

**Analyse der Expression einer  
Virulenzgenfamilie von *Candida albicans*  
während der Infektion**

**Dissertation**

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

**vorgelegt von**

**Peter Staib**

**aus Würzburg**

**Würzburg, 2001**

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender:

Gutachter: PD Dr. J. Morschhäuser

Gutachter: Prof. Dr. J. Kreft

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

für Nicki

## Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Januar 1998 bis Juli 2001 in der *Candida*-Arbeitsgruppe des Zentrums für Infektionsforschung der Universität Würzburg unter Leitung von PD Dr. J. Morschhäuser am Institut für Molekulare Infektionsbiologie von Prof. Dr. J. Hacker angefertigt.

Prof. Dr. J. Hacker danke ich für sein großes Interesse an meiner Arbeit und seine stete Unterstützung, die auch dazu beitrug, dass ich als Promotionsstipendiat der Studienstiftung des deutschen Volkes gefördert wurde. Für die freundliche Bereitschaft dieser Stiftung, meine Arbeit über den Höchsthförerungszeitraum zu unterstützen, bin ich sehr dankbar und möchte mich an dieser Stelle auch insbesondere bei meinem Vertrauensdozenten Prof. Dr. M. Lohse für seinen großen Einsatz bedanken, d.h. für die stets bereitwillige Erstellung von Gutachten für die Verlängerungsanträge sowie die vielen ideenreichen Gespräche. Bei Prof. Dr. J. Kreft möchte ich mich für die freundliche Übernahme der Begutachtung meiner Arbeit bedanken. Bei Prof. Dr. H. Hof vom Institut für Hygiene und Mikrobiologie des Universitätsklinikums Mannheim bedanke ich mich für die freundliche und fruchtbare wissenschaftliche Zusammenarbeit. Dabei möchte ich besonders Frau PD Dr. M. Kretschmar und PD Dr. T. Nichterlein für die Durchführung der *in vivo*-Experimente meiner Arbeit bedanken.

Mein ganz besonderer Dank gilt PD Dr. J. Morschhäuser, unter dessen Betreuung die vorliegende Arbeit entstanden ist. Stets zu Diskussionen bereit, hat er mit vollstem Einsatz durch fachliche Kompetenz, aber auch in jeder anderen Beziehung immer den Fortgang meiner Arbeit gefördert.

Insgesamt mochte ich mich bei der gesamten Arbeitsgruppe bedanken, dabei vor allem bei Sonja Michel, aber auch bei Ayfer Binder, Stefanie Wirsching, Stephanie Theiß, Anja Strauß, Dr. Gerwald Köhler, Stefan Bentink und Stefan Löffler. Daneben möchte ich mich aber auch bei allen anderen Mitarbeitern des Instituts bedanken, hier insbesondere bei Hilde Merkert für die Hilfe am Computer.

Für all die Unterstützung während dieser Zeit möchte ich mich bei Nicki Nussel bedanken. Ebenfalls danke ich auch meinen Eltern, meinem Vater auch für die vielen hilfreichen wissenschaftlichen Ratschläge.

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1 ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>1</b>
<b>1 SUMMARY .....</b>	<b>4</b>
<b>2 EINLEITUNG .....</b>	<b>7</b>
2.1 Allgemeine Einführung .....	7
2.2 Diskutierte Virulenzfaktoren von <i>Candida albicans</i> .....	9
2.3 Genexpressionsanalyse durch Reportersysteme .....	17
2.4 Zielsetzung dieser Arbeit.....	22
<b>3 MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>23</b>
3.1 Verwendete Bakterienstämme und Plasmide.....	23
3.1.1 <i>Escherichia coli</i> K12-Stamm.....	23
3.1.2 Plasmide .....	23
3.2 Verwendete <i>Candida albicans</i> -Stämme .....	26
3.3 Oligonukleotide.....	29
3.4 Geräte und Chemikalien .....	31
3.5 Mikrobiologisch-molekularbiologische Methoden ( <i>E. coli</i> ) .....	32
3.5.1 Anzucht der <i>E. coli</i> -Stämme.....	33
3.5.2 Plasmidisolierung .....	33
3.5.3 Polymerase chain reaction (PCR).....	33
3.5.4 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen .....	34
3.5.5 Aufreinigung von DNA durch Agarose-Gelelektrophorese .....	35
3.5.6 Ligation und Transformation von Plasmid-DNA .....	35
3.5.7 DNA-Sequenzierung .....	36
3.5.8 Site-spezifische Mutagenese.....	37

<b>3.6 Mikrobiologisch-molekularbiologische Methoden (<i>C. albicans</i>)</b> .....	<b>38</b>
3.6.1 Anzucht der <i>C. albicans</i> -Stämme .....	38
3.6.2 Genetische Transformation von <i>C. albicans</i> durch Elektroporation.....	38
3.6.3 Isolierung chromosomaler DNA aus <i>C. albicans</i> .....	40
3.6.4 Southern-Hybridisierung .....	40
3.6.5 Isolierung von Gesamt-RNA aus <i>C. albicans</i> .....	41
3.6.6 Northern Hybridisierung.....	42
3.6.7 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	43
3.6.8 Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis der <i>GFP</i> -Expression.....	44
<b>3.7 <i>In vivo</i>-Experimente</b> .....	<b>44</b>
<b>4 ERGEBNISSE</b> .....	<b>47</b>
<b>4.1 Etablierung einer <i>in vivo</i>-Expressionstechnologie (IVET) für <i>C. albicans</i></b> .....	<b>47</b>
4.1.1 Funktionsprinzip des Reportersystems .....	47
4.1.2 Herstellung eines <i>C. albicans</i> -Stammes mit deletierbarem Marker.....	49
4.1.3 Integration des <i>caFLP</i> -Gens in den <i>C. albicans</i> - <i>SAP2</i> -Lokus.....	51
4.1.4 Überprüfung des Reportersystems <i>in vitro</i> .....	53
4.1.4.1 Spezifische FLP-vermittelte Deletion des <i>MPA<sup>R</sup></i> -Markers .....	53
4.1.4.2 Detektion der <i>SAP2P</i> -induzierten FLP-Aktivität auf Einzelzellebene .....	55
4.1.4.3 Korrelation der FLP-Aktivität mit der <i>SAP2</i> -Expression .....	57
4.1.5 Verwendung des Reportersystems <i>in vivo</i> .....	58
4.1.5.1 Analyse der <i>SAP2</i> -Expression nach intraperitonealer Infektion.....	59
4.1.5.2 Analyse der <i>SAP2</i> -Expression nach intravenöser Infektion .....	61
4.1.5.3 Analyse der <i>SAP2</i> -Expression nach oraler Infektion.....	62
<b>4.2 Analyse der <i>in vitro</i>- und <i>in vivo</i>-Regulation des <i>SAP2</i>-Gens</b> .....	<b>64</b>
4.2.1 Identifizierung einer auffälligen Repeatstruktur im <i>SAP2</i> -Promotor.....	64
4.2.2 Einfluß der Gesamtrepeatzahl auf die <i>SAP2</i> -Promotorinduktion <i>in vivo</i> .....	66
4.2.2.1 Herstellung von Reporterstämmen mit veränderten <i>SAP2</i> -Promotoren .....	68
4.2.2.2 Repeatzahl-abhängige <i>in vivo</i> -Induzierbarkeit des <i>SAP2</i> -Promotors .....	70
4.2.3 Differentielle <i>in vitro</i> -Regulation der wildtypischen <i>SAP2</i> -Allele .....	73
4.2.3.1 Sequentielle Inaktivierung der beiden <i>SAP2</i> -Allele .....	75
4.2.3.2 Beide <i>SAP2</i> -Allele werden funktionell exprimiert .....	78
4.2.3.3 Abhängigkeit der Expression des <i>SAP2-1</i> -Allels von Allel <i>SAP2-2</i> .....	82
4.2.3.4 Differentielle Aktivierbarkeit der wildtypischen <i>SAP2</i> -Promotoren.....	87
4.2.4 Etablierung einer sensitiveren Version des IVET-Systems .....	95
4.2.4.1 Herstellung des <i>ecaFLP</i> -Gens durch site-spezifische Mutagenese .....	95
4.2.4.2 Integration des <i>ecaFLP</i> -Gens in den <i>SAP2</i> -Lokus .....	97
4.2.4.3 Erhöhte Aktivität der veränderten FLP-Rekombinase.....	99
4.2.5 Differentielle Regulation der beiden <i>SAP2</i> -Allele während der Infektion .....	101

