennen, sondern muss auch zwischen den einzelnen Spezies differenzieren, da dies entscheidende Auswirkungen auf die Therapiewahl hat.

Die einfachste und schnellste Methode stellt das direkte Mikroskopieren primär steriler Patientenmaterialien dar, wie es beispielsweise für Liquor, Organbiopsate oder Urinproben durchgeführt wird. In nicht-sterilen Materialien, z. B. im vaginalen Abstrich, erleichtern Färbungen wie die Methylenblau- oder die Gramfärbung die Suche nach Erregern (Novikova et al. 2002).

Um dem Verdacht auf eine Candidämie nachzugehen, ist die Blutkultur das Mittel der Wahl. Verschiedene verbesserte Methoden ermöglichen hier eine möglichst schnelle und sichere Identifizierung, so z. B. das Prinzip der Lysezentrifugation, bei dem die Blutzellen lysiert und die Erreger durch Zentrifugation konzentriert werden (O'Shaughnessy et al. 2003).

Nach Verbesserung der anfänglich zu geringen Sensitivität finden heute zunehmend indirekte Nachweismethoden wie ELISA, RIA oder PCR bei der Diagnose der invasiven Candidose Verwendung, meist ergänzend oder bestätigend zu konventionellen Verfahren (Reiss et al. 1998). Hierbei werden, je nach Technik, *Candida*-Antigene der Zellwand oder des Zytoplasmas ebenso nachgewiesen wie Metaboliten oder genomische DNA-Sequenzen (Walsh und Chanock 1998).

*C. albicans* und die „neue“ nah verwandte Art *C. dubliniensis* lassen sich von anderen *Candida*-Spezies und Hefen durch Anzucht auf Rice-Tween-Agar differenzieren, wo sie, insbesondere an den Enden der Filamente, so genannte Chlamydosporen, nämlich dickwandige, relativ große, abgerundete, scheinbar leblose Zellen produzieren (Odds 1988; Sullivan and Coleman 1998). *C. albicans* und *C. dubliniensis* wiederum lassen sich auf Staib-Agar voneinander abgrenzen: Erstere bildet darauf glatte Kolonien und keine Chlamydosporen, während letztere aufgrund filamentösen Wachstums raue Kolonien aufweist bei reichlicher Chlamydosporenbildung (Staib und Morschhäuser 1999; Kurzai et al. 2000).

Die systemische **Therapie** disseminierter Mykosen gestaltet sich aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit der eukaryontischen Pilzzelle mit der menschlichen Zelle

allgemein schwierig. Potentielle Targets einer antimykotischen Chemotherapie sind die Zellwandsynthese (als einziges Target pilzspezifisch), Biosynthese und Funktion der Sterine (membranschädigend), Nukleinsäuresynthese, metabolische Vorgänge und makronukleare Biosynthese (Polak 1997).

Für die Therapie der systemischen Candidose spielt momentan fast ausschließlich die Interaktion mit den Sterinen eine Rolle, die als wesentliche Bestandteile der Pilzmembran nicht nur wichtige Membranfunktionen ausüben, sondern auch für Regulation von Wachstum und Vermehrung bedeutsam sind.

Das wirksamste Antimykotikum mit dieser Wirkungsweise ist das Makrolid-Polyen Amphotericin B, das über eine Aggregatbildung mit Ergosterin und eine daraus resultierende Porenbildung die Membranpermeabilität so erhöht, dass elektrochemische Gradienten zusammenbrechen und die Zelle letztendlich oxidativ geschädigt wird (Cohen 1992). Der große Nachteil des Amphotericin B besteht in seinen unerwünschten Wirkungen: Neben akuten Reaktionen wie Fieber, Schüttelfrost, Rigor oder Anämie stellt vor allem die Nephrotoxizität dieses Wirkstoffes ein großes Problem dar (Hoeprich 1995). Diese lässt sich offenbar durch neue Formulierungen, z. B. die Einbettung in Lipidträger, reduzieren (Nath et al. 1999).

Insgesamt besser verträglich sind die Antiinfektiva aus der Gruppe der Azole, die daher auch am häufigsten gegen die Candidose eingesetzt werden. Auch sie greifen im Bereich des Ergosterols, nämlich in seine Synthese, ein, indem sie das Cytochrom-P450-abhängige Enzym Lanosterin-C<sub>14</sub>-Demethylase hemmen (Hoeprich 1995). Im Gegensatz zu Amphotericin B treten hier allerdings, besonders bei HIV-Infizierten, zunehmend resistente Erreger in Erscheinung, die die Therapie erschweren (Revankar et al. 1996). Als relativ neuer Vertreter aus der Gruppe der Triazole steht das Breitspektrumantimykotikum Voriconazol zur Behandlung invasiver Aspergillosen und Candidosen zur Verfügung – es zeichnet sich durch Wirksamkeit gegen fluconazolresistente *Candida spp.* aus (Pearson et al. 2003).

Das einzige Antimykotikum, das als echter Antimetabolit im Rahmen der RNA- und DNA-Synthese wirkt, ist das Pyrimidinderivat Flucytosin (5-FC). Seiner hohen Wirksamkeit und den geringen Nebenwirkungen steht die schnelle Resistenzentwicklung gegen diesen Wirkstoff gegenüber, die sich aufgrund der Diploidie von *C. albicans* und möglicher Heterozygotität von Mutationen in totale und partielle Resistenz einteilen lässt. Wegen der frühzeitigen Resistenzen spielt 5-FC

heute nur noch als Partner in Kombinationstherapien eine Rolle (Whelan und Magee 1981).

Die allgemeine Resistenzproblematik lenkt den Blick auf neue, womöglich auch pilzspezifischere Wirkstoffe. Am intensivsten wird an 1,3 $\beta$ -Glucan-Synthase-Inhibitoren, den sog. Candinen, gearbeitet, da sie die Zellwandsynthese der Pilze hochspezifisch hemmen, ohne die Wirtszelle zu beeinträchtigen (Bartizal et al. 1995). Caspofungin als erster zugelassener Vertreter dieser Gruppe weist offenbar sehr gute Wirksamkeit bei invasiven Aspergillosen und Candidosen auf (Pacetti und Gelone 2003).

Ein zweites interessantes Target ist die Chitin-Synthase, die sich z. B. durch Stoffe der Nikkomyzin-Gruppe inhibieren lässt; das Chitin-Synthase-Gen *CHS1* in *C. albicans* ist als für die Pilzentwicklung essentiell beschrieben worden. Allerdings führt die Anwendung von Nikkomyzin Z nur zu einer moderaten Wachstumshemmung in *C. albicans* (Clemens und Stevens 1996).

Neue Studien haben gezeigt, dass die in der HIV-Therapie verwendeten HIV-Protease-Inhibitoren neben der generellen Verbesserung des Immunzustandes des Patienten offenbar auch einen direkten Einfluss auf die Proteaseproduktion und dadurch auf die Virulenz der *Candida*-Zellen haben (Hood et al. 1998; Korting et al. 1999; Monod et al. 1999). Der häufig eingesetzte Wirkstoff Saquinavir beispielsweise hemmt in vitro die *Candida*-Proteasen *SAP1-SAP3* und reduziert die invasiv-zerstörende Wirkung von *C. albicans* auf die Epithelzellen.

#### 1.4 Virulenzfaktoren – Voraussetzungen für die Pathogenität

Etwa 200 der bisher beschriebenen insgesamt 300.000 Pilzarten gelten als Krankheitserreger des Menschen (Kerridge 1993). Während obligat pathogene Pilzarten meist endemisch vorkommen, wie z. B. *Histoplasma capsulatum* entlang des Mississippi River Valley, haben in Mitteleuropa die opportunistischen Spezies, wie z. B. auch *C. albicans*, weit größere Bedeutung.

Dass diese Spezies in der Lage sind, den Menschen als Wirt zu besiedeln und darüber hinaus zu schädigen, wird ihnen durch ihre verschiedenartigen Virulenzfaktoren ermöglicht, durch die sie der Immunabwehr des Wirtes mehr oder weniger erfolgreich trotzen, ihren Standort bewahren oder sich nach Durchschreitung

der physikalischen Barrieren im Organismus invasiv verbreiten können. Dieses Spektrum an Interaktionen mit dem Wirt in sich stark unterscheidenden Wirtsnischen erfordert eine enorme Anpassungsfähigkeit (Odds 1994).

Zahlreiche (z. T. putative) Pathogenitätsfaktoren von *C. albicans* sind schon beschrieben worden:

Eine wichtige Rolle bei der Pathogenität dieses Hefepilzes spielt seine Fähigkeit zum Di- bzw. Polymorphismus, das heißt der reversiblen Umwandlung der Zellmorphologie in Abhängigkeit von verschiedenen Umweltfaktoren. Je nach Eigenschaft der Wirtsnische wächst *C. albicans* nämlich als Sprosspilz (Hefeform) oder als fadenartig wachsender Hyphenpilz (s. Abb. 2 b+c). Dabei erhöhen die Hyphen der filamentierenden Form nicht nur die Adhärenz an das Epithel (Odds 1994), sondern scheinen für die Penetration und die darauf folgende Invasion ins Gefäßsystem maßgeblich verantwortlich zu sein (Brown und Gow, 1999). Dies wurde durch In-vivo-Untersuchungen im Mausmodell untermauert, wo zur Hyphenbildung unfähige *C.-albicans*-Mutanten eine stark verminderte Virulenz zeigten (Lo et al. 1997).

Ebenfalls von pathogenetischer Bedeutung ist die Freisetzung verschiedener hydrolytisch aktiver Enzyme, wie Phospholipasen und Proteinasen. Von letzteren wurden bisher zehn so genannte sekretorische Aspartylproteinasen (*SAPs*) kloniert, die in vitro differentiell exprimiert werden (Hube et al. 1994; White and Agabian 1995; Monod et al. 1998; Staib et al. 2002; Felk et al. 2002). In-vivo-Untersuchungen deuten darauf hin, dass Infektionen verschiedener Nischen je ein eigenes, abhängig vom Infektionsstadium auch zeitlich variables Sap-Expressionmuster hervorrufen (Staib et al. 2000). Beispielsweise wurde bei einer ösophagealen Candidose im Mausmodell drei Tage nach Infektion eine hohe Induktion von *SAP5* und *SAP6* gemessen, was eine Funktion dieser Proteinase bei der Gewebsinvasion vermuten lässt. Dagegen findet sich eine erhöhte *SAP2*-Induktion erst in späten Infektionsstadien, die mit einer Ausbreitung und Zerstörung tiefer Organe verbunden sind. Die Tatsache, dass *SAP2* in vitro immer dann stark induziert wurde, wenn Proteine als einzige Stickstoffquelle in Frage kamen, legt eine Bedeutung von Sap2 für den nutritiven Bereich nahe (Staib et al. 2000). Sowohl die Zerstörung von Wirtszellbarrieren als auch die Degradation von Wirtszellproteinen zur Nährstoffbereitstellung durch die Saps waren bereits früher beschrieben worden (Colina et al. 1996; McDonald 1984). Als eine weitere Funktion dieser Enzyme wird

die Eliminierung von menschlichen Abwehrproteinen wie Immunglobulinen und Komplement-Molekülen diskutiert (Kaminishi et al. 1995). Auch könnten die sekretorischen Proteinase über die proteolytische Aktivierung von Interleukinen (z. B. des pro-IL-1 $\beta$  zu IL-1 $\beta$ ) eine ineffiziente Entzündungsreaktion triggern und dadurch die Ausbreitung und Invasion indirekt begünstigen (Beauséjour et al. 1998). Neben der oben beschriebenen morphologischen Flexibilität auf Zellebene kann auch ein „phänotypisches Switching“ zwischen verschiedenen Kolonievarianten beobachtet werden. Dieses insbesondere unter Nährstoffmangelbedingungen und im Zuge einer Infektion auftretende Phänomen basiert vermutlich auf präzisen, reversiblen DNA-Veränderungen an einem sog. „master switch locus“ und soll zur Anpassung an verschiedene Wirtsnischen und zum Schutz gegen das menschliche Immunsystem dienen (Odds 1997; Soll et al. 1993; Soll 1997).

Ein weiterer Faktor für die Pathogenität von *C. albicans* sind Adhäsine wie z. B. Int1p, Hwp1p oder die Proteine der Als-Familie (Odds 1994; Gale et al. 1998; Staab et al. 1999; Sundstrom 1999; Tsuchimori et al. 2000; Hoyer et al. 1998). Über diese spezifischen Oberflächenproteine kann es zur Interaktion mit Oberflächengewebe des Wirtes kommen, was eine wichtige Voraussetzung für die Kolonisation und Invasion darstellt.

Ein Virulenzfaktor von klinisch-praktischer Bedeutung ist außerdem die Resistenz gegenüber bestimmten Antimykotika. Während die Resistenzproblematik bei Amphotericin B aktuell noch kaum eine Rolle spielt, wird Flucytosin wegen schneller Resistenzentwicklung nur noch in Kombination eingesetzt (Sanglard und Odds 2002). Insbesondere die Azol-Gruppe gibt momentan Anlass zur Sorge. In zunehmendem Maße werden nämlich *C.-albicans*-Stämme isoliert, die nicht mehr oder nur noch auf sehr hohe Dosen der gebräuchlichen Substanzen ansprechen. Häufigste Ursache der Azolresistenz ist die verminderte Akkumulation des Wirkstoffes in der Pilzzelle aufgrund der reduzierten Aufnahme bzw. des erhöhten Effluxes (Franz et al. 1999). So wurden in *C. albicans* mehrere für Membran-Transporter kodierende Gene identifiziert, wie z. B. *CDR1*, *CDR2* oder *MDR1*, deren vermehrte Expression den Fluconazol-Efflux steigert (Sanglard et al. 1995; Sanglard et al. 1997). Daneben wurden in resistenten Stämmen, offenbar als Folge von Spontanmutationen, eine verminderte Bindungsfähigkeit von Fluconazol an das Target Erg11p im Cytochrom-P450-System bzw. eine erhöhte Produktion des Targets Lanosterin-C<sub>14</sub>-Demethylase beobachtet (Sanglard et al. 1998). Ein Teil der

Fluconazol-resistenten Stämme zeigt Kreuzresistenz mit anderen Azolen, z. B. Itraconazol, ein anderer Teil bleibt weiterhin sensibel dagegen.

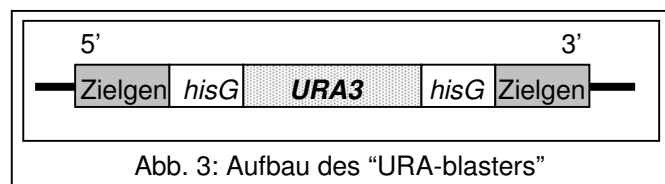
### 1.5 Untersuchungsmethoden – Molekulargenetik von *C. albicans*

Die diploide und asexuelle Natur von *C. albicans* erschwerte lange Zeit die molekulargenetische Untersuchung. So muss beispielsweise die Deletion eines Genes in der Regel beide Allele betreffen, da sich heterozygote Mutationen meist rezessiv verhalten und daher phänotypisch nicht in Erscheinung treten.

Musste man solche Mutationen vor etwa zwei Jahrzehnten noch klassischen Methoden wie UV-Bestrahlung oder chemischer Mutagenese und damit zu einem guten Teil dem Zufall überlassen, so brachte die Etablierung effizienter Transformationsprotokolle die Möglichkeit mit sich, ganz gezielte genetische Manipulationen in *C. albicans* durchzuführen (Gietz et al. 1992). So konnten mehrere *C.-albicans*-Mangelmутanten konstruiert werden, die nun als Wirtsstämme für die Transformation von linearisierten Plasmiden verwendet werden können.

Eine erfolgreiche und heute häufig angewandte Technik zur Durchführung gezielter Gendeletionen in *C. albicans* mit Hilfe des so genannten „URA-blaster“ wurde im Jahr 1993 erstmals beschrieben (Fonzi und Irwin 1993). Das Herz der hierbei

verwendeten Kasette wird vom *URA3*-Gen gebildet, das von Sequenzen des *hisG* von *Salmonella typhimurium* flankiert



wird; diesen benachbart befinden sich nach außen wiederum die 5'- und 3'-Enden des Zielgens (s. Abb. 3). Im Zuge der integrativen Transformation in einen *ura3Δ*-Stamm und der homologen Rekombination der 5'- und 3'-Enden des Zielgens in der Kasette mit Sequenzen des Gens am nativen genomischen Locus kommt es zur Disruption eben dieses Genes. Es folgt eine spontane intrachromosomale Rekombination der einander homologen *hisG*-Sequenzen, was zur Entfernung des *URA3*-Markers und damit zur Wiederherstellung des anfänglichen *ura3Δ*-Status führt. Die Wiederholung der Transformation resultiert schließlich in der Inaktivierung auch des zweiten wildtypischen Allels.

Die Isolierung und Identifizierung von *C.-albicans*-Genen sowie funktionelle Studien wurden wegen der erschwerten Bedingungen in *C. albicans* zu einem beträchtlichen Teil mit Hilfe anderer Spezies durchgeführt, wie z. B. *Escherichia coli* und insbesondere *Saccharomyces cerevisiae*.

*C. albicans* und die Bäckerhefe *S. cerevisiae* zeigen eine Sequenzhomologie einander äquivalenter Gene von 30 bis 60%, in konservierten Regionen ist sie noch höher. Von den mehr als 6400 im Genom von *C. albicans* gefundenen offenen Leserastern (ORF) weisen einer Sequenzierungstudie zufolge über 75% eine signifikante Homologie zu einem entsprechenden Gen in *S. cerevisiae* auf (Jones et al. 2004).

Dies ermöglicht einerseits die Anwendung molekularbiologischer Methoden wie Komplementation, Überexpression und Hybridisierung in *S. cerevisiae* zur Isolierung und Charakterisierung von *C.-albicans*-Genen (Gillum et al. 1984; Fu et al. 1998; Pla et al. 1996). Andererseits birgt die relativ nahe Verwandtschaft die Möglichkeit in sich, in *S. cerevisiae* bereits bekannte Mechanismen und Regulationswege als Arbeitshypothesen bei der Untersuchung in *C. albicans* heranzuziehen, was die Erforschung dieser Spezies enorm beschleunigt. Dies stößt allerdings dort an Grenzen, wo keine signifikante Homologie festgestellt werden konnte oder wo die Funktionsunterschiede homologer Gene zu groß sind. So regulieren bestimmte Gene in *S. cerevisiae* die sexuelle Fortpflanzung, während ihre Homologe in *C. albicans* z. B. Funktionen im Bereich der Morphogenese erfüllen.

Andere Methoden zur Genisolierung sind das immunologische Screening und die Analyse von cDNA-Banken.

Des Weiteren kann man über den Einsatz regulierbarer Promotoren die Auswirkungen der Expression bzw. Repression ausgewählter Gene beobachten. Mehrere solcher Promotoren in *C. albicans* wurden bisher beschrieben. Sie eignen sich insbesondere für die Funktionsuntersuchung essentieller Gene, deren Expressionsgrad dadurch steuerbar wird (Leuker et al. 1997; Care et al. 1999).

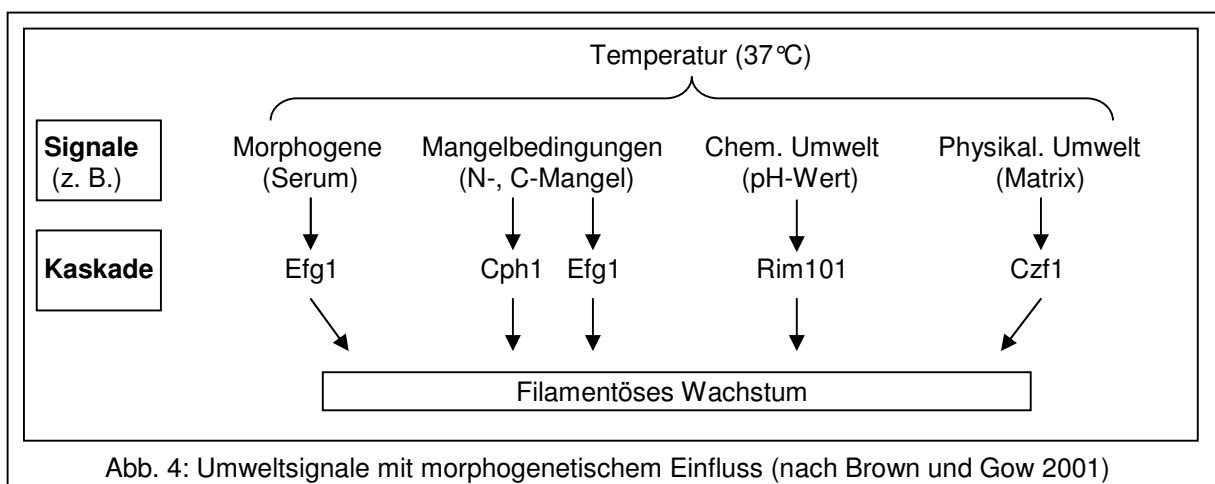
Umgekehrt macht es zur Charakterisierung differentiell exprimierter Gene oder ganzer Genexpressionsmuster Sinn, die Aktivität ihrer Promotoren unter verschiedenen Umweltbedingungen sichtbar machen zu können. Hierzu eignen sich so genannte Reportergene, die in der Regel für leicht messbare Proteine, meist Enzyme, codieren. Als homologe Reportergene werden momentan *URA3* (Uridinstoffwechsel) und *XOG1* (Exoglukanase) verwendet (Koloteva et al. 1998).



Das Problem heterologer Reportergene liegt in der Tatsache, dass *C. albicans* das Codon CUG, abweichend vom universellen genetischen Code, in Serin statt in Leucin translatiert (Santos et al. 1993). Dies lässt sich umgehen, indem man entweder modifizierte Gene verwendet, wie im Falle von GFP (green fluorescent protein), oder CUG-freie Gene, wie die Luziferase von *Renilla reniformis*.

### 1.6 Dimorphismus – Flexibilität zwischen Hefen und Hyphen

Bei mikroskopischer Betrachtung von *C.-albicans*-Zellen stößt man, je nach Wachstumsbedingungen, auf zwei recht unterschiedliche Wachstumsformen dieser polymorphen Hefe: Einer sprossenden, unizellulären Hefeform, die sich durch Knospung und komplette Abschnürung von ovoiden Zellen vermehrt, steht eine langgezogene, filamentös wachsende Hyphenform gegenüber (s. Abb. 2 b+c). Die hierbei initial auftretende schlauchförmige Ausstülpung wird deskriptiv auch als Keimschlauch bezeichnet. Ein Geflecht aus zahlreichen Hyphen heißt Pilzmyzel. Während bei den Hyphen im engeren Sinne die hintereinander gereihten Zellen durch Septen ohne sichtbare Membraneinziehungen voneinander getrennt sind, setzen sich die so genannten Pseudomyzelien aus aneinander gereihten elongierten Zellen zusammen, die an den Berührungsstellen deutliche Konstriktionen zeigen. Noch konnte nicht abschließend geklärt werden, ob es sich beim pseudofilamentösen Wachstum um eine Intermediärform zwischen Hefeform und Filament handelt oder ob es eine alternative, vom hyphalen Wachstum distinkte Form darstellt (Brown und Gow 2001). Welche der geschilderten Wachstumsformen dominiert, hängt entscheidend von den vorliegenden Umweltbedingungen ab (s. Abb. 4).



Eine Änderung des Extrazellulärmilieus kann dabei in relativ kurzer Zeit einen Gestaltwechsel der Zellen hervorrufen. Dies macht *C. albicans* anpassungsfähig an verschiedene Wirtsnischen und ermöglicht ihr insbesondere, in verschiedenen Stadien der *Candida*-Infektion eine für die Invasion förderliche Form anzunehmen. So gelten Triggerfaktoren wie Serum, neutrale pH-Bereiche und erhöhte Temperaturen als Stressoren, die mit filamentösem Wachstum beantwortet werden, was den Zellen beispielsweise im Zuge einer Fungämie die Flucht aus dem immunologisch unwirtlichen Blutstrom in Schleimhäute oder innere Organe ermöglicht (Brown und Go 1999). Auch im Kolonisationsstadium überwiegt die filamentöse Form. Offenbar ermöglicht die stark hydrophobe Hyphenoberfläche im Zusammenspiel mit der Expression von hyphenspezifischen Adhäsinen und sekretorischen Proteinasen zunächst eine optimale Anheftung an Epithel- bzw. Endothelzellen und dann eine effiziente Invasion (Odds 1994). Im Gegensatz hierzu finden sich im kranken oder gar nekrotischen Gewebe überwiegend Sprosszellen (Odds 1988).

Wenngleich eine recht große Zahl von Umweltparametern bekannt ist, die für die Morphogenese bedeutend sind, insbesondere chemische und physikalische Zusammensetzung des Mediums, pH-Wert und Temperatur, wurden bisher keine extrazellulären Rezeptoren für diese Signale entdeckt (s. Abb. 4).

Dagegen kennt man bereits verschiedene miteinander verschaltete Signaltransduktionswege, die für die Steuerung der morphogenetischen Flexibilität in *C. albicans* eine Rolle spielen (s. Abb. 5). Die Vielzahl der beteiligten Faktoren und möglichen Interaktionen unterstreicht die Bedeutung der morphologischen Flexibilität für *C. albicans*. Zwei der Transduktionskaskaden scheinen von zentraler Bedeutung zu sein:

Die eine Kaskade beinhaltet eine in *CEK1* kodierte Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK) als Schaltstelle und mündet in den Transkriptionsfaktor Cph1p (kodiert von *CPH1*). Eine Inaktivierung des MAPK-Weges blockiert die Filamentierung lediglich auf einigen Festmedien und führt *in vivo* zu einer gewissen Virulenzminderung (Lo et al. 1997).

Die andere dieser beiden Kaskaden führt über eine Interaktion von Ras-Proteinen mit der Adenylatzyklase zur Bildung von zyklischem AMP (cAMP), das seinerseits eine Proteinkinase A (katalytische Untereinheiten kodiert von *TPK1/TPK2*) aktiviert. Diese aktiviert möglicherweise den terminalen Faktor des cAMP-abhängigen Weges,

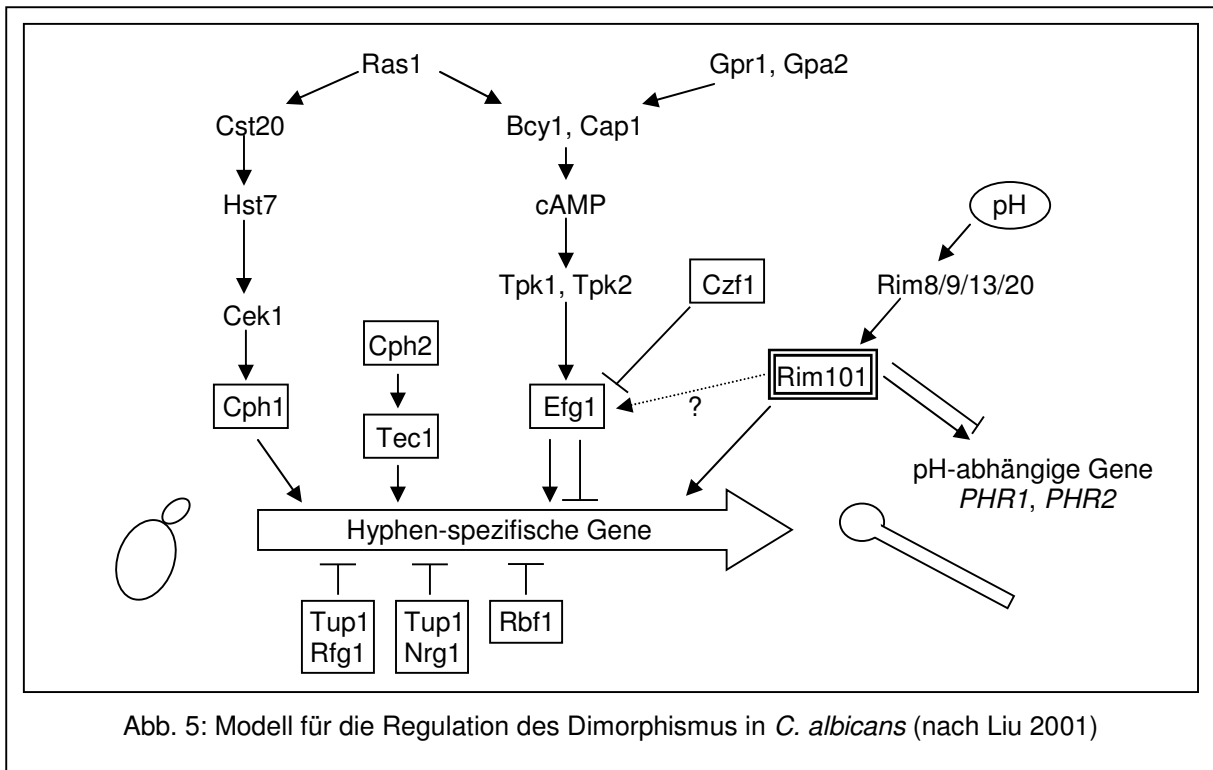


Abb. 5: Modell für die Regulation des Dimorphismus in *C. albicans* (nach Liu 2001)

nämlich Efg1p, an einer putativen PKA-Phosphorylierungsstelle (Bockmühl und Ernst 2001).

Efg1p ist ein Transkriptionsfaktor, der über eine so genannte bHLH-Domäne (basic helix-loop-helix domain) an die E-boxes (Konsensussequenz: 5'-CANNTG-3') der Promotoren wichtiger hyphenspezifischer Gene, z. B. *HWP1*, *ALS8* und *HYR1*, bindet (Leng et al. 2001; Sharkey et al. 1999). Diese Gene kodieren für Proteine der Zelloberfläche und sind virulenzassoziiert (Brown and Gow 1999). Für die Modulation des cAMP-Levels und womöglich zur Überführung von Knospungsprozessen in das filamentöse Wachstum kommt dem Adenylatzyklase-assoziierten Protein Cap1p eine Bedeutung zu (Bahn und Sundstrom 2001).

Die herausragende Stellung der cAMP-abhängigen Kaskade zeigt sich bei Inaktivierung von Efg1p und anderer ihrer Komponenten: Entsprechende Mutanten sind unter den meisten hypheninduzierenden Bedingungen, selbst in Anwesenheit von Serum, unfähig zur Filamentierung, und ihre Virulenz ist stärker attenuiert, als es bei Inaktivierung des MAPK-Weges der Fall ist (Lo et al. 1997). Ebenso lassen sich Filamentierungsdefekte durch gezielte Mutation der Efg1p-Phosphorylierungsstelle oder durch Inaktivierung der Adenylatzyklase bewirken; letzteren Defekt kann man durch Zufuhr von exogenem cAMP aufheben (Rocha et al. 1999). Der Verlust der

Hyphenbildung in *tpk2Δ*-Mutanten lässt sich durch Überexpression von Efg1p beheben (Sonneborn et al. 2000).

Eine komplette Blockade der Filamentierung und völlige Avirulenz im Mausmodell resultieren aus der Doppelnullmutation *efg1Δ cph1Δ* (Lo et al. 1997). Hierbei ist der Virulenzverlust vermutlich nicht allein auf die fehlende Hyphenbildung zurückzuführen, sondern auch auf die Tatsache, dass andere, für die Pathogenität bedeutende Faktoren mangels der beiden Transkriptionsfaktoren nicht induziert werden können. Dazu zählen z. B. das phänotypische Switching, die Chlamydosporenbildung und die *SAP*-Expression, die unter anderem von Efg1p beeinflusst werden (Sonneborn et al. 1999/1 und 1999/2; Stoldt et al. 1997; Felk et al. 2002).

Interessanterweise ließ sich zeigen, dass die *efg1Δ/cph1Δ*-Mutante unter mikroaerophilen Bedingungen doch filamentieren kann, was die Existenz mindestens einer weiteren Kaskade in der Regulation des Dimorphismus nahe legt (Sonneborn et al. 1999/1). In letzter Zeit identifizierte, aber bisher nicht den zwei bekannten Kaskaden zugeordnete Gene der Morphogenese wie *ASH1*, *CLN1*, *CRK1*, *INT1* und andere könnten Bestandteile solcher zusätzlicher Transduktionswege sein (Gale et al. 1998; Brown and Gow 1999).

Auch konnte gezeigt werden, dass die Expression des hyphen- und virulenzassoziierten Transkriptionsfaktors Tec1p sowohl von Efg1p als auch von Cph2p, einem Transkriptionsfaktor aus der Familie der bHLH-Proteine, gesteuert wird (s. Abb. 5), so dass man von einer partiell eigenständigen Cph2-Kaskade sprechen könnte (Schweizer et al. 2000; Lane et al. 2001).

Auf die Rolle der Rim101-Kaskade im pH-abhängigen Dimorphismus wird im folgenden Kapitel gesondert eingegangen (s. Kap. 1.7).

Bisher bekannte Repressoren der Filamentierung sind die Transkriptionsfaktoren Tup1p und Rbf1p, die als negative Regulatoren an hyphenspezifischen Promotoren agieren (Braun and Johnson 1997; Kadosh and Johnson 2001). Tup1p tritt dabei offenbar als Teil eines Transkriptionsrepressor-Komplexes mit Rfg1p bzw. Nrg1p auf. Eine *tup1Δ*- oder eine *rbf1Δ*-Nullmutation bewirkt pseudohyphales bis filamentöses Wachstum in allen hyphenreprimierenden Medien (Braun und Johnson 1997; Ischii et al. 1997). Die Beobachtung, dass *tup1Δ*-Mutanten nicht zur Schädigung und Invasion von Endothelzellen fähig sind, legt die Notwendigkeit echter Hyphen oder

hyphenspezifischer Faktoren hierfür nahe (Phan et al. 2000). Auffallend ist im Bereich der zwei beschriebenen Signaltransduktionskaskaden die starke Homologie zwischen *C. albicans* und *S. cerevisiae*. Während in *C. albicans* die cAMP-abhängige Kaskade anscheinend die bedeutendere Stellung einnimmt, steht in der Bäckerhefe die MAPK-Kaskade mit der Kontrolle von Mating, pseudohyphalem Wachstum diploider und invasivem Wachstum haploider Zellen im Vordergrund. Offenbar steuern die beiden terminal stehenden Transkriptionsfaktoren Efg1p / Cph1p in *C. albicans* bzw. ihre Homologe Phd1p / Ste12p in *S. cerevisiae* funktionell recht unterschiedliche Gengruppen.

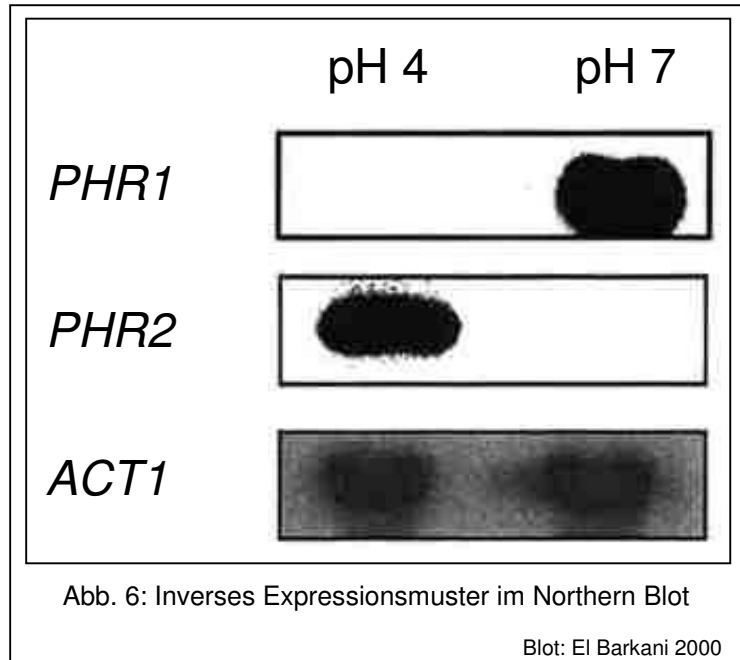
Auch auf die interessante Homologie der beiden Transduktionswege in *C. albicans* und dem Pflanzenpathogen *Ustilago maydis*, dem Erreger der Beulenbrandkrankheit bei Mais, sei hingewiesen. In diesem ebenfalls dimorphen Basidiomyceten wird offenbar in auffallender Ähnlichkeit zu *C. albicans* die Transition von der Hefeform zum filamentösen Dikaryon, die in einem spezifischen Infektionsstadium abläuft, durch das Zusammenspiel einer cAMP- und einer MAPK-abhängigen Kaskade gesteuert.

### 1.7 Der pH-Wert – Umweltsignal für Wachstum und Morphogenese

*C. albicans* besitzt die Fähigkeit, über einen weiten pH-Bereich zu wachsen. Dadurch kann sie im Menschen Nischen unterschiedlichsten Milieus besiedeln und von dort aus unter entsprechenden Umständen Infektionen verursachen (Buffo et al. 1984; Evans et al. 1974).

Der Anpassung an diese pH-Differenzen in der Umgebung dient eine differenzielle Genexpression, die je nach Perzeption eines sauren oder eines neutralen Extrazellulärmilieus mit der Induktion zweier verschiedener Gengruppierungen antwortet, die als „sauer exprimiert“ bzw. „neutral/alkalisch exprimiert“ zusammengefasst werden können. Dadurch wird erreicht, dass Genprodukte, die Funktionen in der Zellwand oder im Extrazellulärraum erfüllen, nur bei pH-Werten synthetisiert werden, bei denen sie auch effektiv funktionieren (Denison et al. 1995). Auf diese Weise kommt auch das inverse Expressionsmuster der beiden für den **Zellwandaufbau** entscheidenden Proteine Phr1p und Phr2p zustande. Während im pH-Bereich über 5,5 und insbesondere bei alkalischem pH-Wert *PHR1* stark, *PHR2*

jedoch kaum induziert wird, verhält es sich für saure pH-Werte unter 5,5 genau umgekehrt (s. Abb. 6). Die beiden funktionellen Homologe kodieren Glukanosyltransferasen, die, an der Zelloberfläche über GPI-Anker befestigt, für die Quervernetzung von  $\beta$ -1,3- und  $\beta$ -1,6-Glukanen und damit für den Aufbau einer stabilen Pilzzellwand verantwortlich sind (Saporito-Irwin et al. 1995; Fonzi 1999; Mouyna et al. 2000). Die Deletion eines der beiden Gene resultiert in einer unförmigen, aufgeblähten Zellmorphologie und fehlerhafter



Zellteilung im korrespondierenden pH-Bereich, während eine *phr1Δ-phr2Δ*-Doppelnullmutante unabhängig vom pH-Wert im Wachstum gestört und amorph erscheint (Saporito-Irwin et al. 1995; Mühlischlegel und Fonzi 1997). Diesem Phänomen liegt eine gesteigerte Chitineinlagerung in die Zellwand bei sinkendem  $\beta$ -1,6-Glukan-Anteil zugrunde (Fonzi 1999).