<b>4.3 Analyse der <i>in vivo</i>-Expression der Gene <i>SAP1-SAP6</i>.....</b>	<b>104</b>
4.3.1 Integration des <i>ecaFLP</i> -Gens in die Gene <i>SAP1-SAP6</i> .....	104
4.3.1.1 Konstruktion der Plasmide .....	105
4.3.1.2 Integration der Reporterfusionen in die entsprechenden <i>SAP</i> -Gene.....	107
4.3.2 Differentielle Aktivierung der Gene <i>SAP1-SAP6</i> während der Infektion.....	110
4.3.2.1 Stadienspezifische <i>SAP</i> -Aktivierung nach intraperitonealer Infektion.....	111
4.3.2.2 Differentielle <i>SAP</i> -Aktivierung nach intravenöser Infektion .....	112
4.3.2.3 Differentielle <i>SAP</i> -Aktivierung nach oraler Infektion.....	113
<b>4.4 Einfluß von Signalwegen auf die <i>SAP5</i>-Expression während der Infektion.....</b>	<b>115</b>
4.4.1 Integration des <i>MPA<sup>R</sup></i> -Markers in <i>C. albicans-cph1</i> - und <i>efg1</i> -Mutanten .....	116
4.4.2 <i>ecaFLP</i> -Integration in <i>SAP</i> -Gene der regulatorischen Mutanten .....	117
4.4.3 <i>In vitro</i> -Überprüfung des IVET-Systems in den regulatorischen Mutanten.....	120
4.4.4 Einfluß der Transkriptionsregulatoren CPH1 und EFG1 auf die <i>in vivo-SAP5</i> -Aktivierung .....	121
<b>5 DISKUSSION .....</b>	<b>127</b>
5.1 Etablierung einer <i>in vivo</i> -Expressionstechnologie für <i>C. albicans</i> .....	128
5.2 Regulation des <i>C. albicans SAP2</i> -Gens; <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i> .....	133
5.3 Regulation der Gene <i>SAP1-SAP6</i> während der Infektion.....	142
5.4 Abschließende Wertung und Ausblick.....	151
<b>6 LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>153</b>
<b>ANHANG .....</b>	<b>A</b>
1. Erklärungen .....	A.1
2. Publikationen .....	A.2
3. Lebenslauf .....	A.3

# 1 Zusammenfassung

Der opportunistisch humanpathogene Hefepilz *Candida albicans* gehört bei vielen gesunden Menschen zur mikrobiellen Schleimhautflora, kann jedoch bei abwehrgeschwächten Patienten oberflächliche Infektionen sowie auch lebensbedrohliche tiefe Organmykosen verursachen. Obwohl der Immunstatus des Wirtes für eine Infektion mit diesem Erreger von entscheidender Bedeutung ist, tragen vermutlich auch eine Reihe von Virulenzfaktoren zur Pathogenität von *C. albicans* bei, indem sie Besiedlung, Ausbreitung und Vermehrung der Pilzzellen unter Anpassung an die verschiedensten Wirtsnischen unterstützen. Eine für die Pathogenität von *C. albicans* wichtige Eigenschaft ist die Bildung sekretorischer Aspartylproteasen (SAPs), die durch eine große Familie homologer Gene codiert werden. Es wird angenommen, dass die individuellen Proteasen während der Infektion verschiedene Aufgaben erfüllen bzw. optimal an unterschiedliche Wirtsnischen angepaßt sind. Jedoch ist der Beitrag der einzelnen SAP-Gene zur Pathogenese noch weitgehend unverstanden. Da die wirtsinduzierte Aktivierung dieser Virulenzgene während bestimmter Infektionsstadien Hinweise auf ihre spezifische pathogenetische Bedeutung liefern könnte, wurde in dieser Arbeit eine Methode für *C. albicans* entwickelt, mit der die Induktion eines Gens während der Infektion nachgewiesen werden kann. Die Methode beruht auf einer genetischen Rekombination als Reporter einer Genexpression, was bedeutet, dass nach Induktion des zu untersuchenden Gens eine site-spezifische Rekombinase spezifisch einen Mykophenolsäure-Resistenzmarker aus dem Genom der Zelle entfernt. Da diese Deletion ein irreversibles Ereignis darstellt, das auf die jeweiligen Nachkommen vererbt wird, kann selbst eine vorübergehende Genaktivierung während eines bestimmten Infektionsstadiums bzw. in einem bestimmten Organ in einzelnen Zellen nach deren Reisolierung aus infiziertem Gewebe durch Ausplattieren auf geeignetem Indikatormedium nachgewiesen werden. Durch Analyse der Expression des SAP2-Gens wurde bestätigt, dass mit diesem Reportersystem eine biologisch signifikante Genaktivierung in *C. albicans* nachgewiesen werden kann. SAP2 wird in *C. albicans in vitro* in einem Medium induziert, das Rinderserumalbumin als alleinige Stickstoffquelle enthält, ist in anderen gängigen Labormedien jedoch reprimiert.

Diese *in vivo*-Expressionstechnologie (IVET) wurde verwendet, um die Expression von sechs verschiedenen SAP-Genen von *C. albicans*, SAP1-SAP6, in unterschiedlichen Tiermodellen zu studieren. Dabei konnte gezeigt werden, dass die einzelnen Proteasegene abhängig von der Art der Infektion, d.h. lokal begrenzte Schleimhautinfektion bzw. Systeminfektion, und auch vom Infektionsstadium differentiell reguliert werden. Dabei wurden sogar die äußerst



homologen Gene *SAP4-SAP6*, die aufgrund von *in vitro* erzielten Ergebnissen als hyphenspezifische Gene galten, *in vivo* unterschiedlich reguliert. *SAP5* und *SAP6*, aber nicht die anderen *SAP*-Gene, wurden in einem Maus-Ösophagus-Schleimhautmodell signifikant aktiviert, als die *C. albicans*-Hyphen in das Epithel invadierten. Eine stadienspezifische Expression der *SAP*-Gene wurde in einem Maus-Peritonitis-Modell beobachtet. Kurz nach Inokulation der *C. albicans*-Hefezellen in die Bauchhöhle der Tiere, zu einem Zeitpunkt, als noch keine Ausbildung von Hyphen zu beobachten war, wurde *SAP5*, aber nicht *SAP6* oder eines der anderen analysierten *SAP*-Gene in einem signifikanten Anteil der infizierenden Zellen aktiviert. Demzufolge scheint *SAP5* für die Gewebeinvasion während der Schleimhautinfektion und auch für die ersten Schritte während einer disseminierenden Infektion von Bedeutung zu sein. Durch die intravenöse Infektion der Maus, bei der frühe Infektionsschritte umgangen werden, wurde gezeigt, dass *SAP5* und *SAP6*, aber auch *SAP4*, während der späteren Stadien einer disseminierenden Infektion weiterhin aktiviert werden. Dagegen wurde eine Induktion des *SAP2*-Gens vorwiegend im Spätstadium einer systemischen Infektion beobachtet, nachdem die Pilzzellen innere Organe befallen hatten. Daher fördert *SAP2* vermutlich weniger die Invasion von Geweben, dafür aber die Vermehrung der Pilze nach Organbefall, möglicherweise durch die Bereitstellung von Nährstoffen. Dabei wurde gezeigt, dass die *in vivo*-Regulation von *SAP2* durch bestimmte Repeatstrukturen innerhalb der Promotorregion dieses Gens beeinflusst wird. Während des Verlaufs einer systemischen Infektion wurden sogar die zwei *SAP2*-Allele des hier untersuchten *C. albicans*-Modellstammes CAI4, die sich in dieser Repeatregion unterscheiden, differentiell reguliert. Das *SAP2-2*-Allel wurde nämlich bereits deutlich früher induziert als das Allel *SAP2-1*. Eine Expression von *SAP1* und *SAP3* konnte im Gegensatz zu den anderen *SAP*-Genen nur in wenigen der infizierenden Zellen nachgewiesen werden, so dass diesen Genen ein Beitrag zur Pathogenität in den hier untersuchten Infektionsmodellen nicht beigemessen werden kann.