Die in vitro beobachteten Konsequenzen der *PHR*-Nullmutationen bestätigten sich in vivo: Bei Untersuchungen der systemischen Infektion im Tiermodell erwies sich der *phr1Δ*-Stamm als avirulent, während er im vaginalen Infektionsmodell ohne Virulenzminderung auftrat. Genau umgekehrt verhielt sich die *phr2Δ*-Nullmutante (De Bernardis et al. 1998). Offensichtlich spielt also in vivo, wie es in den gegensätzlichen Wirtsnischen Blutstrom (annähernd neutraler pH) und Vagina (saurer Milieu) deutlich wird, die beobachtete differenzielle Genexpression tatsächlich eine bedeutsame Rolle.

Neben *PHR1* kodiert auch *PRA1* für ein Zellwandprotein, das nach ähnlichem Muster wie *PHR1* exprimiert wird, dessen Funktion bei Wachstum und Filamentierung unter alkalischen Bedingungen aber noch nicht ganz klar ist (Sentandreu et al. 1998).

Auch der **Dimorphismus** unterliegt in *C. albicans* in besonderer Weise der pH-Regulation: Bei sauren pH-Werten findet man in vitro fast ausschließlich die sprossende Hefeform. Das pH-abhängige filamentöse Wachstum hingegen ist beim Wildtyp lediglich in neutraler oder alkalischer Umgebung zusammen mit Temperaturen um 37°C zu beobachten (Buffo et al. 1984). Daneben können andere Umweltsignale, wie z. B. Serum oder bestimmte Nährmedien, die Bildung von Filamenten pH-unabhängig auslösen (s. Kap. 1.6).

Als übergeordneter Regulator der pH-Antwort in *C. albicans* wurde der Transkriptionsfaktor Rim101p identifiziert (Ramon et al. 1999). *RIM101* wird vor allem bei alkalischen bis neutralen pH-Werten induziert; sein Transkript verfügt über drei Cys<sub>2</sub>-His<sub>2</sub>-Zinkfingersequenzen, mit Hilfe derer Rim101p DNA binden und auf diese Weise Gene induzieren und reprimieren kann. Die Folge einer *rim101Δ*-Nullmutation ist zum einen die konstitutive Induktion von *PHR2* bei Fehlen jeglicher *PHR1*-Induktion, zum anderen das Ausbleiben der pH-abhängigen Filamentierung. Dies weist darauf hin, dass Rim101p als Induktor von *PHR1* und Repressor von *PHR2* fungiert und darüber hinaus eine Schlüsselfunktion innerhalb des pH-regulierten Dimorphismus einnimmt (Ramon et al. 1999; Davis et al. 2000/1).

Ein schon länger bekanntes und besser untersuchtes Homolog zu *RIM101* in *C. albicans* ist der Transkriptionsfaktor PacC im apathogenen Ascomyceten *Aspergillus nidulans*, anhand dessen viele Erkenntnisse über die pH-abhängige Genexpression gewonnen werden konnten. PacC besitzt ebenfalls eine Zinkfingerregion, innerhalb derer die Sequenzhomologie zu *RIM101* sehr hoch ist (68%); in den Bereichen außerhalb ist sie deutlich geringer (Ramon et al. 1999). Besonders interessant ist der Aktivierungsmechanismus von PacC: Das Protein wird zunächst in einer 674 Aminosäuren langen inaktiven Vorläuferform synthetisiert. Bei alkalischem Extrazellulärmilieu wird die so genannte Pal-Kaskade mit ihren bisher beschriebenen Komponenten PalA, -B, -C, -F, -H, -I aktiviert. Sie führt in einem ersten Schritt, der sog. Signalproteolyse, in PacC zur Abspaltung eines C-terminalen Anteils von ca. 180 AS, woraus die Intermediärform (Größe zwischen 493 und 500 AS) resultiert. Diese wird hiernach in einem zweiten, pH-unabhängigen Proteolyseschritt, der endgültigen Prozessierung, zur kurzen PacC-Form (Größe zwischen 252 und 254 AS) verkleinert (Orejas et al. 1995; Espeso et al. 2000; Peñalva und Arst 2002). Diese kann im Zellkern offenbar alkalisch-exprimierte Gene

induzieren bzw. sauer-exprimierte Gene reprimieren. Im Falle von *A. nidulans* werden über diesen Weg Prozesse wie Wachstum unter alkalischen Bedingungen, Konidienbildung und Pigmentierung reguliert (Espeso et al. 1993; Tilburn et al. 1995). Bei aktivierter Pal-Kaskade befinden sich unabhängig von einer intakten DNA-Bindungsfähigkeit nicht nur alle endgültig prozessierten aktiven PacC, sondern auch ein beträchtlicher Anteil der Intermediärform im Zellkern. Dies legt die Vermutung nahe, dass als Reaktion auf die Pal-Aktivierung durch eine Konformationsänderung oder durch die Signalproteolyse ein zuvor verdecktes Kernlokalisierungssignal „sichtbar“ werden kann, welches den aktiven Transport von PacC in den Zellkern vermittelt (Mingot et al. 2001; Peñalva und Arst 2002).

Eine Nullmutation eines der *Pal*-Gene ruft ebenso wie eine *pacCΔ*-Mutation einen konstitutiv „sauren“ Phänotyp hervor. Ein *palΔ*-Phänotyp lässt sich allerdings durch bestimmte deletions- oder mutationsbedingte C-terminale Verkürzungen von PacC voll supprimieren (Mingot et al. 1999). Offenbar wirkt sich also eine Unterbrechung der Pal-Kaskade in der fehlenden proteolytischen Aktivierung von PacC aus.

In zwei weiteren Pilzspezies ist der beschriebene Mechanismus der pH-abhängigen Genexpression als konserviert beschrieben worden, und auch hier scheint das PacC-Homolog unter alkalischen Bedingungen durch Abspaltung des C-terminalen Anteils aktiviert zu werden: In *Saccharomyces cerevisiae* steuert das Transkript des *PacC*-Homologs *Sc-RIM101* Vorgänge wie Wachstum bei alkalischem pH, invasives Wachstum und Sporulation, was im Wesentlichen über Repressionsvorgänge an negativen und positiven Regulatoren der Genexpression geschieht (Li und Mitchell 1997; Su und Mitchell 1993; Lamb und Mitchell 2003). In *Yarrowia lipolytica* werden über den von *YI-RIM101* kodierten Transkriptionsfaktor bei alkalischem pH spezifische Gene induziert, während im sauren pH-Bereich die Induktion entsprechender Gene unabhängig von YI-Rim101p abläuft. Auch beim sog. „Mating“ und bei der Sporulation spielt YIRim101p eine Rolle (Lambert et al. 1997).

In *Candida albicans* wurden zusätzlich zum bereits oben angeführten *PacC*-Homolog *RIM101* auch Faktoren beschrieben, die den Komponenten der Pal-Kaskade homolog sind, nämlich *RIM20* (*PalA*) und *RIM8* (*PalF*) (Davis et al. 2000/1). Die Deletion von *RIM8* oder *RIM20* führt zu einer Imitation des *rim101Δ*-Phänotyps (Davis et al. 2000/1). Es ist zu erwarten, dass auch die Homologe zu PalB und Pall in *C. albicans*, die laut Genomstudien putativ in *RIM13* bzw. *RIM9* kodiert sind,



demnächst identifiziert und charakterisiert werden, was in *S. cerevisiae* bereits geschehen ist. Hier wurde *RIM9* als Homolog zu Pal gefunden, dessen Transkript eine rezeptorähnliche Funktion erfüllen könnte, und *RIM13* als Homolog zur putativen Cysteinprotease PalB (Denison et al. 1995). Der Prozessierungsmechanismus von *S.-cerevisiae*-Rim101p könnte nach einem Modell, das von Xu und Mitchell vorgeschlagen wurde, so aussehen, dass Rim20p an den C-Terminus von Rim101p bindet, worauf sich, vermittelt durch das Endosomen-assoziierte Protein Snf7p, Rim13p anlagert und in der Rolle einer Cysteinprotease die proteolytische Prozessierung von Rim101p ausführt (Xu and Mitchell 2001; Ito et al. 2001).

Die auffallenden Analogien im Vergleich mit *A. nidulans* und *S. cerevisiae* sowie die angeführten Homologien legen nahe, dass auch Rim101p in *C. albicans* über die Aktivierung einer Pal-homologen Rim-Kaskade im alkalischen Milieu und eine konsekutive ein- oder zweistufige proteolytische Abspaltung des C-Terminus aktiviert wird, wobei das 661 bp große primäre Translationsprodukt in eine kurze, aktive Form übergeführt wird. Diese würde dann einerseits die Expression pH-regulierter Gene, andererseits die pH-abhängige Morphogenese steuern. Diese Annahme wird von den folgenden Beobachtungen gestützt:

*C.-albicans*-Stämme, die aufgrund einer Punktmutation ein carboxyterminal verkürztes Rim101p exprimieren, verhalten sich geradezu komplementär im Vergleich zu *rim101Δ*-Mutanten (El Barkani et al. 2000). Sie zeigen nämlich pH-unabhängig eine konstitutive *PHR1*-Induktion bei gleichzeitiger *PHR2*-Repression. Darüber hinaus sind solche Stämme in der Lage, auch unter sauren Kulturbedingungen in hohen Raten zu filamentieren (El Barkani et al. 2000). El Barkani et al. verwendeten für diese Untersuchung zwei unabhängig voneinander isolierte *phr2Δ*-Suppressormutanten, also Klone, die trotz der *PHR2*-Nullmutation in der Lage sind, bei restriktivem saurem pH-Wert zu wachsen. Als Ursache hierfür wurde jeweils eine Nonsense-Mutation auf einem der *RIM101*-Allele gefunden, die offenbar zur Synthese eines C-terminal trunkierten Rim101p führt, das seinerseits für den konstitutiv „alkalischen“ Phänotyp verantwortlich ist (El Barkani et al. 2000).

Einer anderen Studie zufolge ist ein auf diese Weise mutiertes *RIM101*-Allel außerdem in der Lage, die Filamentierungsdefekte infolge einer *rim101Δ*-, einer

*rim8Δ*- bzw. einer *rim20Δ*-Mutation bei alkalischem pH-Wert zu supprimieren (Davis et al. 2000/1).

Interessant sind die voneinander abweichenden Beobachtungen, die in diesen beiden Arbeiten gemacht wurden: Die von El Barkani et al. beschriebenen Suppressormutationen liegen in Codon 476 bzw. 584 von *RIM101* und befähigen die entsprechenden Stämme, sowohl bei alkalischen als auch bei sauren Bedingungen zu wachsen, *PHR1* zu induzieren und in hohen Raten Hyphen zu bilden. Davis et al. hingegen arbeiten mit einer per Plasmid gezielt eingeführten Nonsense-Mutation im *RIM101*-Codon 463 unserer Zählart, die trotz eines *rim101Δ*-, *rim8Δ*- oder *rim20Δ*-Hintergrundes zwar bei alkalischem pH-Wert hohe Filamentierungsraten mit sich bringt, bei saurem pH-Wert aber praktisch keine Hyphenbildung ermöglicht.

Über das Geschilderte hinaus ist die Beobachtung interessant, dass es offensichtlich zwei verschiedene Mechanismen gibt, über die aktiviertes Rim101p agiert: Für die Rim101p-vermittelte *PHR1*-Induktion ist *EFG1* nicht erforderlich; für die pH-abhängige, Rim101p-vermittelte Filamentierung hingegen ist *EFG1* essentiell – eine *efg1Δ*-Mutation wirkt epistatisch auf eine gleichzeitige *RIM101*-Trunkierung (El Barkani et al. 2000).

## 1.8 Zielsetzungen dieser Arbeit

Die Zielsetzung dieser Arbeit war es, die molekularbiologischen Grundlagen der pH-abhängigen Genexpression und des pH-gesteuerten Dimorphismus in *C. albicans* weiter zu untersuchen und dabei insbesondere die Funktionen des Transkriptionsfaktors *RIM101* zu charakterisieren. Ausgehend von den oben angeführten Ergebnissen wurden die Konsequenzen von mutations- bzw. deletionsbedingten C-terminale Verkürzungen von Rim101, die aus zufällig aufgetretenen bzw. gezielt eingeführten Nonsense-Codons resultierten, untersucht. Hierbei wurden insbesondere die Wachstumsfähigkeit, die *PHR1*-Induktion und die Zellmorphologie bei sauren Wachstumsbedingungen (pH 4) auf dem Hintergrund einer *phr2Δ*-Nullmutation betrachtet. Neben der Frage, ob spontane *phr2Δ*-Suppressormutationen geclustert bzw. auf einen bestimmten Bereich begrenzt auftreten würden, war vor allem folgende Frage von Interesse: Zeigen (a) Wachstum,

das von Rim101p unter anderem durch die Induktion der *PHR*-Gene vermittelt wird, und (b) pH-abhängiger Polymorphismus ein stets synchrones Verhalten, unabhängig davon, wo Rim101 trunkiert wird, oder wird es im Rahmen einer progressiven, in N-terminale Richtung fortschreitenden Verkürzung von Rim101 zu einer Dissoziation dieser beiden durch Rim101p wesentlich beeinflussten Phänomene kommen? Dahinter verbirgt sich die Frage, wie pH-abhängige Filamentierung und pH-regulierte Genexpression in *C. albicans* auf molekularer Ebene zusammenhängen.

Weiterhin von Interesse war die Frage, ob sich aus den Beobachtungen Rückschlüsse auf die Aktivierungsmodalitäten von Rim101p, insbesondere auf den Ablauf der anzunehmenden proteolytischen Abspaltung des C-Terminus ziehen ließen.

Schließlich sollte in einem anschließenden Projekt die potentielle Bedeutung von Rim101p in der differentiellen Expression von sog. sekretorischen Aspartylproteinasen (*SAPs*) beleuchtet werden. Mit Hilfe eines Reportersystemes sollten die Auswirkungen von *RIM101*-Mutationen auf drei „hyphenspezifische“ Mitglieder der *SAP*-Genfamilie, nämlich *SAP4*, *SAP5* und *SAP6*, untersucht werden. Daraus gewonnene Informationen könnten dazu dienen, eine Brücke zu schlagen zwischen Vorgängen der Morphogenese und der Sekretion von Proteinasen im Pathogenitätsprozess, insbesondere im Stadium der invasiven Filamentation durch *C. albicans*.

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Verwendete Geräte

Brutschränke	KB 500	Heraeus, Hanau
Elektrophoresekammern	DNA Subcell™	BioRad, München
	Agagel Maxi	Biometra, Göttingen
Elektroporationsgeräte	Gene Pulser™	BioRad, München
	Pulse Controller™	BioRad, München
Feinwaagen	R160P / PT120	Sartorius, Göttingen
Gel-Dokumentationssystem	MidiDoc	Herolab, Wiesloch
Hybridisierungsöfen	Hybaid	Biometra, Göttingen
Kühlschränke	versch. Modelle	Liebherr, Biberach
Metallblock-Thermostate	Typ 2099/DA	Liebisch, Bielefeld
Mikroskope	Aristoplan / DMRB	Leica, Bensheim
	Dialux 22HY-100/8	Leitz, Wetzlar
Schüttelinkubatoren	G24 / G76	New Brunswick Scientific, Edison (NJ, USA)
Sequenzierer	ABI Prism™ Sequencer 377	Perkin Elmer, Weiterstadt
Spannungstransformatoren	Elektrophoresis Power Supply E431 Power Supply 200/2.0	Consort, Turnhout (Belgien) BioRad, München
Speed Vac® Plus	SC110A	Savant, New York (NY, USA)
Spektralphotometer	U-2000	Hitachi, San Jose (CA, USA)
Szintillationszähler	Tri-Carb 2100 TR	Canberra-Packard, Dreieich
Thermocycler	T3	Biometra, Göttingen
UV-Crosslinker	Stratalinker® 1800	Stratagene Europe, Amsterdam (NL)
Vortexer	REAX 2000	Heidolph, Kehlheim

Wasserbad	Modell 3043	Köttermann KG, Häningsen
Zentrifugen	EBA12/12R	Hettich, Tuttlingen
	MikroRapid/K	Hettich, Tuttlingen
	Biofuge Pico	Heraeus, Hanau
	Omnifuge 2.0 RS	Heraeus, Hanau
	Kühlzentrifuge RC-5B	Sorvall Heraeus, Hanau

## 2.2 Verbrauchsmaterialien

Blottingpapier	Hartenstein, Würzburg
Bottle-Top-Filter	Hartenstein, Würzburg
Deckgläser	Hartenstein, Würzburg
Elektroporationsküvetten 0,2 cm	Eurogentec, Seraing (Belgien)
Falcon-Röhrchen	Becton-Dickinson, Heidelberg
Nylonmembran HybondN	Amersham Pharmacia, Freiburg
Objekträger	Hartenstein, Würzburg
Reaktionsgefäße 0,5 ml; 1,5 ml; 2,0 ml	Sarstedt, Nümbrecht
RNase-freie Reaktionsgefäße 1,5 ml	Ambion, Austin (TX, USA)
Röntgenfilm Hyperfilm™ -MP	Amersham Pharmacia, Freiburg
Petrischalen	Sarstedt, Nümbrecht
Zentrifugengefäße 15 ml; 50 ml	Greiner Labortechnik, Frickenhausen

## 2.3 Chemikalien, Enzyme, Medien und Reaktionskits (Bezugsquellen)

Chemikalien	Amersham Pharmacia, Freiburg / AppliChem, Darmstadt / Eurogentec, Seraing (Belgien) / ICN Biomedicals, Asse-Relegem (Belgien) / Merck, Darmstadt / Roth, Karlsruhe / Serva, Heidelberg / Sigma, München / Stratagene Europe, Amsterdam (Niederlande)
-------------	--

Enzyme	Boehringer, Mannheim / ICN Biomedicals, Asse-Relegem (Belgien) / New England Biolabs, Schwalbach / PAN Systems, Nürnberg / Perkin Elmer, New Jersey (N. J., USA)
Medien	Difco Laboratories, Augsburg / Gibco, Paisley (GB) / Life Technologies, Karlsruhe
Reaktionskits	Dianova, Hamburg / Invitrogen, Groningen (NL) / Qiagen, Hilden / Stratagene Europe, Amsterdam (NL)

## 2.4 Lösungen und Puffer

### 50 mM CuSO<sub>4</sub>-Lösung

#### Denaturierungspuffer (pH 12,0)

1,5 M NaCl

0,5 M NaOH

#### DNA-Auftragungspuffer

1% Bromphenolblau

1% Xylencyanol

0,5 M EDTA

add. Glycerin

#### Hybridisierungspuffer (MONOD)

7% SDS

0,5 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7,4

1mM EDTA

(→ Erwärmung auf 65°C vor Gebrauch)

**Hybridisierungswaschpuffer**

2x SSC

0,1% SDS

(→ Erwärmung auf 65 °C vor Gebrauch)

**0,5 M Kaliumphosphatlösung pH 7,5**

Zusammensetzung aus  $K_2HPO_4$  und  $KH_2PO_4$

**10x Lithiumacetat**

1 M Lithiumacetat pH 7,5

**10x MOPS**

(hier alle Lösungen in DEPC- $H_2O$ )

41,8 g MOPS

51 mM NaAc

107,5 mM NaOH

10 mM EDTA

→ Einstellung auf pH 7,0

add. 1 l DEPC- $H_2O$

**Neutralisationspuffer**

1,5 M NaCl

1 M Tris

→ Einstellung auf pH 8,0 mit HCl

**50% Polyethylenglykol (PEG)****RNA-Auftragspuffer**

50% Glycerin

0,01% Bromphenolblau

in DEPC- $H_2O$

**RNA-Premix**

100 µl 10x MOPS

175 µl Formaldehyd 37%

500 µl Formamid

**SOC-Medium**

20 g Bacto Tryptone 2%

5 g Bacto Yeast Extract 0,5%

0,58 g NaCl 10 mM

0,19 g KCl 2,5 mM

2,03 g MgCl<sub>2</sub> · 6 H<sub>2</sub>O 10 mM

2,46 g MgSO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O 10 mM

3,96 g Glucose 20 mM

add. 1 l H<sub>2</sub>O

**20x SSC**

3 M NaCl

0,5 M Natriumcitrat

→ Einstellen auf pH 7,0

**10x TE-Puffer**

10 mM Tris-HCl pH 8,0

1 mM EDTA

**10x TAE**

48,5 g Tris

27,2 g Natriumacetat · 3 H<sub>2</sub>O

0,38 g EDTA-Na<sub>2</sub>

→ Einstellen auf pH 8,0 mit Essigsäure

add. 1 l H<sub>2</sub>O



**Uridin**

Stammlösung: 100 mg/ml

Arbeitskonzentration: 25 µg/ml

**X-Gal (5-Bromo-4-chlor-3-indolyl-β-galaktosid)**

Stocklösungen: 20 mg/ml bzw. 400 mg/ml

Lösung in Dimethylformamid

Lagerung bei -20 °C unter Lichtausschluß

**2.5 Bakterienkulturen****2.5.1 *E.-coli*-Stämme****DH5α** (Hanahan, 1983)

F<sup>-</sup> end A1 hsdR17(r<sub>k</sub><sup>-</sup>, m<sub>k</sub><sup>-</sup>) supE44 thi-1 λ<sup>-</sup> recA1 gyrA relA1 Δ(lacIZYA-argF) U169  
deoRΦ80d lacZΔM15

**TOP10** (Invitrogen)

F<sup>-</sup> mcrA endA1 Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80dlacZΔM15 ΔlacX74 recA1 deoR  
arabD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str<sup>R</sup>) endA1 nupG

**XL1-Blue MRF'** (Stratagene)

Δ(mcrA) 183 Δ(mcrBC-hsdSMR-mrr) 173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1  
lac [F' proAB lacI<sup>q</sup>ZΔM15 Tn5(Kan<sup>R</sup>)]

**2.5.2 Nährmedien****LB-Medium**

1 % Bacto-Trypton

0,5 % Hefeextrakt

1 % NaCl

## LB-Agar

LB-Medium mit 1,5 % Agar

### 2.5.3 Kulturbedingungen

*E. coli* wird auf LB-Agar oder in LB-Flüssigmedium angereichert. Die Inkubation findet bei 37°C, im Falle von Flüssigmedium im Schüttler statt. Zur Kultur rekombinanter Bakterienstämme mit einem Ampicillin-Resistenzgen werden dem Medium zur Selektion 100 µg/ml des Antibiotikums zugesetzt.

## 2.6 Hefekulturen

### 2.6.1 *Candida-albicans*-Stämme

Stamm	Elternstamm	Genetische Eigenschaften	Referenz	
SC 5314		Klinisches Isolat	Gillum et al., 1984	
CFM-2		<u><i>ura3Δ::λimm434 phr2Δ::hisG-URA3-hisG</i></u>	Mühlschlegel und Fonzi, 1997	
CFM-4		<u><i>ura3Δ::λimm434 phr2Δ::hisG</i></u>	Mühlschlegel und Fonzi, 1997	
CDZ-1	CFM-4	<u><i>ura3Δ::λimm434-(pBSK<sup>(+)</sup> – RIM101-475 – URA3)</i></u> <i>ura3Δ::λimm434</i>	<u><i>phr2Δ::hisG RIM101</i></u> <i>phr2Δ::hisG RIM101</i>	Diese Arbeit
CDZ-2	CFM-4	<u><i>ura3Δ::λimm434-(pBSK<sup>(+)</sup> – RIM101-474 – URA3)</i></u> <i>ura3Δ::λimm434</i>	<u><i>phr2Δ::hisG RIM101</i></u> <i>phr2Δ::hisG RIM101</i>	Diese Arbeit
CDZ-3	CFM-4	<u><i>ura3Δ::λimm434-(pBSK<sup>(+)</sup> – RIM101-473 – URA3)</i></u> <i>ura3Δ::λimm434</i>	<u><i>phr2Δ::hisG RIM101</i></u> <i>phr2Δ::hisG RIM101</i>	Diese Arbeit
CDZ-4	CFM-4	<u><i>ura3Δ::λimm434-(pBSK<sup>(+)</sup> – RIM101-472 – URA3)</i></u> <i>ura3Δ::λimm434</i>	<u><i>phr2Δ::hisG RIM101</i></u> <i>phr2Δ::hisG RIM101</i>	Diese Arbeit
CDZ-5	CFM-4	<u><i>ura3Δ::λimm434-(pBSK<sup>(+)</sup> – RIM101-471 – URA3)</i></u> <i>ura3Δ::λimm434</i>	<u><i>phr2Δ::hisG RIM101</i></u> <i>phr2Δ::hisG RIM101</i>	Diese Arbeit
CDZ-6	CFM-4	<u><i>ura3Δ::λimm434-(pBSK<sup>(+)</sup> – RIM101-470 – URA3)</i></u> <i>ura3Δ::λimm434</i>	<u><i>phr2Δ::hisG RIM101</i></u> <i>phr2Δ::hisG RIM101</i>	Diese Arbeit
CDZ-7	CFM-4	<u><i>ura3Δ::λimm434-(pBSK<sup>(+)</sup> – RIM101-469 – URA3)</i></u> <i>ura3Δ::λimm434</i>	<u><i>phr2Δ::hisG RIM101</i></u> <i>phr2Δ::hisG RIM101</i>	Diese Arbeit
CDZ-8	CFM-4	<u><i>ura3Δ::λimm434-(pBSK<sup>(+)</sup> – RIM101-468 – URA3)</i></u> <i>ura3Δ::λimm434</i>	<u><i>phr2Δ::hisG RIM101</i></u> <i>phr2Δ::hisG RIM101</i>	Diese Arbeit
CDZ-9	CFM-4	<u><i>ura3Δ::λimm434-(pBSK<sup>(+)</sup> – RIM101-467 – URA3)</i></u> <i>ura3Δ::λimm434</i>	<u><i>phr2Δ::hisG RIM101</i></u> <i>phr2Δ::hisG RIM101</i>	Diese Arbeit
CDZ-10	CFM-4	<u><i>ura3Δ::λimm434-(pBSK<sup>(+)</sup> – RIM101-466 – URA3)</i></u> <i>ura3Δ::λimm434</i>	<u><i>phr2Δ::hisG RIM101</i></u> <i>phr2Δ::hisG RIM101</i>	Diese Arbeit

CDZ-11	CFM-4	<u><i>ura3Δ::λimm434</i>-(pBSK<sup>(+)</sup> – RIM101-465 – URA3)</u> <i>ura3Δ::λimm434</i>	<u><i>phr2Δ::hisG</i> RIM101</u> <i>phr2Δ::hisG</i> RIM101	Diese Arbeit
CDZ-12	CFM-4	<u><i>ura3Δ::λimm434</i>-(pBSK<sup>(+)</sup> – RIM101-464 – URA3)</u> <i>ura3Δ::λimm434</i>	<u><i>phr2Δ::hisG</i> RIM101</u> <i>phr2Δ::hisG</i> RIM101	Diese Arbeit
CDZ-13	CFM-4	<u><i>ura3Δ::λimm434</i>-(pBSK<sup>(+)</sup> – RIM101-463 – URA3)</u> <i>ura3Δ::λimm434</i>	<u><i>phr2Δ::hisG</i> RIM101</u> <i>phr2Δ::hisG</i> RIM101	Diese Arbeit
CDZ-14	CFM-4	<u><i>ura3Δ::λimm434</i>-(pBSK<sup>(+)</sup> – RIM101 – URA3)</u> <i>ura3Δ::λimm434</i>	<u><i>phr2Δ::hisG</i> RIM101</u> <i>phr2Δ::hisG</i> RIM101	Diese Arbeit
CDZ-15	CFM-4	<u><i>ura3Δ::λimm434</i>-(pBSK<sup>(+)</sup> – URA3)</u> <i>ura3Δ::λimm434</i>	<u><i>phr2Δ::hisG</i> RIM101</u> <i>phr2Δ::hisG</i> RIM101	Diese Arbeit
CDZ-200	CFM-4	<u><i>ura3Δ::λimm434</i>-(pBSK<sup>(+)</sup> – RIM101-411 – URA3)</u> <i>ura3Δ::λimm434</i>	<u><i>phr2Δ::hisG</i> RIM101</u> <i>phr2Δ::hisG</i> RIM101	Diese Arbeit
CDZ-300	CFM-4	<u><i>ura3Δ::λimm434</i>-(pBSK<sup>(+)</sup> – RIM101-385 – URA3)</u> <i>ura3Δ::λimm434</i>	<u><i>phr2Δ::hisG</i> RIM101</u> <i>phr2Δ::hisG</i> RIM101	Diese Arbeit
CDZ-400	CFM-4	<u><i>ura3Δ::λimm434</i>-(pBSK<sup>(+)</sup> – RIM101-359 – URA3)</u> <i>ura3Δ::λimm434</i>	<u><i>phr2Δ::hisG</i> RIM101</u> <i>phr2Δ::hisG</i> RIM101	Diese Arbeit
CDZ-500	CFM-4	<u><i>ura3Δ::λimm434</i>-(pBSK<sup>(+)</sup> – RIM101-333 – URA3)</u> <i>ura3Δ::λimm434</i>	<u><i>phr2Δ::hisG</i> RIM101</u> <i>phr2Δ::hisG</i> RIM101	Diese Arbeit
CDZ-600	CFM-4	<u><i>ura3Δ::λimm434</i>-(pBSK<sup>(+)</sup> – RIM101-305 – URA3)</u> <i>ura3Δ::λimm434</i>	<u><i>phr2Δ::hisG</i> RIM101</u> <i>phr2Δ::hisG</i> RIM101	Diese Arbeit
CDZ-700	CFM-4	<u><i>ura3Δ::λimm434</i>-(pBSK<sup>(+)</sup> – RIM101-281 – URA3)</u> <i>ura3Δ::λimm434</i>	<u><i>phr2Δ::hisG</i> RIM101</u> <i>phr2Δ::hisG</i> RIM101	Diese Arbeit
<i>phr2Δ</i> - Suppres- sormu- tanten	CFM-2	14 verschiedene RIM101-Punktmutationen auf dem Hintergrund: <u><i>ura3Δ::λimm434 phr2Δ::hisG-URA3-hisG</i></u> <i>ura3Δ::λimm434 phr2Δ::hisG</i>		Diese Arbeit

## 2.6.2 Nährmedien

### YPD-Medium

2 % Glucose

2 % Pepton

1 % Hefeextrakt

### YPD-Medium pH 4 oder pH 7

A) 20 g Pepton

10 g Hefeextrakt

add. 200 ml H<sub>2</sub>O

→ Autoklavieren

- B) 20 g Glucose  
35,7 g HEPES  
add. 800 ml H<sub>2</sub>O  
→ Einstellen auf pH-Wert mit HCl bzw. NaOH; Sterilfiltration

A) und B) zusammengeben

### **YPD-Agar**

YPD-Medium (s. o. ) mit 1,5 % Agar

### **YNB-Medium pH 4 oder pH 7**

- A) 20 g Glucose  
5 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  
35,7 g HEPES  
add. 900 ml H<sub>2</sub>O  
→ Einstellen auf pH-Wert; Sterilfiltration

- B) 1,7 g YNB (Yeast nitrogen base)  
add. 100 ml H<sub>2</sub>O  
→ Sterilfiltration

A) und B) zusammengeben

### **YNB-Agar**

YNB-Medium (s. o.) mit 1,5 % Agar

### **Medium 199 (M199) pH 4 bis pH8**

- 9,8 g M199  
35,7 g HEPES  
add. 1 l H<sub>2</sub>O  
→ Einstellen auf pH-Wert; Sterilfiltration

### **M199-Agar**

Medium 199 (s. o.) mit 1,5 % Agar

### 2.6.3 Kulturbedingungen

*Candida albicans* wird auf YPD-Agar unter Inkubation bei 30°C für ein bis zwei Tage angezüchtet. Zur Selektion bestimmter Transformanten wird *Candida* auf YNB-Agar (Mangelmedium) angereichert. Zur Vermehrung von *ura3Δ*-Stämmen auf YNB-Agar oder in YNB-Medium wird dem Medium Uridin in einer Konzentration von 25 µg/ml zugesetzt.

## 2.7 Plasmide

### 2.7.1 Vektoren

#### pBluescript® II SK(+)

(von Stratagene)  
Derivat des pUC19; f1 ori, ColE1 ori, *lacZ*; multiple Klonierungsregion, flankiert von T3- und T7-RNA-Promotoren; Amp<sup>R</sup>

#### pCR® 2.1-TOPO

(von Invitrogen)  
Linearisierter Vektor mit 3'-Thymidin-Überhängen zur Klonierung von PCR-Produkten; f1 ori, ColE1 ori, *lacZ*, multiple Klonierungsregion flankiert vom T7-RNA-Promotor, Amp<sup>R</sup>, Kan<sup>R</sup>

### 2.7.2 Rekombinante Plasmide

Plasmid	Vektor	Funktionelle Bereiche	Referenz
pSM2	pBSK(+)	<i>URA3</i> (3,85 kb)	El Barkani et al. 2000
pEM6	pBSK(+)	<i>URA3</i> (0,9 kb)	Diese Arbeit
pDZ3-1	pCR® 2.1	<i>RIM101-475</i>	Diese Arbeit
pDZ3-2	pCR® 2.1	<i>RIM101-474</i>	Diese Arbeit
pDZ3-3	pCR® 2.1	<i>RIM101-473</i>	Diese Arbeit
pDZ3-4	pCR® 2.1	<i>RIM101-472</i>	Diese Arbeit
pDZ3-5	pCR® 2.1	<i>RIM101-471</i>	Diese Arbeit

pDZ3-6	pCR <sup>®</sup> 2.1	<i>RIM101-470</i>	Diese Arbeit
pDZ3-7	pCR <sup>®</sup> 2.1	<i>RIM101-469</i>	Diese Arbeit
pDZ3-8	pCR <sup>®</sup> 2.1	<i>RIM101-468</i>	Diese Arbeit
pDZ3-9	pCR <sup>®</sup> 2.1	<i>RIM101-467</i>	Diese Arbeit
pDZ3-10	pCR <sup>®</sup> 2.1	<i>RIM101-466</i>	Diese Arbeit
pDZ3-11	pCR <sup>®</sup> 2.1	<i>RIM101-465</i>	Diese Arbeit
pDZ3-12	pCR <sup>®</sup> 2.1	<i>RIM101-464</i>	Diese Arbeit
pDZ3-13	pCR <sup>®</sup> 2.1	<i>RIM101-463</i>	Diese Arbeit
pDZ3-14	pCR <sup>®</sup> 2.1	<i>RIM101</i>	Diese Arbeit
pDZ3-200	pCR <sup>®</sup> 2.1	<i>RIM101-411</i>	Diese Arbeit
pDZ3-300	pCR <sup>®</sup> 2.1	<i>RIM101-385</i>	Diese Arbeit
pDZ3-400	pCR <sup>®</sup> 2.1	<i>RIM101-359</i>	Diese Arbeit
pDZ3-500	pCR <sup>®</sup> 2.1	<i>RIM101-333</i>	Diese Arbeit
pDZ3-600	pCR <sup>®</sup> 2.1	<i>RIM101-305</i>	Diese Arbeit
pDZ3-700	pCR <sup>®</sup> 2.1	<i>RIM101-281</i>	Diese Arbeit
pDZ4-1	pSM2	<i>URA3-RIM101-475</i>	Diese Arbeit
pDZ4-2	pSM2	<i>URA3-RIM101-474</i>	Diese Arbeit
pDZ4-3	pSM2	<i>URA3-RIM101-473</i>	Diese Arbeit
pDZ4-4	pSM2	<i>URA3-RIM101-472</i>	Diese Arbeit
pDZ4-5	pSM2	<i>URA3-RIM101-471</i>	Diese Arbeit
pDZ4-6	pSM2	<i>URA3-RIM101-470</i>	Diese Arbeit
pDZ4-7	pSM2	<i>URA3-RIM101-469</i>	Diese Arbeit
pDZ4-8	pSM2	<i>URA3-RIM101-468</i>	Diese Arbeit
pDZ4-9	pSM2	<i>URA3-RIM101-467</i>	Diese Arbeit
pDZ4-10	pSM2	<i>URA3-RIM101-466</i>	Diese Arbeit
pDZ4-11	pSM2	<i>URA3-RIM101-465</i>	Diese Arbeit
pDZ4-12	pSM2	<i>URA3-RIM101-464</i>	Diese Arbeit
pDZ4-13	pSM2	<i>URA3-RIM101-463</i>	Diese Arbeit
pDZ4-14	pSM2	<i>URA3-RIM101</i>	Diese Arbeit
pDZ4-200	pSM2	<i>URA3-RIM101-411</i>	Diese Arbeit
pDZ4-300	pSM2	<i>URA3-RIM101-385</i>	Diese Arbeit
pDZ4-400	pSM2	<i>URA3-RIM101-359</i>	Diese Arbeit

pDZ4-500	pSM2	<i>URA3-RIM101-333</i>	Diese Arbeit
pDZ4-600	pSM2	<i>URA3-RIM101-305</i>	Diese Arbeit
pDZ4-700	pSM2	<i>URA3-RIM101-281</i>	Diese Arbeit
pSU4	pEM6	<i>SAP4pr::URA3</i>	Diese Arbeit
pSU5	pEM6	<i>SAP5pr::URA3</i>	Diese Arbeit
pSU6	pEM6	<i>SAP6pr::URA3</i>	Diese Arbeit

## 2.8 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden von ARK Scientific, Darmstadt bezogen.

Antisense-Primer für die Amplifizierung verkürzter *RIM101*-Fragmente unter Einführung eines TAA-Stopcodons:

DZ 1:	5'- <u>TT</u> ATTGGGTTGACATGTTATGATATTG-3'
DZ 2:	5'- <u>TT</u> AGGTTGACATGTTATGATATTGCAT-3'
DZ 3:	5'- <u>TT</u> ATGACATGTTATGATATTGCATGTC-3'
DZ 4:	5'- <u>TT</u> ACATGTTATGATATTGCATGTTCGAT-3'
DZ 5:	5'- <u>TT</u> AGTTATGATATTGCATGTTCGATGGA-3'
DZ 6:	5'- <u>TT</u> AATGATATTGCATGTTCGATGGAATT-3'
DZ 7:	5'- <u>TT</u> AATATTGCATGTTCGATGGAATTCGA-3'
DZ 8:	5'- <u>TT</u> ATTGCATGTTCGATGGAATTCGATAA-3'
DZ 9:	5'- <u>TT</u> ACATGTTCGATGGAATTCGATAAGGA -3'
DZ 10:	5'- <u>TT</u> AGTCGATGGAATTCGATAAGGAGTT-3'
DZ 11:	5'- <u>TT</u> AGATGGAATTCGATAAGGAGTTGAA-3'
DZ 12:	5'- <u>TT</u> AGGAATTCGATAAGGAGTTGAAGAA-3'
DZ 13:	5'- <u>TT</u> AATTCGATAAGGAGTTGAAGAATTT-3'
DZ 200:	5'- <u>TT</u> ACCTCTTGGTGGTGAACCTCAG-3'
DZ 300:	5'- <u>TT</u> AGTTGAAATCGTTCAAATACTATTA-3'
DZ 400:	5'- <u>TT</u> AGTCGTTCGTAGTTCAATCCATC-3'
DZ 500:	5'- <u>TT</u> ACGAGTTTGCTCGCTTGTTGG-3'
DZ 600:	5'- <u>TT</u> AATACTTCTTTGGATGGTCTTCAG-3'
DZ 700:	5'- <u>TT</u> AGGGACACAAGTCACAATGGAA-3'

Unterstrichen ist das an den Primer angefügte Stopcodon; als Sense Primer wurde jeweils PRR2-3 (s. u.) verwendet.