Im Verlauf einer Infektion setzt *C. albicans* vermutlich viele verschiedene Virulenzfaktoren gleichzeitig für eine bestmögliche Anpassung an die jeweilige Wirtsnische ein. Ob in Abhängigkeit entsprechender Wirtssignale dabei unterschiedliche Eigenschaften der Pilzzelle koordiniert reguliert werden, ist kaum erforscht, erscheint jedoch für ein besseres Verständnis der Erreger-Wirts-Auseinandersetzung von besonderem Interesse. An der Kontrolle der Hyphenbildung von *C. albicans* sind wenigstens zwei Signaltransduktionskaskaden beteiligt, eine MAP-Kinase-Kaskade und ein cAMP-abhängiger Signalweg, die in den Transkriptionsregulatoren CPH1 bzw. EFG1 enden. Nachdem dimorphes Wachstum für die

Infektion von Bedeutung ist und die Expression der Gene *SAP4-SAP6* *in vitro* mit der Hyphenwachstumsphase verbunden ist, wurde eine mögliche Abhängigkeit hyphenassoziierter *SAP*-Aktivierung von diesen Regulatoren durch die Analyse der *SAP5*-Expression in entsprechenden Mutanten analysiert. Sowohl in *cph1*- als auch in *efg1*-Einzelmutanten wurde eine reduzierte Aktivierung des *SAP5*-Gens *in vivo* beobachtet. Dadurch konnte gezeigt werden, dass sowohl CPH1 als auch EFG1 zur *SAP5*-Aktivierung während der Infektion beitragen. Da *cph1*-Mutanten im infizierten Gewebe wie der Wildtyp-Stamm Hyphen ausbildeten, war die Hyphenbildung allein offensichtlich nicht für eine volle *SAP5*-Aktivierung *in vivo* ausreichend. Andererseits war die *SAP5*-Induktion *in vivo* nicht von der Hyphenwachstumsphase abhängig, da eine verminderte, aber dennoch signifikante *SAP5*-Expression auch in den *efg1*-Mutanten zu beobachten war, die in den infizierten Tieren nur in der Hefephase wuchsen. In Zellen, in denen beide Regulatoren fehlten, konnte eine Induktion von *SAP5* kaum nachgewiesen werden. Das bedeutet, dass diese Signalwege in *C. albicans* für die Kontrolle verschiedener zellulärer Programme während der Infektion wichtig sind und die Expression von unterschiedlichen Virulenzgenen koordinieren.

Durch die *in vivo*-Analyse der Virulenzgenexpression in *C. albicans* konnten Einblicke in regulatorische Anpassungsmechanismen dieses Mikroorganismus an verschiedene Wirtsnischen gewonnen werden. Einzelne Mitglieder einer Virulenzgenfamilie dieses Pilzes werden während der Infektion differentiell und in Abhängigkeit vom Infektionsstadium reguliert und tragen daher vermutlich sehr spezifisch zur Pathogenese bei. Unterschiedliche Virulenzmerkmale können zudem während der Infektion koordiniert reguliert werden und dadurch gemeinsam die Anpassungsfähigkeit von *C. albicans* an den Wirt unterstützen. Die erzielten Erkenntnisse sollten letztlich dazu beitragen, die Pathogenität dieses wichtigen opportunistisch humanpathogenen Erregers besser verstehen zu können.

## 1 Summary

The opportunistic human pathogenic yeast *Candida albicans* is a member of the microflora on mucosal surfaces of many healthy people but can cause superficial infections as well as life-threatening deep organ mycoses in immunocompromised patients. Although the ability of *C. albicans* to cause disease largely depends on the immune status of the host, it is generally assumed that a number of virulence factors also contribute to the pathogenicity of *C. albicans*, thereby supporting colonization, distribution and multiplication of the fungal cells and allowing an adaptation to various host niches. The production of secreted aspartic proteases (SAPs), encoded by a large family of homologous genes, plays an important role in *C. albicans* pathogenicity. It is likely that the individual proteases fulfill various functions during infection or are optimally adapted to different host niches. However, the contribution of single *SAP* genes to pathogenicity is not well understood. Because the host-induced activation of these virulence genes at a certain infection stage might give clues to their specific role in pathogenicity, an *in vivo*-expression technology (IVET) was developed in this work that allows the detection of gene activation in *C. albicans* during infection. The method is based on genetic recombination as a reporter of gene expression, resulting in the specific excision of a mycophenolic acid resistance marker from the genome by a site-specific recombinase after induction of the target gene. Because deletion of the marker represents an irreversible event that is inherited by the progeny of the corresponding cell, even a transient gene expression at a certain infection stage or in specific organs can be detected in single cells recovered from infected tissue by plating on appropriate indicator medium. The suitability of the reporter system for detecting a biologically meaningful gene activation in *C. albicans* was confirmed by analyzing expression of the *SAP2* gene, which is induced *in vitro* during growth in a medium containing bovine serum albumin as the sole nitrogen source, but repressed in other commonly used laboratory media.

IVET was then used to analyze the *in vivo* expression of six different *SAP* genes of *C. albicans*, *SAP1-SAP6*, in various animal models. It could be demonstrated that the individual protease genes are indeed differentially regulated, depending on the type of the infection, i.e. locally restricted mucosal infection or systemic infection, and the stage of an infection. Even the highly homologous *SAP4-SAP6* genes, which from the results of *in vitro* experiments had been supposed to be hyphae-specific genes, were differentially regulated *in vivo*. *SAP5* and *SAP6*, but not the other *SAP* genes, were significantly activated in a mouse model of oesophageal candidiasis when *C. albicans* hyphae invaded into the epithelium. A

stage-specific expression of *SAP* genes was observed in a mouse model of *Candida* peritonitis. Soon after inoculation of *C. albicans* yeasts into the peritoneal cavity, before hyphae formation was observed, *SAP5* but not *SAP6* or any of the other *SAP* genes analyzed was activated in a significant part of the infecting cell population. Therefore, *SAP5* seems to be important for tissue invasion during mucosal infection and also during the initial steps of a disseminated infection. By intravenous inoculation of *C. albicans* into mice, thereby bypassing the early infection stages, it was demonstrated that expression of *SAP5* and *SAP6*, but also *SAP4*, continued into the later stages of a disseminated infection. In contrast, an induction of the *SAP2* gene was observed predominantly in the late stages of a systemic infection, when the fungal cells had spread to deep organs. Hence, *SAP2* presumably supports the multiplication of the fungal cells within the infected organs, perhaps by providing nutrient supply, rather than the invasion into host tissues. The *in vivo* regulation of *SAP2* was shown to be influenced by certain repeat structures in the promoter region of this gene. In the *C. albicans* model strain CAI4 that was used in this study even the two *SAP2* alleles, which differed in this repeat region, were differentially regulated during the course of a systemic infection, the *SAP2-2* allele being induced at an earlier infection stage than the *SAP2-1* allele. In contrast to the other *SAP* genes, expression of *SAP1* and *SAP3* could be detected in only few infecting cells, and a role in pathogenicity could not be attributed to these genes in the infection models used in this work.

During the course of an infection *C. albicans* presumably employs many different virulence factors at the same time in order to achieve the best possible adaptation to the corresponding host niche. Yet, a question that has hardly been addressed but may enhance our understanding of the host-microbe interactions is whether different properties of the fungal cell are regulated in a coordinated fashion by specific host signals. At least two signal transduction pathways, a MAP kinase cascade and a cAMP-dependent pathway ending in the transcriptional regulators CPH1 and EFG1, respectively, control hyphae formation in *C. albicans*. As dimorphic growth is important for infection and because expression of the genes *SAP4-SAP6* is linked to the hyphal growth form *in vitro*, a possible dependence of hyphae-associated *SAP* gene expression on these regulators was analyzed by studying *SAP5* expression in corresponding signal transduction mutants. *SAP5* activation *in vivo* was reduced in *cph1* as well as in *efg1* single mutants. Therefore, both CPH1 and EFG1 contribute to *SAP5* activation during infection. Since the *cph1* mutant formed hyphae in infected tissue as efficiently as the wild-type strain, hyphae formation alone evidently was not sufficient for full *SAP5* induction *in vivo*. On the other hand, induction of *SAP5* *in vivo* did not depend on the hyphal growth form,

because a reduced but still significant *SAP5* expression was also detected in the *efg1* mutant that grew only in the yeast form in the infected animals. In cells defective in both of the regulators an induction of *SAP5* was hardly detectable. Therefore, these signalling pathways are important for the control of various cellular programs during infection and coordinate the expression of different virulence genes in *C. albicans*.

The *in vivo* analysis of virulence gene expression of *C. albicans* provided insights into regulatory adaptation mechanisms of the pathogen in various host niches. The individual members of a virulence gene family of this fungus are differentially and stage-specifically regulated during infection and thus presumably contribute very specifically to pathogenesis. Moreover, various virulence traits can be regulated in a coordinated fashion during infection and in this way together support the adaptability of *C. albicans* to the host. Overall, these findings enhance our understanding of the pathogenicity of this important opportunistic fungal pathogen.

## 2 Einleitung

### 2.1 Allgemeine Einführung

Obwohl Pilze im Vergleich zu bakteriellen Infektionserregern epidemiologisch eine eher untergeordnete Rolle spielen, konnte innerhalb der letzten Jahrzehnte eine deutliche Zunahme an Pilzinfektionen des Menschen beobachtet werden, so dass auch die hierbei in Frage kommenden Pilzarten ein ernstzunehmendes medizinisches Problem darstellen. Sie sind zwar als Opportunisten für den immunkompetenten Menschen in der Regel ungefährlich, stellen jedoch eine große Gefahr für abwehrgeschwächte Patienten dar, deren Anzahl im Zuge des medizinischen Fortschritts und der Immunschwäche AIDS ebenfalls deutlich angestiegen ist (Fridkin and Jarvis, 1996; Hacker, 2000).

Von den mehr als 100.000 bekannten Pilzarten sind nur wenige (ca. 150) für eine klinisch relevante Infektion des Menschen verantwortlich, da der gesunde Mensch durch seine natürliche Abwehr gegen Pilzinfektionen geschützt ist, bedingt durch einen mechanischen Schutz durch Haut und Schleimhäute, eine bestehende Mikroflora und ein intaktes Immunsystem. Als Folge lebensnotwendiger Entwicklungen in der Intensivmedizin hat jedoch auch die Zahl abwehrgeschwächter Patienten in den letzten Jahren deutlich zugenommen. Zu diesen prädisponierenden Maßnahmen zählen z.B. Immunsuppression bei Organtransplantationen und der Einsatz von Chemotherapeutika und Breitspektrum-Antibiotika. Gefährdet sind insbesondere auch neutropenische Patienten sowie Patienten mit schwerwiegenden Grundkrankheiten wie z.B. AIDS und Diabetes mellitus (Einsele *et al.*, 2000).

Die medizinisch interessierenden Pilze werden nach ihrem morphologischen Erscheinungsbild eingeteilt in Sprosspilze, z.B. *Candida albicans* und *Cryptococcus neoformans*, Fadenpilze, z.B. *Aspergillus fumigatus*, sowie endemisch begrenzt vorkommende, klassisch dimorphe Pilze wie *Histoplasma capsulatum* und *Blastomyces dermatitidis* (Rippon, 1988; Staib P *et al.*, 2000). Der Großteil der fakultativ humanpathogenen Arten gehört zur Gattung *Candida*. Als anamorphe Hefen zählen sie zu den Fungi imperfecti, von denen ein sexueller Vermehrungszyklus nicht bekannt ist (Rinaldi, 1993). Neben *C. albicans* als Haupterreger pilzbedingter Infektionen des Menschen treten von den etwa 200 bekannten *Candida*-Arten nur wenige klinisch in Erscheinung, wie z.B.

*C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* und *C. dubliniensis*. Erst vor wenigen Jahren als eigenständige Spezies beschrieben, wird zunehmend auch die klinisch-epidemiologische Bedeutung von *C. dubliniensis* wahrgenommen (Sullivan *et al.*, 1995). Das liegt offensichtlich daran, dass *C. dubliniensis* bislang als *C. albicans* mißidentifiziert wurde, da in den routinediagnostischen Nachweismethoden für *C. albicans* eine Unterscheidung dieser beiden Arten kaum möglich ist. Beide bilden in Gegenwart von Serum Keimschläuche und auf Reisagar sogenannte Chlamydosporen („Mantelsporen“), vergrößerte, dickwandige Zellen. Neben bestehenden, jedoch aufwendigen molekularbiologischen Differenzierungsmöglichkeiten konnte in der Zeit meiner Doktorarbeit eine einfache Methode zur phänotypischen Identifizierung von *C. dubliniensis* beschrieben werden (Staib P and Morschhäuser, 1999). Während *C. dubliniensis* auf Staib-Agar (syn. *Guizotia abyssinica*-Kreatinin-Agar), eingeführt als Differentialnährboden zum Nachweis von *Cr. neoformans*, mit einer rauhen Kolonieform unter massiver Chlamydosporenbildung wächst, bildet *C. albicans* hier nur glatte Kolonien, die aus Blastosporen bestehen.

Der Großteil der klinisch relevanten Fadenpilze wie z.B. *A. fumigatus* hat sein natürliches Biotop in organisch inaktivem Material in der Umwelt (z.B. Kompost) und gelangt exogen erst nach Exposition erregerrhaltigen Materials durch Inhalation oder traumatische Einwirkung in seinen Wirt (Rippon, 1988). Im Gegensatz zu freilebenden Pilzen scheint ein Hauptreservoir von *C. albicans* der Mensch selbst zu sein, weswegen dieser Erreger einen besonders bemerkenswerten Mikroorganismus darstellt. Ohne eine sichtbare Erkrankung auszulösen, kann *C. albicans* auf Schleimhäuten des Verdauungstraktes bei etwa der Hälfte aller gesunden Individuen nachgewiesen werden. Die *C. albicans*-Infektion ist daher in der Regel endogenen Ursprungs und erfolgt seltener exogen als Schmierinfektion. Zum Erreger einer Mykose wird *C. albicans* aber gewöhnlich erst bei einer biologischen Störung des Wirtes, wobei die Infektion lokal oder systemisch verlaufen kann. Der Befall mit Belagbildung der Schleimhäute von Mundhöhle, Ösophagus und Vagina wird dabei als Soor bezeichnet und kann als Folge einer lokalen Störung der Normalflora (z.B. bei Antibiotikatherapie) bzw. bei Vorliegen einer definierten Grundkrankheit auftreten. Bei fortgeschrittenen HIV-Infektionen ist *C. albicans* Leitererreger, und Infektionen des Mund- und Rachenraumes treten bei diesen Risikopatienten oft auch rekurrent auf. Im Gegensatz zu dieser mukokutanen Candidiasis bei AIDS, bei der in der Regel keine hämatogene Streuung der Erreger zu beobachten ist, sind insbesondere bei leukopenischen Patienten die invasiven *C. albicans*-Infektionen mit systemischem Verlauf oft lebensbedrohlich. Bei diesen tiefen Organmykosen können sich die Erreger nach Dissemination über die Blutbahn in sämtlichen

Organen unter Ausbildung von Abszessen absiedeln. Solche Infektionen sind auch im Verlauf einer Immunsuppression bei Organtransplantation gefürchtet (Engelmann, 1999).

Pilze haben als Eukaryonten zellbiologische Gemeinsamkeiten mit dem Wirt. Die Therapie von Mykosen ist daher aufgrund der begrenzten Auswahl an selektiven Angriffsmöglichkeiten, aber auch aufgrund der Wirksamkeit der heute zur Verfügung stehenden Antimykotika höchst unzureichend, da effektive Dosierungen oft mit starken Nebenwirkungen verbunden sind. Darüberhinaus treten zunehmend Resistenzen gegen die zur Verfügung stehenden Medikamente auf. Zur Zeit sind Antimykotika aus vier Stoffklassen im klinischen Einsatz: Polyene (z.B. Amphotericin B), Azole (z.B. Flukonazol), Allylamine (z.B. Terbinafin) und Fluoropyrimidine (z.B. 5-Fluorocytosin) (Georgopapadakou, 1998).

Obwohl für das Auftreten einer Pilzerkrankung der Immunstatus des Wirtes von entscheidender Bedeutung ist, scheint auch der Erreger selbst für Aufrechterhaltung und Fortgang der Infektion maßgeblich zu sein. Dies ergibt sich bereits aus der Überlegung, dass nur sehr wenige Pilzarten pathogenetisch von Bedeutung sind und demnach im Vergleich zu den apathogenen Arten über besondere Eigenschaften verfügen müssen. Ein entsprechendes Verständnis der Beziehungen zwischen Erreger und Wirt zwingt deshalb zu einer Charakterisierung von möglichen Virulenzeigenschaften humanpathogener Pilze. Auf diesem Wege können sich letztlich auch neue Zielstrukturen für effiziente Therapieansätze ergeben. Zu diesem Zweck wurden in den letzten Jahren zahlreiche Techniken eingeführt, die ein Studium der Pathogenitätsmerkmale von *C. albicans* auch auf molekularer Ebene ermöglicht haben.