Primer für die Herstellung einer *PHR1*-Sonde zur Hybridisierung:

PHR1-a: 5'-CTATCAGCAAGATGCCGCG-3'

PHR1-b: 5'-CCAGAAGCAGATGCAGAGG-3'

Primer für die Amplifizierung des *RIM101*-Gens aus genomischer DNA:

PRR2-3: 5'-ACGACCTTATATGCGTAATCC-3'

PRR2-4: 5'-GAACCATGTAAATAGAGAACGG-3'

Primer für die Sequenzierung des *RIM101*-Gens:

PRR2-5: 5'-GCATTTAGTAGGTAGTGTG-3'

PRR2-6: 5'-GTCAAGCTCGTCTTCTGAAG-3'

PRR2-7: 5'-CATTCATCCCGTAACATAC-3'

PRR2-8: 5'-CAGCTTCATAGATGTTACC-3'

PRR2-9: 5'-CTTCAGAAGACGAGCTTGAC-3'

PRR2-10: 5'-CACACTACCTACTAAATGC-3'

PRR2-11: 5'-CCTCAACAGCAACACCCAC-3'

PRR2-12: 5'-CTTCAAATCTTGAGGTCTC-3'

PRR2-13: 5'-GAAAGGTCCTTTCAAGTG-3'

PRR2-14: 5'-GGCTGCAGATTGAGAAGTG-3'

PRR2-15: 5'-GATGAAAGCCGGCACTGAG-3'

Primer für die Amplifizierung des *ACT1*-Gens aus genomischer DNA von *C. albicans* zur Herstellung einer *ACT1*-Sonde:

OK1: 5'-TGTTTTCCCATCCCTCGT-3'

OK2: 5'-TTCGTCGTATTCTTGTTT -3'



Primer für die Sequenzierung transformierter Fragmente aus genomischer DNA von *Candida-albicans*-Transformanten:

T3: 5'-AATTAACCCTCACTAAAGGG-3'  
URA3-1: 5'-CTACGAAAGAATTGTATCTAG-3'

Primer in *RIM101* bzw. auf einer flankierenden Sequenz der multiplen Klonierungsregion des Vektors pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO, eingesetzt in der RT-PCR:

TVU 1: 5'-CGCCAGTGTGCTGGAATTC-3'  
PRR2-20: 5'-CACAAAGCTCCACAGCAACC-3'

## 2.9 DNA-Präparation

### 2.9.1 Schnellmethode zur Plasmid-DNA-Isolierung

#### Lösung 1

50 mM Glukose  
25 mM Tris-HCl, pH 8  
10 mM EDTA

#### Lösung 2

0,2 M NaOH  
1 % SDS

#### Lösung 3

29,45 g Kaliumacetat  
add. 88,5 ml H<sub>2</sub>O  
11,5 ml Essigsäure

Lösung 1 und 3 werden bei 4°C gelagert. Lösung 2 wird immer frisch angesetzt.

Eine Einzelkolonie eines plasmidtragenden *E.-coli*-Stammes wird in 3 ml LB-Medium angeimpft. Die Kultur wächst über Nacht unter Selektionsdruck (z. B.

durch Zugabe von Ampicillin) bei 37°C im Schüttler. 2 ml der Übernachtskultur werden bei 14000 rpm für 1 min abzentrifugiert und das Zellpellet in 100 µl Lösung 1 durch Vortexen gelöst. Nach Zugabe von 200 µl Zell-Lysis-Puffer (Lösung 2) wird die Suspension solange gemischt, bis sie sich aufklart, und anschließend für 5 min auf Eis inkubiert. Darauf wird 150 µl Neutralisations-Puffer (Lösung 3) hinzugefügt, durch mehrmaliges Schwenken gemischt und wieder für 5 min auf Eis inkubiert. Nach dem Abzentrifugieren von 3 min bei 14000 rpm werden 400 µl des Überstandes, der die Plasmid-DNA enthält, in ein neues Cap dekantiert. Zur Fällung der DNA wird dieser Überstand mit dem 2,5-fachen Volumen absoluten Ethanol versetzt und 30 min bei -20°C inkubiert, um ihn dann 15 min bei 4°C zu zentrifugieren. Das Sediment wird mit 70%igem Ethanol gewaschen, bei 37°C getrocknet und in 30 µl H<sub>2</sub>O (30 µg RNase/ml) aufgenommen. Menge und Qualität der gewonnenen Plasmid-DNA werden auf einem Agarosegel überprüft.

### **2.9.2 Mini-Präparation von Plasmid-DNA**

Da Beschaffenheit und Menge der Plasmid-DNA aus der Schnellmethode zwar für diagnostische Zwecke wie Größenbestimmung oder Probeverdau des Plasmides, nicht aber für die präparative Weiterverarbeitung oder Sequenzierung zufrieden stellend sind, wird in diesen Fällen eine Präparationsmethode verwendet, bei der die DNA über spezielle Silicagel-Anionenaustauschersäulen aufgereinigt wird. Diese Präparation wird mit dem Plasmid-DNA-Isolierungskit QIAprep Spin Miniprep von Qiagen durchgeführt. Bis zu 20 µg DNA können nach Angaben des Herstellers an eine Säule gebunden werden.

#### P1 (Resuspendierungspuffer)

50 mM Tris-HCl, pH 8

10 mM EDTA

100 µg/ml RNase

#### P2 (Lysepuffer)

200 mM NaOH

1 % SDS

N3 (Neutralisierungspuffer)

3 M Kaliumacetat, pH 5,5

PE (Waschpuffer)

1 M NaCl

50 mM MOPS, pH 7

15 % Ethanol

2 ml einer Übernachtskultur (Kulturbedingungen s. o.) werden 1 min abzentrifugiert. Nach vollständiger Resuspension des Pellets in 250 µl P1 werden 250 µl P2 durch Schwenken dazugemischt – die Lysezeit sollte 5 min nicht überschreiten. 350 µl N3 werden hinzugegeben und sofort durch nochmaliges Schwenken vermischt. Es bildet sich ein Niederschlag, der durch 10minütige Zentrifugation bei 14000 rpm sedimentiert wird. 800 µl des Überstandes werden in eine Silicagel-Anionenaustauschersäule pipettiert und 1 min bei 14000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wird verworfen, und die in der Säule verbliebene Plasmid-DNA wird mit 750 µl PE durch 1 min Zentrifugation gewaschen. Der Durchfluss wird wiederum verworfen, und in der Säule verbliebene PE-Reste werden durch nochmaliges einminütiges Zentrifugieren weitestgehend entfernt. Um die DNA zu eluieren, werden je nach erwünschter Konzentration 30 µl oder 50 µl H<sub>2</sub>O in die Säule pipettiert, anschließend wird für 1 min zentrifugiert. Schließlich folgt die Überprüfung von Menge und Größe des Plasmides über ein Agarosegel.

### **2.9.3 Midi-Präparation von Plasmid-DNA**

Zur Präparation größerer Mengen reiner Plasmid-DNA wird das QIAGEN Plasmid-DNA-Isolierungskit von Qiagen verwendet, das wie das Minikit (s. o.) auf der Technik der Silicagel-Anionenaustauschersäule beruht. Es enthält folgende Lösungen: P1 (Resuspendierungspuffer), P2 (Lysepuffer), P3 (Neutralisierungspuffer), QBT (Äquilibrierungspuffer), QC (Waschpuffer), QF

(Elutionspuffer). Nach den Angaben des Herstellers beträgt die maximale DNA-Ausbeute 100 µg.

#### **2.9.4 Präparation genomischer DNA aus *Candida*-Spezies**

Folgende Lösungen sind für die DNA-Präparation erforderlich:

##### 2 M Sorbitol

##### Zymolase-Lösung

0,04 % Zymolase 20T (ICN Biomedicals)

1 M Sorbitol

50 mM K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,5

10 mM DTT

##### Lösung 1

50 mM EDTA

0,2 % SDS

##### Phenol / Chloroform (1:1)

##### 70%iges und 100%iges Ethanol

Der *Candida*-Stamm wird in 15 ml YPD-Medium bei 30°C im Schüttler über Nacht angezogen. Die Übernachtskultur wird für 3 min bei 4000 rpm abzentrifugiert und das Pellet in 1 ml 1 M Sorbitol aufgenommen. Nun werden die Zellen für 3 min bei 8000 rpm abzentrifugiert, in 800 µl Zymolase-Lösung resuspendiert und für 1,5 h bei 37°C geschüttelt. Die Zymolase hydrolysiert die Zuckerpolymere der Zellwand und verdaut sie dadurch. Anschließend wird die Zellsuspension bei 8000 rpm für 1 min abzentrifugiert und das Zellpellet in 1 ml 1M Sorbitol gewaschen. Nach nochmaligem Abzentrifugieren (8000 rpm, 1 min) wird das Pellet in 800 µl Lösung 1 aufgenommen und durch Vortexen vollständig gelöst. 1 ml Phenol/Chloroform (1:1) wird zugesetzt und unter Schütteln für 1 h bei 37°C

inkubiert. Daraufhin wird für 3 min bei 14000 rpm abzentrifugiert und 800 µl der wässrigen Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Es folgt eine erneute Extraktion mit 1 ml Phenol/Chloroform (1:1) für 30 min bei 37°C im Schüttler. Nach 3minütigem Abzentrifugieren bei 14000 rpm werden 400 µl der wässrigen Phase mit 1 ml eiskaltem absolutem Ethanol versetzt und die DNA bei –20°C für 15 min gefällt. Ein 10minütiger Zentrifugationsschritt bei 4°C und 14000 rpm bringt ein DNA-Pellet zutage, das mit 1 ml 70%igem Ethanol gewaschen, abzentrifugiert und bei 37°C getrocknet wird. Die genomische DNA wird schließlich in 100 µl H<sub>2</sub>O (30 µg RNase/ml) aufgenommen, worauf der Erfolg der Isolierung auf einem Agarosegel überprüft werden kann.

### **2.9.5 Phenolextraktion und Ethanol-fällung von DNA**

Mit der Phenolextraktion und anschließender Ethanol-fällung lassen sich Substanzen wie z. B. Enzyme (i. a. Proteine), Oligonukleotide, Cofaktoren oder Puffer, die in nachfolgenden Reaktionen unerwünscht sind oder diese gar beeinträchtigen könnten, aus einem DNA-haltigen Reaktionsansatz entfernen.

Dazu wird das Ausgangsvolumen mit H<sub>2</sub>O auf 100 µl oder 200 µl aufgefüllt und mit dem gleichen Volumen Phenol-Chloroform (1:1) versetzt, durch Schütteln oder Vortexen kräftig gemischt und zur Phasentrennung 3 min bei 14000 rpm zentrifugiert. Die sich danach oben befindende wässrige Phase, in der sich die DNA aufhält, wird per Pipette abgenommen und mit einem zehntel Volumen 3 M NaAc (pH 5,2) und dem 2,5-fachen Volumen absoluten Ethanols gemischt. Auf eine 30minütige Fällung bei –20°C folgt die Abzentrifugation von 15 min bei 4°C. Das Pellet wird mit 70%igem Ethanol gewaschen, bei 37°C getrocknet und in einem angemessenen Volumen H<sub>2</sub>O aufgenommen.

### **2.9.6 Aufreinigung von DNA aus verschiedensten Reaktionsansätzen**

Alternativ zur oben beschriebenen Phenol-Chloroform-Extraktion wurde die Aufreinigung von DNA-Fragmenten der Größe 0,1 bis 10 kb in manchen Fällen über das QIAquick Nucleotide Removal kit von Quiagen vorgenommen. Das

Prinzip dieses Kits besteht in der selektiven Bindung von DNA an Säulen mit Silikagel-Membranen in Gegenwart hoher Salzkonzentrationen, während die übrigen Komponenten des Ansatzes (z. B. Restriktionsenzyme, Ligase, Puffer) ausgewaschen und entfernt werden. Bezüglich der Zusammensetzung der Lösungen werden vom Hersteller keine Angaben gemacht.

### 2.9.7 Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Dieses Verfahren dient zur Aufreinigung bestimmter PCR- oder DNA-Spaltprodukte und zu ihrer Befreiung sowohl von störenden Reaktionskomponenten als auch von anderen DNA-Fragmenten, um sie für Klonierungen, Sequenzierungen oder als Sonde für Hybridisierungen einzusetzen. Dazu wird die Bande, die das gewünschte Fragment enthält, mit einem Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten. Zur Extraktion aus dem Gelstück wird das QIAquick Gel Extraction kit von Qiagen verwendet.

### 2.10 RNA-Präparation aus *C. albicans*

Erforderliche Lösungen:

#### DEPC-H<sub>2</sub>O

0,1 % DEPC (Diethylpyrokarbonat)

#### Saures Phenol

#### Phenol/Chloroform (1:1)

#### TES-Puffer

10 mM Tris-HCl, pH 7,5

10 mM EDTA, pH 8

0,5 % SDS

in DEPC-H<sub>2</sub>O

### 70%iges und 100%iges Ethanol

#### 3M NaAc-Lösung

pH 5,2; in DEPC-H<sub>2</sub>O

Die Präparation von hochmolekularer RNA ist ein essentieller Schritt in der Analyse der Genexpression von Hefen. Die RNA-Isolierung verlangt aufgrund der ubiquitär vorhandenen RNA-degradierenden Enzyme einige wichtige Vorkehrungen. Das Tragen von Handschuhen bei der RNA-Präparation ist genauso unerlässlich wie das Benutzen von RNase-freien Chemikalien und Verbrauchsmaterialien. Da die Degradation von RNA durch RNasen eine zeitabhängige Reaktion ist, ist zügiges Arbeiten geboten. Die Präparationsgefäße sollten dabei stets auf Eis gehalten werden.

Die Zellzahl pro ml einer 10 ml Übernachtskultur wird mit Hilfe der Zählkammer ermittelt, so dass  $4,5 \times 10^8$  Zellen in 100 ml M199 angeimpft und bei dem gewünschten pH-Wert angezüchtet werden können. Während die Inkubationstemperatur im Regelfall 37°C beträgt, ist die Inkubationszeit (1 - 3 h) vom zu untersuchenden Transkript abhängig. Die Kulturen werden für 5 min bei 4000 rpm und 4°C abzentrifugiert, und das Pellet wird in 1 ml DEPC-H<sub>2</sub>O resuspendiert. Nach einminütigem Zentrifugieren bei 14000 rpm werden die Zellen in 600 µl TES aufgenommen und mit 600 µl saurem Phenol durch Vortexen vermischt, danach 1 h unter gelegentlichem Vortexen bei 65°C inkubiert. Das Eppendorf-Cap mit dem Gemisch wird für 10 sec in Ethanol/Trockeneis eingetaucht und 5 min bei 14000 rpm zentrifugiert. 600 µl der oberen, wässrigen Phase, welche die RNA enthält, wird mit 600 µl saurem Phenol versetzt, gründlich gevortext und nochmals für 10 sec in Ethanol/Trockeneis getaucht und 5 min bei 14000 rpm zentrifugiert. Anschließend werden 550 µl der wässrigen Phase mit 550 µl Phenol/Chloroform (1:1) versetzt, 2 min durch Schwenken vermischt und 1 min bei 14000 rpm zentrifugiert. Nun werden 500 µl der wässrigen Phase abgenommen und in 500 µl Phenol/Chloroform (1:1) überführt, nochmals 2 min durch Schwenken vermischt und 1 min bei 14000 rpm zentrifugiert. Für die RNA-Fällung werden 400 µl der wässrigen Phase in ein Gemisch von 1 ml eiskaltem 100%igem Ethanol und 40 µl 3M Na-Acetat (pH 5,2) pipettiert und 1 h bei -20°C

inkubiert. Die RNA wird bei 4°C und 14000 rpm für 15 min abzentrifugiert, das Pellet mit 400 µl eiskaltem 70%igem Ethanol gewaschen und bei 37°C luftgetrocknet. Abschließend wird es in 100 µl DEPC-H<sub>2</sub>O aufgenommen und bis zum Gebrauch bei -80°C gelagert. Quantität und Qualität der RNA können mittels denaturierender Agarose-Gelelektrophorese überprüft werden.

## **2.11 Gelelektrophorese**

### **2.11.1 Agarose-Gelelektrophorese**

Die Elektrophorese über ein Agarosegel dient der Auftrennung und der Größenbestimmung von DNA-Fragmenten. Die Agarosekonzentration ist in Abhängigkeit von der Größe der zu erwartenden DNA-Fragmente zu wählen, wobei in der Regel mit einer Konzentration von 0,7% - 1,5% Agarose gearbeitet wird. Für große DNA-Fragmente empfiehlt sich ein niedrigprozentiges, für kleine ein hochprozentiges Gel. Als Gelpuffer und Laufpuffer wird 1x TAE verwendet. Die Agarose wird im Gelpuffer durch Erhitzen in der Mikrowelle gelöst und nach Abkühlen auf ca. 50°C in horizontale Gelträger gegossen. Die zu analysierende DNA wird vor dem Auftragen mit einem Blaumarker (GEBS) versetzt. Als DNA-Größenstandard wird die Smart-Ladder (Eurogentec) verwendet. Die Elektrophorese erfolgt bei 25 - 150 V. Um die DNA-Banden sichtbar zu machen, wird das Gel für 10 - 15 min in eine Ethidiumbromid-Lösung gelegt und anschließend unter UV-Licht (302 nm) betrachtet. Aufgrund der konstanten Menge an DNA-Größenmarker lässt sich die Menge der zu analysierenden DNA-Fragmente abschätzen.

### **2.11.2 Gelelektrophorese mit Formaldehydgelen**

Die Auftrennung von RNA geschieht in einem Formaldehydgel. 10 µg RNA werden mit 15 µl Premix-Lösung (10x MOPS, Formaldehyd 37%, Formamid; Verhältnis 1 : 1,75 : 5) und 3 µl RNA-Auftragspuffer versetzt. Nach 5minütiger Denaturierung



bei 65°C werden die Proben in einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt. Zur Herstellung des Agarosegels, das 0,66% Formaldehyd und 1x MOPS enthält, wird die Agarose in DEPC-H<sub>2</sub>O aufgekocht und erst nach Abkühlen auf ca. 50°C mit Formaldehyd und 10x MOPS versetzt. Die Elektrophorese erfolgt in 1x MOPS (Laufpuffer) bei 60 bis 80 V.

## **2.12 Klonierungsmethoden**

### **2.12.1 Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen**

Alle Enzyme werden in den vom Hersteller (NEB) beigefügten Puffern eingesetzt. Zur analytischen Spaltung von DNA inkubiert man 1 µg DNA mit 1 bis 2 Units Enzym in einem Volumen von 20 µl für 1 bis 2 Stunden, in der Regel bei einer Inkubationstemperatur von 37°C. Die Reaktion wird durch Phenolextraktion des Restriktionsenzym, durch Aufreinigung des Verdau über bestimmte Säulen (s. o.) oder durch Zugabe von DNA-Auftragspuffer beendet. Grundsätzlich ist darauf zu achten, dass maximal 1 µl Enzym pro 10 µl-Ansatz eingesetzt wird, damit das Glycerin im Enzympuffer nicht inhibitorisch auf die Reaktion wirkt.

### **2.12.2 Dephosphorylierung linearisierter Plasmidvektoren**

Bei der Dephosphorylierung entfernen spezielle Enzyme die Phosphatgruppen an den 5'-Enden der linearisierten DNA-Fragmente. Dies verhindert wirksam die Selbstligation eines nur mit einem Restriktionsenzym geschnittenen Vektors, was sich nach der Transformation des Ligationsansatzes in einem stark reduzierten bis nicht vorhandenen „Hintergrund“ auf den Transformationsplatten bemerkbar macht.

Der geschnittene Vektor wird phenolextrahiert und mit Ethanol gefällt, das Pellet in der Speed-Vac getrocknet und in 17 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen. Danach erfolgt die Behandlung mit 2 µl 10x Dephosphorylierungspuffer und 1 U Phosphatase (Shrimp-Phosphatase, Boehringer Mannheim). Dieser Ansatz wird für 30 min bei 37°C inkubiert. Nach der anschließenden Phenolextraktion wird das Pellet in 20 µl

H<sub>2</sub>O aufgenommen. 2 µl der DNA werden über ein Agarosegel qualitativ und quantitativ beurteilt.

### 2.12.3 DNA-Ligation

Bei der DNA-Ligation werden zwei verschiedene DNA-Fragmente durch das Enzym T4-DNA-Ligase (NEB) in Anwesenheit von ATP miteinander verknüpft. Ein Ansatz aus linearisiertem Vektor und zu inserierendem Fragment wird mit Hilfe der T4-DNA-Ligase zu einem geschlossenen Plasmid verbunden. Dabei sollte das Insert im Überschuss vorhanden sein, um die Wahrscheinlichkeit der Vektor-Selbstligation zu vermindern. Die Vektor-Selbstligation lässt sich aber auch durch Dephosphorylieren der 5'-Enden des Plasmids (s. o.) vermeiden. Wird der Vektor mit zwei unterschiedlichen Enzymen linearisiert, ist eine Religation aufgrund der im Regelfall nicht-kompatiblen Enden ebenfalls nicht möglich. Das Insert besitzt phosphorylierte 5'-Enden, die mit den 3'-Enden des Vektors verbunden werden können. Vektor und Insert haben im Ligationsansatz in der Regel ein molares Verhältnis von 1 : 1 bis 1 : 3. Das Ligationsvolumen beträgt 20 µl und enthält außer Vektor und Insert 2 µl 10x T4-Ligasepuffer (NEB), 1 U T4-DNA-Ligase und H<sub>2</sub>O. Ein Kontrollansatz, welcher H<sub>2</sub>O anstelle des Inserts enthält, zeigt nach der Transformation mögliche Vektorreligationen oder Verunreinigungen mit nicht geschnittenem Vektor an und verweist damit auf den „Hintergrund“, der dann im Normalfall auf allen Platten enthalten ist. Die Ligationsansätze werden entweder für 30 min bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 14 °C im Wasserbad inkubiert. Danach sollte entweder direkt mit der Transformation des Ansatzes fortgefahren oder eine Zwischenlagerung bei -20 °C vorgenommen werden.

### 2.13 Transformation von Bakterien

Bei der Transformation wird ein Plasmid in das Zytoplasma eines Bakterienstammes übertragen, wo eine selbstständige Replikation stattfinden kann. Dadurch lässt sich ein bereits vorhandenes oder durch Ligation bzw.

Klonierung gewonnenes Plasmid praktisch beliebig amplifizieren, um es dann beispielsweise für einen Restriktionsverdau oder für die Sequenzierung einzusetzen. Durch die Transformation erhält das Bakterium zusätzliche, von der Plasmid-DNA kodierte genetische Information, die unter anderem für die Selektion derer, die das Plasmid aufgenommen haben, verwendet wird. Meist sind es Antibiotikaresistenzgene – in dieser Arbeit eine Ampicillin-Resistenz – die auf und in entsprechenden antibiotikahaltigen Medien einen Wachstumsvorteil verleihen.

### 2.13.1 Chemische Transformation von *E. coli*

Zur chemischen Transformation werden *E.-coli*-Zellen mit Hilfe von Kalziumchlorid „chemisch kompetent“ gemacht. In der Folge kann ein kurzzeitig verabreichter Hitzeschock die Permeabilität der Bakterien-Membran so erhöhen, dass es zur Aufnahme der zugegebenen Plasmide kommt.

#### 2.13.1.1 Herstellung Kalziumchlorid-kompetenter Bakterien (Hanahan 1991)

##### Erforderliche Lösung

50 mM CaCl<sub>2</sub>

15 % Glyzerin

2 ml einer *E.-coli*-Übernachtskultur werden in 100 ml LB-Medium gegeben und bei 37°C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,8 geschüttelt. Daraufhin werden die Zellen für 15 min auf Eis inkubiert und in der Sigma-Zentrifuge für 10 min bei 4000 rpm und 4°C abzentrifugiert. Das Pellet wird in 40 ml eiskalter, 50 mM CaCl<sub>2</sub> / 15 % Glyzerin-Lösung resuspendiert und wieder 15 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Abzentrifugation für 10 min bei 4000 rpm und 4°C wird das Zellpellet in 4 ml eiskalter, 50 mM CaCl<sub>2</sub> / 15 % Glyzerin-Lösung aufgenommen, für 30 min auf Eis belassen und in 200 µl Aliquots überführt. Die so gewonnenen kompetenten Zellen werden bei –80°C gelagert.

### 2.13.1.2 Durchführung der Transformation

Die CaCl<sub>2</sub>-kompetenten Bakterien werden auf Eis aufgetaut. Nach Zugabe der zu transformierenden DNA wird der Ansatz für 30 min auf Eis inkubiert. Auf einen 90 Sekunden dauernden Temperaturschock von 42°C folgt unmittelbar eine 2minütige Abkühlung auf Eis. 1 ml SOC- oder LB-Medium wird zu den Bakterien pipettiert, die darauf eine Stunde bei 37°C geschüttelt werden. Abschließend wird der Transformationsansatz auf antibiotikahaltigen LB-Agar ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

### 2.13.2 Elektroporation von *E. coli*

Bei der Elektroporation werden elektrokompetente Zellen und Plasmide einem elektrischen Schock ausgesetzt, der kurzzeitig Löcher in der Bakterien-Membran verursacht (Böttger 1988) und so eine sehr hohe Transformationseffizienz bewirkt (bis 10<sup>10</sup> CFU/μg DNA).

#### 2.13.2.1 Herstellung elektrokompetenter Bakterien

##### Erforderliche Lösung

10 % Glycerin

10 ml einer *E.-coli*-Übernachtskultur werden zu 690 ml LB-Medium gegeben und bei 37°C geschüttelt. Wenn eine OD<sub>600</sub> von 0,6 erreicht ist, werden die Zellen für 15 min auf Eis abgekühlt und 15 min bei 4000 rpm und 4°C abzentrifugiert. Das Pellet wird in 500 ml eiskaltem 20%igem Glycerin resuspendiert und danach wiederum für 15 min bei 4000 rpm und 4°C abzentrifugiert. Die Wasch- und Zentrifugationsschritte werden dreimal wiederholt und dabei das Volumen sukzessive auf 200 ml, 20 ml und 1,75 ml reduziert. Die Bakterien werden dann in 40 μl Aliquots überführt, durch kurzes Eintauchen in flüssigen Stickstoff schockgefroren und bis zum Gebrauch bei –80°C gelagert.

### 2.13.2.2 Durchführung der Elektroporation (Calvin et al. 1988)

Die kompetenten Zellen werden auf Eis aufgetaut und einige  $\mu\text{l}$  eines aufgereinigten Ligationsansatzes dazugegeben. Dieser Transformationsansatz wird 5 min auf Eis inkubiert und anschließend in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette (0,2 cm) pipettiert. Dabei ist Sorge zu tragen, dass sich keine Lufteinschlüsse oder Blasen bilden. Am Elektroporationsgerät werden als Widerstand 400  $\Omega$ , als Kapazität 25  $\mu\text{F}$  und als elektrische Feldstärke 2,5 kV/cm gewählt, wobei die Zeitkonstante etwa zwischen 8,6 und 9,2 liegt. Sofort nach vollzogener Elektroporation werden die Bakterien mit 1 ml SOC-Medium gemischt und in einem neuen Eppendorf-Cap waagrecht für 1 h bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Schließlich wird der Ansatz in geeigneten Volumina auf antibiotikahaltigen LB-Agar ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

### 2.13.3 Ligation und Transformation mittels TOPO TA Cloning<sup>®</sup> Kit (Invitrogen)

Mit der Taq-DNA-Polymerase amplifizierte PCR-Produkte enthalten an beiden Enden einen 5'-Überhang, welcher aus einem einzigen Adenosin (A) besteht. Für die Klonierung solcher PCR-Produkte ist ein Vektor erforderlich, welcher an den 3'-Enden einen Thymidin-(T)-Überhang besitzt. pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO ist ein linearisierter Vektor mit 3'-Thymidin-Überhängen, der für die Klonierung von PCR-Produkten eingesetzt wird. Er enthält zusätzlich die Topoisomerase I, welche kovalent an ihn gebunden ist und Ligationsaktivität besitzt. Die Ligationsreaktion von Vektor (10 ng) und PCR-Produkt (5 - 80 ng) findet in einer Salzlösung statt; sie ist äußerst effizient und bereits nach 5 min bei Raumtemperatur abgeschlossen. Nach Zugabe von 2  $\mu\text{l}$  des Reaktionsansatzes zu einem Aliquot chemisch kompetenter TOP10-Zellen (Invitrogen) wird der Ansatz für 30 min auf Eis inkubiert. Er wird einem Temperaturschock von 42°C für 30 sec unterzogen, sofort auf Eis gestellt und mit 250  $\mu\text{l}$  SOC-Medium vermischt. Im waagrecht liegenden Gefäß werden die Zellen für 30 min bei 37°C und ca. 200 rpm geschüttelt. 50 bis 100  $\mu\text{l}$  der Probe werden auf LB-Selektivplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Auf die Oberfläche der ampicillinhaltigen LB-Platten

wurden zuvor 40  $\mu\text{l}$  X-Gal (5-Bromo-4-chlor-3-indolyl- $\beta$ -galaktosid) aus einer 400 mg/ml-Stammlösung ausgestrichen, um eine Blau-Weiß-Selektion durchführen zu können.

## 2.14. Transformation von *Candida albicans*

Verwendete Methoden der Transformation von *Candida albicans* sind die Lithiumacetat- und die Sphäroblasten-Methode. Das erstere ist das einfachere und schnellere Verfahren, das letztere ist jedoch beim Einsatz geringerer DNA-Mengen wegen der höheren Effizienz empfehlenswert. Daneben gibt es mehrere andere Techniken, die im Rahmen dieser Arbeit nicht eingesetzt wurden.

### 2.14.1 Transformation anhand der Lithiumacetat-Methode (Gietz et al. 1992)

#### Erforderliche Lösungen

1x TE / 1x LiAc

1x TE / 1x LiAc / 40% PEG

Eine häufig angewandte und relativ einfach durchzuführende Strategie zur Transformation von *Candida* ist die Lithiumacetat-Methode, bei der die Zellen durch LiAc und Polyethylenglykol (PEG) kompetent gemacht werden. Die Transformationseffizienz wird durch Einzelstrang-DNA (ss-DNA) von Lachsspermien, die als Carrier für die zu transformierende Nukleinsäure dient, deutlich erhöht.

Eine Einzelkolonie des zu transformierenden *Candida*-Stammes wird in 10 ml YPD-Medium angeimpft und über Nacht bei 30°C im Schüttler angezchtet. Mit Hilfe der Zählkammer wird am folgenden Tag die Zellzahl pro ml ermittelt, und  $1 \times 10^8$  Zellen werden in 50 ml YPD überführt (dadurch erzielte Dichte:  $2 \times 10^6$  Zellen/ml). Die Kultur wird bei 30°C bis zu einer Zelldichte von etwa  $1 \times 10^7$  Zellen/ml angereichert und darauf für 4 min bei 4000 rpm abzentrifugiert. Die Zellen werden mit 500  $\mu\text{l}$  H<sub>2</sub>O gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation

(10000 rpm, 1 min) wird das Pellet in 500 µl 1x TE / 1x Li-Ac aufgenommen, die Zellzahl bestimmt und durch Verdünnen oder Aufkonzentrieren auf  $2 \times 10^9$  Zellen/ml eingestellt.

Transformationsansatz:

Zellsuspension (s. o.)	50 µl
zu transformierende DNA (linear)	1 µg (entspricht ca. 10 - 20 µl)
Lachssperm-DNA denaturiert	10 µl (zuvor 5 min aufgekocht)
1x TE / 1x Li-Acetat / 40 % PEG	300 µl

Der Transformationsansatz wird für 30 min bei 30°C unter Schütteln inkubiert, 3 min einem Hitzeschock von 42°C unterzogen und anschließend für 1 min bei 4000 rpm abzentrifugiert. Das Zellpellet wird mit 200 µl H<sub>2</sub>O gewaschen, abzentrifugiert (4000 rpm, 1 min) und wieder in 200 µl H<sub>2</sub>O resuspendiert. Diese Zellsuspension wird dann auf geeignete Selektivplatten ausplattiert und für 3 bis 4 Tage bei 30°C bebrütet.

### 2.14.2 Transformation anhand der Sphäroblasten-Methode (Rose et al. 1990)

Erforderliche Lösungen:

1 M Sorbitol

SPE-Puffer

1 M Sorbitol

50 mM K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> pH 7,5

10 mM EDTA pH 7,5

β-Mercaptoethanol

0,09%ige Zymolase in SPE

(wird immer frisch angesetzt)

STC-Lösung

0,9 M Sorbitol

0,01 M Tris-HCl pH 7,4

0,01 M CaCl<sub>2</sub>

#### PEG / Tris / CaCl<sub>2</sub>

PEG 8000

0,01 M Tris-HCl pH 7,4

0,01 M CaCl<sub>2</sub>

#### SOS-Lösung

Ansatz für 2 ml SOS (wird immer frisch angesetzt):

1 ml Sorbitol 1 M

13 µl CaCl<sub>2</sub> 1 M

670 µl YPD pH 7

2 µl Uridin 25 mg/ml

315 µl H<sub>2</sub>O

Bei dieser Methode, die mit mehr Aufwand verbunden ist als das LiAc-Verfahren, wird die Zellwand der Hefen durch einen Zymolase-Verdau angedaut, wodurch die Zellen eine kugelige (sphäroide) Form annehmen und Kompetenz erwerben. Als Schutz gegen die drohende Osmolyse der Zellen dient Sorbitol.

Aus einer Übernachtskultur (30 °C, Schüttler) der zu transformierenden Zellen in 10 ml YPD-Medium wird nach Ermittlung der Zellzahl pro ml ein solches Volumen in eine 200 ml YPD-Subkultur überimpft, dass sich eine Dichte von  $2,5 \times 10^6$  Zellen/ml ergibt. Sobald diese nach Inkubation bei 30 °C im Schüttler auf  $2,5 \times 10^7$  Zellen/ml angestiegen ist, wird die Kultur für 5 min bei 4000 rpm abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wird mit 20 ml 1 M Sorbitol gewaschen und auf dieselbe Weise abzentrifugiert. Nachdem die Zellen in 19,6 ml SPE-Puffer und 40 µl β-Mercaptoethanol aufgenommen worden sind, werden 400 µl 0,09%ige Zymolase-Lösung zugegeben. Dieser Ansatz wird für 12 min bei 30 °C inkubiert. Das Pelletieren danach durch 5minütige Zentrifugation bei 2000 rpm erfolgt ohne Dezellulation, da die in diesem Stadium sehr sensiblen Zellen durch das sonst übliche Abbremsen mangels stabiler Zellwand lysiert würden. Einem ersten Waschvorgang mit 20 ml 1 M Sorbitol folgt ein zweiter mit 10 ml STC-Lösung,



worauf jeweils für 5 min bei 2000 rpm ohne Dezelleration abzentrifugiert wird. Schließlich wird das Pellet in 1,5 ml STC-Lösung aufgenommen und zu je 100 µl aliquotiert.

#### Transformationsansatz:

Zellaliquot (s. o.)	100 µl
zu transformierende DNA (linear)	0,5 µg (entspricht ca. 5 µl)
Lachssperm-DNA denaturiert	5 µl (zuvor 5 min aufgekocht)

Der Ansatz wird zunächst 15 min bei Raumtemperatur inkubiert, nach Zugabe von 1 ml PEG / Tris / CaCl<sub>2</sub> weitere 10 min. Dann wird für 10 min bei 2000 rpm und schwach eingestellter Dezelleration zentrifugiert und das Pellet in 150 µl SOS-Lösung aufgenommen. Abschließend wird diese Suspension ohne Schütteln für 40 min bei 30°C inkubiert und auf YNB-Selektivagarplatten, die Sorbitol in 1 molarer Konzentration enthalten, ausplattiert. Nach ca. 3 Tagen bei 30°C können Uri<sup>+</sup> Transformanten analysiert werden.

### **2.15 Automatisierte DNA-Sequenzierung**

Die DNA-Sequenzierung erfolgt mit dem automatischen Sequenziergerät ABI Prism<sup>™</sup> Sequencer 377 (Perkin Elmer) nach der Kettenabbruch- oder Didesoxy-Methode (Sanger et al. 1977). Die DNA wird denaturiert, und zur Initiation der DNA-Synthese durch die Taq-DNA-Polymerase wird ein Primer an den komplementären Einzelstrang angelagert. Um den Kettenabbruch bei der Synthese zu erzielen, werden dem Reaktionsansatz außer den vier Desoxynukleosidtriphosphaten (dNTPs) geringe Mengen der 2', 3'-Didesoxynukleosidtriphosphate (ddNTPs) zugefügt, die jeweils mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind. Die ddNTPs werden von der Polymerase ebenfalls als Substrate verwendet, ermöglichen aber aufgrund des Fehlens einer Hydroxylgruppe am 3'-Ende keine Kettenverlängerung. Somit wird die DNA-Synthese nach dem Einbau eines ddNTPs an einer beliebigen Position gestoppt, und es entsteht letztendlich eine Mischung partiell

doppelsträngiger DNA-Moleküle, die zwar alle das 5'-Ende besitzen, am 3'-Ende jedoch in der Länge variieren und basenspezifisch terminiert sind.

#### Sequenzieransatz:

0,4 µg Plasmid-DNA oder 0,1 µg PCR-Produkt  
10 pmol Primer  
2 µl Sequenzier-Mix  
ad 10 µl dH<sub>2</sub>O

#### Schritte der Taq-Cycle-DNA-Sequenzierung

- Denaturierung: 10 sec bei 96 °C
- Primer-Hybridisierung: 5 sec bei Temperatur je nach Primer (2 AT + 4 CG - 5)
- DNA-Synthese mit Abbrüchen: 4 min bei 60 °C

Im Anschluss an die Markierungsreaktion werden die Reaktionsansätze gefällt, in Probenpuffer aufgenommen und für 2 min bei 90 °C hitzedenaturiert. Danach erfolgt die elektrophoretische Auftrennung der Sequenzieransätze im Polyacrylamidgel. Das emittierte Fluoreszenzlicht der eingebauten Didesoxynukleotide ermöglicht die Detektion der verschieden langen DNA-Moleküle mittels eines Laserscanners, der in das Sequenziergerät integriert ist.