## **2.2 Diskutierte Virulenzfaktoren von *Candida albicans***

Anders als bei einigen obligat pathogenen Bakterien, für deren Virulenz oft nur einer bzw. einige wenige Determinanten verantwortlich sind, scheint die Pathogenität von *C. albicans* durch eine Vielzahl von Mechanismen bedingt zu sein (Navarro-Garcia *et al.*, 2001). Offensichtlich gelingt es diesem Opportunisten durch das koordinierte Zusammenspiel verschiedener Eigenschaften, sich an unterschiedliche Wirtsnischen anzupassen und sich bei entsprechender Disposition des Wirtes vermehren und auszubreiten zu können. Während des Infektionsgeschehens stehen potentielle Virulenzgene vermutlich regulatorisch in enger Beziehung zueinander, werden wahrscheinlich stadienspezifisch je nach Anforderung exprimiert und tragen so in ihrer Kombination zur Flexibilität und Virulenz dieses Keims als



Erreger bei. Dazu zählen die Fähigkeit zur Adhärenz an verschiedenste Wirtsoberflächen, das dimorphe Wachstum, phänotypisches switching und die Sekretion hydrolytischer Enzyme wie Proteasen und Phospholipasen (Cutler, 1991; Odds, 1994). Jedoch ist weitgehend unklar, welchen Beitrag am Infektionsgeschehen die verschiedenen Pathogenitätsmerkmale von *C. albicans* letztlich leisten, wie ihr Einsatz regulatorisch koordiniert wird, und welche genetischen Strukturen der Virulenzgene letztlich an deren An- oder Abschalten beteiligt sind.

### **Adhärenz und Zellwand**

Die Zellwand der *C. albicans*-Zelle, zusammengesetzt aus  $\beta$ -Glukanen, Mannoproteinen und Chitin, spielt während der Infektion als dynamische Struktur eine maßgebliche Rolle, nicht nur für den Erhalt der Zellmorphologie und -physiologie, sondern auch in der Bereitstellung antigener, immunmodulatorischer und adhärenter Eigenschaften (Navarro-Garcia *et al.*, 2001). Die Adhärenz von *C. albicans* an den Epithelzellen der Schleimhaut stellt den initialen Schritt zur Besiedlung und Invasion von Wirtsgewebe dar. Dieser Zusammenhang wurde bereits dadurch erkannt, dass beim Vergleich verschiedener *C. albicans*-Stämme die Fähigkeit zur Adhärenz mit ihrer Virulenz korrelierte (Ghannoum and Elteen, 1986). Vermutlich durch mehrere Typen von Adhäsion-Rezeptor-Interaktionen bindet *C. albicans* sich an unterschiedlichste Wirtsoberflächen, neben Epithel auch an Endothel und extrazelluläre Matrix. In jüngster Zeit wurden Gene identifiziert, deren Produkte im direkten Zusammenhang mit Adhäsion und Virulenz von *C. albicans* stehen (Hostetter, 1999; Sundstrom, 1999). Eine ganze Familie von Genen repräsentieren z.B. die *ALS*-Gene (Agglutinin-like sequences), die für große Zelloberflächenglykoproteine codieren und deren Expression in *C. albicans* auch *in vivo*, d.h. während der Infektion, gezeigt werden konnte (Hoyer, 2001). Ihre differentielle Regulation unterstützt möglicherweise durch Erzeugung variabler Zelloberflächenprofile die Anpassungsfähigkeit des Erregers an unterschiedliche Strukturen während des Infektionsverlaufs. Ein Beitrag zu Adhäsion und Virulenz wurde auch für das HWP1-Protein nachgewiesen (Staab *et al.*, 1999). Dieses Adhäsion, ebenfalls mit den Zellwandglukanen gekoppelt, steht in engem Zusammenhang mit der Morphologie der Zellen, da es nur in Keimschläuchen bzw. echten Hyphen gebildet wird. HWP1 besitzt Ähnlichkeit zu kleinen Prolin-reichen Säugerproteinen und stellt ein Substrat für Wirts-Transglutaminasen dar, deren Aufgabe in einer stabilisierenden Quervernetzung von Proteinen in Epithelzellschichten besteht. *C. albicans* könnte demnach Schritte der Besiedlung und Penetration von Gewebsschichten durch einen Mechanismus eines molekularen Mimikry einleiten. Durch Nachahmung von Wirtsoberflächenstrukturen wird auch die adhäsive

Eigenschaft des Proteins INT1 erklärt, das ebenfalls an Morphogenese und Virulenz beteiligt ist (Gale *et al.*, 1998). INT1 ist ein Transmembranprotein, das geringfügige Homologie zu Vertebraten-Integrinen aufweist. Diese Proteine werden in Wirbeltieren von vielen Zelltypen wie z.B. Leukozyten, Epithel- und Endothelzellen gebildet (Hostetter, 1999). Integrin-Liganden sind vorwiegend Komponenten der extrazellulären Matrix wie Kollagen und Fibronectin, aber auch Komplementkomponenten wie das C3-Fragment iC3b. Aufgrund der INT1-vermittelten Bindung von *C. albicans*-Zellen an diese Wirtsmoleküle werden dem Protein nicht nur adhäsive, sondern auch immunmodulatorische Eigenschaften zugeschrieben. Die vielseitigen Aufgaben der *C. albicans*-Zellwand während einer Infektion erfordern auch rasche Modifikationen in ihrer Zusammensetzung, da nur dadurch die außerordentliche Adaptationsfähigkeit der Zellen während der Interaktion mit dem Wirt möglich zu sein scheint. Zu diesem Zweck müssen regulatorische Signalwege die Vielzahl der an der Biosynthese der Zellwand beteiligten Enzyme in Abhängigkeit von Umweltparametern spezifisch kontrollieren. Ein entsprechender Zusammenhang wurde durch Untersuchung der Gene *PHR1* und *PHR2* aufgedeckt, deren Produkte als Zellwand-gekoppelte Glykosidasen an der Quervernetzung von Glukanresten beteiligt sind. Sie sind je nach pH-Wert komplementär an- bzw. abgeschaltet und beeinflussen dadurch pH-abhängig die Zusammensetzung der Zellwand (Fonzi, 1999; El Barkani *et al.*, 2000).

### **Dimorphismus und Signaltransduktion**

Neben vielen anderen Pilzen kann *C. albicans* in Abhängigkeit von Umweltbedingungen reversibel zwischen den Morphologieformen Hefe und Hyphe wechseln, ein Phänomen, das als Dimorphismus bezeichnet wird. Während die rund-ovalen, im Durchmesser ca. 3-5 µm großen Blastosporen sich nach der Knospung trennen, bildet *C. albicans* auch Filamente in Form von Ketten länglicher Blastokonidien als sogenannte Pseudohyphen, oder aber auch echte Hyphen, in denen Septen die Zellkerne voneinander trennen. Die Hyphenform kann *in vitro* durch Inkubation der Sproßzellen bei erhöhter Temperatur und einem entsprechenden pH-Wert sowie der Gegenwart von Serum induziert werden (Buffo *et al.*, 1984). Myzeliales Wachstum wird jedoch auch im infizierten Wirt bei Gewebsinvasion beobachtet, was dazu führte, diese Fähigkeit als Virulenzmerkmal zu diskutieren. Diese Annahme wurde auch durch die Beobachtungen gestützt, dass Keimschläuche besonders fest an Wirtszellen adhäreren, und dass die Hypheninduktion in Hefezellen nach Aufnahme durch Phagozyten möglicherweise zu deren Zerstörung beiträgt (Louria and Brayton, 1964; Kimura and Pearsall, 1980; Odds, 1988). Zudem wurde gezeigt, dass Mutanten, die keine Hyphen ausbilden

können, im Tiermodell avirulent waren (Lo *et al.*, 1997). Die Bedeutung der individuellen Morphologieformen für die Pathogenese wurde bereits vielfach untersucht und vermutlich sind beide Wachstumsphasen am Infektionsgeschehen beteiligt, so dass erst ihr koordiniertes Zusammenspiel zur Pathogenität von *C. albicans* beiträgt (Odds, 1994). Dabei verändert sich beim Übergang von der Hefen- in die Hyphenform der Zellen aber nicht nur die Morphologie der Pilze, sondern vermutlich auch die Ausprägung anderer Virulenzmerkmale, wie z.B. die Adhärenz oder die Sekretion hydrolytischer Enzyme. Aus diesem Grund sollten Virulenz-Defekte von Mutanten, die phänotypisch in ihrer Hyphenbildung gestört sind, kritisch beurteilt werden (Brown and Gow, 1999).

Um den Dimorphismus als Virulenzfaktor von *C. albicans* besser verstehen zu können, wurden in den letzten Jahren die zugrundeliegenden regulatorischen Netzwerke, die am Hefe-Hyphe-Übergang beteiligt sind, genetisch näher untersucht. Durch vergleichende Studien mit der molekular weit besser charakterisierten Hefe *Saccharomyces cerevisiae* wurden auch in *C. albicans* zwei wichtige konservierte Signaltransduktionswege identifiziert: eine Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK)-Kaskade und ein cAMP-abhängiger Signalweg (Brown and Gow, 1999; Ernst, 2000). Homologe Gene der MAPK-Kaskade, die in *S. cerevisiae* an einem Pheromon-Rezeptor-induzierten Mating-Prozeß und der Ausbildung von Pseudohyphen beteiligt sind, wurden auch in *C. albicans* nachgewiesen, obwohl hier kein sexueller Zyklus bekannt ist. Über eine Reihe verschiedener Kinasen enden die Signale in dieser Kaskade in dem Transkriptionsfaktor CPH1. In *S. cerevisiae* hat die Deletion des homologen Gens (*STE12*) einen Defekt im Mating-Prozeß der Zellen als auch in ihrer Fähigkeit zur Filamentbildung zur Folge (Brown and Gow, 1999). Dagegen führte eine Inaktivierung des *CPH1*-Gens in entsprechenden *C. albicans*-Mutanten zwar unter bestimmten *in vitro*-Bedingungen zu einer deutlich verminderten Filamentbildung, hatte jedoch keinerlei Einfluß auf die Serum-induzierte Bildung echter Hyphen oder die Virulenz der Mutanten im Tiermodell (Lo *et al.*, 1997).

Zu einem zweiten morphogenetisch wichtigen Signalweg in *C. albicans* gehört der Transkriptionsfaktor EFG1, ein DNA-bindendes Protein der basischen Helix-Loop-Helix-Familie (Stoldt *et al.*, 1997). Diese über cAMP und Proteinkinase A regulierte Kaskade scheint für die Ausbildung echter Hyphen in *C. albicans* von besonderer Bedeutung zu sein. Im Gegensatz zu *cph1*-Mutanten sind *efg1*-Mutanten nicht in der Lage, in Serum-haltigem Medium Keimschläuche auszubilden. Zudem verhielten sich *cph1 efg1*-Doppelmutanten im Infektionsmodell avirulent (Lo *et al.*, 1997). Neben diesen Signalwegen scheinen aber auch andere Faktoren an der Hyphenbildung beteiligt zu sein, da auch in den *cph1 efg1*-

Doppelmutanten myzeliales Wachstum unter bestimmten *in vitro*-Bedingungen bzw. in anderen Tiermodellen nicht völlig unterbunden war (Riggle *et al.*, 1999).

Neben Komponenten der durch CPH1 bzw. EFG1 vermittelten Signalkaskaden wurden in *C. albicans* eine ganze Reihe weiterer morphogenetisch wichtiger Regulatormoleküle identifiziert, deren Beziehungen zueinander und zu bekannten Signalwegen aber noch weitgehend unklar sind. Hierzu gehören Faktoren wie z.B. TUP1, INT1, RIM101 und TEC1. Untersuchungen zur Funktion des Transkriptionsregulators TUP1 zeigten, dass Hyphenbildung nicht nur induziert, sondern auch reprimiert wird. *tup1*-Mutanten bildeten konstitutiv Filamente, so dass TUP1 offensichtlich als negativer Regulator fungiert. Da sich hyperfilamentierende *tup1*-Mutanten im Tiermodell aber avirulent verhielten, ist offenbar filamentöses Wachstum allein nicht für eine Infektion ausreichend (Braun and Johnson, 1997; Braun *et al.*, 2000). Bemerkenswerterweise hatte TUP1 hier jedoch nicht nur Einfluß auf die Zellmorphologie, sondern auch auf die Expression anderer Gene, darunter *HWP1*, das für ein hyphenspezifisches Zellwandprotein codiert. Dieses Beispiel unterstützt die Annahme, dass Virulenz und Hyphenbildung nicht notwendigerweise gekoppelt sein müssen, da sich *hwp1*-Mutanten im Tiermodell trotz unauffälliger Hyphenregulation avirulent verhielten (Staab *et al.*, 1999). Ähnliches wurde auch für eine *C. albicans*-Mutante festgestellt, in der das Gen für den Transkriptionsfaktor TEC1 inaktiviert wurde (Schweizer *et al.*, 2000). Während die Fähigkeit der *tec1*-Mutante zur Hyphenbildung unter *in vitro*-Bedingungen stark eingeschränkt war, konnte dieser Defekt während der experimentellen Infektion nicht beobachtet werden. Da sich der Stamm aber dennoch avirulent verhielt, zeigt auch dieses Beispiel, dass morphogenetisch relevante Regulatoren offenbar auch Virulenzgene beeinflussen können, deren Expression von der Morphologie an sich unabhängig zu sein scheint. Dabei wird auch deutlich, dass die Expression verschiedener Eigenschaften *in vitro* und *in vivo* unterschiedlich reguliert sein kann bzw. Laborbedingungen eine natürliche Situation nicht imitieren können.

Die hier getroffene Auswahl an Beispielen der heute bekannten morphogenetisch wichtigen Regulatormoleküle veranschaulicht, welche Vielzahl an Faktoren am dimorphen Wachstum von *C. albicans* beteiligt sind. Dabei ist weitgehend unerforscht, wie komplex ihre gegenseitigen Beziehungen zueinander sind und inwieweit sie auch an der Regulation anderer zellulärer Eigenschaften beteiligt sind. Obwohl auch Genprodukte identifiziert wurden, die während der Hypheninduktion in Abhängigkeit spezifischer Transkriptionsfaktoren exprimiert werden, sind keine Gene bekannt, die von diesen Faktoren direkt aktiviert bzw. reprimiert

werden. Letztlich bleibt auch die Frage offen, inwieweit die Expression anderer Virulenzgene, insbesondere während der Infektion, von den charakterisierten Regulatoren beeinflusst wird.

### **Sekretorische Aspartyl-Proteasen (SAPs)**

Die extrazelluläre proteolytische Aktivität von *C. albicans* spielt vermutlich eine wichtige Rolle bei der Bereitstellung von Nährstoffen, der Adhärenz und der Invasion von Wirtsgeweben und wird daher seit ihrer Erstbeschreibung durch F. Staib im Jahre 1965 als Virulenzfaktor von *C. albicans* diskutiert (Odds, 1988). Der Entdeckung, dass *C. albicans* bei saurem pH-Wert Serum-Albumin als alleinige Stickstoffquelle im Nährsubstrat über eine Proteolyse verwerten konnte, folgte die biochemische Charakterisierung einer sekretorischen Protease aus dem Kulturüberstand einer proteolytisch aktiven *C. albicans*-Kultur (Remold *et al.*, 1968). Schon früh wurde ein Zusammenhang der Proteasen mit der Pathogenität von *C. albicans* vermutet, nachdem festgestellt wurde, dass die Stärke der *in vitro*-Proteaseaktivität der *Candida*-Arten *C. albicans*, *C. tropicalis* und *C. parapsilosis* mit ihrer Pathogenität korrelierte (Rüchel *et al.*, 1983). Darüberhinaus wurde auch ein Zusammenhang zwischen der *in vitro*-Proteolyse-Aktivität verschiedener *C. albicans*-Stämme mit ihrer Virulenz im Tierversuch beobachtet (Staib F, 1968; Louie *et al.*, 1994). Die Bedeutung der Proteasen als Pathogenitätsfaktor wurde in den 1980er Jahren durch Experimente mit unspezifisch hergestellten Mutanten gestützt, die bei verminderter *in vitro*-Proteolyse-Aktivität auch eine deutlich verminderte Virulenz aufwiesen als entsprechende Ausgangsstämme (Macdonald *et al.*, 1983; Kwon-Chung *et al.*, 1985). Nachdem erstmals über die genetische Sequenz eines *C. albicans*-Proteasegens von Hube *et al.* (1991) berichtet wurde, konnten wenig später weitere homologe Gene identifiziert werden, so dass heute mindestens neun Mitglieder einer Familie von mehr oder weniger eng verwandten Proteasegenen bekannt sind (Magee *et al.*, 1993; Monod *et al.*, 1994, 1998). Durch zahlreiche genetische, biochemische und immunologische Versuchsansätze wurde der Zusammenhang der Proteasen mit verschiedenen Virulenzeigenschaften unterstützt (Hube, 1996). Dennoch ist die spezifische Bedeutung der einzelnen Protease-Isoenzyme für die Virulenz von *C. albicans* noch unklar.