### **2.16 Sequenzanalysen**

Die ermittelten DNA-Sequenzen wurden mit der Lasergene-Sequenzanalyse-Software (Dnastar, Madison, USA) analysiert. Die *RIM101*-Sequenz von *C. albicans* wurde via Internet von der Netzseite „*Candida albicans* Information“ (<http://www.alces.med.umn.edu/candida.html>) entnommen.

### **2.17 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mit der AmpliTaq<sup>®</sup> DNA-Polymerase**

Die Polymerase-Kettenreaktion dient zur Amplifizierung von linearen DNA-Fragmenten. Die vervielfältigten DNA-Fragmente können zur Klonierung, zur

Sequenzierung und als Hybridisierungs sonden verwendet werden. Darüber hinaus ist die Reaktion geeignet, um in zu analysierenden DNA-Pools nach DNA-Abschnitten bekannter Sequenz zu suchen. So wird die PCR zum Beispiel beim Screening oder bei der Suche nach bekannten Genen in unbekanntem Genomen angewandt. Dabei kann sich ihre sehr hohe Sensitivität allerdings auch zum Nachteil entwickeln, da durch den exponentiellen Amplifizierungsmodus geringste Spuren des gesuchten Templates, z. B. in Form einer Verunreinigung, zu deutlich positiven Ergebnissen führen können.

Die PCR ist temperaturgesteuert. Ausgehend von zwei Primern, deren 3'-OH-Enden auf der DNA auf einander zuweisen, synthetisiert die thermostabile DNA-Polymerase (AmpliTaq; aus *Thermus aquaticus*) den komplementären Strang des Templates. Die Reaktion findet im Thermocycler statt und läuft in drei zyklisch wiederholten Schritten ab, gerahmt von zwei weiteren, einfach durchgeführten Schritten.

First Delay: Dieser einleitende Schritt dient dazu, möglichst die gesamte Template DNA einzelsträngig zu machen. Er dauert in der Regel 2 - 5 min bei 94°C.


Denaturierung: Hier wird die doppelsträngige DNA in einzelsträngige DNA aufgetrennt. Die Dauer dieses Schritts ist abhängig von der Art (GC-Gehalt, Länge der Fragmente) des Templates und wird bei 94°C durchgeführt.

Hybridisierung: Bei diesem Schritt binden die Primer spezifisch an die DNA-Einzelstränge (Annealing), so dass doppelsträngige Bereiche entstehen, die als Ausgangspunkt für die Amplifizierung genutzt werden können. Reaktionstemperatur und -dauer hängen vom Primer/Template-Verhältnis und der Schmelztemperatur des Hybrides ab.

Kettenverlängerung: Die temperaturstabile DNA-Taq-Polymerase verlängert die durch die Primerbindung entstandenen doppelsträngigen Bereiche – von den 3'-OH Enden der Primer ausgehend – komplementär zum Templatestrang. Die dabei gebildeten Doppelstränge dienen wiederum als Template für die nächste Reaktionsfolge. Die Temperatur ist gegeben durch die optimale Aktivität der Taq-Polymerase bei 72°C, die Dauer wird durch die Länge des zu bildenden DNA-Fragments bestimmt.

Last Delay: Nachdem die Reaktionszyklen durchlaufen sind, wird meist noch ein Schritt bei 72°C hinzugefügt, um überhängende Enden der gebildeten DNA-Fragmente aufzufüllen. Dieser Schritt dauert in der Regel 2 - 5 min.

First Delay und Last Delay sind jeweils einmalige Reaktionen, während die anderen Schritte 15- bis 45mal wiederholt werden können.

<u>Beispiel:</u>	First Delay	94 °C	120 s	
	Denaturierung	94 °C	20 s	 Wiederholung 15x bis 45x
	Hybridisierung	50 °C	30 s	
	Kettenverlängerung	72 °C	90 s	
	Last Delay	72 °C	180 s	

Verwendete Reagenzien und Lösungen:

10x PCR-Puffer

500 mM KCl

100 mM Tris-HCl, pH 8,3

25 mM MgCl<sub>2</sub>

10x Nukleotid-Mix

Jeweils 2 mM dATP, dGTP, dCTP und dTTP

AmpliTa<sup>®</sup> DNA-Polymerase (5 U/ml)

Primer (0,2 mM)

Bei der Colony-PCR, einer vereinfachten PCR-Form mit Bakterienzellen, wird anstatt präparierter DNA eine Einzelkolonie des Bakterienstammes dem Reaktionsansatz zugefügt.

Nach Beendigung der Reaktion werden 10 µl des Reaktionsansatzes zur quantitativen und qualitativen Analyse auf ein Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt.

Beispiel für einen PCR-Reaktionsansatz (100 µl):

Template-DNA	1 µl	200 – 500 ng
Primer 1	1 µl	50 pmol
Primer 2	1 µl	50 pmol
10x PCR-Puffer	10 µl	→ 1,5 mM
MgCl <sub>2</sub>	6 µl	150 nmol
dNTPs	5 µl	→ 200 µM
<i>Taq</i> -Polymerase	0,4 µl	2 U
H <sub>2</sub> O	75,6 µl	

**2.18 RT-PCR mit dem SuperScript™ One-Step RT-PCR System**

Die RT-PCR (Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction) ist ein Verfahren, mit dessen Hilfe sich RNA-Sequenzen spezifisch und hochsensibel detektieren und analysieren lassen. Das Prinzip der RT-PCR basiert auf zwei hintereinander geschalteten Reaktionsschritten: Im ersten Schritt, der reversen Transkription, wird, jeweils ausgehend von einem spezifischen Primer, aus der nachzuweisenden RNA die so genannte codogene DNA (cDNA) synthetisiert. Der zweite Schritt entspricht einer PCR (s. Kap. 2.17.1), bei der die gewonnene DNA unter Anwesenheit eines spezifischen Primerpaares temperaturgesteuert amplifiziert wird.

In der Regel wird die RT-PCR eingesetzt, um über die mRNA-Level die Induktion verschiedenster Gene nachzuweisen. Relativ zum Induktionslevel so genannter „Housekeeping genes“ und im zeitlichen Verlauf lassen sich daraus auch quantitative Aussagen ableiten.


Die RT-PCR ist einer erhöhten Gefahr falsch-positiver Ergebnisse ausgesetzt durch evtl. vorhandene DNA-Spuren, die im Verlauf der PCR amplifiziert werden und so im Rückschluss das Vorhandensein von entsprechender RNA vortäuschen. Daher empfiehlt es sich, die als Template eingesetzte RNA zuvor einem DNA-Verdau zu unterziehen. Hierfür wurde das Enzym Desoxyribonuclease I, Amplification Grade (Life Technologies) nach Protokoll des Herstellers eingesetzt.

Des Weiteren wurde mit Hilfe einer Negativkontrolle ausgeschlossen, dass sich DNA-Spuren im Reaktionsansatz befunden haben: Von zwei identischen Ansätzen

wurde einer dem kompletten RT-PCR Programm unterzogen, der andere nur dem Denaturierungsschritt und der PCR. Letzterer darf im Sinne einer Negativkontrolle kein nachweisbares Amplifikat hervorbringen.

Eine Quelle für falsch-niedrige oder -negative Ergebnisse der RT-PCR besteht, wie bei allen Arbeiten mit RNA, in deren Instabilität angesichts der ubiquitär vorhandenen RNA-degradierenden Enzyme. Daher gelten für die Vorbereitung der RT-PCR dieselben Sicherheitsvorkehrungen wie schon bei der RNA-Isolation, nämlich sauberes, zügiges Arbeiten auf Eis unter Verwendung RNase-freier Reagenzien und Materialien sowie das Tragen von Handschuhen. Zusätzlich wurde dem RT-PCR-Ansatz ein rekombinanter Ribonuklease-Inhibitor RNaseOUT™ (Life Technologies) zugesetzt, rekombinantes Produkt eines klonierten Gens aus der Schweineleber, das 1:1-Komplexe mit verschiedenen RNasen bildet und sie so nicht-kompetitiv hemmt.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde das SuperScript™ One-Step RT-PCR System (Life Technologies) verwendet, das beide Schritte der RT-PCR auf der Basis eines einzigen Reaktionsansatzes in direkter Folge zusammenfasst. Der Trick, der diese praktische Kombination ermöglicht, besteht darin, dass die reverse Transkriptase bei 45°C aktiv ist, während für die Dauer dieses ersten Schrittes die Aktivität der DNA-Polymerase durch spezifische Antikörper blockiert wird. Ein anschließender Denaturierungsschritt bei 94°C beendet den reversen Transkriptionsprozess durch Inaktivierung der reversen Transkriptase und startet gleichzeitig die PCR durch Denaturierung der blockierenden Antikörper und die daraus resultierender Reaktivierung der *Taq*-Polymerase.

<u>Beispiel:</u>	cDNA-Synthese	45 °C	45 min	
	Prä-Denaturierung	94 °C	2 min	
	PCR-Amplifikation	94 °C	15 sec	 Wiederholung 30x bis 35x
		55 °C	30 sec	
		70 °C	60 sec	
	Final extension	72 °C	10 min	

Verwendete Reagenzien und Lösungen:

### 2x Reaction Mix

Puffersystem (ohne Angaben des Herstellers)

Jeweils 2 mM dATP, dGTP, dCTP und dTTP

2,4 mM MgSO<sub>4</sub>

SuperScript II RT/Platinum *Taq* Mix

RNase Out™

Rekombinanter Ribonuklease-Inhibitor aus Schweineleber (40 U/μl)

Primer (10 μM)

Nach Beendigung der Reaktion werden 10 μl des Reaktionsansatzes zur quantitativen und qualitativen Analyse auf ein Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt.

Beispiel für einen RT-PCR-Reaktionsansatz (50 μl):

Template-RNA	1 μl	100 - 700 ng
Primer 1	1 μl	50 pmol
Primer 2	1 μl	50 pmol
2x Reaction Mix	25 μl	→ 1x
RT/ <i>Taq</i> Mix	1 μl	
H <sub>2</sub> O	21 μl	

## 2.19 DNA-RNA-Hybridisierung

Hybridisierungsreaktionen erfolgen aufgrund der Basenpaarungswechselwirkungen zwischen zwei einzelsträngigen Nukleinsäureketten, wenn sie komplementäre Nukleotidsequenzen aufweisen (DNA-DNA, RNA-RNA, DNA-RNA). Bei der Identifizierung spezifischer Nukleinsäure-Fragmente weisen diese Reaktionen eine hohe Sensitivität und Selektivität auf. Methode der Wahl zum spezifischen RNA-Nachweis ist der Northern-Blot, bei dem aus den Zellen isolierte RNA aufgereinigt, aufgetrennt, geblottet und dann mit geeigneten Sonden hybridisiert wird.

### 2.19.1 Radioaktive Markierung spezifischer DNA-Sonden

Die radioaktive Markierung spezifischer DNA-Sonden erfolgt mit dem Prime-It® Random Primer Labeling Kit (Stratagene).

Folgende Lösungen aus dem Kit werden verwendet:

#### Random-9-primers

Randomisierte Oligodesoxyribonukleotide (27 OD U/ml)

#### 5x dCTP-Puffer

0,1 mM dATP

0,1 mM dGTP

0,1 mM dTTP

#### Exo(-) Klenow 5 U/ml

#### Stop-Mix

0,5 M EDTA, pH 8

25 ng linearisierte DNA werden in 24 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen, mit 10 µl Random oligonucleotide primers versetzt und 5 min bei 95°C erhitzt. Sofort im Anschluss wird die DNA auf Eis abgekühlt. 10 µl 5x dCTP-Puffer, 5 µl [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP (10 µCi/µl) und 1 µl Klenow-Fragment werden zugegeben und der Reaktionsansatz 30 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wird darauf mit 2 µl Stop-Mix arretiert.

Um die Sonde aufzureinigen, wird der Reaktionsansatz mit dem QIAquick Nucleotide Removal kit von Qiagen behandelt. Durch diese Behandlung werden alle Oligonukleotide bis zu einer Größe von zehn Basen, Enzyme, Salze sowie nicht eingebaute Nukleotide beseitigt (Prinzip siehe 2.9.6). Nach der Aufreinigung wird ein Aliquot der markierten DNA im Szintillationszähler gemessen, um den Einbau der [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTPs zu kontrollieren.



### 2.19.2 Northern Blot

Die zu hybridisierende RNA wird mittels denaturierenden Agarosegels elektrophoretisch aufgetrennt. Der Kapillartransfer der RNA aus dem Agarosegel auf eine Nylonmembran erfolgt über Nacht. Hierzu wird eine Glasplatte auf eine mit 20x SSC gefüllte Wanne gelegt und mit einem Whatman-Papier so bedeckt, dass die Enden des Papiers in die Flüssigkeit der Wanne eintauchen. Ein der Größe des Gels entsprechendes Stück Whatman-Papier und das Gel werden luftblasenfrei aufgelegt. Es folgt nun die Nylonmembran, die ebenfalls luftblasenfrei aufgelegt wird. Auf die Membran werden ein Whatman-Papier sowie eine 10 bis 20 cm dicke Schicht handelsüblicher Papierhandtücher aufgelegt und mit einer zweiten Glasplatte beschwert. Nach dem Transfer, den allein die Kapillarkräfte in den Papierhandtüchern vollziehen, wird die Membran luftgetrocknet. Schließlich wird die RNA durch UV-Vernetzung („Cross linking“ mit 100 mJ) auf der Membran fixiert.

### 2.19.3 RNA-DNA-Hybridisierung

Die auf der Nylonmembran durch UV-Vernetzung fixierte DNA wird für 30 min bei 65°C mit 20 ml MONOD-Puffer im Hybridisierungssofen inkubiert. Hierbei werden freie Stellen der Membran abgesättigt. Anschließend wird diese Lösung durch 20 ml frischen MONOD-Puffer ersetzt. Die radioaktiv markierte DNA-Sonde (ca.  $5 \times 10^6$  cpm/ml) wird für 5 min bei 95°C denaturiert und zur Membran hinzugegeben, die dann über Nacht bei 65°C im Hybridisierungssofen inkubiert wird. Die Membran wird am darauf folgenden Tag zweimal 30 min mit 2% SSC / 0,1% SDS (Waschpuffer) bei 65°C behandelt. Auf die Membran wird anschließend ein Röntgenfilm „Hyperfilm™-MP“ (Amersham Pharmacia, Freiburg) gelegt, und beide werden in einer lichtundurchlässigen Kassette bei -20°C inkubiert. Die Expositionsdauer (Stunden bis Tage) richtet sich nach der Strahlenaktivität der Sonde und der gewünschten Schwärzungsintensität des Filmes. Abschließend wird der Röntgenfilm im vollautomatischen Gerät entwickelt und der Auswertung zugeführt.

## 2.20 Induktion der Keimschlauchbildung von *C. albicans*

*C. albicans* reagiert in Abhängigkeit bestimmter Milieubedingungen mit der Bildung von Keimschläuchen. Hierbei kommt es nicht zu einer normalen Zellteilung der Sprosszelle. Die durch Knospung gebildete Tochterzelle trennt sich nicht von der Mutterzelle, sondern bildet vielmehr einen keimschlauchartigen Fortsatz. Dieser Keimschlauch ist in der Lage sich zu verzweigen. Ein solches Zellgebilde wird als Hyphe bezeichnet. Ein Geflecht von Hyphen bezeichnet man als Myzel.

Ungeachtet der Tatsache, dass filamentöse Wachstumsformen im *C.-albicans*-Wildtyp zwar sehr wohl bei alkalischen und neutralen, nicht aber bei sauren pH-Werten auftreten, wurde die Keimschlauchinduktion hier bei pH 4 und allein durch die Inkubationstemperatur vorgenommen:

Aus einer 5 ml-Übernachtskultur bei 30 °C in flüssigem Medium M199 pH 4 wurden 100 µl – die Zellen befinden sich zu diesem Zeitpunkt in der stationären Phase – in frisches Medium M199 pH 4 auf eine Zelldichte von ca.  $5 \times 10^6$  angeimpft. Diese Kultur wurde dann bei 37 °C für 3 h geschüttelt. Daraufhin wurde der prozentuale Anteil der keimschlauchbildenden Zellen mikroskopisch mit Hilfe des 40xObjektivs und einer Zählkammer ermittelt.

## 2.21 Isolierung von *phr2*Δ-Revertanten

Stämme CFM-4 (*phr2*Δ *ura3*Δ) und CFM-2 (*phr2*Δ) wurden bis zur stationären Phase in YPD pH 7 bei 30 °C angezüchtet und in sterilem H<sub>2</sub>O gewaschen.  $10^8$  Zellen wurden anschließend auf jede von fünf YNB pH 4-Agarplatten verteilt und für 3 Tage bei 30 °C inkubiert. YNB pH 4-Agarplatten für CFM-4 enthielten, da dieser Stamm eine *ura3*-Nullmutation enthält, 25 µg Uridin pro ml. Kolonien, die bei diesem restriktiven pH wuchsen, wurden mit einer mittleren Frequenz von  $1,5 \times 10^{-7}$  gewonnen.

### 3 ERGEBNISSE

#### 3.1 Mutationsanalyse in Revertanten

##### 3.1.1 Isolierung von *phr2*Δ-Suppressormutanten

Die Gene *PHR1* und *PHR2* in *Candida albicans* sind für den Aufbau einer intakten Zellwand und damit für das Wachstum essentiell. Sie zeigen ein inverses Expressionsmuster: Im pH-Bereich < 5,5 wird hauptsächlich *PHR2*, bei pH-Werten > 5,5 überwiegend *PHR1* induziert. Eine *phr2*Δ-Mutante kann bei pH 4 nicht, bei pH 6 reduziert, bei pH 8 hingegen normal wachsen. Genau umgekehrt verhält sich eine *phr1*Δ-Mutante. Beide Nullmutanten zeigen im jeweils restriktiven pH-Bereich eine kugelige, aufgeblähte Zellmorphologie bei atypisch abgeflachter, weithalsiger Form der Zellknospungen (Mühlschlegel und Fonzi 1997).

*PHR1* und *PHR2* sind funktionelle Homologe. Wenngleich sie im Wildtyp dieselbe Aufgabe, aber diese lediglich im jeweils zugeordneten pH-Bereich, erfüllen, kann jedes der beiden in entsprechenden Konstrukten den Verlust des anderen voll ausgleichen. So ermöglicht die Expression von *PHR1* unter dem konstitutiven EF1-α-Promotor das normale Wachstum einer *phr2*Δ-Mutante bei pH 4; ebenso funktioniert das reziproke Experiment bei pH 8 (Mühlschlegel und Fonzi 1997).

Einem von El Barkani et al. beschriebenen Experiment folgend, haben wir zunächst so genannte *phr2*Δ-Suppressormutanten isoliert (El Barkani et al. 2000). Hierzu wurden  $10^8$  Zellen des Stammes CFM-2 (*phr2*Δ) auf jede von fünf YNB-Agarplatten verteilt, die auf pH 4 eingestellt waren. Nach drei Tagen Inkubation bei 30°C fanden sich Kolonien, die offensichtlich in der Lage waren, die pH-Restriktion zu umgehen und trotz des *PHR2*-Verlustes bei saurem pH-Wert zu wachsen. Diese traten mit einer Frequenz von ca.  $1,5 \times 10^{-7}$ , bezogen auf die Anzahl der eingesetzten Zellen, auf. 14 dieser Revertanten wurden zur näheren Untersuchung herangezogen.

### 3.1.2 Morphologische Untersuchung der *phr2* $\Delta$ -Revertanten

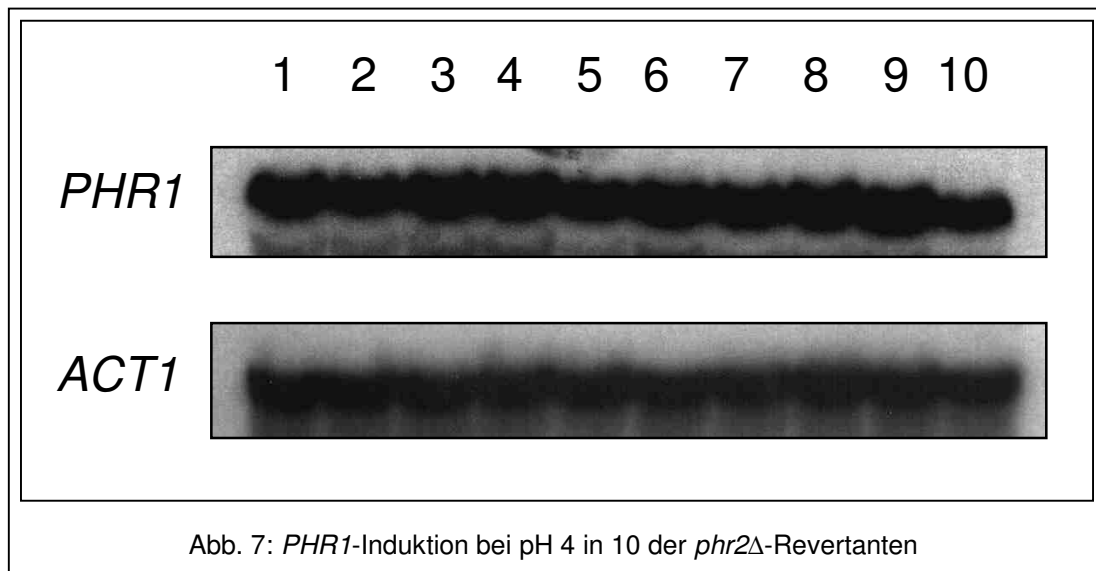
Die 14 zufällig ausgewählten Revertanten wurden auf YNB-Platten pH 7 bzw. pH 4 replikaplatziert, wo jeweils ein dem Wildtyp entsprechendes Wachstum zu beobachten war. Daraufhin wurde die Zellmorphologie in Abhängigkeit vom pH-Wert untersucht. Hierzu wurde jeder Stamm zunächst in Flüssigmedium M199 bei pH 4 und 30°C über Nacht angezchtet. Die mikroskopische Untersuchung dieser Kulturen zeigte die sprossende Hefeform als bei weitem überwiegende Wachstumsform, womit die Revertanten dem als Negativkontrolle dienenden Wildtypstamm SC5314 entsprachen. Nach einer Keimschlauchinduktion, die über drei Stunden bei 37°C und pH 4 durchgeführt wurde, konnte hingegen ein bedeutender Unterschied beobachtet werden: Während beim Kontrollstamm SC5314 erwartungsgemäß weiterhin die Hefeform dominierte, bildete bei allen Revertanten ein hoher Prozentsatz von knapp 90% der Zellen Keimschläuche aus.

### 3.1.3 Expression von *PHR1* in den *phr2* $\Delta$ -Suppressormutanten

Der zur Isolierung der Revertanten eingesetzte Stamm CFM-2 ist eine *phr2*-Nullmutante, die bei pH 4 nicht wachsen kann. Wenn für ein reguläres Wachstum die Gegenwart von entweder *PHR1* oder *PHR2* essentiell ist, und wenn weiter der Verlust eines dieser Gene durch die Aktivierung des anderen ausgeglichen werden kann (s. o.), so lag die Vermutung nahe, dass es in den Revertanten zu eben einer solchen atypischen *PHR1*-Induktion gekommen war, welche die Wachstumsfähigkeit im sauren pH-Bereich wiederhergestellt haben musste. El Barkani et al. hatten dies zuvor schon für zwei auf gleiche Art gewonnene *phr2* $\Delta$ -Revertanten nachgewiesen (El Barkani et al. 2000).

Um eine solche irreguläre *PHR1*-Expression unter sauren Wachstumsbedingungen zu zeigen, führten wir eine Northern-Blot-Hybridisierung durch. Hierzu wurde nach einer Induktionszeit von 1,5 Stunden in YPD pH 4 von jedem der revertanten Stämme RNA isoliert, die anschließend mit einer *PHR1*-Sonde hybridisiert wurde. Die hierbei nachgewiesenen *PHR1*-mRNA-Level entsprachen in etwa denjenigen, die sich üblicherweise im neutralen pH-Bereich detektieren

ließen (s. Abb. 7). Daraus konnte man schließen, dass *PHR1* offenbar konstitutiv im Sinne von pH-unabhängig induziert wurde.



### 3.1.4 Analyse von *RIM101*-Mutationen in den *phr2Δ*-Revertanten

Worin lag nun die Ursache der phänotypischen Reversion in Wachstum und Filamentierungsverhalten sowie der außergewöhnlichen *PHR1*-Induktion, die bei allen 14 Revertanten beobachtet werden konnten?

Frühere Untersuchungen hatten für zwei solcher Revertanten gezeigt, dass keine Mutationen in der *PHR1*-Promotorregion ursächlich zugrunde lagen. Sehr wohl hingegen war jeweils eine Mutation in einem der *RIM101*-Allele entdeckt worden, welche die charakteristischen Eigenschaften der Revertanten in sich trug (El Barkani et al. 2000).

Aus diesem Grund wurden in jeder Revertante beide *RIM101*-Allele sequenziert und analysiert. Dazu wurde jeweils eine DNA-Extraktion durchgeführt, um daraufhin mittels PCR und mit Hilfe geeigneter Primer die *RIM101*-Allele zu amplifizieren. Das pro Stamm resultierende Gemisch von Amplifikaten beider Allele wurde zur automatischen Sequenzierung verwendet.

In jedem der analysierten Sequenzierungschromatogramme war an genau einer Stelle das Auftreten eines Doppelsignals auffällig, während die übrigen Signale stets klar und eindeutig abzugrenzen waren (s. Abb. 8). Der *RIM101*-Lokus der *phr2Δ*-Suppressormutanten war also offenbar heterozygot aufgrund einer einzigen

Punktmutation innerhalb des *RIM101*-ORF, die für das vom Wildtyp abweichende Signal innerhalb des Doppelausschlages verantwortlich war.

Um diese Beobachtung zu verifizieren, wurden einige der *RIM101*-Amplifikate aus dem PCR-Gemisch stichprobenartig zusätzlich in den Vektor pCR2.1 kloniert. Die resultierenden Plasmide wurden

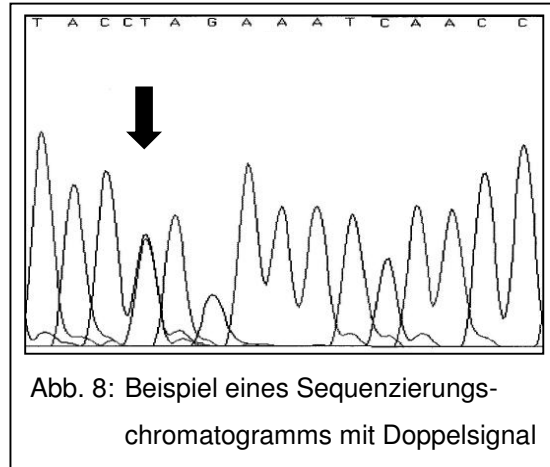


Abb. 8: Beispiel eines Sequenzierungschromatogramms mit Doppelsignal

ebenfalls sequenziert, und das Auftreten von jeweils zwei sich nur am Ort des vorherigen Doppelsignals unterscheidenden Plasmiden bestätigte die Annahme einer Punktmutation auf einem der Allele.

Die Orte solcher Punktmutationen in den 14 untersuchten Revertanten relativ zum gesamten *RIM101*-ORF sind in Abb. 9 dargestellt.

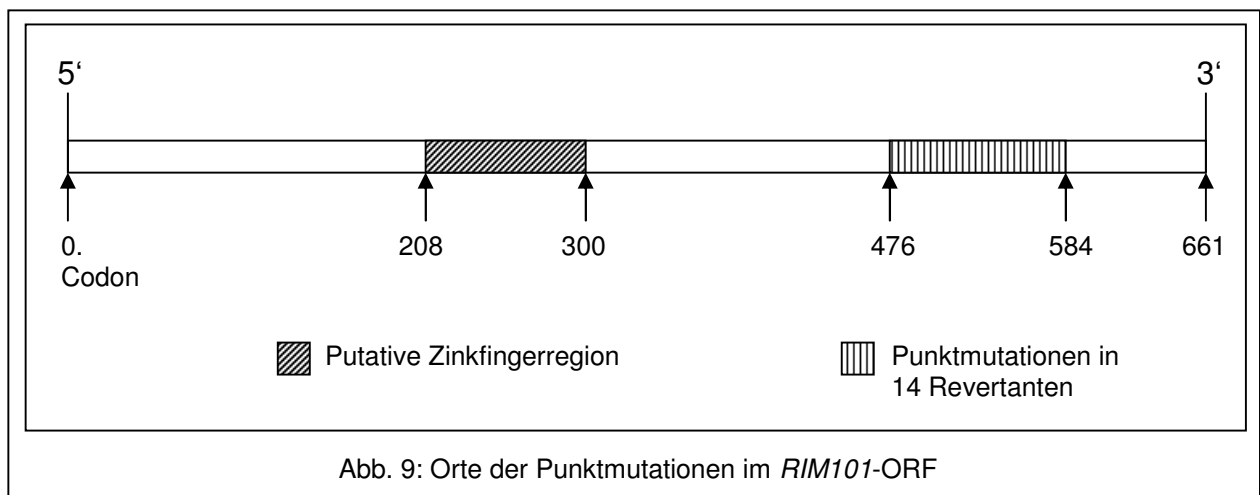


Abb. 9: Orte der Punktmutationen im *RIM101*-ORF

## 3.2 Progressive Trunkierung von *RIM101*

### 3.2.1 Konstruktion *RIM101*-trunkierter *phr2* $\Delta$ -Stämme

Die beobachteten Konsequenzen singulärer Nonsensmutationen, die spontan in einem begrenzten C-terminalen Bereich des *RIM101*-ORF aufgetreten waren, sind identisch mit denjenigen, die El Barkani et al. für zwei Revertanten beschrieben hatten: Wachstum und *PHR1*-Expression bei pH 4 sowie Filamentierung bei pH 4 unter induktiven Bedingungen. Dabei hatte eine Revertante (CEM-2) eine Punktmutation im *RIM101*-Basenpaar 1751 (Codon 584) und damit downstream der hier beschriebenen Mutationen; die andere (CEM-1) hingegen enthielt eine solche Punktmutation in Basenpaar 1426 (Codon 476), also upstream der Suppressormutationen dieser Arbeit (El Barkani et al. 2000).

Als Vermutung lässt sich formulieren, dass Nonsensmutationen, die an irgendeiner Stelle in diesem Bereich zwischen den Basenpaaren 1426 und 1751 von *RIM101* auftreten würden, den gleichen, oben beschriebenen Phänotyp hervorriefen.

Demgegenüber beschreibt die bereits oben zitierte Studie von Davis et al. eine per Plasmid gezielt eingeführte Nonsensmutation im *RIM101*-Codon 463 (nach unserer Zählung), die (auf einem *rim101* $\Delta$ -, *rim8* $\Delta$ - oder *rim20* $\Delta$ -Hintergrund) zwar bei alkalischem pH-Wert hohe Filamentierungsraten, bei saurem pH-Wert aber praktisch keine Hyphenbildung mit sich bringt (Davis et al. 2000).

Daraus stellte sich uns die Frage, wie sich Nonsensmutationen in *RIM101*, die upstream von Codon 476 lokalisiert sind, phänotypisch auswirken, und ob es letztendlich zu einer Aufspaltung der bisher als gekoppelt beobachteten Eigenschaften Wachstum und Filamentierung kommen würde.

Zur Untersuchung dieser Fragestellung war ein Verfahren notwendig, mit dessen Hilfe wir gezielt Stopcodons in das *RIM101*-ORF einführen konnten.

Hierfür erwies sich ein PCR-basiertes Verfahren (Polymerase Chain Reaction) als günstig: Als Sense-Primer wurde generell der Primer PRR2-3 verwendet, der 753 Nukleotide upstream des 1.986 bp *RIM101*-ORF bindet. Kombiniert wurde dieser mit jeweils einem von 19 speziell entworfenen Antisense-Primern DZ1 bis DZ700, die durch ein angehängtes ATT am 5'-Ende in der Lage sind, ein TAA-Codon an einen ausgewählten Ort des PCR-Amplifikates einzuführen (s. Abb. 10). Zusätzlich

wurde unter Verwendung des Antisense-Primers PRR2-4, der 181 Nukleotide downstream des *RIM101*-ORF bindet, ein komplettes *RIM101*-ORF als spätere Negativkontrolle amplifiziert.

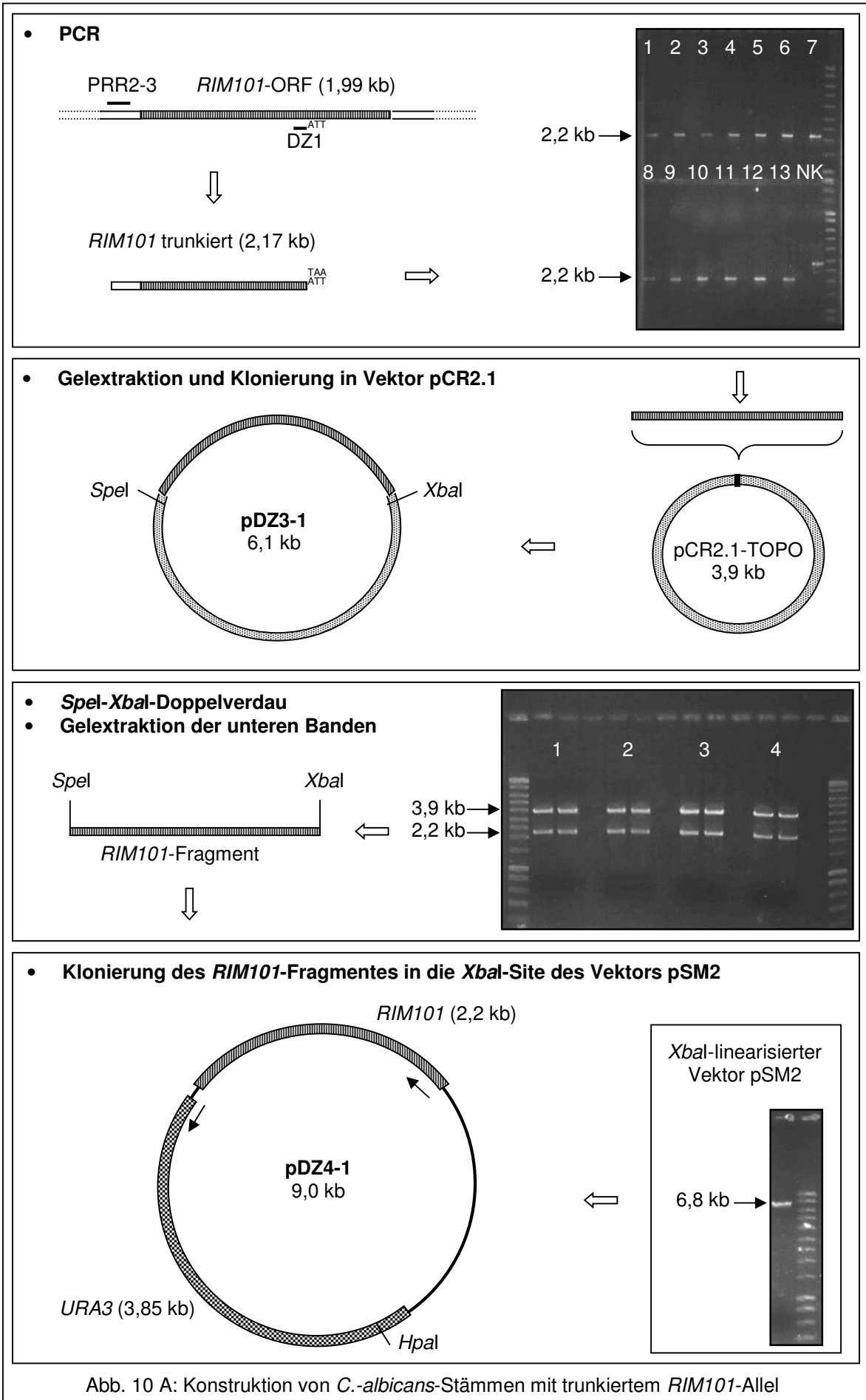
Die gewonnenen PCR-Amplifikate wurden daraufhin in den Vektor pCR2.1-TOPO (Invitrogen) kloniert, dessen „Cloning site“ durch 3'-Thymidin-Überhänge für die Aufnahme von PCR-Produkten geschaffen ist. Die resultierenden Plasmide erhielten – korrespondierend zum jeweils zuvor verwendeten Primer – die Bezeichnungen pDZ3-1 bis pDZ3-700, die Negativkontrolle den Namen pDZ3-14. Durch einen *SpeI*-*XbaI*-Doppelverdau wurden die Fragmente unter Gewinn der entsprechenden Schnittstellen wieder aus dem Vektor herausgelöst und in die *XbaI*-Schnittstelle Plasmid pSM2 ligiert. Dieses Plasmid besteht aus einem das *URA3*-Gen von *C. albicans* enthaltenden 3,85 kb *XbaI*-Fragment, das in die *SmaI*-Schnittstelle des Vektors pBSK(+) (Stratagene) blunt-end-ligiert wurde (s. Abb. 10). Die daraus resultierenden Plasmide erhielten die Namen pDZ4-1 bis pDZ4-700.

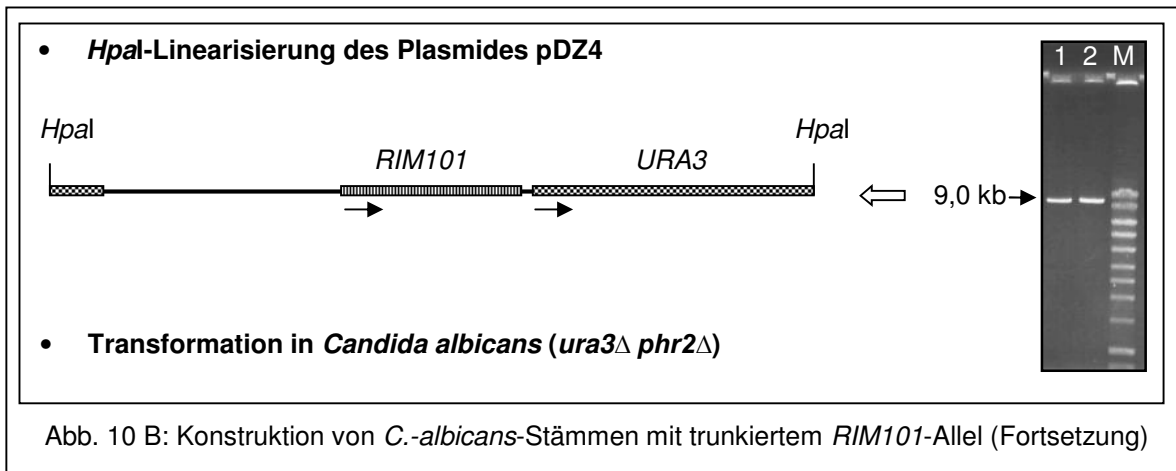
In einem nächsten Schritt wurden diese Plasmide mittels eines *HpaI*-Verdau linearisiert und für die Transformation in *C. albicans* aufgereinigt. Als zusätzliche Kontrolle wurde die Linearisierung auch mit dem nativen Plasmid pSM2, das kein *RIM101*-Fragment, jedoch *URA3* enthält, durchgeführt.