Nachdem die *C. albicans*-Proteasen zahlreiche Bezeichnungen erhielten, werden sie heute Sekretorische Aspartyl-Proteasen genannt (SAPs). Sie gehören zu den Carboxypeptidasen und werden auch als saure Proteasen bezeichnet, da sie meist nur im sauren Milieu aktiv sind (Davis, 1990). Ihnen gemeinsam ist ihre spezifische Hemmbarkeit durch das kompetitiv bindende Hexapeptid Pepstatin. Die SAPs, die durch zwei Aspartatreste im aktiven Zentrum

gekennzeichnet sind, werden als Präproteine synthetisiert. Als solche enthalten sie neben einer Signalsequenz für den Transport in das endoplasmatische Retikulum ein Propeptid mit 1-4 putativen dibasischen Lys-Arg-Prozessierungsstellen für eine Kex2-ähnliche Protease des Golgi-Apparates. Da in proteolytisch aktiven Zellen keine intrazelluläre Protease-Akkumulation beobachtet werden konnte, sind Transkription der *SAP*-Gene und extrazelluläre Sekretion der reifen, ca. 340 Aminosäuren-großen Proteine vermutlich eng gekoppelt (Banerjee *et al.*, 1991). Zu verwertbaren Substraten der Proteasen gehören neben Serum-Albuminen auch Hämoglobin, Immunglobuline, Keratin, Kollagen und andere Proteine (Ray and Payne, 1991). Bereits ihre breite Substratspezifität ließ einen Beitrag der sauren Proteasen zur Virulenz von *C. albicans* vermuten (Ray and Payne, 1990). SAPs spalten unter geeigneten Bedingungen eine Vielzahl von Wirtsproteinen, darunter Proteine der Wirtsabwehr wie z.B. Antikörper der Immunglobulinisotypen A und G (Rüchel, 1986). Daneben sind sie auch an der Zerstörung von Wirtsstrukturen beteiligt und werden daher auch im Zusammenhang mit der Penetration und Invasion von Wirtsbarrieren diskutiert (Colina *et al.*, 1996; Morschhäuser *et al.*, 1997).

Obwohl sich die bislang näher untersuchten SAPs in ihrer breiten Substratverwertbarkeit *in vitro* ähnlich sind, könnten Wirtssubstratspezifitäten sowie leicht unterschiedliche pH-Optima und Temperaturstabilitäten zu individuellen Aufgaben während des Infektionsverlaufs beitragen. Diese Vermutung wird auch durch die Beobachtung gestützt, dass die *SAP*-Gene *in vitro* differentiell reguliert werden (Hube *et al.*, 1994). Die Gene *SAP1-SAP6* sind auf DNA-Ebene untereinander eng verwandt, lassen sich aber zusätzlich in die Untergruppen *SAP1-SAP3* bzw. *SAP4-SAP6* einordnen (Hube, 1996). Die Expression des *SAP1*-Gens wurde hauptsächlich in dem Stamm WO-1 nachgewiesen, und zwar im Zusammenhang mit dem Phänomen des phänotypischen switching, einem reversiblen Vorgang, bei dem *in vitro* die Oberfläche der Kolonien je nach Phänotyp „white“ bzw. „opaque“ erscheint. Dabei fiel auf, dass opaque-Zellen *SAP1* exprimierten, white-Zellen dagegen nicht. Unter Bedingungen, die eine *SAP2*-Sekretion induzierten, d.h. Medien mit saurem pH-Wert und einem Protein als alleiniger Stickstoffquelle, konnte bei diesem Stamm in opaque-Zellen neben *SAP2* auch die Expression von *SAP3* beobachtet werden (White and Agabian, 1995). Die Aktivierung der Isogene *SAP4-SAP6* konnte bislang nur in *C. albicans*-Zellen beobachtet werden, die bei neutralem pH-Wert von der Hefe- in die Hyphenphase wechselten, z.B. während der Keimschlauchinduktion bei 37°C in Gegenwart von Serum (Hube *et al.*, 1994). Die Beobachtungen zur differentiellen *in vitro*-Aktivierung der *SAP*-Gene lassen vermuten, dass

die individuellen Proteasen auch während der Infektion spezifisch von dem Erreger eingesetzt werden.

Um die Bedeutung eines putativen Virulenzfaktors eines Erregers näher zu charakterisieren, werden gewöhnlich Mutanten hergestellt, die im Tiermodell auf ihr Verhalten während der Infektion untersucht werden. Auf diese Weise ließen experimentelle Infektionen mit chemisch induzierten Proteolyse-negativen Mutanten den *C. albicans*-Proteasen bereits einen Beitrag zum Infektionsgeschehen zuschreiben. Da in diesen Stämmen jedoch unspezifische Mutationen mit Einfluß auf die Virulenz nicht auszuschließen waren, wurden später unter Kenntnis der *SAP*-Genfamilie Stämme mit spezifischen *SAP*-Mutationen konstruiert (Hube *et al.*, 1997; Sanglard *et al.*, 1997). Obwohl Mutanten in den Genen *SAP1*, *SAP2*, *SAP3* und *SAP4-SAP6* in Tiermodellen mehr oder weniger in ihrer Virulenz attenuiert waren, konnte den individuellen Isoenzymen ein Beitrag am Krankheitsverlauf aber nicht eindeutig zugewiesen werden. Während der Interaktion mit rekonstituiertem humanen Epithel konnte interessanterweise auf Transkriptionsebene ein unterschiedliches Expressionsmuster der *SAP*-Gene in den verschiedenen Mutanten nachgewiesen werden, so dass vermutet wurde, dass auch unter *in vivo*-Bedingungen das Verhalten dieser Stämme durch kompensatorische Expression anderer Gene der *SAP*-Familie beeinflusst werden könnte (Schaller *et al.*, 1999a). Ähnliche Effekte wurden auch bei der Analyse von Mutanten in *Aspergillus flavus* beobachtet, nachdem die Inaktivierung eines Gens für eine Serin-Protease zu einer Expression einer Metallo-Protease führte (Ramesh and Kolattukudy, 1996). Aufgrund der hohen Homologie der Proteasegene ist in *SAP*-Mutanten eine kompensatorische Induktion von Genen, die unter entsprechenden Bedingungen normalerweise nicht exprimiert werden, durchaus denkbar. Darüberhinaus muß berücksichtigt werden, dass vermutlich nicht nur eine der Proteasen als dominanter Virulenzfaktor in Frage kommt, sondern eher das Zusammenspiel der einzelnen Isoenzyme für den Krankheitsverlauf entscheidend ist.

Ein Hinweis auf die Bedeutung eines Virulenzgens für die Pathogenität eines Erregers kann auch durch den Nachweis seiner Expression während der Infektion erhalten werden. Dies trifft besonders auf solche Gene zu, die nur *in vivo* induziert werden. Eine Analyse der individuellen Mitglieder der Proteasegene in *C. albicans* bietet sich an, zumal sie *in vitro* nur unter besonderen Wachstumsbedingungen angeschaltet werden, bzw. von bestimmten Genen eine Expression überhaupt nicht nachgewiesen werden konnte (Hube *et al.*, 1994). Erster Beweis für eine *in vivo*-Sekretion der Protease gelang MacDonald und Odds (1980) durch indirekte Immunfluoreszenz während einer experimentellen Mausinfektion. *SAP*-Antigene ließen sich aber auch in Material von Patienten mit oropharyngealer Candidiasis bzw.