Schließlich konnten die linearisierten Plasmide in den *C.-albicans*-Stamm CFM-4 (*ura3Δ phr2Δ*) transformiert werden, wo es über homologe Rekombination zu einer Integration der *RIM101*-Fragmente und des *URA3*-Gens in die genomische DNA kommt. Diejenigen Klone, die das DNA-Fragment integriert hatten, wurden auf der Basis ihrer Uridin-Prototrophie auf YNB-Platten (Uridin-Mangelmedium) selektioniert.

Hierdurch konnten 19 verschiedene Stämme konstruiert werden, deren *RIM101*-Trunkierungen sich von Codon 475 bis Codon 281 erstrecken (s. Abb. 11). Ersteres liegt dabei nahe den oben beschriebenen revertierenden Basentriplets, letzteres ist bereits in dem Bereich lokalisiert, der für die putative Zinkfingerregion von Rim101p codiert. Die gewonnenen *C.-albicans*-Stämme wurden mit CDZ-1 bis CDZ-700 bezeichnet, die Kontrollstämme sind CDZ-14 (mit zusätzlichem komplettem *RIM101*-ORF) und CDZ-15 (nur *URA3*). Dabei korrespondiert die Nummerierung der Stämme jeweils mit derjenigen der transformierten Plasmide.

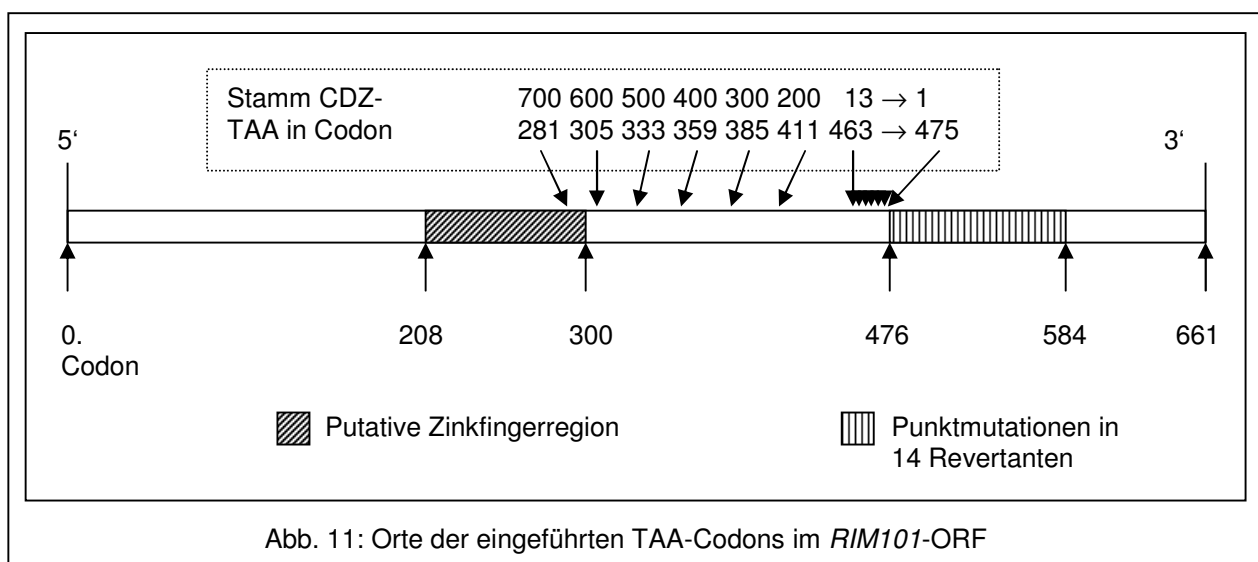






### 3.2.2 Transkriptionsnachweis der trunkierten *RIM101*-Allele mittels RT-PCR

Das nach der Transformation zu beobachtende Wachstum eines Klonen auf YNB, dessen *ura3Δ*-Elternstamm nicht auf einem Uridin-Mangelmedium wächst, scheint praktisch nur mit der Integration des linearisierten Plasmides erklärbar zu sein, was somit als gegeben betrachtet wird. Nicht ohne weiteres läßt sich hingegen behaupten, dass das mit dem Plasmid transformierte trunkierte *RIM101*-Allel auch tatsächlich transkribiert wird und damit überhaupt Konsequenzen für Wachstum, Genexpression oder Zellmorphologie des entsprechenden Klonen haben kann. Um zu zeigen, dass die Transkription des *RIM101*-Fragmentes stattfindet, haben wir das Verfahren der RT-PCR (PCR nach reverser Transkription von RNA) angewendet. Dieses setzt sich im Prinzip aus zwei hintereinandergeschalteten

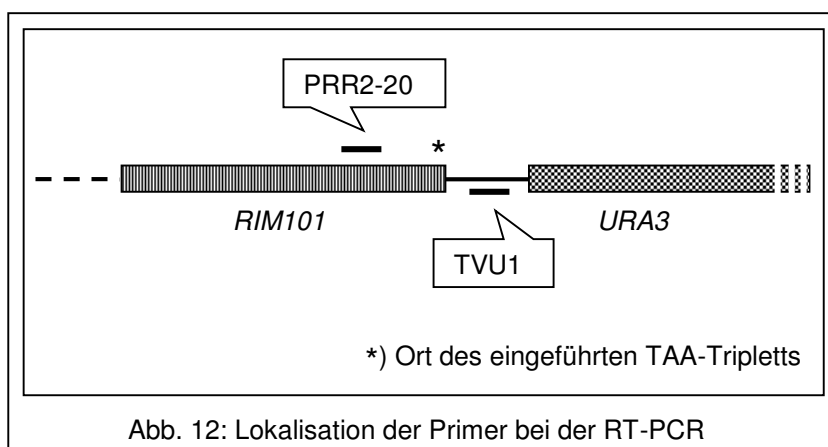


Prozessen zusammen: In einem ersten Schritt wird RNA mit Hilfe der reversen Transkriptase in DNA umgeschrieben, die dann im zweiten Schritt durch eine PCR amplifiziert wird; beides geschieht mit Hilfe eines spezifischen Primerpaares.

In Vorbereitung der RT-PCR erfolgte zunächst die RNA-Isolation: Aus einer Übernachtskultur eines *C.-albicans*-Stammes mit trunkiertem *RIM101*-Allel (s. Kap. 3.2.1) wurden Zellen der stationären Phase in Medium M199 angeimpft und bei pH 4 angezüchtet. Zur Induktion wurden eine Inkubationstemperatur von 37°C und eine Inkubationszeit von 1,5 h gewählt. Anschließend wurde die Gesamt-RNA nach Protokoll isoliert und aufgereinigt.

Entscheidend für die Aussagekraft einer RT-PCR ist die Sicherheit, dass das Reaktionsgemisch frei von DNA-Spuren ist, die bei der dazugehörigen PCR als Template dienen und damit die Anwesenheit von revers-transkribierter DNA vortäuschen könnte. Deshalb wurde die gewonnene RNA einem DNase-Verdau ausgesetzt, anschließend aufgereinigt und schließlich mit Hilfe eines Agarosegels quantifiziert.

Die Durchführung der eigentlichen RT-PCR erfolgte mit einem One-Step RT-PCR System (Life Technologies), bei dem an einem Reaktionsgemisch beide Schritte der RT-PCR in Folge stattfinden. Das Funktionieren dieses Verfahrens beruht auf der Tatsache, dass die reverse Transkriptase bei 45°C aktiv ist, während gleichzeitig die DNA-Polymerase durch spezifische Antikörper blockiert wird. Ein Denaturierungsschritt bei 94°C beendet den reversen Transkriptionsprozess durch Inaktivierung der reversen Transkriptase und startet gleichzeitig die PCR durch



Denaturierung der Antikörper und daraus resultierender Reaktivierung der DNA-Polymerase.

Als Sense-Primer kam PRR2-20 zum Einsatz, der 1166 bp in 3' vom Startcodon

im *RIM101*-ORF bindet. Der Antisense-Primer TVU1 liegt auf dem kleinen Anteil des pCR2.1-TOPO-Vektors, der in der transformierten DNA enthalten ist, nur 6 bp benachbart zur Cloning site (s. Abb. 12).

Durch die Lage von TVU1 auf einer Vektorsequenz ist er absolut spezifisch für mRNA, die von dem transformierten trunkierten *RIM101*-Allel abstammt.

Zur Kontrolle wurde ein erstes Reaktionsgemisch beiden Schritten der RT-PCR zugeführt, während ein zweites von identischer Zusammensetzung erst vor dem Denaturierungsschritt aus 4°C in die 94°C Denaturierung überführt wurde und lediglich an der PCR, nicht aber an der reversen Transkription teilnahm (Negativkontrolle).

Auf dem abschließend angefertigten Gelchromatogramm zeigte sich als Amplifikat beim ersten Probenansatz ein ca. 250 bp großes Fragment, während bei der Negativkontrolle keinerlei Banden sichtbar waren (s. Abb. 13). Dies wurde als

Beleg dafür gewertet, dass die integrierten *RIM101*-Fragmente tatsächlich transkribiert werden.

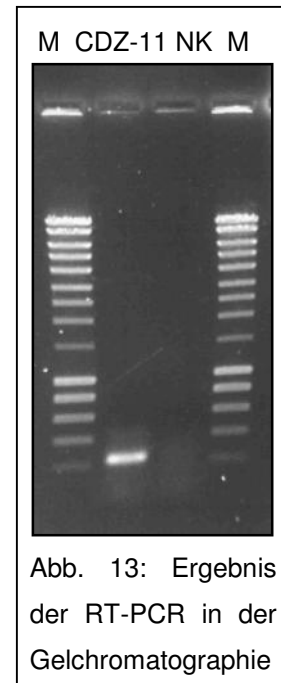


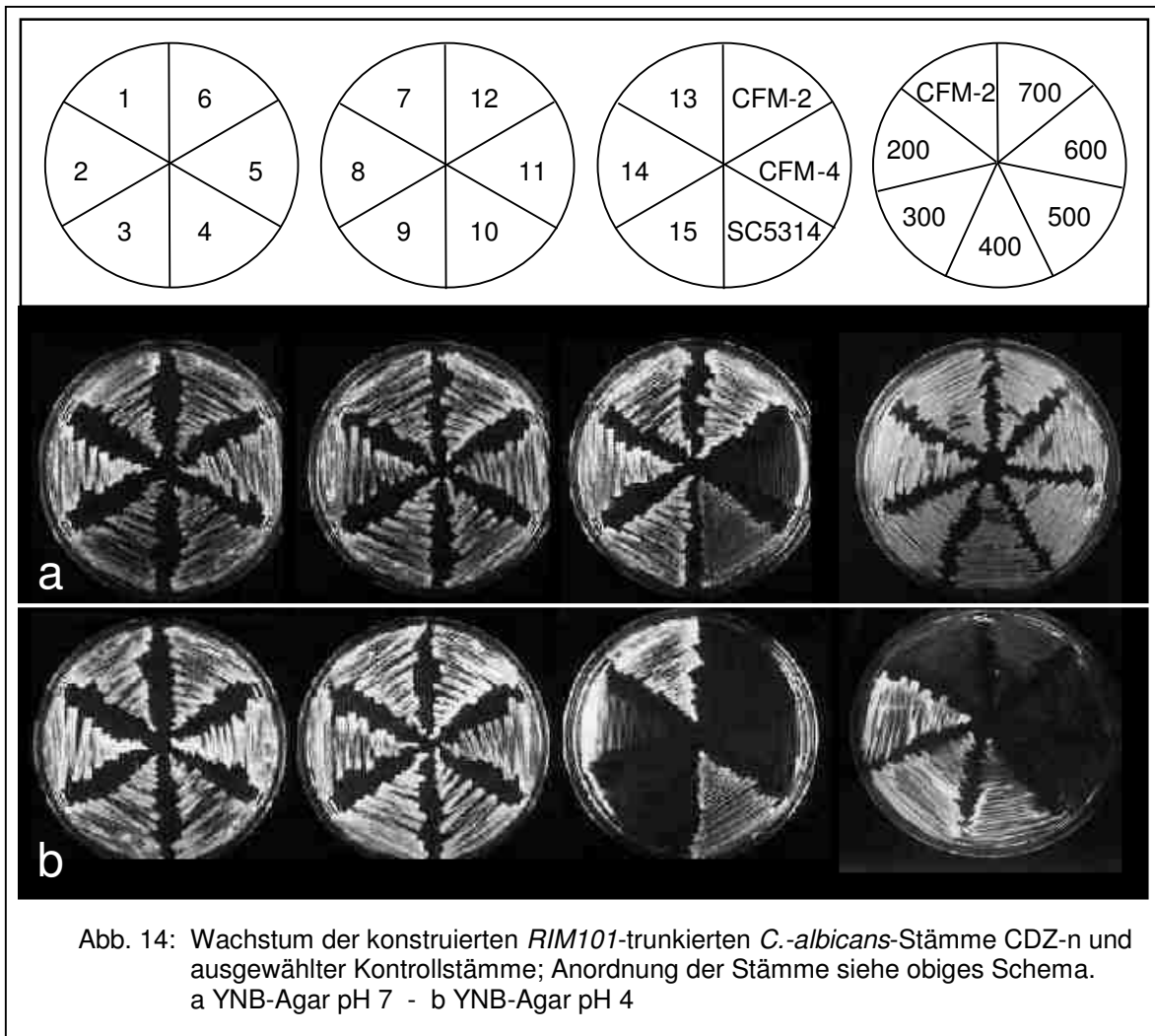
Abb. 13: Ergebnis der RT-PCR in der Gelchromatographie

### 3.2.3 Untersuchung der *RIM101*-trunkierten Stämme auf Wachstum

Von jeder Transformationsplatte CDZ-1 bis CDZ-700 wurden mehrere Kolonien auf YNB-Agarplatten mit pH 7 replikaplattiert, auf welchen alle Klone inklusive der Kontrollstämmen ein dem Wildtypstamm SC5314 entsprechendes Wachstum zeigten (s. Abb. 14a). Der Elternstamm CFM-4 konnte erwartungsgemäß nicht wachsen, da er durch die *ura3Δ*-Mutation auf ein externes Uridinangebot angewiesen ist.

Dieselben Stämme wurden nun von den pH-neutralen Platten auf YNB-Agarplatten, die auf pH 4 eingestellt waren, replikaplattiert. Wenngleich – mit Ausnahme des Wildtypstammes SC5314 – alle getesteten Stämme *phr2*-Nullmutanten waren, so waren doch 16 der 19 Stämme, die ein trunkiertes *RIM101*-Allel enthielten, in der Lage, bei pH 4 ähnlich wie der als Positivkontrolle dienende Wildtypstamm zu wachsen. Es waren dies die Stämme CDZ-1 bis CDZ-400, deren transformierte *RIM101*-Allele das Stopcodon in Codon 475 (CDZ-1) bis Codon 359 (CDZ-400) enthielten.

Stärkere *RIM101*-Trunkierungen in Codon 333 (CDZ-500), 305 (CDZ-600) bzw. 281 (CDZ-700) erlaubten es den dazugehörigen Stämmen nicht, bei pH 4 zu wachsen; ebensowenig waren die Negativkontrollstämmen CDZ-14 und CDZ-15, die ja lediglich drei bzw. zwei nicht-verkürzte *RIM101*-Allele beinhalten, zum Wachstum im sauren Milieu fähig (s. Abb. 14b).



### 3.2.4 *PHR1*-Induktion in den gewonnenen Stämmen

Wir hatten bei den *phr2* $\Delta$ -Suppressormutanten beobachtet, dass dort als Folge einer Nonsensmutation im *RIM101*-Gen der Verlust von *PHR2* durch die konstitutive Induktion des funktionellen Homologes *PHR1* ausgeglichen werden konnte, was Wachstum auch im restriktiven pH-Bereich möglich machte. Unter

Berücksichtigung dieser vorangegangenen Untersuchungen lag nun die Vermutung nahe, dass bei den durch Transformation gewonnenen *RIM101*-trunkierten Stämmen, die trotz ihres *phr2Δ*-Hintergrundes bei pH 4 wachsen konnten, ein ähnlicher Sachverhalt, nämlich eine Substitution des *PHR2*-Verlustes durch *PHR1*-Induktion, zugrunde lag.

Um diesen Verdacht zu prüfen, wurde eine Northern-Blot-Analyse mit einer *PHR1*-Sonde durchgeführt. Die hierfür erforderliche RNA wurde aus jedem der Stämme nach einer 1,5 h dauernden Induktionsphase in Medium M199 bei pH 4 und 37°C isoliert. Sie wurde im Agarosegel aufgetrennt und nach Protokoll des Northern-Blots auf Nitrocellulosepapier geblottet. Die mittels PCR gewonnene *PHR1*-DNA-Sonde wurde mit  $^{32}\text{P}$ -gelabelten Nukleotiden markiert, aufgereinigt und anschließend zur Hybridisierung der RNA-Proben verwendet.

Im Northern Blot zeigte sich tatsächlich eine starke *PHR1*-Induktion in all denjenigen Stämmen, die auch in der Lage waren, bei pH 4 zu wachsen. Diejenigen allerdings, die zuvor nicht gewachsen waren, wiesen eine schwache oder gar keine *PHR1*-Induktion auf (s. Abb. 15). Dies bestätigte die Annahme, dass dem Wachstum der Transformanten eine *PHR1*-Induktion zugrunde lag.

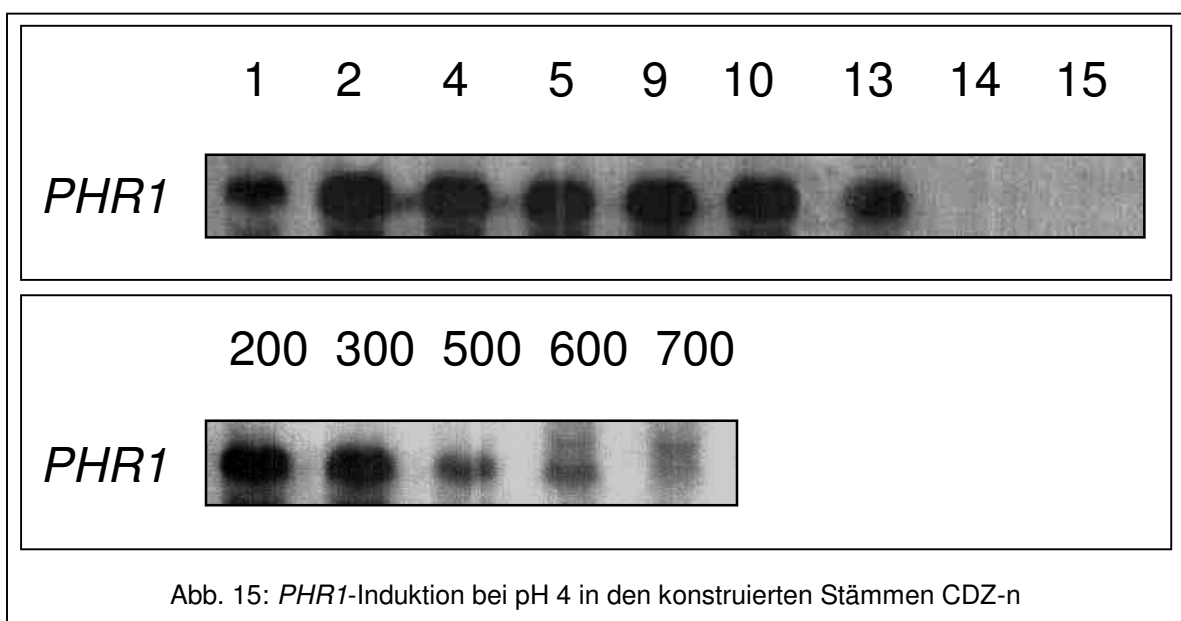


Abb. 15: *PHR1*-Induktion bei pH 4 in den konstruierten Stämmen CDZ-n

### 3.2.5 Untersuchung der Zellmorphologie

An die Untersuchung des Wachstums schloss sich die Betrachtung der Zellmorphologie an. Auch hier gab das zuvor geschilderte Verhalten der *phr2Δ*-Suppressormutanten Anlass zur Spekulation: Nicht nur stellte sich die Frage, ob auch die artifiziell erzeugten *RIM101*-Verkürzungen Auswirkungen auf das morphologische Verhalten der Trägerstämme im sauren pH-Bereich haben würden, sondern ebenso interessant war die Fragestellung, ob die Erscheinungen

auf der Ebene der Zellmorphologie Hand in Hand gehen würden mit dem Wachstumsverhalten bzw. der gezeigten *PHR1*-Induktion.

Die phänotypischen Assays wurden alle nach dem gleichen Protokoll durchgeführt: Aus einer 30°C-Übernachtskultur in flüssigem Medium M199 pH 4 wurden Zellen – zu diesem Zeitpunkt in der stationären Phase – in frisches Medium M199 pH 4 auf eine Zelldichte von ca.  $5 \times 10^6$  angeimpft. Diese

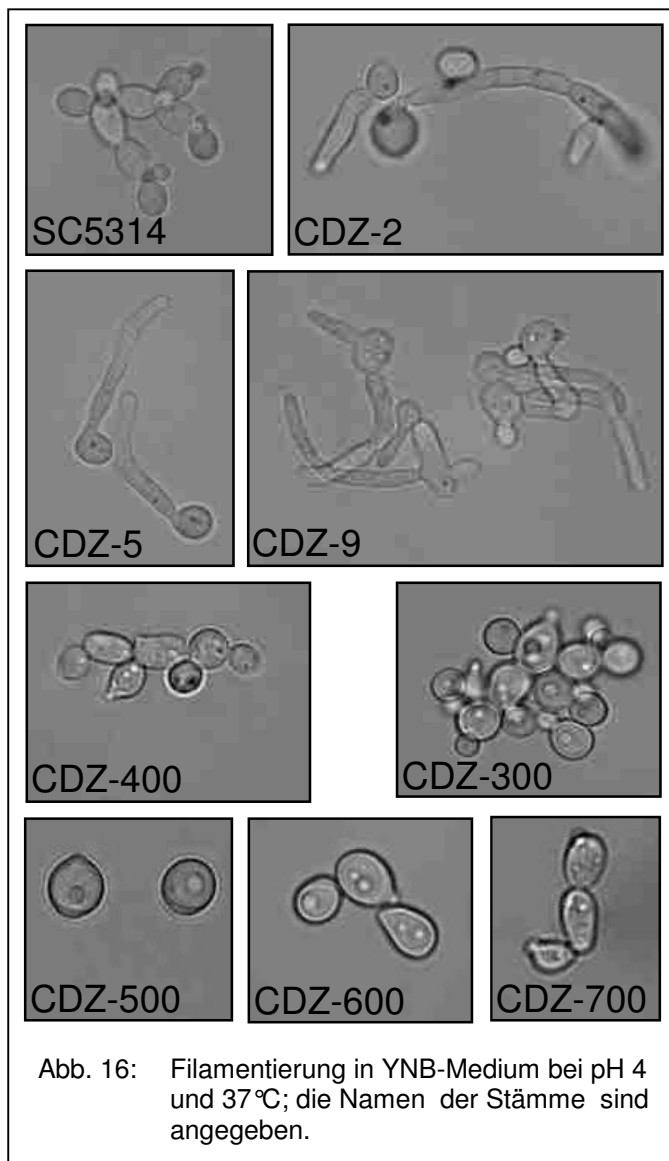
Stamm	Ersetztes Codon	% Keimschlauchbildung bei pH 4
CDZ-1	475 → (och)	89
CDZ-2	474 → (och)	90
CDZ-3	473 → (och)	83
CDZ-4	472 → (och)	86
CDZ-5	471 → (och)	93
CDZ-6	470 → (och)	76
CDZ-7	469 → (och)	84
CDZ-8	468 → (och)	90
CDZ-9	467 → (och)	80
CDZ-10	466 → (och)	86
CDZ-11	465 → (och)	80
CDZ-12	464 → (och)	61
CDZ-13	463 → (och)	93
CDZ-200	411 → (och)	<0,5
CDZ-300	385 → (och)	<0,5
CDZ-400	359 → (och)	<0,5
CDZ-500	333 → (och)	0*
CDZ-600	305 → (och)	0*
CDZ-700	281 → (och)	0*
CDZ-14	Kontrollstamm	0*
CDZ-15	Kontrollstamm	0*

Tab. 1: Filamentationsraten der *C.-albicans*-Stämme mit progressiv trunkierten *RIM101*-Allelen (\* = kein Wachstum zu beobachten).

Kultur wurde dann bei 37°C für 3 h geschüttelt. Daraufhin wurde der prozentuale Anteil der keimschlauchbildenden Zellen mikroskopisch mit Hilfe des 40xObjektivs und einer Zählkammer ermittelt.

Auf diese Weise wurden alle Stämme CDZ-1 bis CDZ-700 sowie als Kontrollstämme CDZ-14, CDZ-15, Wildtypstamm SC5314 phänotypisch untersucht.

Bereits nach der Übernacht-Inkubation bei 30°C, also nach nicht-keimschlauchinduzierenden Bedingungen, wurde eine Probe aus jeder Kultur mikroskopisch inspiziert. Hierbei zeigte sich zum einen, dass die Zellen, die auf



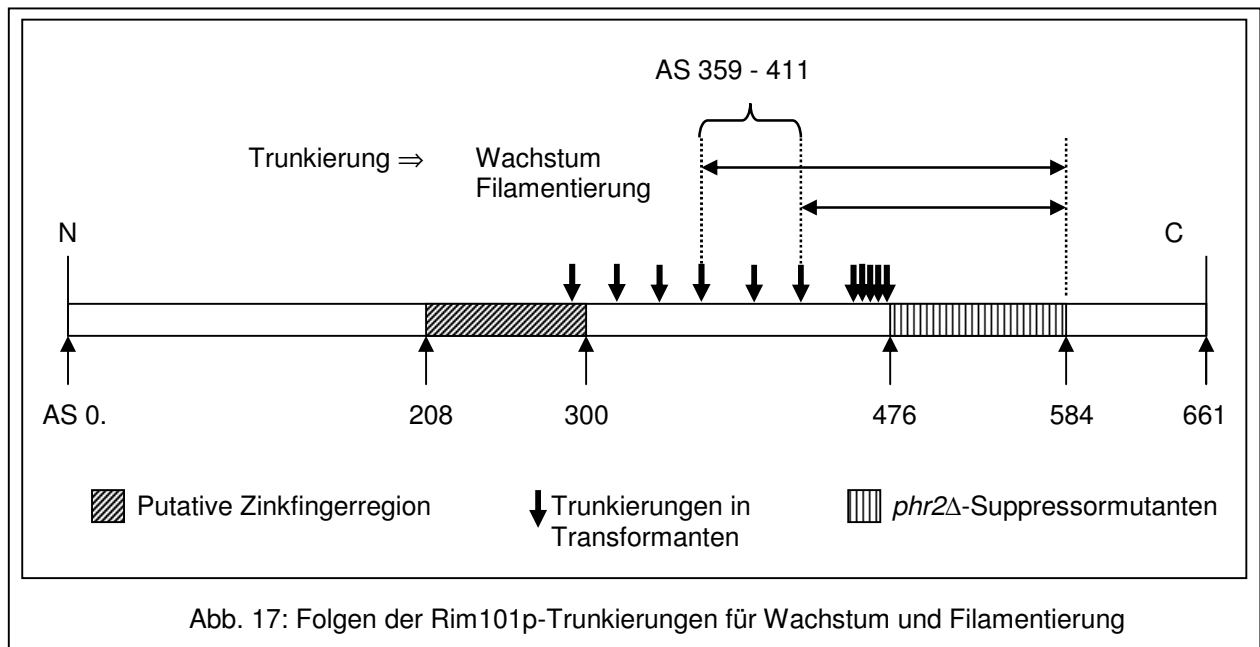
YNB-Agarplatten pH 4 nicht wachsen konnten, erwartungsgemäß auch im sauren Flüssigmedium nicht zum Wachstum befähigt waren; sie erschienen aufgebläht, unförmig und in ihrer Wachstumsgeschwindigkeit extrem herabgesetzt (CDZ-500 bis CDZ-700; CDZ-14; CDZ-15). Zum anderen glich die Zellmorphologie der Stämme, die bei pH 4 wachsen konnten, weitgehend derjenigen vom Wildtypstamm SC5314: Die sprossende Hefeform dominierte bei weitem, und nur ganz vereinzelt waren filamentöse Strukturen zu erkennen (CDZ-1 bis CDZ-13; CDZ-200 bis CDZ-400).

Nach der dreistündigen Keimschlauchinduktion bei 37°C im

frischen Medium M199 pH 4 zeigte sich dann ein ganz neues Bild: Die Stämme CDZ-1 bis CDZ-13, die ein weniger stark trunkiertes *RIM101*-Allel enthalten, zeigten hohe Prozentsätze an filamentösen Wachstumsformen (s. Tab. 1; Abb. 16). Die Stämme CDZ-200, -300 und -400 hingegen wiesen einen Anteil filamentierender Zellen von weniger als 0,5% auf (s. Tab. 1; Abb. 16).



Dieses Ergebnis war insofern sehr überraschend, als offensichtlich drei der konstruierten Stämme, nämlich CDZ-200, -300 und -400, solche *RIM101*-Trunkierungen enthielten, die ihnen das Wachstum im restriktiven pH-Bereich ermöglichten, sie aber im Gegensatz zu den weniger stark verkürzten *RIM101*-Allelen nicht mehr zur Keimschlauchbildung bei pH 4 befähigten. In Abb. 17 wird durch die schematische Zuordnung der Fähigkeiten zu den jeweils *RIM101*-trunkierten Stämmen diese Dissoziation von Rim101p-vermittelter *PHR1*-Induktion und Rim101p-gesteuerter Keimschlauchbildung verdeutlicht.



### 3.3 Untersuchung zur Funktion von *RIM101* bei der *SAP*-Induktion

*Candida albicans* besitzt verschiedenartige hydrolytisch aktive Exoenzyme, wie z. B. Proteinasen (s. u.) und Phospholipasen (Ibrahim et al. 1995). Die größte Aufmerksamkeit galt bisher den sogenannten sekretorischen Aspartyl-Proteinasen, kurz SAPs, denen eine wesentliche Rolle als Virulenzfaktor in *C. albicans* zugeschrieben wird. SAPs werden mit Vorgängen der Adhäsion, der Degradation von Wirtsbarrieren, der Nutrition und der Verteidigung gegen Abwehrmechanismen des Wirtes in Verbindung gebracht (Watts et al. 1998; Morschhäuser et al. 1997; Kaminishi et al. 1995). Bisher konnten zehn Mitglieder der SAP-Genfamilie (SAP1 bis SAP10) kloniert werden, die bei In-vitro-Untersuchungen in Antwort auf die extrazellulären Bedingungen eine differentielle Expression zeigen (Hube et al. 1994; White and Agabian 1995; Monod et al. 1998). Auch in vivo gibt es Hinweise, dass Infektionen verschiedener Nischen je ein örtlich und zeitlich variables Expressionmuster der zehn Isoenzyme hervorrufen (Staib et al. 2000). Bei einer ösophagealen Candidose im Mausmodell beispielsweise wurde drei Tage nach Infektion, während der Invasion in die ösophageale Mucosa, eine hohe Induktion von *SAP5* und *SAP6* gemessen. Eine gesteigerte *SAP2*-Induktion war erst in späten Stadien der Infektion parallel zur Zerstörung von inneren Organen festzustellen, *SAP1* und *SAP3* zeigten keine gesteigerte Induktion in diesem Modell (Staib et al. 2000).

*SAP4*, *SAP5* und *SAP6* bilden eine in sich stark homologe Untergruppe. Alle drei liegen auf Chromosom 6 und sind möglicherweise durch Genduplikation entstanden (Monod et al. 1994). Ihre Genprodukte enthalten jeweils vier charakteristische Lys-Arg- bzw. Lys-Lys-Stellen für eine regulatorische Proteinase vom Kex2-Typ und befinden sich möglicherweise auf der Oberfläche filamentös wachsender Zellen (Julius et al. 1984). Die Expression der *SAP4-SAP6*-Transkripte tritt in vielen, nicht jedoch in allen Stämmen während der seruminduzierten Keimschlauchbildung bei neutralem pH-Wert auf (Hube et al. 1994). Sie scheint allerdings nicht obligatorisch mit der Hyphenbildung verknüpft zu sein, da sich bei der Keimschlauchinduktion durch pH-Wert und Temperatur keine gesteigerte Expression beobachten ließ (Hube et al. 1994). Im Gegensatz zu *SAP1-SAP3* wird die Induktion von *SAP4-SAP6* in der Gegenwart von Aminosäuren nicht down-reguliert. Interessant ist die Tatsache, dass sehr hohe

mRNA-Levels von *SAP4-SAP6* bei pH 7 gefunden wurden, obwohl das charakteristische pH-Optimum anderer Saps im sauren Bereich unterhalb pH 7 liegt (Davis 1990). Es ist daher denkbar, dass die enzymatische Aktivität der entsprechenden Proteine auf saure Mikromilieus beschränkt ist oder dass die Rolle dieser Proteine in einem nicht-enzymatischen Bereich wie der Zelladhäsion zu suchen ist, möglicherweise bei der Adhäsion oder Invasion filamentöser Zellen im Rahmen der oralen Candidose (Cutler 1991; Hube et al. 1994).

Hinter der differentiellen Expression der SAP-Isoenzyme muss ein komplexes Netzwerk an Perzeptions-, Transduktions- und Regulationsmechanismen stehen, das in der Lage ist, die während verschiedener Infektionsstadien auftretenden äußeren Bedingungen mit dem adäquaten Enzymexpressionsmuster zu beantworten (Hube und Naglik 2001). Dadurch werden in Assoziation mit einer bestimmten Zellmorphologie und den ihr zugrundeliegenden Umweltbedingungen Sap-Enzyme mit verschiedenen pH-Optima und Substratspezifitäten synthetisiert (Hube et al. 1994; Borg-von-Zepelin et al. 1998; Koelsch et al. 2000).

Es wurde gezeigt, dass die Regulationskaskaden für den Polymorphismus und für die Expression von Proteinasen in *Candida albicans* miteinander verschaltet sind und gemeinsame Strecken besitzen. Die terminalen Transkriptionsfaktoren der beiden am besten untersuchten Signaltransduktionswege, nämlich Cph1p aus dem MAP-Kinase-Weg und Efg1p aus der cAMP-abhängigen Kaskade, regulieren demnach nicht nur die Expression von Faktoren der Morphogenese, sondern haben auch bei der transkriptionellen Regulation von *SAP4-SAP6* Bedeutung (Staib et al. 2002; Felk et al. 2002). Für *efg1Δ*-Mutanten wird hierbei aus RT-PCR-Daten folgendes Bild beschrieben: (a) Die Induktion von *SAP1-SAP3* und *SAP7-SAP10* scheint von der *efg1Δ*-Mutation unbeeinflusst zu sein. (b) Wird die Keimschlauchinduktion mit 5% Serum vorgenommen, zeigt der *efg1Δ*-Stamm im Vergleich zum Wildtyp eine stark reduzierte *SAP4-SAP6*-Induktion. (c) Wird hingegen über einen pH/Temperatur-Shift induziert, weist der Wildtyp keine nennenswerte, der *efg1Δ*-Stamm aber eine deutlich gesteigerte *SAP4-SAP6*-Induktion auf, die für *SAP4* von Anfang an, für *SAP5* und *SAP6* insbesondere ab 90 Minuten nach der Induktion sichtbar wird (Felk et al. 2002).

Der Transkriptionsfaktor Rim101p nimmt, wie bereits in den vorangestellten Kapiteln dargestellt, eine Schlüsselrolle in der pH-Transduktionskaskade ein, die in die Induktion pH-regulierter Gene und möglicherweise in die Modifikation

anderer beteiligter Faktoren mündet. El Barkani et al. haben gezeigt, dass zwar für die Rim101p-vermittelte *PHR1*-Induktion *EFG1* nicht erforderlich ist, für die pH-abhängige, Rim101p-vermittelte Filamentierung *EFG1* hingegen essentiell ist: Eine *efg1* $\Delta$ -Mutation wirkt epistatisch auf eine gleichzeitige *RIM101*-Trunkierung (El Barkani et al. 2000). Wenn aber Rim101p mit oder auf *EFG1* wirkt und Efg1p eine offenbar wichtige Rolle in der Steuerung der *SAP4-SAP6*-Expression hat, so stellt sich die Frage nach der Rolle von Rim101p oder ihm nachgeschalteter Elemente im Bereich der pH-abhängigen hyphenassoziierten SAP-Expression.

### 3.3.1 Konstruktion eines Reportersystems

Um die Bedeutung von *RIM101* im Rahmen der *SAP4-SAP6*-Expression zu untersuchen, haben wir ein Reportersystem verwendet, mit dessen Hilfe die Induktion des *SAP4*-, *SAP5*- bzw. *SAP6*-Promotors über das homologe Reporter-gen *URA3* nachgewiesen werden sollte.

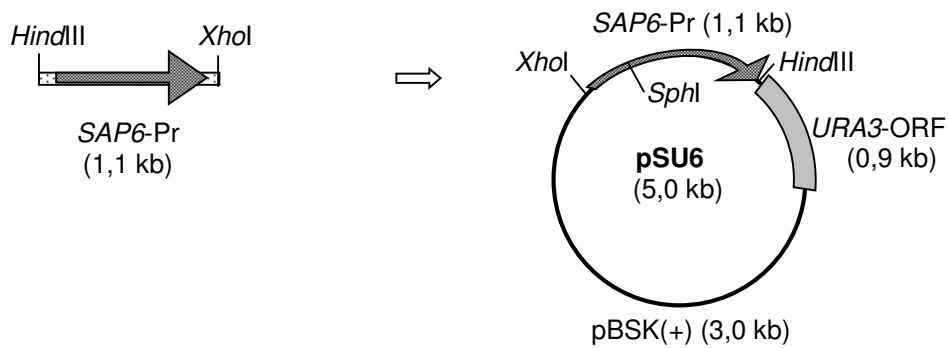
Hierfür wurden zunächst die drei Promotoren über eine Polymerase Chain Reaction (PCR) amplifiziert: Der *SAP4*-Promotor mit den Primern *SAP4P3/SAP4P4*, der *SAP5*-Promotor mit *SAP5P1/SAP5P2* und der *SAP6*-Promotor mit dem Primerpaar *SAP6P1/SAP6P2* (Primersequenzen s. Kap. 2.8). Die gewonnenen PCR-Amplifikate (ca. 1,0 kb / 0,8 kb / 1,1 kb für *SAP4*-Pr / *SAP5*-Pr / *SAP6*-Pr) wurden daraufhin zur Gewinnung geeigneter Schnittstellen für Restriktionsenzyme in den Vektor pCR2.1-TOPO (Invitrogen) kloniert, dessen Cloning site durch 3'-Thymidin-Überhänge für die Aufnahme von PCR-Produkten konstruiert ist. Die korrekte Zusammensetzung der resultierenden Plasmide p*SAP4*, p*SAP5* und p*SAP6* wurde jeweils durch eine Sequenzierung bestätigt (s. Abb. 18).

Im Anschluss wurde jeder Promotor in ein Plasmid pEM6 kloniert. Dieses Plasmid besteht aus dem ORF (0,9 kb) des *URA3*-Gens von *C. albicans*, das in die *Sma*I-Schnittstelle des Vektors pBSK(+) (Stratagene) ligiert wurde. Hierzu wurde mit p*SAP4*, p*SAP5* und pEM6 ein *Pst*I/*Hind*III-Doppelverdau durchgeführt, mit p*SAP6* und dem entsprechenden pEM6 hingegen ein *Xho*I/*Hind*III-Doppelverdau. Die ligierten und aufgereinigten Plasmide enthielten hiernach jeweils einen der drei Promotoren vor dem *URA3*-ORF im Vektor pBSK(+) (s. Abb. 18).

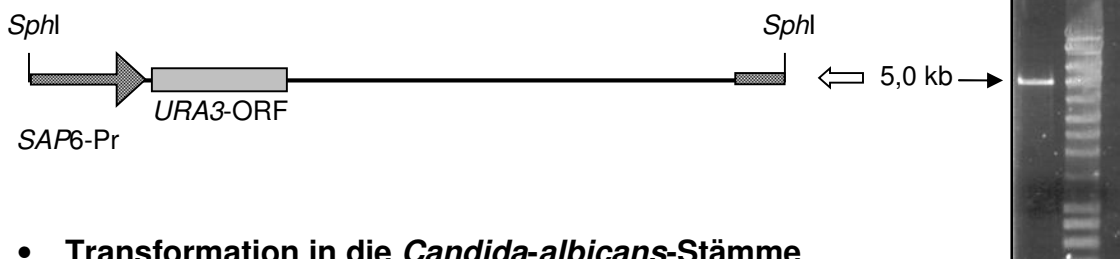
- **PCR (- Primer SAP6P1/SAP6P2) und Klonierung in Vektor pCR2.1**



- **XhoI/HindIII-Doppelverdau und Klonierung in Vektor pEM6**



- **Linearisierung von pSU6 mit SphI**



- **Transformation in die *Candida-albicans*-Stämme CAF3-1 (*ura3Δ*) und CAR26 (*ura3Δ rim101Δ*)**

Abb. 18: Konstruktion eines Reportersystemes am Beispiel des *SAP6*-Promotors.

Sie und die zugehörigen *E.-coli*-Stämme erhielten – korrespondierend zur Nummer des enthaltenen SAP-Promotors – die Bezeichnungen pSU4, pSU5 und pSU6. Die Zusammensetzung der Plasmide und die Richtung ihrer Komponenten wurden mittels PCR überprüft (s. Abb. 18).

Daraufhin wurden die Plasmide linearisiert: pSU4 mit *AgeI*, pSU5 mit *BsaBI* und pSU6 mit *SphI*. Nach der Aufreinigung wurde jedes Konstrukt sowohl in den *Candida-albicans*-Stamm CAF3-1 (*ura3Δ*) als auch in CAR26 (*ura3Δ rim101Δ*) transformiert und auf YNB-Agarplatten mit Aminosäuren (pH 7) bzw. auf Lee-Agarplatten (pH 7) ausplattiert, die schließlich für einige Tage bei 30°C inkubiert wurden.

### 3.3.2 Untersuchung der konstruierten Stämme

Nach der Transformation der Konstrukte in *Candida albicans* erwies es sich als höchst problematisch, lebensfähige positive Transformanten zu gewinnen und zu isolieren. Nachdem alle beteiligten Komponenten auf Richtigkeit (Plasmide, verwendete Stämme, etc.) bzw. Funktionstüchtigkeit (Agarplatten, Chemikalien) überprüft waren und sich nach mehrfachen Wiederholungen der Transformation keiner der sechs gewünschten *C.-albicans*-Stämme gewinnen ließ, mussten wir uns kritisch mit dem angewendeten System auseinandersetzen.

Beide zur Transformation verwendeten Elternstämme CAF3-1 und CAR26 sind Uridin-auxotroph, d. h. sie sind auf die externe Zufuhr von Uridin aus dem Nährmedium angewiesen, um wachsen zu können. Jedes der transformierten Plasmide pSU4 bis pSU6 enthält das *URA3*-ORF, allerdings unter dem jeweiligen Promotor SAP4-Pr bis SAP6-Pr. Das *URA3*-ORF wurde hierbei also in einer doppelten Funktion verwendet: Zum einen als Reportergen, das den Aktivierungsgrad der zugeordneten SAP-Promotoren sichtbar machen soll, zum anderen aber als Selektionsmarker, um Transformanten aufgrund ihrer Uridin-Prototrophie auslesen zu können.

Mit großer Wahrscheinlichkeit ist das Scheitern dieser Vorgehensweise darin begründet, dass unter den Bedingungen der Transformation und den zum anschließenden Ausplattieren gewählten Bedingungen die Aktivierung der SAP-Promotoren nicht ausreichte, um die *URA3*-Expression so zu steigern, dass

genügend essentielles Uridin für Wachstum und Vermehrung synthetisiert werden konnte. Deshalb waren auch u. U. vorhandene Transformanten nicht in der Lage, zu Kolonien heranzuwachsen.

Die Lösung dieses Problems würde darin bestehen, einen zusätzlichen, vom Reportersystem unabhängigen Selektionsmarker, z. B. *HIS1* oder *ARG4*, zu verwenden. In *ura3Δ/his1Δ*-Stämme beispielsweise könnte dann ein linearisiertes Plasmid transformiert werden, das zusätzlich zum *SAP*-Promotor vor dem *URA3*-ORF auch noch *HIS1* enthält. Dadurch wäre eine von den Wachstumsbedingungen weniger abhängige Selektion auf einem Histidin-Mangelmedium möglich. Die Verwirklichung dieses Projektes steht noch aus.

## 4 DISKUSSION

### 4.1 In *RIM101* trennen sich die Wege

Ausgehend von 14 spontan aufgetretenen *phr2Δ*-Suppressormutanten haben wir 19 weitere *C.-albicans*-Stämme konstruiert, die auf einem *phr2Δ*-Hintergrund ein zusätzliches, am 3'-Ende durch ein Nonsense-Codon trunkiertes *RIM101*-Allel enthalten. Dabei schreiten die Trunkierungen progressiv in 5'-Richtung fort, so dass die Region zwischen der am meisten 5' gelegenen revertierenden Punktmutation und der Region, die für die putative Zinkfingerdomäne codiert, sukzessive durchwandert wird.

Mit Hilfe einer RT-PCR wurde spezifisch gezeigt, dass diese transformierten *RIM101*-Allele tatsächlich transkribiert werden.

Anschließend wurden die gewonnenen Stämme insbesondere in drei Kategorien untersucht: Wachstum bei pH 4, *PHR1*-Induktion bei pH 4 und Keimschlauchbildung bei pH 4. Von großem Interesse war hierbei die Fragestellung, ob die drei untersuchten Kategorien zu jeder Zeit miteinander gekoppelt auftreten oder ob eine Dissoziation stattfindet.

Nach Abschluss dieser Untersuchungen ließ sich das Verhalten der *C.-albicans*-Stämme in drei verschiedene Gruppen einteilen (s. Abb. 17 in Kap. 3.2.5):

- (a) *RIM101*-Trunkierungen zwischen den Codons 584 und 463 ermöglichen den zugehörigen Stämmen Wachstum, *PHR1*-Induktion und Filamentierung bei pH 4.
- (b) Trunkierungen in den Codons 411, 385 und 359 erzeugen Stämme, die bei pH 4 zu Wachstum und *PHR1*-Induktion, nicht aber zur Filamentierung fähig sind.
- (c) Stärkere *RIM101*-Verkürzungen von Codon 333 bis 281 können keines der drei Phänomene Wachstum, *PHR1*-Induktion oder Filamentierung im sauren pH-Bereich ermöglichen.

Diese Ergebnisse zeigen, dass eine Region auf Rim101p oberhalb von Aminosäure 463 (bei pH 4) zwar für die Keimschlauchbildung unter induzierenden Bedingungen essentiell ist, nicht jedoch notwendig für *PHR1*-Induktion bzw. Wachstum. Aufgrund der strengen Parallelität zwischen *PHR1*-Induktion und Wachstumsfähigkeit werden diese beiden Phänomene, verknüpft durch den Begriff „Zellwandaufbau“, in diesem Kapitel als ein Komplex behandelt.



Über welche Mechanismen bewirkt nun die verkürzte Form von Rim101p die *PHR1*-Induktion im Zellkern und damit Wachstum einerseits, andererseits aber die morphogenetische Transition von der Hefeform in die filamentöse Wachstumsform? Welche Funktion hat hierbei die beschriebene Region auf Rim101p oberhalb Aminosäure 463?

#### 4.2 Ausgangspunkt: Homologe Proteine zu *C.-albicans*-Rim101p

Zum Verständnis von Prozessen und Funktionen in *Candida albicans* hat es sich bewährt, von Erkenntnissen aus nah verwandten Spezies auszugehen, deren molekulare Organisationsebene bereits besser untersucht ist. Hierzu gehören z. B. *Aspergillus nidulans* und *Saccharomyces cerevisiae*. In beiden existiert ebenfalls die konservierte pH-Transduktionskaskade mit den zu Rim101p homologen terminalen Komponenten PacC in *A. nidulans* und ScRim101p in *S. cerevisiae*. Die drei homologen Proteine sind in Abb. 19 schematisch nebeneinandergestellt. Alle drei enthalten eine Zinkfingerdomäne mit drei Zinkfingersequenzen der Cys<sub>2</sub>-His<sub>2</sub>-Klasse, in der auch die stärkste Homologie zu finden ist: 68% zwischen CaRim101p und PacC, 60% zwischen CaRim101p und ScRim101p (Ramon et al. 1999). Die Sequenzen außerhalb der Zinkfingerdomäne sind deutlich schwächer konserviert (Ramon et al. 1999). Dennoch lohnt sich ein Vergleich auf der Suche nach konservierten Strukturen und Mechanismen.

##### 4.2.1 PacC in *Aspergillus nidulans*

Im Ascomyceten *A. nidulans* wird die pH-abhängige Genexpression von dem Transkriptionsfaktor PacC gesteuert (Orejas et al. 1995). Das primäre 674-AS-Translationsprodukt gilt als inaktive Vorläuferform, die bei saurem extrazellulärem pH-Wert dominiert (Orejas et al. 1995). Befindet sich die Zelle jedoch im alkalischen Milieu, so wird die pH-Transduktionskaskade mit ihren bisher bekannten sechs Pal-Proteinen PalA/B/C/F/H/I aktiviert, die den überwiegenden Teil der PacC-Proteine auf nicht endgültig geklärte Weise in eine offene, C-terminal um ca. 180 AS verkürzte Intermediärform überführen (Orejas et al. 1995;

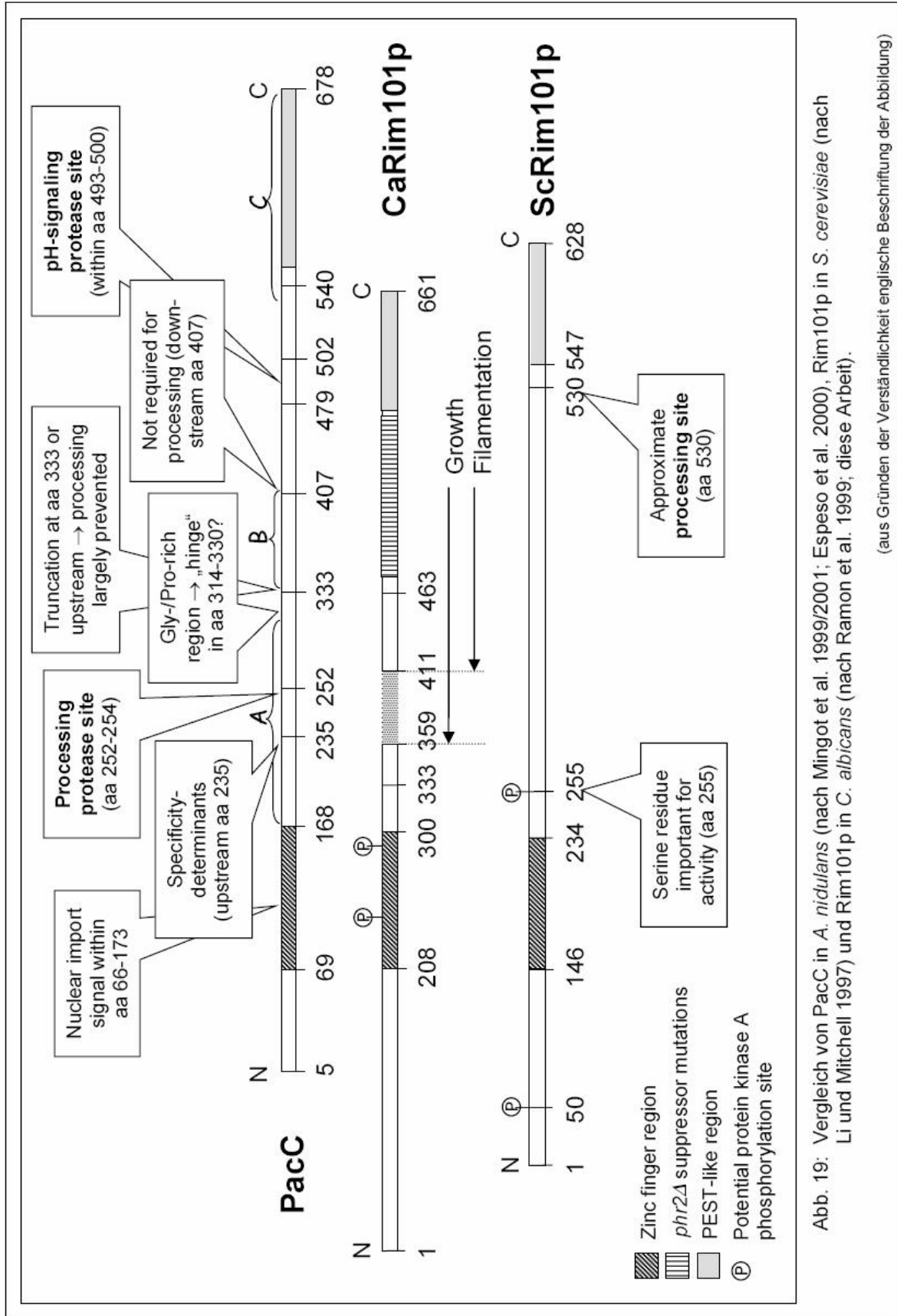


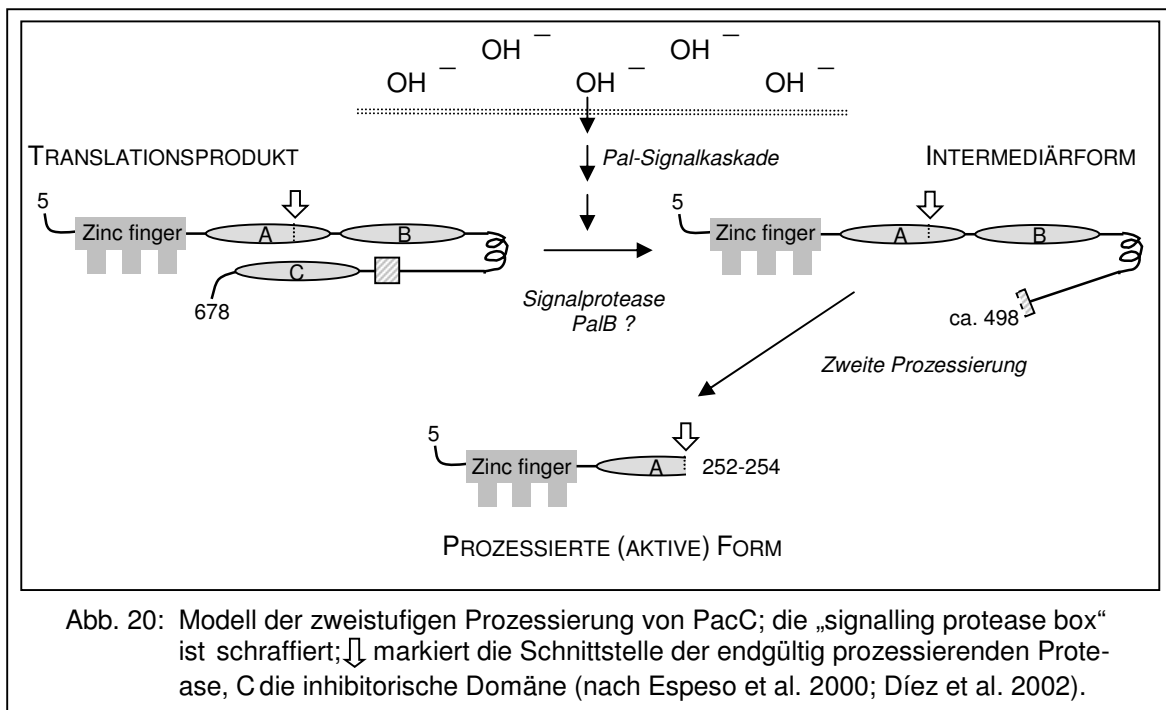
Abb. 19: Vergleich von PacC in *A. nidulans* (nach Mingot et al. 1999/2001; Espeso et al. 2000), Rim101p in *S. cerevisiae* (nach Li und Mitchell 1997) und Rim101p in *C. albicans* (nach Ramon et al. 1999; diese Arbeit).

(aus Gründen der Verständlichkeit englische Beschriftung der Abbildung)

Espeso et al. 2000; Díez et al. 2002). Diese wird von einer konstitutiv vorhandenen, wahrscheinlich im Zytosol lokalisierten Protease durch die erneute Abspaltung eines C-terminalen Anteiles von etwa 245 AS in die aktive Form (ca. 252-254 AS) überführt (Mingot et al. 2001; Díez et al. 2002). Der überwiegende Anteil des prozessierten PacC ist im Zellkern anzutreffen, daneben ein nicht geringer Anteil der Intermediärform. Dies wird auf die Existenz eines „Nuclear import signal“ für aktive Transportmechanismen im Bereich der Zinkfingerdomäne zurückgeführt, das in der geschlossenen Form verdeckt ist (Mingot et al. 2001; Peñalva und Arst 2002).

Die kurze PacC-Form induziert schließlich im Zellkern die so genannten alkalisch exprimierten Gene über 5'-GCCARG-Sequenzen in deren Promotoren und reprimiert sauer exprimierte Gene (Espeso und Peñalva 1996; Espeso und Arst 2000). Ein Mechanismus der Repression wurde anhand des Gens für die GABA-Permease gezeigt: Eine Prävention der Induktion wird hier durch die Überlappung von PacC-Bindestellen mit Bindestellen des natürlichen Induktors IntA und der resultierenden Kompetition erreicht (Espeso und Arst 2000).

Erst neuerdings wird das oben geschilderte zweistufige Modell für den Mechanismus der proteolytischen Aktivierung von PacC favorisiert (Díez et al. 2002): Zunächst waren über die Untersuchung zahlreicher Mutanten, deren PacC pH-unabhängig „alkalische“ oder „saure“ Phänotypen erzeugte, bestimmte Regionen auf PacC charakterisiert worden, unter anderem ein Bereich, der für die effiziente PacC-Prozessierung notwendig ist (Mingot et al. 1999). Nach gezielter Deletion dieser Region (AS 266-407) von PacC in *A. nidulans* konnte im alkalischen Milieu die Akkumulation einer ca. 500 AS langen Intermediärform beobachtet werden (Díez et al. 2002). Diese ist das Produkt eines ersten, durch eine sog. Signalprotease ausgeführten und bislang nicht bekannten Prozessierungsschrittes, der bei alkalischen Wachstumsbedingungen über die Pal-Kaskade eingeleitet wird und damit der eigentliche pH-gesteuerte Vorgang ist. Er setzt eine intakte sog. „signalling protease box“ voraus, eine hochkonservierte Region zwischen AS 479 und 502; außerdem scheint die Aminosäure Leu498 eine essentielle Bedeutung zu haben (Díez et al. 2002; s. Abb. 19 + 20). Konsequenz dieses ersten Schrittes ist die Entfernung einer inhibitorischen C-terminalen Domäne C, wodurch erst der zweite, endgültige und schon längere Zeit bekannte



Schritt der Prozessierung ermöglicht wird (Díez et al. 2002; s. Abb. 19 + 20). Die hieraus resultierenden Produkte weichen in der Größe geringfügig voneinander ab, wobei die am weitesten upstream gelegene Schnittstelle im Bereich von AS 252 liegt (Mingot et al. 1999). Die ausführende Protease erkennt möglicherweise spezifische Sequenzen oder strukturelle Eigenschaften upstream von AS 235 und schneidet das Protein in einer festgelegten Entfernung downstream davon (Mingot et al. 1999).

Bemerkenswert ist die Tatsache, dass trunkiertes PacC<sup>C</sup>, wenn es in *S. cerevisiae* gebracht wird, an der gleichen Stelle gespalten wird wie in *A. nidulans*, was auf einen hohen Konservierungsgrad der nicht näher bekannten Protease schließen lässt (Mingot et al. 1999).

Bei PalB, einem Element der Pal-Kaskade, wurde eine Sequenzähnlichkeit mit der katalytischen Domäne der Calpain-Familie Kalzium-aktivierter Cysteinproteasen entdeckt, wobei eine Aktivierung durch Kalzium mangels typischer EF-Hand-Strukturen als eher unwahrscheinlich gilt (Denison et al. 1995). Die Beobachtung, dass C-terminal trunkiertes PacC<sup>C</sup> auch in *palBΔ*-Nullmutanten prozessiert wird, legt allerdings die Vermutung nahe, dass der Protease PalB der erste Schritt der zweistufigen proteolytischen Prozessierung zugeordnet werden kann, sie also mit der oben erwähnten Signalprotease identisch ist (Denison et al. 1995; Díez et al. 2002). Dieser Verdacht wird durch die bekannte Präferenz der Protease Calpain

für Leucin in Position P2 des Target-Moleküls insofern verstärkt, als Leu498 in PacC für Schritt 1 essentiell ist (Díez et al. 2002; Carafoli und Molinari 1998).

Die Beobachtungen zusammenfassend, dass bestimmte Bereiche der beschriebenen Domänen „A“, „B“ und „C“ interagieren und dass die Glyzin- und Prolin-reiche Region in AS 314-330 als eine Art „Scharnier“ dienen könnte, wurde grob orientierend auf die räumliche Struktur von PacC geschlossen (Espeso et al. 2000; Díez et al. 2002; s. Abb. 20).

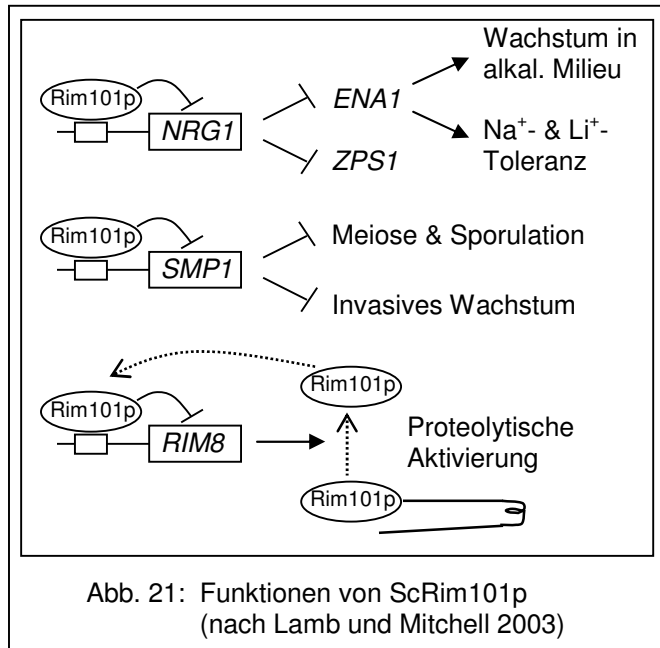
#### 4.2.2 Rim101p in *Saccharomyces cerevisiae*

In der Bäckerhefe *S. cerevisiae* ist das PacC-Homolog ScRim101p ein positiver Regulator von Vorgängen der Meiose und der Sporenbildung unter nutritionellen Mangelbedingungen, vermittelt durch *IME1*-Expression (Su und Mitchell 1993). *RIM101* ist notwendig sowohl für die basale *IME1*-Promotoraktivität als auch für die gesteigerte Aktivität unter Mangelbedingungen (*RIM* = „Regulator of *IME2*“). Eine *rim101Δ*-Mutation führt ebenso wie Nullmutationen in *RIM8*, *9* und *13* zu vier phänotypischen Veränderungen: Schwaches Wachstum bei niedrigen Temperaturen, veränderte (glatte) Koloniemorphologie, partieller Sporulationsdefekt aufgrund reduzierter *IME1*-Expression und Invasionsdefekte (Su und Mitchell 1993; Li und Mitchell 1997).

ScRim101p wird als 628-bp-Vorläuferform synthetisiert und durch C-terminale Abspaltung von etwa 100 Aminosäuren in eine kürzere Form überführt. Für diesen Vorgang sind die Produkte von *RIM8*, *9*, *13* und *20* notwendig (Li und Mitchell 1997; Xu und Mitchell 2001). Deletionen, die zum Fehlen C-terminaler Sequenzen von ScRim101p führen, können die Defekte von Nullmutationen in *RIM8*, *9*, *13* oder *20* supprimieren (Li und Mitchell 1997; Xu und Mitchell 2001).

Bei saurem extrazellulärem pH-Wert, der sich offenbar auch als Folge eines hohen Angebotes an Kohlenstoffquellen einstellen kann, liegt ScRim101p vorwiegend in Form des unprozessierten Translationsproduktes vor. Dies würde in der Umkehrung eine Prozessierung des Transkriptionsfaktors bei Nährstoffmangel mit konsekutiv gesteigerter *IME1*-Induktion erklären (Li und Mitchell 1997).

Während PacC in *A. nidulans* die sog. alkalisch-induzierten Gene vorwiegend direkt aktiviert, scheint ScRim101p die pH-abhängige Expression im wesentlichen über eine Hemmung der Repression dieser Gene auszuüben (Lamb und Mitchell 2003). Durch die direkte Repression der beiden Regulorgene *NRG1* und *SMP1*, deren Funktion wiederum in der Repression alkalisch-induzierter Gene besteht, kommt es unter alkalischen Wachstumsbedingungen in der Summe zu einer Steigerung der Expression z. B.



von Proteinen der Zellwand (Cwp1p, Zps1p) und von Ionenpumpen (Ena1p), die für die Zelldifferenzierung und die Ionentoleranz der Zellen im alkalischem Milieu notwendig sind (Lamb und Mitchell 2003; s. Abb. 21). Auch *RIM8*, dessen Produkt zur pH-abhängigen Aktivierung von Rim101p benötigt wird, wird von aktivem Rim101p direkt reprimiert. Dies wirkt, im Sinne einer negativen Rückkopplung, einer Hyperakkumulation von prozessiertem Rim101p und einer Hyperaktivität der Rim13p-Protease entgegen (Lamb und Mitchell 2003; s. Abb. 21).

Die Repression geschieht offenbar direkt über die Bindung an PacC-Erkennungssequenzen (TGCCARG), wobei nicht die Bindung an den Promotor selbst, wohl aber der Akt der Repression die vorherige proteolytische Rim101p-Aktivierung voraussetzt (Lamb und Mitchell 2003). Da auf einem *tup1Δ*-Hintergrund die Repressionsfähigkeit von aktiviertem Rim101p auf weniger als 1% des Ausgangswertes fällt, wird eine von der Prozessierung abhängige Interaktion von Rim101p mit dem Korepressorkomplex Tup1p-Ssn6p diskutiert (Lamb und Mitchell 2003).

Neben der repressiv aktiven Zinkfingerdomäne birgt auch das C-terminale Ende von ScRim101p Auffälligkeiten in sich: 25 der 88 terminalen Aminosäuren sind sauer und tragen zur starken negativen Ladung des Carboxyterminus bei. Dies ließ vermuten, es könnte sich hierbei um eine Domäne zur transkriptionellen

Aktivierung handeln (Su und Mitchell 1993). Die Ähnlichkeit des C-Terminus zu so genannten PEST-Regionen, die reich an Prolin, Aspartat, Glutamat, Serin und Threonin sind, könnte aber auch auf eine Rolle als Erkennungsmotiv für die proteolytische Degradation, z. B. durch ein Cysteinprotease-System, hinweisen (Xu und Mitchell 2001).

Außerdem enthält ScRim101p zwei Konsensussequenzen für die Phosphorylierung durch eine cAMP-abhängige Proteinkinase A (PKA), welche die Zinkfingerdomäne flankieren. Zumindest die Phosphorylierungsstelle downstream des Zinkfingerbereiches, genauer der Serinrest an Position 255, ist offenbar bedeutend für die *RIM101*-Aktivität (Su und Mitchell 1993). Die Annahme einer aktivierenden Phosphorylierung an dieser Stelle stünde allerdings im Widerspruch zu der Beobachtung, dass PKA-Aktivität die Transkription von *IME1* hemmt (Smith und Mitchell 1989; Matsuura et al. 1990). Möglicherweise liegt die Bedeutung dieses Serinrestes im Bereich Strukturerehalt, Stabilität oder Funktion von ScRim101p. Eine andere Erklärung könnte sein, dass ScRim101p lediglich für die basale *IME1*-Induktion außerhalb von Mangelbedingungen zuständig ist (Su und Mitchell 1993).

Wenngleich noch kein Gesamtbild für das Zusammenspiel in der Pal-homologen Rim-Kaskade in *S. cerevisiae* vorliegt, sind doch einzelne Komponenten davon bereits charakterisiert worden (s. Tab. 2 in Kap. 4.6):

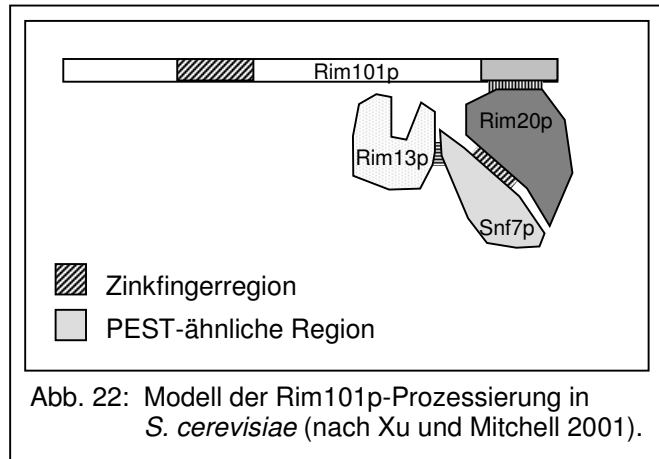
Das Pall-Homolog Rim9p weist vier potentielle Transmembrandomänen sowie eine mögliche Signalsequenz auf. So könnte dieses Protein als Transmembranrezeptor oder aber als Subunit einer membrangebundenen Protease fungieren (Li und Mitchell 1997; Denison et al. 1998). Eine ähnliche Funktion wird für das Homolog zu PalH, nämlich Rim21p, diskutiert (Tréton et al. 2000).

Eine mögliche Funktion von Rim8p (PalF) im Zellkern ist momentan noch im Stadium der Spekulation anzusiedeln (Tréton et al. 2000).

Rim13p besitzt wie sein Homolog PalB die Struktur einer Cysteinprotease mit einer Calpain-ähnlichen katalytischen Domäne (Futai et al. 1999; s. Kap. 4.2.1 zu PalB).

Rim20p hat direkten Bezug zur ScRim101p-Prozessierung: Interaktionen zwischen dem C-Terminus von Rim101p und Rim20p sind sowohl in *S. cerevisiae*

als auch in *C. albicans* zu finden und haben daher vermutlich funktionelle Bedeutung (Xu und Mitchell 2001). Homologe zu Rim20p sind bisher in jedem sequenzierten metazoischen Genom gefunden worden, wo sie nach bisherigen Erkenntnissen die Aktivität von Cysteinproteasen regulieren (Xu und Mitchell 2001). Auf der Basis von genomweiten Two-Hybrid-Analysen, die über Interaktionen zwischen Rim13p und Snf7p bzw. Snf7p und Rim20p berichten (Ito et al. 2001), entwerfen Xu und Mitchell ein Modell, das die Rolle



von Rim20p und Snf7p in *S. cerevisiae* darin sieht, eine Art Gerüst zu bilden für die Protease Rim13p (Xu und Mitchell 2001; s. Abb. 22). Die proteolytische Abspaltung von ca. 100 C-terminalen Aminosäuren durch das PalB-Homolog Rim13p entspräche dabei vermutlich dem ersten, pH- und Pal-abhängigen Schritt des zweistufigen Aktivierungsmodelles von PacC, dem in *S. cerevisiae* keine weitere Prozessierung folgen würde (Peñalva und Arst 2002). Entsprechend der ausgeprägten Größendifferenz der Peptide, die in den Modellen der physiologischen Aktivierung von PacC bzw. ScRim101p abgespalten werden, unterscheiden sich die Konsequenzen C-terminal trunkierender Mutationen: Bei PacC werden vom (infolge der Mutation) primär verkürzt translatierten Protein C-terminal weitere ca. 320 Aminosäuren abgespalten, wohingegen sich ScRim101p in der Länge des primären, infolge der Mutation verkürzten Produktes anreichert (Xu und Mitchell 2001).

Wie bereits oben ausgeführt, ist die Protease des zweiten PacC-Prozessierungsschrittes auch in *S. cerevisiae* konserviert, spielt dort aber offenbar keine Rolle bei der ScRim101p-Aktivierung. Somit bleibt aus evolutionsgeschichtlicher Perspektive die Frage offen, ob PacC diesen zweiten Spaltungsschritt hinzugewonnen oder ScRim101p ihn verloren hat (Peñalva und Arst 2002).

Da Snf7p als endosomenassoziiertes Protein auch bei der Fusion des späten Endosoms mit der Vakuole mitwirkt, könnte hier ein Hinweis auf den Rezeptionsmodus des pH-Wertes vorliegen: Ein spezieller Oberflächenrezeptor



könnte nach endozytotischer Aufnahme aktiviert werden, um daraufhin die Rim101p-Prozessierung zu steuern, oder der Säuregehalt von endozytierter Flüssigkeit könnte als Maß für den extrazellulären pH-Wert verwendet werden (Xu und Mitchell 2001).

### 4.3 Rim101p in *C. albicans* und Konsequenzen C-terminaler Trunkierungen

#### 4.3.1 Die *phr2* $\Delta$ -Suppressormutationen

Im ersten Schritt dieser Arbeit haben wir spontan aufgetretene *phr2* $\Delta$ -Suppressormutationen in *RIM101* von *C. albicans* ausgewertet. Hierbei zeigte sich, dass die 14 heterozygoten, dominanten Nonsensmutationen innerhalb eines begrenzten Bereiches von 59 Codons am 3'-Ende von *RIM101* auftraten. El Barkani et al. hatten in vorausgegangenen Studien bereits zwei Revertanten beschrieben, die Nonsensmutationen in den Codons 476 (CEM1) und 584 (CEM2) von *RIM101* enthielten (El Barkani et al. 2000).

Porta et al. berichten über acht *rim8* $\Delta$ -Suppressormutanten, die ebenfalls solche Nonsensmutationen in einem umschriebe-

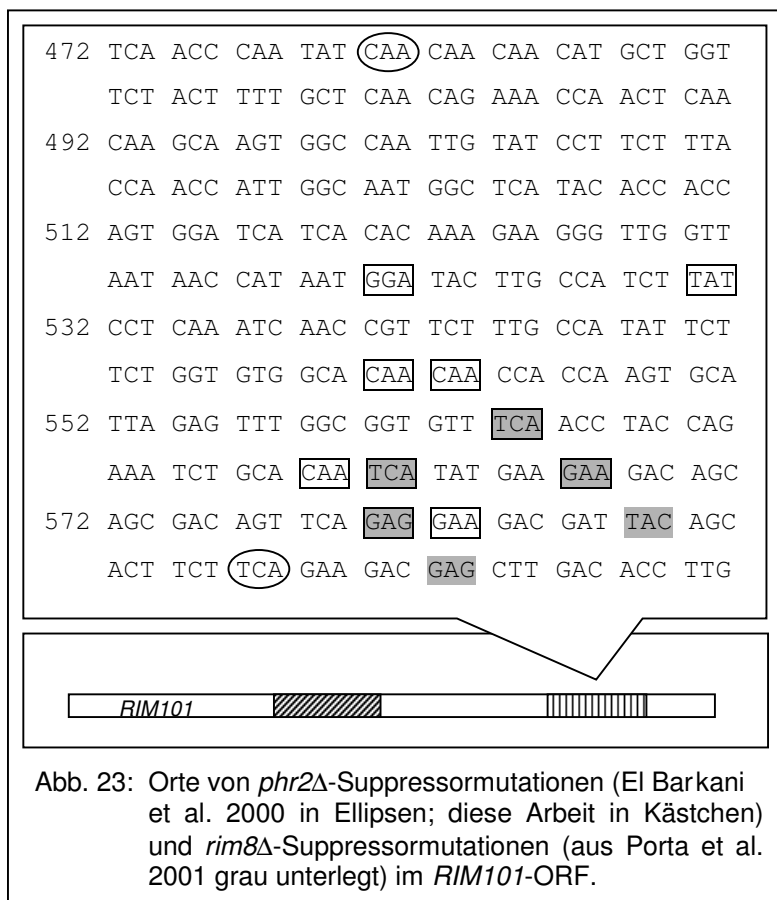


Abb. 23: Orte von *phr2* $\Delta$ -Suppressormutationen (El Barkani et al. 2000 in Ellipsen; diese Arbeit in Kästchen) und *rim8* $\Delta$ -Suppressormutationen (aus Porta et al. 2001 grau unterlegt) im *RIM101*-ORF.

nen Bereich von *RIM101* aufweisen (Porta et al. 2001). Die Mutationen aller drei genannten Studien ermöglichten den Revertanten pH-unabhängige *PHR1*-Induktion und Filamentierung. Betrachtet man die insgesamt 24 revertierenden

Mutationen in 14 verschiedenen Codons, so fällt auf, dass sie sich mit einer Ausnahme im engen Bereich der Codons 526 bis 587 befinden, man also von einer „Clusterung“ innerhalb des zweiten carboxyterminalen Zehntels von *RIM101* sprechen könnte (s. Abb. 23).

In Analogie zum Modell der pH-abhängigen proteolytischen Aktivierung von PacC in *A. nidulans* (s. Abb. 20) verweisen die spontanen Punktmutationen möglicherweise auf einen besonders kritischen Bereich, der für die Tertiärstruktur und die stabile Konformation der langen Form von Rim101p entscheidend ist. Es ist aufgrund des mangelnden Konservierungsgrades nicht ohne weiteres möglich, diesen Bereich einer der PacC-Domänen „B“ oder „C“ zuzuordnen (s. Abb. 20). Aber unabhängig davon würde nach diesem Modell eine Nonsensmutation, die konsekutiv zum translationellen Kettenabbruch führt, eine C-terminale Trunkierung von Rim101p hervorrufen. Die daraus resultierende Störung der Tertiärstruktur könnte zusammen mit der primären Verkürzung des Proteins um eine inhibitorische Domäne (analog zu „C“ in Abb. 20) eine pH-unabhängige Prozessierung von Rim101p zulassen mit den geschilderten phänotypischen Konsequenzen.

Bei PacC ist die postulierte Konformationsänderung von „geschlossen“ nach „offen“ in Verbindung mit dem ersten proteolytischen Schritt durch die Signalprotease der einzige pH-abhängige Schritt zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors (Mingot et al. 1999; Díez et al. 2002). Die Aktivität der prozessierenden Protease wird hingegen als pH-unabhängig geschildert (Mingot et al. 1999). Sollte dieser pH-abhängige Schritt in *C. albicans* prinzipiell konserviert sein und ist er physiologischerweise auf alkalische Wachstumsbedingungen beschränkt, so wird er in den Revertanten offensichtlich durch trunkierende Punktmutationen umgangen. Die *rim8Δ*-Mutation hat hiernach keine Bedeutung mehr, da die Rim101p-Aktivierung unabhängig von der pH-Transduktionskaskade geschieht (Porta et al. 2001). Ebenso wenig Bedeutung hat die *phr2Δ*-Mutation in den Revertanten dieser Arbeit, wenn die konstitutive Rim101p-Aktivierung permanent alkalische Bedingungen „vortäuscht“.

### 4.3.2 Gezielte angrenzende Mutationen erzeugen Imitate der Revertanten

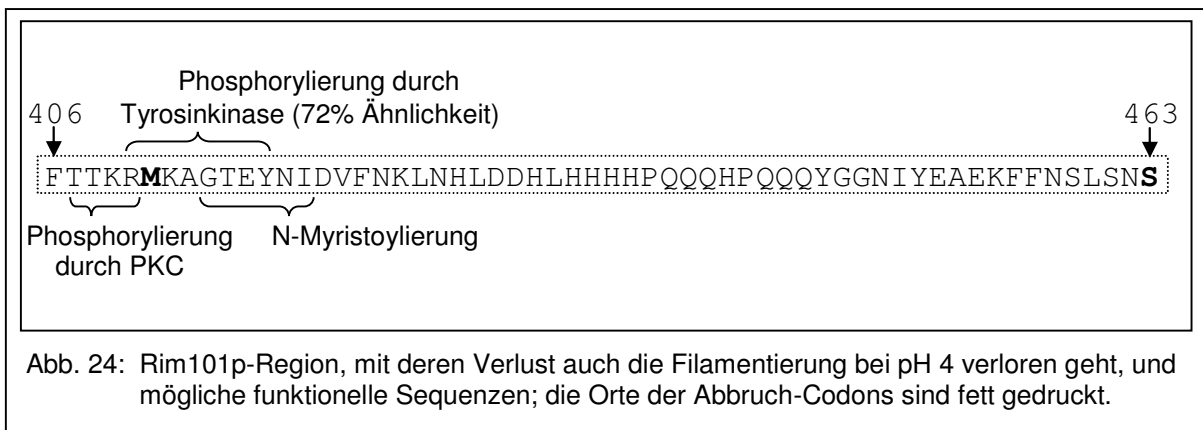
Auch die am weitesten in 5'-Richtung gelegene *phr2Δ*-Suppressormutation (Codon 476) im Stamm CEM-2 ermöglichte bei pH 4 Wachstum und starke *PHR1*-Induktion sowie ca. 88% Filamentierung unter induzierenden Bedingungen (El Barkani et al. 2000). Bei der bereits zitierten Studie von Davis et al. hingegen zeigte eine per Plasmid gezielt eingeführte Nonsensmutation im *RIM101*-Codon 463 (nach unserer Zählung) zwar bei alkalischem, nicht jedoch bei saurem pH-Wert die Fähigkeit zur Filamentierung (Davis et al. 2000).

Mit der Frage, wo genau diese phänotypische Veränderung festgemacht werden kann, konstruierten und untersuchten wir 13 Stämme mit Trunkierungen, die von Codon 475 bis 463 jeweils um ein Codon nach 5' fortschritten. Überraschenderweise verhielten sich alle gewonnenen Stämme genau so, wie wir es bereits bei den *phr2Δ*-Suppressormutanten beobachtet hatten. Mindestens bis Aminosäure 463 scheint eine Rim101p-Trunkierung also ähnliche Konsequenzen, nämlich konstitutive Rim101p-Aktivierung mit pH-unabhängigem, „alkalischem“ Phänotyp, zu haben.

### 4.3.3 Upstream-gerichtete Progression auf Kosten der Filamentierung

Weitere Progression der Mutagenese in 5'-Richtung mit in der Folge stärker werdenden C-terminalen Rim101p-Trunkierungen brachte nun eine Veränderung mit sich: Die Rim101p-Verkürzung in Codon 411 erzeugte einen *C.-albicans*-Stamm, der bei pH 4 zwar wachsen konnte und eine starke *PHR1*-Induktion aufwies, nicht jedoch zur Keimschlauchbildung in der Lage war. Gleiches Verhalten brachten die Trunkierungen in den Codons 385 und 359 mit sich. Der Verlust der Region zwischen den Aminosäuren 411 und 463 (s. Abb. 24) muss also in irgendeiner Art und Weise verantwortlich sein für den Verlust der Filamentierungsfähigkeit, während die *PHR1*-Induktion und das Wachstum bei pH 4 nicht beeinträchtigt sind.

Erste Überlegungen gingen in die Richtung von spezifischen Sequenzen, die auf der kritischen Region liegen und für filamentöses Wachstum essentiell sein könnten. In-silicio-Recherchen (<http://npsa-pbil.ibcp.fr>) verwiesen auf je eine mögliche Phosphorylierungsstelle für eine Proteinkinase C bzw. eine Tyrosinkinase und eine N-Myristoylationsstelle (s. Abb. 24). Bisher liegen jedoch keine Evidenzen vor, dass für Rim101p einer dieser Modifizierungsschritte eine



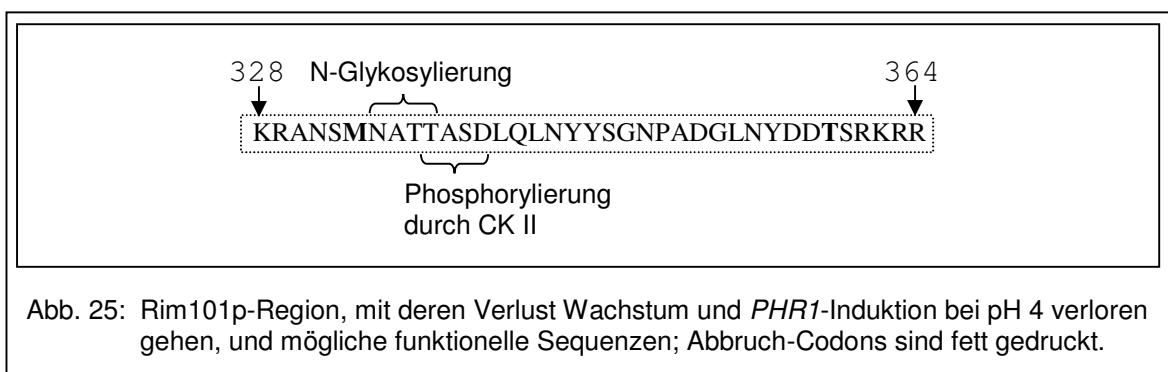
Rolle spielt. Zwar existiert in *C. albicans* tatsächlich eine MyristoylCoA-Protein-N-Myristoyltransferase (NMT), welche die kovalente Anbindung der Fettsäure Myristat an einen N-terminalen Glycinrest katalysiert und bereits als Target der antifungalen Therapie entdeckt wurde (Sikorski et al. 1997). Das Enzym aktiviert i. d. R. Proteine mit Steuerfunktionen im zellulären Wachstum und fördert Protein-Protein-Interaktionen (Rudnick et al. 1993; Johnson et al. 1994). Allerdings muss sich die Erkennungssequenz für diesen Vorgang am absoluten N-Terminus befinden, was hier nur am abgespaltenen, C-terminalen Rim101p-Anteil der Fall sein könnte. Dessen Modifikation würde ihm eine Bedeutung im Prozess des filamentösen Wachstums zuschreiben, die bisher als unwahrscheinlich gilt. So bleiben die Ergebnisse der Sequenzsuche deutlich im spekulativen Bereich.

Bei PacC in *A. nidulans* liegt die am meisten upstream lokalisierte endgültige Prozessierungsstelle um AS 252-254, also ca. 80 Aminosäuren downstream von der Zinkfingerdomäne. Während C-terminale PacC-Trunkierungen in einem weiten Bereich zur pH-unabhängigen PacC-Prozessierung führen, findet nach Trunkierungen in AS 333 oder noch weiter upstream die proteolytische Spaltung nur noch in stark reduziertem Maße und häufig fehlerhaft statt (Mingot et al. 1999). Anscheinend ist für die Funktion der beteiligten Protease eine Mindestlänge des Peptides erforderlich, das C-terminal an die Schnittstelle angrenzt.

Unter der Annahme, dass die Rim101p-Aktivierung trotz geringer Homologien in der Primärstruktur analog zu dem für PacC beschriebenen zweistufigen Modus verläuft, ließen sich für CaRim101p zwei alternative Ableitungen formulieren: (a) Die in AS 411 gesetzte Trunkierung ist entsprechend den Beobachtungen an PacC bereits zu nahe an der potentiellen Schnittstelle der zweiten Protease lokalisiert, so dass es nicht oder zur fehlerhaften Prozessierung von Rim101p kommt. In dieser Spekulation wäre die exakte Prozessierung aber Voraussetzung für die Steuerung von filamentösem Wachstum, da ein C-terminaler Überhang die notwendigen Wechselwirkungen inhibiert. Oder: (b) Die Trunkierung ist bereits upstream der Prozessierungsstelle gelegen, so dass schon im Translationsprodukt ein Abschnitt fehlt oder unvollständig vorhanden ist, der eine Rolle in der Morphogenese spielt, z. B. für Wechselwirkungen mit anderen Proteinen.

#### 4.3.4 Kein Wachstum bei weiterer 5'-Progression

Bei drei noch weiter N-terminal gelegenen Rim101p-Verkürzungen, deren C-terminales Extrem bereits 20 bp der Zinkfingerdomäne trunkiert, ist schließlich bei pH 4 nur noch eine minimale *PHR1*-Induktion, kein Wachstum und keine Filamentierung zu beobachten. Es handelt sich um die Lokalisationen AS 333, AS 305 und AS 281. Rim101p verliert also gleichzeitig mit der Region zwischen



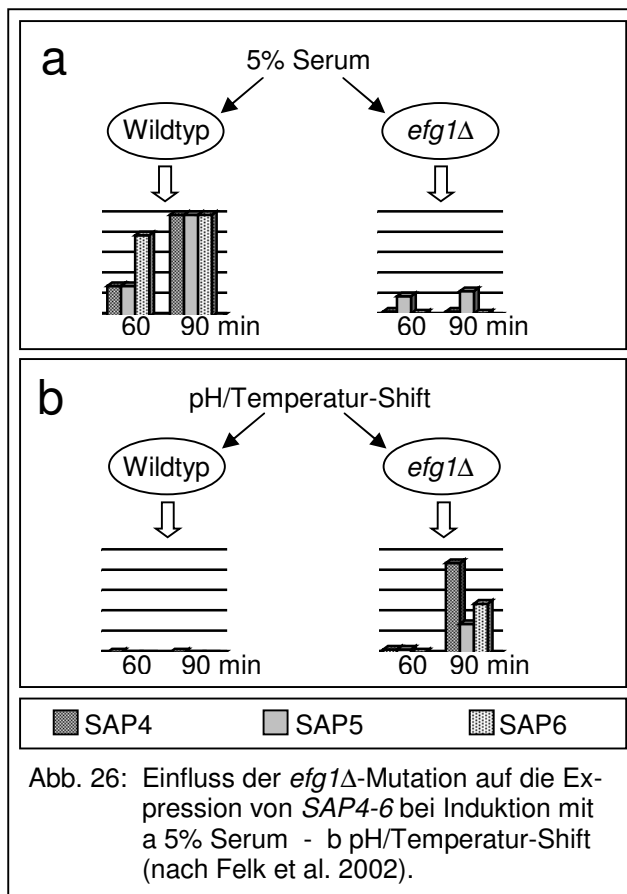
den Aminosäuren 333 und 359 die wichtige Funktion, *PHR1* zu induzieren, was verallgemeinert vermutlich dem Verlust der pH-abhängigen Geninduktion insgesamt gleichkommt (s. Abb. 25). Die Wachstumsunfähigkeit ist mit großer Wahrscheinlichkeit eine der phänotypischen Konsequenzen dieses Sachverhaltes. Auch diese Region wurde deshalb auf mögliche funktionelle Sequenzen hin

untersucht, und es fanden sich lediglich eine potentielle N-Glykosylierungsstelle und eine Phosphorylierungsstelle der Casein-Kinase II, denen mit geringer Wahrscheinlichkeit funktionelle Bedeutung zukommt.

Viel wahrscheinlicher liegt die Ursache des Funktionsverlustes von Rim101p in Störungen der Struktur des Proteins: Die Trunkierung in AS 333 befindet sich höchstwahrscheinlich upstream der natürlichen Prozessierungsstelle und nur 33 AS downstream des dritten Zinkfingers. Zwischen den Positionen 290 und 306 (KKHSTHAEDHPKLLKK) sowie zwischen 301 und 307 (PKLLKKA) liegen darüber hinaus je ein potentielles Nuclear-localization-signal, also Sequenzen, die normalerweise den Transport des aktivierten Rim101p in den Zellkern vermitteln (Ramon et al. 1999). Der Abbruch des Proteins in unmittelbarer Nähe zu solch wichtigen funktionellen Regionen des Transkriptionsfaktors könnte eine derartige Änderung der Tertiärstruktur zur Folge haben, dass Rim101p nicht mehr aktiv in den Zellkern transportiert werden kann und konsekutiv keine Regulation pH-gesteuerter Gene vornehmen kann. Selbst wenn aber ein Teil der kurzen Proteine in den Zellkern gelangen könnte, wäre die empfindliche Wechselwirkung mit der DNA, also die spezifische Bindung an Promotoren und die Induktion bzw. Repression von Genen, möglicherweise so gestört, dass man von einem Funktionsverlust sprechen könnte.

#### 4.4 Der pH-Wert, *RIM101* und die *SAP*-Familie

Noch lässt sich wenig über die Funktion von Rim101p im Bereiche der Steuerung der *SAP4-6*-Expression aussagen. Interessant ist jedoch der oben geschilderte Sachverhalt: Die Keimschlauch-Induktion mit 5% Serum bringt in einem *efg1Δ*-Stamm eine wesentlich schwächere *SAP4-SAP6*-Induktion mit sich als im Wildtyp (s. Abb. 26a). Bei Induktion über einen pH/Temperatur-Shift weist dagegen der Wildtyp eine sehr geringe, der *efg1Δ*-Stamm aber eine deutlich gesteigerte *SAP4-SAP6*-Induktion auf, die für *SAP4* von Anfang an, für *SAP5* und *SAP6* insbesondere ab 90 Minuten nach der Induktion sichtbar wird (Felk et al. 2002; s. Abb. 26b).



Geht man vereinfachend davon aus, dass die pH-Antwort im Wesentlichen durch die Aktivierung von Rim101p vermittelt wird, so würde Efg1p im Zusammenspiel mit Rim101p hier eine hemmende Funktion zukommen, wodurch eine *efg1Δ*-Mutation einer Deinhibition gleichkäme. Diese würde dann in einer zeitlich verzögerten Induktion der drei Proteinase-Gene *SAP4-6* Ausdruck finden.

#### 4.5 Synthese: Hypothetisches Modell der *RIM101*-Funktion in *C. albicans*

Die Vermittlung der pH-abhängigen Filamentierung durch aktiviertes Rim101p steht in einer engen Beziehung zu Efg1p, dem terminalen Transkriptionsfaktor der cAMP-abhängigen Proteinkinase-A-Kaskade. Während nämlich eine *RIM101-1426*-Mutation im *phr2Δ*-Stamm zur pH-unabhängigen Filamentierung führt, wirkt eine gleichzeitige *efg1Δ*-Nullmutation epistatisch auf die Filamentierung bei saurem pH-Wert. Die *PHR1*-Induktion durch Rim101p geschieht hingegen von *EFG1* unabhängig (El Barkani et al. 2000).

Wenngleich aufgrund dieser Beobachtung ein Zusammenspiel von Rim101p und Efg1p angenommen werden kann, bleibt offen, ob die beiden Faktoren in zwei verschiedenen Transduktionskaskaden parallelgeschaltet sind oder ob sie innerhalb einer gemeinsamen Kaskade in Serie stehen.

Der Transkriptionsfaktor Efg1p ist mit hoher Wahrscheinlichkeit Substrat einer Typ-A-Proteinkinase, möglicherweise von Tpk2p (Bockmühl und Ernst 2001). Als

putative Phosphorylierungsstelle wird hierbei Threonin-206 von Efg1p diskutiert, dessen Substitution starke Auswirkungen auf das Filamentierungsverhalten hat. Efg1p gehört zur Familie der „basic helix-loop-helix regulators“, enthält also eine bHLH-Domäne, die typisch für eine Klasse von Transkriptionsfaktoren ist, in denen sie eine Rolle bei Dimerisierungsvorgängen und/oder bei der DNA-Bindung spielt (Leng et al. 2001). Mit Hilfe dieser Domäne könnte durch Phosphorylierung aktiviertes Efg1p im Zellkern an die so genannte E-box (Konsensussequenz 5'-CANNTG-3') hyphenspezifischer Promotoren binden, hyphenspezifische Gene induzieren und schließlich filamentöses Wachstum hervorrufen. Zwei oder mehr E-boxes wurden z. B. in den Promotoren von *HWP1*, *HYR1*, *ALS3* und *ALS8* gefunden, die für hyphale Zellwandproteine kodieren (Leng et al. 2001).

In Rim101p von *Saccharomyces cerevisiae* findet man zwei Erkennungssequenzen für cAMP-abhängige Proteinkinasen, welche die Zinkfingerdomäne flankieren (AS 50 und AS 255). Während die Substitution von AS 50 die Rim101p-Aktivität nicht beeinträchtigt, reduziert eine Substitution an Position 255 diese signifikant (Su und Mitchell 1993). Der Serinrest an Position 255 ist also wichtig für die Funktion von Rim101p, möglicherweise für eine Phosphorylierung oder für Struktur und Stabilität des Proteins.

Auch CaRim101p besitzt zwei potentielle Phosphorylierungsstellen für eine cAMP-abhängige Proteinkinase: Eine wird von den Aminosäuren 236 bis 239 (RKSS), die andere von den Aminosäuren 290 bis 293 (KKHS) gebildet, wobei beide Stellen im Bereich der Zinkfingerdomäne lokalisiert sind. Im Modell einer Parallelstellung von Rim101p und Efg1p wäre es denkbar, dass auch Rim101p als Substrat der cAMP-abhängigen Proteinkinase A eine Phosphorylierung erfährt, die zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors führt. Dies würde aber nicht hinreichend erklären, weshalb sich eine *efg1Δ*-Mutation epistatisch auf konstitutiv aktives *RIM101-1426* auswirkt.

Auffallend ist hingegen, dass die beschriebene *efg1Δ*-Mutation bei gegebenem *RIM101-1426* dieselben Konsequenzen hat wie die Rim101p-Trunkierung in AS 411: Ein Verlust der Filamentierungsfähigkeit tritt auf, ohne dass dabei die Induktion von *PHR1* und das Wachstum beeinträchtigt sind. In beiden Fällen wird also phänotypisch sichtbar, dass es zwei getrennte Wege gibt, über die aktiviertes Rim101p die pH-abhängige Genexpression einerseits und den pH-regulierten Dimorphismus andererseits steuert. Daraus erwächst aber die Vermutung, dass in



der pH-abhängigen Steuerung der Filamentierung Efg1p doch hinter Rim101p liegt und dass ein möglicher Aktivierungsweg von Efg1p in einer Wechselwirkung mit der beschriebenen Region zwischen den Aminosäuren 411 und 463 von Rim101p besteht. Diese Wechselwirkung auf Proteinebene könnte direkt oder über zwischengeschaltete Faktoren vermittelt stattfinden.

Alternativ zu diesem Modell und in Anlehnung an Daten, die über *S. cerevisiae* vorliegen, wäre allerdings auch eine Steuerung der Filamentierung durch indirekte Steigerung der Expression filamentierungsfördernder Faktoren denkbar. Dabei wäre ein Zusammenspiel von CaRim101p mit den Korepressoruntereinheiten Tup1p und Ssn6p zu diskutieren, die sich in der Bäckerhefe für die Genrepression über PacC-Bindungssequenzen als essentiell herausgestellt hatten (Lamb und Mitchell 2003).

Im Gegensatz zu diesem repressionsvermittelten Mechanismus wurde gezeigt, dass die Induktion von *PHR1* durch direkte Bindung des aktivierten Rim101p an nicht-kanonische Konsensussequenzen, die von der PacC-Bindungssequenz abweichen, im upstream-gelegenen *PHR1*-Promotorbereich stattfindet (Ramon und Fonzi 2002).

Über den genauen Ablauf der Rim101p-Aktivierung ist wenig bekannt. In Analogie zu PacC in *A. nidulans* wird die Überführung einer langen, geschlossenen in eine offene, der Prozessierung zugängliche Form unter Einfluss einer Pal-homologen Rim-Kaskade postuliert (s. Tab. 2). Dabei ist noch nicht geklärt, inwieweit sich die

<i>Asperg. nidulans</i>	Homolog	kloniert in		Mögliche Funktionen
		<i>S.c.</i>	<i>C.a.</i>	
PalA	Rim20p	X	X	Bindung an Rim101p
PalB	Rim13p	X	p	Cysteinprotease
PalC				
PalF	Rim8p	X	X	Funktion im Zellkern?
PalH	Rim21p	X	p	Rezeptorfunktion?
Pal I	Rim9p	X	p	Rezeptorfunktion?
PacC	Rim101p	X	X	Transkriptionsfaktor

Tab. 2: Homologe Proteine der pH-Transduktionskaskaden in *A. nidulans*, *S. cerevisiae* (*S.c.*) und *C. albicans* (*C.a.*) und diskutierte Funktionen derselben (p=putatives Homolog auf der Basis von Genomstudien).

Erkenntnisse über die Mechanismen bei PacC und ScRim101p auch auf CaRim101p übertragen lassen. Die Ergebnisse einer Studie von Xu und Mitchell in *S. cerevisiae* über die Funktion des PalA-Homologs Rim20p machen jedoch verschiedenartige, teils noch hypothetische Annahmen über die Mechanismen der pH-Transduktion in *C. albicans* möglich: Die C-terminale PEST-ähnliche Region von CaRim101p interagiert mit dem C-Terminus von CaRim20p (Xu und Mitchell 2001). Diese Interaktion ist laut der zitierten Studie „relativ direkt“ mit der Prozessierungsreaktion verknüpft, und ihre Konservierung in *S. cerevisiae* und *C. albicans* belegt ihre funktionelle Bedeutung. Alle Pal-Homologe sind in *S. cerevisiae* für die proteolytische Spaltung von ScRim101p essentiell, so dass eine Ähnlichkeit im Verlauf der beiden Kaskaden nahe liegt (Xu und Mitchell 2001).

C-terminale Trunkierung mit Verlust der PEST-ähnlichen Region führt sowohl bei PacC als auch bei ScRim101p zu „alkalischen“ Phänotypen mit von PalA/Rim20p bzw. PalB/Rim13p unabhängiger konstitutiver Aktivierung. Doch in den Konsequenzen auf molekularer Ebene ist hier ein großer Unterschied zwischen PacC und ScRim101p auffallend: Das trunkierte ScRim101p akkumuliert in ungefähr der Länge des ursprünglichen, also um die PEST-ähnliche Region verkürzten, Translationsproduktes. Das trunkierte PacC hingegen wird C-terminal unabhängig von PalA und PalB um einen weiteren Anteil von ca. 320 Aminosäuren verkürzt, um so seine aktive Form zu erreichen (Xu und Mitchell 2001). ScRim101p wird also vermutlich durch einmalige Prozessierung nahe der PEST-ähnlichen Region (um AS 530) aktiviert, während PacC einen zweistufigen Aktivierungsprozess durchläuft. Der initiale Schritt verläuft analog zur ScRim101p-Prozessierung, entfernt die PEST-ähnliche Region (ca. 100 AS) und hängt von dem Zusammenspiel der Pal-Proteine ab. Im anschließenden zweiten Schritt werden weitere ca. 320 AS unabhängig von den Pal-Produkten, aber abhängig vom ersten Schritt entfernt (Denison et al. 1995; Mingot et al. 1999; Xu und Mitchell 2001).

Als Nebenbeobachtung einer anderen Studie wird berichtet, dass trunkiertes PacC<sup>C</sup>, in *S. cerevisiae* gebracht, an der gleichen Stelle gespalten wird wie in *A. nidulans*, was auf einen hohen Konservierungsgrad der nicht näher bekannten Protease schließen lässt (Mingot et al. 1999). Diese Protease wäre zwar im hier zitierten Modell für die Rim101p-Aktivierung in *S. cerevisiae* gar nicht notwendig,

doch die hohe funktionelle Konservierung lässt sich wahrscheinlich auf *C. albicans* übertragen, was noch in weiteren Studien zu zeigen ist.

Der Entscheidung für ein anschauliches Modell, das nachfolgend dargestellt wird, liegen insbesondere folgende augenscheinliche Sachverhalte innerhalb der aktuellen Datensituation zugrunde:

- (i) In *S. cerevisiae* scheint die proteolytische Aktivierung von Rim101p in einem einstufigen Prozess vonstatten zu gehen, in dem die Cysteinprotease Rim13p den Transkriptionsfaktor durch moderate C-terminale Verkürzung aktiviert. Dieser agiert nun ausschließlich durch Repression von Genen (direkte Repression) oder von Repressoren (indirekte Induktion), vermittelt über die Bindung an PacC-Bindungssequenzen ohne UAS-Aktivität, also ohne Aktivierungspotential für das nachgeschaltete Gen (Lamb und Mitchell 2003).
- (ii) In *A. nidulans* hingegen liegt eine zweistufige Prozessierung vor, die sowohl eine Intermediärform (53 kDa) als auch eine kurze, vollständig prozessierte Form (27 kDa) hervorbringt (Peñalva und Arst 2002). Beide sind durch aktiven Transport vorwiegend im Zellkern lokalisiert (Mingot et al. 2001). Die pH-abhängige Genexpression wird sowohl über Vorgänge der Induktion (z. B. *ipnA*) als auch der Repression (z. B. *gabA*) gesteuert (Peñalva und Arst 2002).
- (iii) In *C. albicans* wird das zweistufige Aktivierungsmodell ebenfalls bevorzugt. Vorgänge direkter Induktion sind, z. B. für *PHR1*, beschrieben (Ramon und Fonzi 2002), Repressionsmechanismen über PacC-Bindungssequenzen wahrscheinlich (Lamb und Mitchell 2003). Die vorliegende Arbeit hebt eine kritische Domäne im Bereich der AS 359 bis 411 auf Ca-Rim101p hervor, die für die Filamentierung essentiell, für das Wachstum aber nicht notwendig zu sein scheint.

Auf der Basis der geschilderten Datenlage und in Zusammenführung dessen, was über Struktur und Aktivierung von Rim101p in *C. albicans* und den Homologen PacC bzw. ScRim101p in *A. nidulans* bzw. *S. cerevisiae* bisher bekannt ist, steht das folgende hypothetische Modell (Illustration s. Abb. 27):

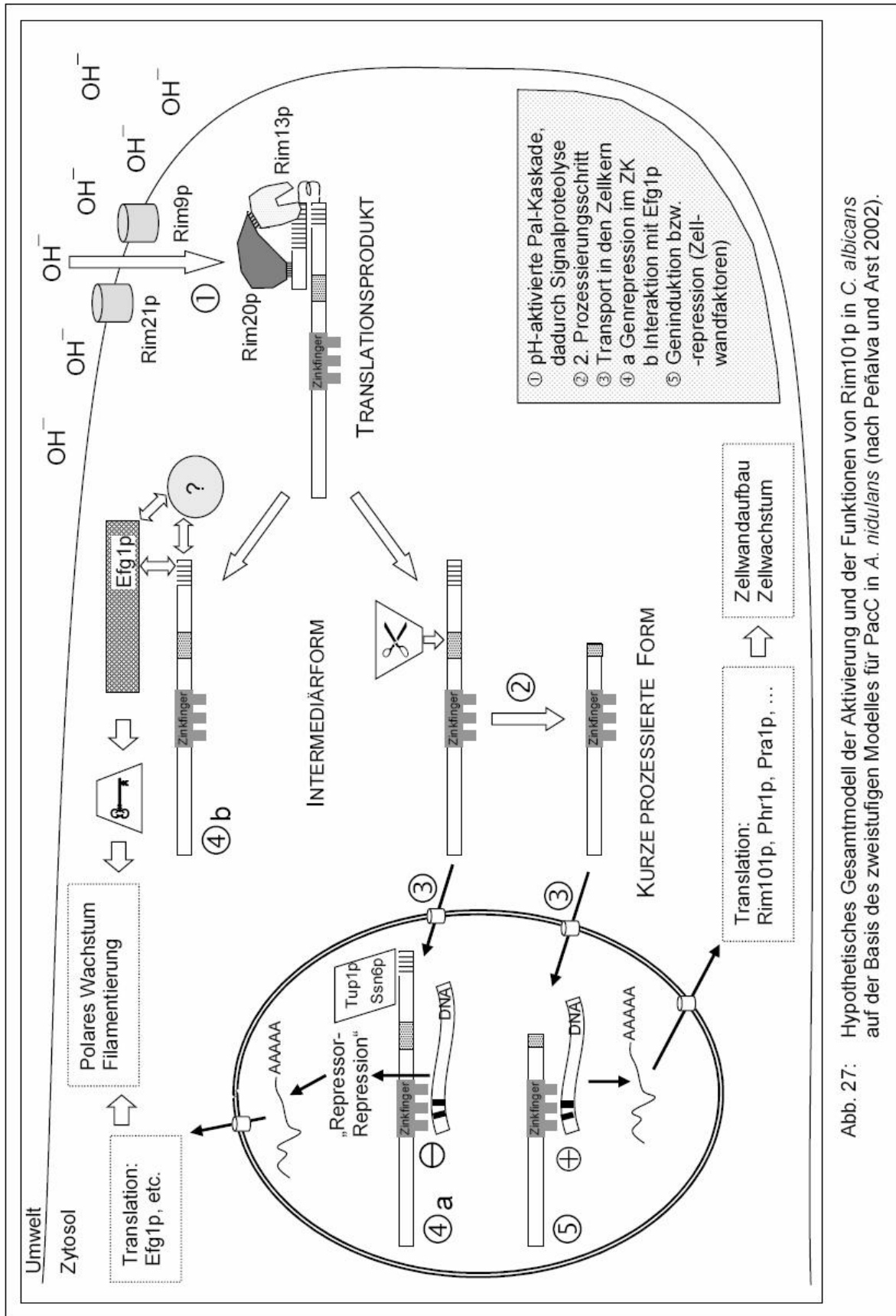


Abb. 27: Hypothetisches Gesamtmodell der Aktivierung und der Funktionen von Rim101p in *C. albicans* auf der Basis des zweistufigen Modelles für PacC in *A. nidulans* (nach Peñaiva und Arst 2002).

- (1) Rim101p in *C. albicans* wird wie PacC in *A. nidulans* durch zwei in zeitlicher Folge ablaufende proteolytische Schritte aktiviert. Nach Perzeption alkalischer Wachstumsbedingungen, möglicherweise unter Beteiligung von Rim21p und Rim9p, kommt es zunächst zu einer reversiblen Konformationsänderung von Rim101p. Dadurch kann Rim20p an die saure, PEST-ähnliche Region im C-terminalen Zehntel von Rim101p andocken, und unter Beteiligung anderer Proteine kommt es in einem ersten Schritt zur proteolytischen Abspaltung dieser Domäne durch die Cysteinprotease Rim13p – es resultiert eine Intermediärform von Rim101p.
- (2) Durch die erste Prozessierung ändert sich mit dem Verlust einer C-terminalen Region auch die Tertiärstruktur von Rim101p. Anfangs vorhandene Wechselwirkungen zwischen carboxy- und aminoterminalen Anteilen entfallen oder verändern sich. So kann eine konstitutiv im Zytosol vorhandene, nicht pH-regulierte Protease in einem zweiten Schritt einen größeren C-terminalen Anteil entfernen, wobei die Spezifitätsdeterminanten upstream der Schnittstelle gelegen sein könnten. Hieraus geht die kurze, endgültig prozessierte Form von Rim101p hervor.
- (3) Sowohl die Intermediärform als auch die kurze Form von Rim101p gelangen, wahrscheinlich vermittelt durch ein Nuclear-import-signal im Bereich der Zinkfingerdomäne, in den Zellkern.
- (4) Die Intermediärform steuert wesentlich die pH-abhängige Filamentierung in *C. albicans*, indem sie Repressoren filamentierungsfördernder Gene über PacC-Bindungssequenzen (TGCCAAG) reprimiert, möglicherweise im Zusammenspiel mit Tup1p/Ssn6p. Denkbar ist neben einer indirekten Induktion von *EFG1* aber auch eine Wechselwirkung des C-Terminus von Rim101p mit Efg1p (oder zwischengeschalteten Komponenten) auf Proteinebene im Zytosol oder im Zellkern. Beide Vorgänge würden die filamentöse Wachstumsform fördern. Umgekehrt würde der konstitutive Verlust eines kritischen C-terminalen Bereiches verhindern, dass diese Teilaufgabe effektiv wahrgenommen werden kann: Die Repression setzt eine ausreichende Größe, die Interaktion spezifische Sequenzen der Intermediärform voraus.
- (5) Die kurze Rim101p-Form hingegen hat im Zellkern die Aufgabe, Zellwandaufbau und Wachstum durch die Induktion bzw. Repression von

pH-regulierten Genen, wie *PHR1*, *PHR2* und *PRA1*, zu steuern. Die Induktion findet dabei durch direkte Bindung des aktivierten Rim101p an nicht-kanonische Konsensussequenzen, die von der PacC-Bindungssequenz abweichen, statt, wie es für den Promotorbereich von *PHR1* gezeigt wurde (Ramon und Fonzi 2002).

Ohne Frage beruht ein großer Teil dieses Modelles auf Analogieschlüssen und nachzuweisenden Annahmen, doch in seiner anschaulichen Konsistenz verdeutlicht und verknüpft es die aktuellen Daten, insbesondere auch der vorliegenden Arbeit, zu einem vorläufigen Gesamtbild, das sich der Überprüfung in Form von Beweisen und Gegenbeweisen stellt.

Eine ganze Fülle an Daten wird noch zu erheben sein, um die wichtigsten Fragen über diesen konservierten pH-Transduktionsweg beantworten zu können. Zum einen ist in *A. nidulans* ebenso wie in *S. cerevisiae* und *C. albicans* noch völlig offen, über welchen Rezeptionsmechanismus die Pilzzelle den extrazellulären pH-Wert wahrnimmt. Zum anderen ist noch wenig bekannt über das Schicksal des Proteins Rim101p in *C. albicans*. Untersuchungen auf Proteinebene, wie sie insbesondere für *A. nidulans* bereits vorliegen, könnten hier wichtige Einsichten in Fragen der Konformation, der jeweiligen Größe und der Lokalisation verschiedener CaRim101p-Formen bringen. Darüber hinaus bleibt offen, wie genau sich CaRim101p verschiedener Mechanismen bedient, um die Morphogenese einerseits und die pH-regulierte Genexpression andererseits zu beeinflussen, und welcher Art das Zusammenwirken mit der Kaskade ist, die in Efg1p mündet.

Je genauer diese für Wachstum und Invasivität absolut entscheidenden Prozesse in *C. albicans* untersucht werden, desto wahrscheinlicher werden sich hieraus auch Möglichkeiten ergeben, solche Vorgänge pharmakologisch zu beeinflussen, insbesondere im Bereich der transmembranösen Perzeptionsprozesse. Daraus resultierende Therapieoptionen, die den Erreger spezifisch angreifen und den Übergang in ein invasives Infektionsstadium wirkungsvoll verhindern, ohne gleichzeitig den Wirt zu schädigen, wären angesichts der steigenden Anzahl opportunistischer *Candida*-Infektionen in immungeschwächten Menschen von großem Nutzen.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

*Candida albicans* ist ein opportunistischer Hefepilz, den die meisten gesunden Menschen als harmlosen Kommensalen des Verdauungstraktes beherbergen. Bei einer Schwächung des Immunsystems kann es jedoch zu schweren *Candida*-Infektionen bis hin zur lebensbedrohlichen Pilzsepsis kommen. Im Zuge einer relativen Zunahme nicht-immunkompetenter Patienten ist ein steiler Anstieg der Anzahl solcher gefürchteten Infektionen zu verzeichnen.

Neben anderen Virulenzfaktoren spielt offenbar der Polymorphismus, also die Fähigkeit, sowohl in einer sprossenden Hefeform als auch in einer filamentösen Hyphenform zu wachsen, eine bedeutende Rolle in der Pathogenität von *C. albicans*. Welche Wachstumsform überwiegt, hängt entscheidend von den Wachstumsbedingungen ab: Signale wie Serum, Nährstoffmangel, pH-Wert, Temperatur oder Einbettung in Matrix führen über verschiedene miteinander verschaltete Transduktionskaskaden letztendlich zur adäquaten Wachstumsform der Zelle.

Im Zentrum des pH-abhängigen Transduktionsweges steht der alkalisch-exprimierte Transkriptionsfaktor *RIM101*, dessen inaktive Vorläuferform unter neutralen bzw. alkalischen Wachstumsbedingungen vermutlich durch eine zweistufige proteolytische Prozessierung des C-Terminus in (mindestens) eine aktive Form übergeführt wird. Diese wiederum hat mindestens zwei Funktionen: Erstens induziert sie im Rahmen der pH-abhängigen Genexpression unter anderem *PHR1* und reprimiert *PHR2*, die beide für den Zellwandaufbau erforderliche, funktionell homologe Proteine kodieren. Zweitens steuert sie bei gleichzeitig vorliegender Temperaturerhöhung auf ca. 37°C auf noch unbekannte Weise den Übergang der Zelle in die filamentöse Wachstumsform.

Ziel dieser Arbeit ist es, die Folgen von spontan aufgetretenen bzw. gezielt durchgeführten C-terminalen Verkürzungen von Rim101 auf das Wachstum, die *PHR1*-Induktion und die Filamentierung, jeweils in Abhängigkeit vom extrazellulären pH-Wert, zu untersuchen. Daraus können neue Einsichten über die Bedeutung von *RIM101*, den Mechanismus seiner Aktivierung und seine Funktion im Geflecht der Transduktionskaskaden gewonnen werden.

Hierzu wurden zunächst 14 *phr2Δ*-Suppressormutanten isoliert, die trotz der *phr2Δ*-Nullmutation in der Lage waren, bei saurem pH-Wert zu wachsen. Es zeigte sich, dass diese Stämme im sauren Milieu nicht nur eine starke *PHR1*-Induktion aufwiesen, sondern darüber hinaus unabhängig vom pH-Wert des Mediums in hohen Raten zur Filamentierung fähig waren. Die molekulargenetische Analyse beider *RIM101*-Allele in diesen Revertanten ergaben, dass in jedem der Stämme ein *RIM101*-Allel eine Nonsense-Mutation enthielt, die offensichtlich zur Synthese eines trunkierten und damit konstitutiv aktiven Rim101p führte.

Die spontan aufgetretenen *RIM101*-Suppressormutationen fanden sich bei den 14 verschiedenen analysierten Revertanten in einem umschriebenen Bereich, der auf dem das C-terminale Drittel codierenden Teil des *RIM101*-ORF liegt. Um die Folgen von stärkeren, also weiter upstream lokalisierten, Rim101p-Trunkierungen zu untersuchen, wurden daraufhin *C.-albicans*-Stämme konstruiert, die nach Transformation eines linearisierten Plasmides jeweils ein *RIM101*-Allel mit einer gezielt eingeführten Nonsense-Mutation enthielten. Wir erhielten 19 solcher Stämme (*phr2Δ*) mit in 5'-Richtung progressiven *RIM101*-Trunkierungen in einem weiten Bereich des *RIM101*-ORF.

Interessanterweise konnten wir bei der darauf folgenden Untersuchung der gewonnenen Stämme drei Gruppen von *RIM101*-Trunkierungen unterscheiden, die verschiedene Konsequenzen für Wachstum und Filamentierung mit sich brachten: a) Der Austausch der Codons 281, 305 und 333, die näher am 5'-Ende im Bereich oder der Nähe der Zinkfingerregion lokalisiert sind, ermöglicht kein Wachstum bei pH 4. b) Die Einführung von Nonsense-Codons an die Stellen 385 und 411 führt dazu, dass die entsprechenden Stämme bei pH 4 wachsen und *PHR1* induzieren, aber nicht in der Lage sind, bei diesem pH-Wert zu filamentieren. c) Dagegen erlaubt der Ersatz von einem der Codons 463 bis 475 durch ein Stop-Codon Wachstum, *PHR1*-Induktion **und** filamentöses Wachstum bei pH 4. Die Region zwischen den Aminosäuren 411 und 463 muss also für die Initiation der Keimschlauchbildung essentiell, für die Induktion pH-regulierter Gene wie *PHR1* aber nicht notwendig sein.

Dieses Ergebnis scheint darauf hinzuweisen, dass der Funktion des Transkriptionsfaktors Rim101p in den Bereichen Zellwandaufbau/Wachstum und pH-abhängiger Morphogenese zwei verschiedenartige Steuermechanismen zugrunde liegen. Vor dem Hintergrund, dass früheren Studien zufolge der



Transkriptionsfaktor *EFG1* nur für die pH-abhängige Filamentierung, nicht aber für die pH-gesteuerte Genexpression erforderlich ist, wäre eine Interaktion zwischen der beschriebenen Rim101p-Region und Efg1p zu diskutieren. Eine ebenfalls plausible Erklärung bestünde in der Annahme, dass innerhalb des zweistufigen Prozessierungsmodelles die Intermediärform im Wesentlichen die pH-abhängige Filamentierung in *C. albicans* steuert, indem sie Repressoren filamentierungsfördernder Gene im Zusammenspiel mit Tup1p/Ssn6p reprimiert, während die kurze Rim101p-Form im Zellkern die Aufgabe wahrnimmt, Zellwandaufbau und Wachstum durch die Induktion bzw. Repression von pH-regulierten Genen, wie *PHR1*, *PHR2* und *PRA1*, zu steuern.

Der letzte Teil dieser Arbeit befasst sich mit der potentiellen Bedeutung von Rim101p bei der Regulation der Expression von sog. sekretorischen Aspartylproteinasen (*SAPs*). Bisher wurden zehn Subtypen *SAP1* bis *SAP10* kloniert, die in Abhängigkeit von zahlreichen extrazellulären Faktoren differentiell exprimiert werden und offenbar bedeutend zur Virulenz von *C. albicans* beitragen. Mit Hilfe eines Reportersystemes sollen die Auswirkungen von *RIM101*-Mutationen auf drei „hyphenspezifische“ Mitglieder der *SAP*-Genfamilie, nämlich *SAP4*, *SAP5* und *SAP6*, untersucht werden. Daraus gewonnene Informationen könnten die bisher vorwiegend isolierte Betrachtung des Dimorphismus und der Proteinase im Pathogenitätsprozess ausweiten auf ein sich ergänzendes Zusammenspiel dieser Faktoren.

## 6 LITERATURVERZEICHNIS

- Bahn Y-S & Sundstrom P** (2001): *CAP1*, an adenylate cyclase-associated protein gene, regulates bud-hypha transitions, filamentous growth, and cyclic AMP levels and is required for virulence of *Candida albicans*. *J. Bact.* 183, 3211-3223.
- Beauséjour A, Grenier D, Goulet J-P, Deslauriers N** (1998): Proteolytic activation of the Interleukin-1 $\beta$  precursor by *Candida albicans*. *Infect. Immun.* 66, 676-681.
- Bockmühl DP & Ernst JF** (2001): A potential phosphorylation site for an A-type kinase in the Efg1 regulator protein contributes to hyphal morphogenesis of *Candida albicans*. *Genetics* 157, 1523-1530.
- Borg von Zepelin M, Beggah S, Boggian K, Sanglard D, Monod M** (1998): The expression of the secreted aspartic proteinases Sap4 to Sap6 from *Candida albicans* in murine macrophages. *Mol. Microbiol.* 28, 543-554.
- Braun BR & Johnson AD** (1997): Control of filament formation in *Candida albicans* by the transcriptional repressor *TUP1*. *Science* 277, 105-109.
- Brown AJP & Gow NAR** (1999): Regulatory network controlling *Candida albicans* morphogenesis. *Trends Microbiol* 7, 333-338.
- Brown AJP & Gow NAR** (2001): Signal transduction and morphogenesis in *Candida albicans*. *Aus: Howard & Gow NAR (Ed.): The mycota VIII – Biology of the fungal cell (Seiten 55-71). Springer-Verlag Berlin Heidelberg.*
- Buffo J, Herman MA, Soll DR** (1984): A characterization of pH-regulated dimorphism in *Candida albicans*. *Mycopathologia* 85, 21-30.
- Carafoli E & Molinari M** (1998): Calpain: a protease in search of a function? *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 247, 193-203.
- Care RS, Trevethick J, Binley KM, Sudbery PE** (1999): The MET3 promoter: a new tool for *Candida albicans* molecular genetics. *Mol. Microbiol.* 34, 792-798.
- Colina AR, Aumont F, Deslauriers N, Belhumeur P, De Repentigny L** (1996): Evidence for degradation of gastrointestinal mucin by *Candida albicans* secretory aspartyl proteinase. *Infect. Immun.* 64, 4514-4519.
- Cutler JE** (1991): Putative virulence factors of *Candida albicans*. *Annu. Rev. Microbiol.* 45, 187-218.

- Davis DR** (1990): The structure and function of aspartic proteinases. *Annu. Rev. Biophysics Chem.* 19, 189-215.
- Davis D, Wilson RB, Mitchell AP** (2000/1): *RIM101*-dependent and independent pathways govern pH responses in *Candida albicans*. *Mol. Cell. Biol.* 20, 971-978.
- Davis D, Edwards Jr. JE, Mitchell AP, Ibrahim AS** (2000/2): *Candida albicans RIM101* pH response pathway is required for host-pathogen interactions. *Infect. Immun.* 68, 5953-5959.
- De Bernardis F, Mühlischlegel FA, Cassone A, Fonzi WA** (1998): The pH of the host niche controls gene expression in and virulence of *Candida albicans*. *Infect. Immun.* 66, 3317-3325.
- De Pauw BE & Meunier F** (1999): The challenge of invasive fungal infection. *Chemotherapy* 45 (suppl. 1), 1-14.
- Denison SH, Negrete-Urtasun S, Mingot JM, Tilburn J, Mayer WA, Goel A, Espeso EA, Peñalva MA, Arst Jr. HN** (1998): Putative membrane components of signal transduction pathways for ambient pH regulation in *Aspergillus* and meiosis in *Saccharomyces* are homologous. *Mol. Microbiol.* 30, 259-264 (Addendum: 39, 211).
- Denison SH, Orejas M, Arst Jr. HN** (1995): Signaling of ambient pH in *Aspergillus* involves a cysteine protease. *J. Biol. Chem.* 270, 28519-18522.
- Díez E, Álvaro J, Espeso EA, Rainbow L, Suárez T, Tilburn J, Arst Jr. HN, Peñalva MA** (2002): Activation of the *Aspergillus* PacC zinc finger transcription factor requires two proteolytic steps. *EMBO J.* 21, 1350-1359.
- Doi M, Homma M, Chindamporn A, Tanaka K** (1992): Estimation of chromosome number and size by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) in medically important *Candida* species. *J. Gen. Microbiol.* 138, 2243-2251.
- Edmond MB, Wallace SE, McClish DK, Pfaller MA, Jones RN, Wenzel RP** (1999): Nosocomial blood stream infections in United States Hospitals: A three-year analysis. *Clin. Infect. Dis.* 29, 239-244.
- El Barkani A, Kurzai O, Fonzi WA, Ramon A, Porta A, Frosch M, Mühlischlegel FA** (2000): Dominant active alleles of *RIM101* (*PRR2*) bypass the pH restriction on filamentation of *Candida albicans*. *Mol. Cell. Biol.* 20, 4635-4647.
- Ellepola AN & Samaranayake LP** (2001): Inhalational and topical steroids, and oral candidosis : a mini review. *Oral Dis.* 7, 211-216.

- Ellis M, Richardson M, De Pauw B** (2000): Epidemiology. *Hosp. Med.* 61, 605-609.
- Espeso EA, Tilburn J, Arst Jr. HN, Peñalva MA** (1993): pH regulation is a major determinant in expression of a fungal penicillin biosynthetic gene. *EMBO J.* 12, 3947-3956.
- Espeso EA & Peñalva MA** (1996): Three binding sites for the *Aspergillus nidulans* PacC zinc-finger transcription factor are necessary and sufficient for regulation by ambient pH of the isopenicillin N synthase gene promoter. *J. Biol. Chem.* 271, 28825-28830.
- Espeso EA & Arst Jr. HN** (2000): On the mechanism by which alkaline pH prevents expression of an acid-expressed gene. *Mol. Cell. Biol.* 20, 3355-3363.
- Espeso EA, Roncal T, Díez E, Rainbow L, Bignell E, Álvaro J, Suárez T, Denison SH, Tilburn J, Arst Jr. HN, Peñalva MA** (2000): On how a transcription factor can avoid its proteolytic activation in the absence of signal transduction. *EMBO J.* 19, 719-728.
- Evans EG, Odds FC, Richardson MD, Holland KT** (1974): Optimum conditions for initiation of filamentation in *Candida albicans*. *Can. J. Microbiol.* 21, 338-342.
- Felk A, Kretschmar M, Albrecht A, Schaller M, Beinhauer S, Nichterlein T, Sanglard D, Korting HC, Schäfer W, Hube B** (2002): *Candida albicans* hyphal formation and the expression of the Efg1-regulated proteinases Sap4 to Sap6 are required for the invasion of parenchymal organs. *Infect. Immun.* 70, 3689-3700.
- Ferrer J** (2000): Vaginal candidosis: epidemiological and etiological factors. *Int. J. Gynaecol. Obstet.* 71 (suppl. 1), 21-27.
- Fonzi WA** (1999): *PHR1* and *PHR2* of *Candida albicans* encode putative glycosidases required for proper cross-linking of  $\beta$ -1,3- and  $\beta$ -1,6-glucans. *J. Bacteriol.* 181, 7070-7079.
- Fonzi WA & Irwin MY** (1993): Isogenic Strain construction and gene mapping in *Candida albicans*. *Genetics* 134, 717-728.
- Franz R, Ruhnke M, Morschhäuser J** (1999): Molecular aspects of fluconazole resistance development in *Candida albicans*. *Mycoses* 42, 453-458.
- Fridkin SK & Jarvis WR** (1996): Epidemiology of nosocomial fungal infections. *Clin. Microbiol. Rev.* 9, 499-511.
- Fu Y, Rieg G, Fonzi WA, Belanger PH, Edwards Jr. JE, Filler SG** (1998): Expression of the *Candida albicans* gene *ALS1* in *Saccharomyces cerevisiae*

induces adherence to endothelial and epithelial cells. *Infect. Immun.* 66, 1783-1786.

**Futai E, Maeda T, Sorimachi H, Kitamoto K, Ishiura S, Suzuki K** (1999): The protease activity of a calpain-like cysteine protease in *Saccharomyces cerevisiae* is required for alkaline adaptation and sporulation. *Mol. Gen. Genet.* 260, 559-568.

**Gale CA, Bendel CM, McClellan M, Hauser M, Becker JM, Berman J, Hostetter M** (1998): Linkage of adhesion, filamentous growth, and virulence in *Candida albicans* to a single gene *INT1*. *Science* 279, 1355-1358.

**Gietz D, Jean AS, Woods RA, Schiestl RH** (1992): Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucleic Acids Res.* 20, 1425.

**Gillum AM, Tsay EYH, Kirsch DR** (1984): Isolation of the *Candida albicans* gene for orotidine-5'-phosphate decarboxylase by complementation of *Saccharomyces cerevisiae ura3* and *E. coli pyrF* mutations. *Mol. Gen. Genet.* 198, 179-182.

**Guggenheimer J, Moore PA, Rossie K, Myers D, Mongelluzzo MB, Block HM, Weyant R, Orchard T** (2000): Insulin-dependent diabetes mellitus and oral soft tissue pathologies: II. Prevalence and characteristics of *Candida* and Candidal lesions. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* 89, 570-576.

**Guiot HFL, Fibbe WE, Van 't Wout JW** (1994): Risk factors for fungal infection in patients with malignant hematologic disorders: Implications for empirical therapy and prophylaxis. *Clin. Infect. Dis.* 18, 525-532.

**Hoog GS & Guarro J** (1995): Atlas of clinical fungi.

**Hoyer LL, Payne TL, Hecht JE** (1998): Identification of *Candida albicans* *ALS2* and *ALS4* and localization of Als proteins to the fungal cell surface. *J. Bacteriol.* 180, 5334-5343.

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

**Hube B & Naglik J** (2001): *Candida albicans* proteinases: resolving the mystery of a gene family. *Microbiol.* 147, 1997-2005.

**Ibrahim AS, Mirbod F, Filler SG, Banno Y, Cole GT, Kitajima Y, Edwards Jr. JE, Nozawa Y, Ghannoum MA** (1995): Evidence implicating phospholipase as a virulence factor of *Candida albicans*. *Infect. Immun.* 63, 1993-1998.

- Ishii N, Yamamoto M, Yoshihara F, Arisawa M, Aoki Y** (1997): Biochemical and genetic characterization of Rbf1p, a putative transcription factor of *Candida albicans*. *Microbiology* 143, 429-435.
- Ito T, Chiba T, Ozawa R, Yoshida M, Hattori M, Sakaki Y** (2001): A comprehensive two-hybrid analysis to explore the yeast protein interactome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 4569-4574.
- Johnson DR, Bhatnagar RS, Knoll LJ, Gordon JI** (1994): Genetic and biochemical studies of protein N-myristoylation. *Annu. Rev. Biochem.* 63, 869-914.
- Julius D, Blake A, Blair L, Kunisawa R, Thorner J** (1984): Isolation of the putative structural gene for the lysine-arginine-cleaving endopeptidase required for processing of yeast prepro- $\alpha$ -factor. *Cell* 37, 1075-1089.
- Jones T, Federspiel NA, Chibana H, Dungan J, Kalman S, Magee BB, et al.** (2004): The diploid genome sequence of *Candida albicans*. *PNAS* 101, 7329-7334.
- Kadosh D & Johnson AD** (2001): Rfg1, a protein related to the *Saccharomyces cerevisiae* hypoxic regulator Rox1, controls filamentous growth and virulence in *Candida albicans*. *Mol. Cell. Biol.* 21, 2496-2505.
- Kaminishi H, Miyaguchi H, Tamaki T, Suenaga N, Hisamatsu M, Mihashi I, et al.** (1995): Degradation of humoral host defense by *Candida albicans* proteinase. *Infect. Immun.* 63, 984-988.
- Kerridge D** (1993): Fungal dimorphism: a sideways look. *Aus: Vanden Bossche H, Odds FC, Kerridge D (Ed.): Dimorphic fungi in biology and medicine (Seiten 3-10). Plenum Press, New York.*
- Koelsch G, Tang J, Loy JA, Monod M, Jackson K, Foundling SI, Lin X** (2000): Enzymic characteristics of secreted aspartic proteinases of *Candida albicans*. *Biochem. Biophys. Acta* 1480, 117-131.
- Koloteva N, Hughes JMX, MacCarthy JEG** (1998): Reporter genes and their use in studying yeast gene expression. *Aus: Brown AJP & Tuite MF (Ed.): Methods in Microbiology, Yeast Gene Analysis. Academic Press, UK* 26, 142-159.
- Kurzai O, Korting HC, Harmsen D, Bautsch W, Molitor M, Frosch M, Mühlischlegel FA** (2000): Molecular and phenotypic identification of the yeast pathogen *Candida dubliniensis*. *J. Mol. Med.* 78, 521-529.
- Kwong-Chung KJ & Bennett JE** (1992): Medical Mycology. *Lea & Febiger, Philadelphia, USA.*

- Lamb TM & Mitchell AP** (2003): The transcription factor Rim101p governs ion tolerance and cell differentiation by direct repression of the regulatory genes *NRG1* and *SMP1* in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 23, 677-686.
- Lambert M, Blanchin-Roland S, Le Louedec F, Lépingle A, Gaillardin C** (1997): Genetic analysis of regulatory mutants affecting synthesis of extracellular proteinases in the yeast *Yarrowia lipolytica*: Identification of a *RIM101/pacC* homolog. *Mol. Cell. Biol.* 17, 3966-3976.
- Lane S, Zhou S, Pan T, Dai Q, Liu H** (2001): The basic helix-loop-helix transcription factor Cph2 regulates hyphal development in *Candida albicans* partly via Tec1. *Mol. Cell. Biol.* 21, 6418-6428.
- Leng P, Lee PR, Wu H, Brown AJP** (2001): Efg1, a morphogenetic regulator in *Candida albicans*, is a sequence-specific DNA binding protein. *J. Bact.* 183, 4090-4093.
- Li W & Mitchell AP** (1997): Proteolytic activation of Rim101p, a positive regulator of yeast sporulation and invasive growth. *Genetics* 145, 63-73.
- Liu H** (2001): Transcriptional control of dimorphism in *Candida albicans*. *Curr. Opin. Microbiol.* 4, 728-735.
- Lo HJ, Köhler JR, DiDomenico B, Loebenberg D, Cacciapuoti A, Fink GR** (1997): Nonfilamentous *Candida albicans* mutants are avirulent. *Cell* 90, 939-949.
- Mardh PA, Rodrigues AG, Genc M, Novikova N, Martinez-de-Oliveira J, Guaschino S** (2002): Facts and myths on recurrent vulvovaginal candidosis – a review on epidemiology, clinical manifestations, diagnosis, pathogenesis and therapy. *Int. J. STD AIDS* 13, 522-539.
- Matsuura A, Treinin M, Mitsuzawa H, Kassir Y, Uno I, Simchen G** (1990): The adenylate cyclase/protein kinase cascade regulates entry into meiosis in *Saccharomyces cerevisiae* through the gene *IME1*. *EMBO J.* 9, 3225-3232.
- McDonald F** (1984): Secretion of inducible proteinase by pathogenic *Candida* species. *J. Med. Vet. Mycol.* 22, 79-82.
- Mingot JM, Tilburn J, Diez E, Bignell E, Orejas M, Widdick DA, Sarkar S, Brown CV, Caddick MX, Espeso EA, Arst Jr. HN, Peñalva MA** (1999): Specificity determinants of proteolytic processing of *Aspergillus nidulans* PacC transcription factor are remote from the processing site, and processing occurs in yeast if pH is bypassed. *Mol. Cell. Biol.* 19, 1390-1400.

- Mingot JM, Espeso EA, Díez E, Peñalva MA** (2001): Ambient pH signaling regulates nuclear localization of the *Aspergillus nidulans* PacC transcription factor. *Mol. Cell. Biol.* 21, 1688-1699.
- Monod M, Togni G, Hube B, Sanglard D** (1994): Multiplicity of genes encoding secreted aspartic proteinases in *Candida* species. *Mol. Microbiol.* 13, 357-368.
- Monod M, Hube B, Hess D, Sanglard D** (1998): Differential regulation of *SAP8* and *SAP9*, which encode two members of the secreted aspartyl proteinase family in *Candida albicans*. *Microbiology* 144, 2731-2737.
- Morschhäuser J, Virkola R, Korhonen TK, Hacker J** (1997): Degradation of human subendothelial extracellular matrix by proteinase-secreting *Candida albicans*. *FEMS Microbiol. Lett.* 153, 349-355.
- Mouyna I, Fontaine T, Vai M, Monod M, Fonzi WA, Diaquin M, Popolo L, Hartland RP, Latgé JP** (2000): Glycosylphosphatidylinositol-anchored glucanoyl-transferases play an active role in the biosynthesis of the fungal cell wall. *J. Biol. Chem.* 275, 14882-14889.
- Mühlschlegel FA & Fonzi WA** (1997): *PHR2* of *Candida albicans* encodes a functional homolog of the pH-regulated gene *PHR1* with an inverted pattern of pH-dependent expression. *Mol. Cell. Biol.* 17, 5960-5967.
- Novikova N, Yassievich E, Mardh PA** (2002): Microscopy of stained smears of vaginal secretion in the diagnosis of recurrent vulvovaginal candidosis. *Int. J. STD AIDS* 13, 318-322.
- O'Shaughnessy EM, Shea YM, Witebsky FG** (2003): Laboratory diagnosis of invasive mycoses. *Infect. Dis. Clin. North Am.* 17, 135-158.
- Odds FC** (1988): *Candida* and Candidosis. Baillière Tindall, London, England.
- Odds FC** (1994): *Candida* Species and virulence. *ASM news* 60, 313-318.
- Odds FC** (1997): Switch of phenotype as an escape mechanism of the intruder. *Mycoses* 40, 9-12.
- Orejas M, Espeso EA, Tilburn J, Sarkar S, Arst Jr. HN, Peñalva MA** (1995): Activation of the *Aspergillus* PacC transcription factor in response to alkaline ambient pH requires proteolysis of the carboxy-terminal moiety. *Genes Dev.* 9, 1622-1632.
- Pacetti SA & Gelone SP** (2003): Caspofungin acetate for treatment of invasive fungal infections. *Ann. Pharmacother.* 37, 90-98.



- Paganini H, Rodriguez Brieschcke T, Santos P, Seu S, Rosanova MT** (2002): Risk factors for nosocomial candidaemia: a case-control study in children. *J. Hosp. Infect.* 50, 304-308.
- Pearson MM, Rogers PD, Cleary JD, Chapman SW** (2003): Voriconazole: a new triazole antifungal agent. *Ann. Pharmacother.* 37, 420-432.
- Peñalva MA & Arst Jr. HN** (2002): Regulation of gene expression by ambient pH in filamentous fungi and yeasts. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66, 426-446.
- Phan QT, Belanger PH, Filler SG** (2000): Role of hyphal formation in interactions of *Candida albicans* with endothelial cells. *Infect. Immun.* 68, 3485-3490.
- Pfaller MA, Messer SA, Hollis RJ, Jones RN, Doern GV, Brandt ME, Hajjeh RA** (1999): Trends in species distribution and susceptibility to fluconazol among blood stream isolates of *Candida* species in the United States. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 33, 217-222.
- Pla J, Gil C, Monteoliva L, Navarro-Garcia F, Sanchez M, Nombela C** (1996): Understanding *Candida albicans* at the molecular level. *Yeast* 12, 1677-1702.
- Porta A, Wang Z, Ramon A, Mühlischlegel FA, Fonzi WA** (2001): Spontaneous second site suppressors of the filamentation defect of *ppr1Δ* mutants define a critical domain of Rim101p. *Mol. Genet. Genomics.* 266, 624-631.
- Ramon AM & Fonzi WA** (2002): The pH-dependent expression of *Candida albicans* *PHR1* is regulated by upstream binding of Rim101p. *6<sup>th</sup> ASM Conference on Candida and Candidiasis, Tampa, FL, USA, Jan. 2002.*
- Ramon AM, Porta A, Fonzi WA** (1999): Effect of environmental pH on morphological development of *Candida albicans* is mediated via the PacC-related transcription factor encoded by *PRR2*. *J. Bacteriol.* 181, 7524-7530.
- Reiss E, Tanaka K, Bruker G, Chazalet V, Coleman D, Debeaupuis JP, Hanazawa R, Latge JP, Lortholary J, Makimura K, Morrison CJ, Murayama SY, Naoe S, Paris S, Sarfati J, Shibuya K, Sullivan D, Uchida K, Yamaguchi H** (1998): Molecular diagnosis and epidemiology of fungal infections. *Med. Mycol.* 36 (suppl. 1), 249-257.
- Rennert G, Rennert HS, Pitlik S, Finkelstein R, Kitzes-Cohen R** (2000): Epidemiology of Candidemia – a nationwide survey in Israel. *Infection* 28, 26-29.
- Rudnick DA, McWherter CA, Gokel GW, Gordon JI** (1993): Myristoyl CoA:protein N-myristoyltransferase. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 67, 375-430.

- Sanglard D, Kuchler K, Ischer F, Pagani JL, Monod M, Bille J** (1995): Mechanisms of resistance to azole antifungal agents in *Candida albicans* isolates from AIDS patients involve specific multidrug transporters. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39, 2378-2386.
- Sanglard D, Ischer F, Monod M, Bille J** (1997): Cloning of *Candida albicans* genes conferring resistance to azole antifungal agents – characterization of *CDR2*, a new multidrug ABC transporter gene. *Microbiology* 143, 405-416.
- Sanglard D, Ischer F, Koymans L, Bille J** (1998): Amino acid substitutions in the cytochrome P-450 lanosterol 14 $\alpha$ -demethylase (CYP51A1) from azole-resistant *Candida albicans* clinical isolates contribute to resistance to azole antifungal agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42, 241-253.
- Sanglard D & Odds FC** (2002): Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. *Lancet Infect. Dis.* 2, 73-85.
- Santos MAS, Keith G, Tuite MF** (1993): Non-standard translational events in *Candida albicans* mediated by an unusual seryl-tRNA with a 5'-CAG-3' (leucine) anticodon. *EMBO J.* 12, 607-616.
- Saporito-Irwin SM, Birse CE, Sypherd PS, Fonzi WA** (1995): *PHR1*, a pH-regulated gene of *Candida albicans*, is required for morphogenesis. *Mol. Cell. Biol.* 15, 601-613.
- Schweizer A, Rupp S, Taylor BN, Rollinghoff M, Schröppel K** (2000): The TEA/ATTS transcription factor CaTec1p regulates hyphal development and virulence in *Candida albicans*. *Mol. Microbiol.* 38, 435-445.
- Sentandreu M, Elorza MV, Sentandreu R, Fonzi WA** (1998): Cloning and characterization of *PRA1*, a gene encoding a novel pH-regulated antigen of *Candida albicans*. *J. Bacteriol.* 180, 282-289.
- Sharkey LL, McNemar MD, Saporito-Irwin SM, Sypherd PS, Fonzi WA** (1999): *HWP1* functions in the morphological development of *Candida albicans* downstream of *EFG1*, *TUP1*, and *RBF1*. *J. Bacteriol.* 181, 5273-5279.
- Sikorski JA, Devadas B, Zupec ME, Freeman SK, Brown DL, Lu HF, Nagarajan S, Mehta PP, Wade AC, Kishore NS, Bryant ML, Getman DP, McWherter CA, Gordon JI** (1997): Selective peptidic and peptidomimetic inhibitors of *Candida albicans* myristoylCoA:protein N-myristoyltransferase: a new approach to antifungal therapy. *Biopolymers* 43, 43-71.

- Smith HE & Mitchell AP** (1989): A transcriptional cascade governs entry into meiosis in yeast. *Mol. Cell. Biol.* 9, 2142-2152.
- Soll DR, Morrow B, Srikantha T** (1993): High-frequency phenotypic switching in *Candida albicans*. *Trends Genet.* 9, 61-65.
- Soll DR** (1997): Gene regulation during high-frequency switching in *Candida albicans*. *Microbiology* 143, 279-288.
- Sonneborn A, Tebarth B, Ernst JF** (1999/1): Control of White-Opaque phenotypic switching in *C. albicans* by the Efg1p morphogenetic regulator. *Infect. Immun.* 67, 4655-4660.
- Sonneborn A, Bockmühl DP, Ernst JF** (1999/2): Chlamydospore formation in *Candida albicans* requires the Efg1p morphogenetic regulator. *Infect. Immun.* 67, 5514-5517.
- Sonneborn A, Bockmühl DP, Gerads M, Kurpanek K, Sanglard D, Ernst JF** (2000): Protein kinase A encoded by *TPK2* regulates dimorphism of *Candida albicans*. *Mol. Microbiol.* 35, 386-396.
- Staab JF, Bradway SD, Fidel PL, Sundstrom P** (1999): Adhesive and mammalian transglutaminase substrate properties of *Candida albicans* Hwp1. *Science* 283, 1535-1538.
- Staib P & Morschhäuser J** (1999): Chlamydospore formation on Staib agar as a species-specific characteristic of *Candida dubliniensis*. *Mycoses* 42, 521-524.
- Staib P, Kretschmar M, Nichterlein T, Hof H, Morschhäuser J** (2000): Differential activation of a *Candida albicans* virulence gene family during infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 6102-6107.
- Staib P, Kretschmar M, Nichterlein T, Hof H, Morschhäuser J** (2002): Transcriptional regulators Cph1p and Efg1p mediate activation of the *Candida albicans* virulence gene *SAP5* during infection. *Infect. Immun.* 70, 921-927.
- Stoldt VR, Sonneborn A, Leuker C, Ernst JF** (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.
- Su SSY & Mitchell AP** (1993): Molecular characterization of the yeast meiotic regulatory gene RIM1. *Nucleic Acids Res.* 21, 3789-3797.
- Sullivan DJ & Coleman D** (1998): *Candida dubliniensis*: characteristics and identification. *J. Clin. Microbiol.* 36, 329-334.

- Sundstrom P** (1999): Adhesins in *Candida albicans*. *Curr. Opin. Microbiol.* 2, 353-357.
- Tilburn J, Sarkar S, Widdick DA, Espeso EA, Orejas M, Mungroo J, Peñalva MA, Arst Jr. HN** (1995): The *Aspergillus* PacC zinc finger transcription factor mediates regulation of both acid- and alkaline expressed genes by ambient pH. *EMBO J.* 14, 779-790.
- Tréton B, Blanchin-Roland S, Lambert M, Lepingle A, Gaillardin C** (2000): Ambient pH signalling in ascomycetous yeasts involves homologues of the *Aspergillus nidulans* genes *palF* and *palH*. *Mol. Gen. Genet.* 263, 505-513.
- Tsuchimori N, Sharkey LL, Fonzi WA, French SW, Edwards Jr. JE, Filler SG** (2000): Reduced virulence of *HWP1*-deficient mutants of *Candida albicans* and their interaction with host cells. *Infect. Immun.* 68, 1997-2002.
- Viscoli C, Girmenia C, Marinus A, Collette L, Martino P, Vandercam B, Doyen C, Lebeau B, Spence D, Krcmery V, De Pauw B, Meunier F** (1999): Candidemia in cancer patients: a prospective, multicenter surveillance study by the invasive fungal infection group (IFIG) of the european organization for research and treatment of cancer (EORTC). *Clin. Infect. Dis.* 28, 1071-1079.
- Walsh TJ & Chanock SJ** (1977): Laboratory diagnosis of invasive candidiasis: A rationale for complementary use of culture- and nonculture-based detection systems. *Int. J. of Infect. Dis.* 1 (suppl. 1), 11-19.
- Walsh TJ & Groll AH** (1999): Emerging fungal pathogens: evolving challenges to immunocompromised patients for the twenty-first century. *Transpl. Infect. Dis.* 1, 247-261.
- Walsh TJ, Whitcomb PO, Revankar SG, Pizzo PA** (1995): Successful treatment of hepatosplenic candidiasis through repeated cycles of chemotherapy and neutropenia. *Cancer* 76, 2357-2362.
- Watts HJ, Cheah FS, Hube B, Sanglard D, Gow NA** (1998): Altered adherence in strains of *Candida albicans* harbouring null mutations in secreted aspartic proteinase genes. *FEMS Microbiol. Lett.* 159, 129-135.
- White T & 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.

**Xu W & Mitchell AP** (2001): Yeast PalA/AIP1/Alix homolog Rim20p associates with a PEST-like region and is required for its proteolytic cleavage. *J. Bact.* 183, 6917-6923.

## 7 ANHANG

### 7.1 Abkürzungsverzeichnis

aa	amino acid
Abb.	Abbildung
AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome
AS	Aminosäure
bHLH	basic Helix-Loop-Helix
bp	Basenpaare
ca.	zirka
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
chem.	chemisch
C-terminal	carboxyterminal
DNA	Desoxyribonukleinsäure
et al.	et alii
h	Stunden
HIV	Human Immunodeficiency Virus
i. d. R.	in der Regel
Kap.	Kapitel
kb	Kilobasenpaare
min	Minuten
Mbp	Megabasenpaare
N-terminal	aminoterminal
ORF	Open Reading Frame
physikal.	physikalisch
rpm	Umdrehungen pro Minute
s.	siehe
spp.	species
sog.	so genannte
Tab.	Tabelle
UAS	upstream activation sequence
versch.	verschiedene

---

## DANKE

Diese Arbeit wurde im Institut für Hygiene und Mikrobiologie der Julius-Maximilians-Universität Würzburg angefertigt. Ich danke dem Vorstand des Institutes Herrn Professor Dr. M. Frosch herzlich für die freundliche Aufnahme am Institut und die Bereitschaft, für mich die Rolle des „Doktorvaters“ zu übernehmen.

Besonders möchte ich meinem Betreuer Fritz Mühlshlegel danken, der die Betreuung trotz seines Ortswechsels nach Canterbury bis zur Fertigstellung der Arbeit fortgesetzt hat.

Für die Bereitschaft, diese Arbeit zu begutachten, sage ich Herrn Professor Dr. Morschhäuser aus dem Institut für Molekulare Infektionsbiologie besten Dank.

Malek El Barkani danke ich für die Einführung in die Laborarbeit und die persönliche Begleitung während der ersten zwei Monate.

Ganz herzlich möchte ich mich bei Steffi Müksch bedanken für ihre Bereitschaft, durch ihre Anwesenheit und Unterstützung dazu beizutragen, dass Versuche schnell gelangen und der Laboralltag lebendig wurde. Ebenso danke ich Vroni Hornich für ihre Unterstützung bei den abschließenden Versuchen für diese Arbeit.

Martina, mit der ich jeden Tag meines Lebens teilen möchte, danke ich für das aufmerksame Korrekturlesen und für den Fleißstempel, den ich für meine Dissertation bekommen habe.

Freu dich,  
das war gut!



Nichts wäre möglich ohne meine Eltern, denen ich an dieser Stelle für ihre maßlose Liebe und permanente Unterstützung von ganzem Herzen danken möchte und denen diese Arbeit gewidmet ist.

---

## LEBENS LAUF

Name: Daniel Zeller  
Geburtstag: 22. Oktober 1976  
Geburtsort: Künzelsau / Hohenlohekreis  
Eltern: Wolfram Zeller  
Gudrun Zeller geb. Link  
Geschwister: Dr. med. Sabine Zeller  
Heimatadresse: Kloster Schöntal; Honigsteige 21; 74214 Schöntal  
Schulbesuch: 1983 – 1987 Max-Eyth-Grundschule in Schöntal-Bieringen  
1987 – 1996 Gymnasium Möckmühl  
C-Examen: 1994 – 1996 Externe C-Ausbildung zum nebenberuflichen  
Kirchenmusiker an der Kirchenmusikschule  
in Rottenburg am Neckar  
Zivildienst: 1996 – 1997 Bildungshaus der Diözese Rottenburg-Stuttgart  
in Kloster Schöntal  
Studium: WS 1997/98 Beginn des Medizinstudiums an der  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg  
4/1999 Aufnahme in die Bischöfliche Studienförderung  
Cusanuswerk; Stipendium bis 5/2004  
8/1999 Ärztliche Vorprüfung  
8/2000 Erstes Staatsexamen  
WS 2000/01 Promotionsarbeit am Institut für Hygiene und  
Mikrobiologie der Universität Würzburg  
3/2003 Zweites Staatsexamen  
4/2003 Praktisches Jahr  
(Neurologie / Chirurgie / Innere Medizin)  
5/2004 Drittes Staatsexamen  
seit 8/2004 Neurologische Universitätsklinik Würzburg  
Fremdsprachen: Englisch, Latein, Spanisch, Französisch



---

## KONGRESSBEITRÄGE

- **Zeller D**, El Barkani A, Frosch M, Mühlshlegel FA (2001):  
Effects of successively truncated *RIM101* alleles in *Candida albicans* point to the role of a newly defined domain in regulating filamentation. (Poster)  
35. Tagung der **Deutschsprachigen Mykologischen Gesellschaft**, Marburg, September 2001.  
Posterpreis 2001 für das Gebiet "Grundlagenforschung/Diagnostik".
- **Zeller D**, El Barkani A, Frosch M, Mühlshlegel FA (2001):  
Progressive Truncations of *RIM101* in *Candida albicans* point to the role of a newly defined domain in regulating filamentation. (Vortrag)  
53. Tagung der **Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie**, Aachen, Oktober 2001.
- **Zeller D**, Rupp S, Frosch M, Mühlshlegel FA (2002):  
Progressive carboxy-terminal truncation of *Candida albicans RIM101*.  
(Vortrag & Poster)  
6<sup>th</sup> ASM Conference on Candida and Candidiasis der **American Society of Microbiology**, Tampa, FL, USA, Januar 2002.