Vaginitis identifizieren (Schaller *et al.*, 1999b; De Bernardis *et al.*, 1999). Aufgrund der Kreuzreaktion der verwendeten Antikörper mit den verschiedenen SAP-Antigenen war jedoch eine Beurteilung der Bedeutung der individuellen Proteasen immunchemisch bislang nicht möglich. Eine *SAP*-Genexpression konnte kürzlich auch durch eine Reverse Transkription (RT)-PCR-Strategie im Speichel von symptomatisch Erkrankten und asymptomatischen Trägern detektiert werden (Naglik *et al.*, 1999). Doch trotz des Nachweises der Proteasebildung während der Infektion erscheinen Beitrag und Regulation der individuellen *SAP*-Gene, insbesondere während der systemischen Infektion, noch unklar. Aus diesem Grund sollten entsprechende Analysen mit geeigneten Reportersystemen zur Aufklärung der Bedeutung der Proteasen für die Pathogenität von *C. albicans* beitragen.

### 2.3 Genexpressionsanalyse durch Reportersysteme

Um einen tieferen Einblick in regulatorische Mechanismen biologischer Systeme zu gewinnen, wurden Reportersysteme entwickelt, die eine *in vivo*-Genexpressionsanalyse ermöglichen (Kilby *et al.*, 1993; Chiang *et al.*, 1999). Diese Strategien konnten in unterschiedlichsten Organismen wie z.B. Bakterien, Pflanzen, Fliegen und Säugetieren zur Klärung verschiedener Fragestellungen beitragen. Für die Pathogenitätsanalyse von Mikroorganismen interessieren dabei insbesondere spezifische Genexpressionsmuster während der Auseinandersetzung eines Erregers mit seinem Wirt während der Infektion.

#### ***In vivo*-Expressionstechnologie (IVET)**

Die *in vivo*-Expressionstechnologie beruht auf einer Selektion von Genen eines Mikroorganismus, die spezifisch während der Erreger-Wirts-Auseinandersetzung aktiviert werden. Dies scheint sinnvoll, da solche Gene möglicherweise für die Pathogenität des Erregers von großer Bedeutung sein könnten. In dem Pflanzenpathogen *Xanthomonas campestris* konnten bereits 1987 mit einer Genbank von *X. campestris*-DNA-Fusionen mit einem promotorlosen Chloramphenicol-Resistenzgen wirtsinduzierte Gene identifiziert werden (Osbourn *et al.*, 1987). In diesem Versuch wurden Klone selektioniert, die in Antibiotika-behandelten Rübensämlingen Krankheitssymptome hervorriefen, *in vitro* jedoch gegen das Antibiotikum sensitiv waren. Ebenfalls durch Antibiotika-Selektion wurden auch in humanpathogenen Bakterien wie *Salmonella typhimurium* und *Yersinia enterocolitica* neben bereits beschriebenen auch unbekannte Virulenzfaktoren identifiziert (Mahan *et al.*, 1995;



Young and Miller, 1997). Eine andere Möglichkeit der positiven Selektion beruht auf der Verwendung von auxotrophen Stämmen. Als Selektionsmarker dient hier ein promotorloses, für das Wachstum der Zellen notwendiges Gen, das mit partiell gespaltener DNA des Mikroorganismus fusioniert wird. Während der Infektion mit einem Gemisch solcher Genbankklone können dann nur diejenigen überleben, die wirtsinduzierte Promotoren enthalten. Auf diese Weise konnten Virulenzfaktoren von humanpathogenen Erregern wie z.B. *S. typhimurium* und *Pseudomonas aeruginosa* entdeckt werden, deren Bedeutung durch Insertionsmutagenese anschließend bestätigt wurde (Mahan *et al.*, 1993; Wang *et al.*, 1996). Eine andere vielversprechende Strategie, entwickelt in *S. typhimurium* und als „Differenzielle Fluoreszenzinduktion“ (DFI) bezeichnet, verwendet als Reporter einer Genexpression das „Grünfluoreszierende Protein“ (GFP) der pazifischen Tiefseequalle *Aequorea victoria*. Das GFP wurde bereits zur Aufklärung verschiedenener Fragestellungen in Pro- und Eukaryonten verwendet und ist auch als Reporter einer Genexpression sehr gut geeignet, da es keine Co-Faktoren benötigt und ein GFP-vermitteltes Leuchten auf Einzelzellebene nachweisbar ist (Chalfie *et al.*, 1994). Für die Methode der DFI wurden Fragmente chromosomaler *S. typhimurium*-DNA mit einem promotorlosen *GFP*-Gen in Plasmiden fusioniert und als Genbank in *S. typhimurium* eingeführt. Nach Infektion von Makrophagen konnten dann Klone mit wirtsspezifisch aktivierten Transkriptionsfusionen anhand ihrer Fluoreszenz selektiert werden (Valdivia and Falkow, 1997).

Bei Verwendung der genannten *in vivo*-Expressionstechnologien ist zu bedenken, dass eine positive Selektion spezifisch wirtsinduzierter Gene wahrscheinlich nur dann möglich ist, wenn diese stark und andauernd während der Erreger-Wirts-Auseinandersetzung induziert werden. Vermutlich werden jedoch einige Virulenzgene im Krankheitsverlauf nur vorübergehend in bestimmten Infektionsschritten bzw. Organen exprimiert, so dass entsprechend der Nachweis einer transienten Expression des Reportergens nur schwer möglich ist. Um dieser Anforderung nachzukommen, stellten Camilli *et al.* (1994) für *Vibrio cholerae* eine *in vivo*-Expressionstechnologie vor, deren Reportersystem auf einem irreversiblen genetischen Rekombinationsereignis beruht. Dabei führt eine wirtsspezifische Promotoraktivierung zur Expression des Reportergens *tnpR*, das für die Resolvase codiert, einer site-spezifischen Rekombinase des Transposons  $\gamma\delta$ . Diese Rekombinase katalysiert dann ihrerseits die Exzision eines von den Erkennungssequenzen (*res*) der Rekombinase flankierten Resistenzgens aus dem Genom der entsprechenden Zellen. Als irreversibles genetisches Ereignis weitervererbt, kann somit selbst eine vorübergehende Genaktivierung während einer experimentellen Infektion durch phänotypische Analyse reisolierter Nachkommenklone

nachgewiesen werden. Die Funktionalität dieses *in vivo*-Reportersystems konnte am Beispiel eines Eisen-regulierten Außenmembranproteins von *V. cholerae* gezeigt werden.

### **FLP-Rekombinase**

Site-spezifische Rekombination stellt in der Natur einen vielseitig nutzbaren genetischen Mechanismus dar, bei dem DNA-Elemente an spezifischen Positionen in einem Chromosom neu arrangiert oder auch gezielt in andere DNA-Moleküle eingeführt bzw. aus ihnen herausdeletiert werden können (Kilby *et al.*, 1993). In einigen biologischen Systemen sind site-spezifische Rekombinasen beispielsweise bei der Integration bzw. Exzision von Phagen, der Resolution von Transpositionsintermediaten oder der Kontrolle der Plasmidkopienzahl beteiligt. Bei dem spezifischen Rekombinationsereignis werden die Zielsequenzen der Rekombinasen erkannt, die doppelsträngige DNA präzise geschnitten und mit einer zweiten, ebenfalls geschnittenen Zielsequenz neu verknüpft. Dieser Vorgang ist prinzipiell umkehrbar, da die Zielsequenzen intakt erhalten bleiben. Durch Aminosäuresequenzvergleich lassen sich zwei Familien site-spezifischer Rekombinasen unterscheiden:  $\lambda$ -Integrase- und Tn3-Resolvase-Familie (Stark *et al.*, 1992). Zur  $\lambda$ -Integrase-Familie gehören auch die Rekombinasen FLP der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*, R der Hefe *Zygosaccharomyces rouxii* und Cre des Bakteriophagen P1. Diese drei Rekombinasen wurden bereits in verschiedensten heterologen Organismen zur DNA-Manipulation eingesetzt, da sie für ihre Aktivität keine Zusatzfaktoren benötigen und ihre minimale Erkennungssequenz mit 34 bp höchst unwahrscheinlich zufällig auftritt (Buchholz *et al.*, 1996).

Die FLP (auch „Flip“)-Rekombinase wird durch das natürlich vorkommende zirkuläre 2  $\mu$  Plasmid von *S. cerevisiae* codiert (Broach, 1981). Dieses multicopy-Plasmid enthält zwei FLP-Erkennungssequenzen, sogenannte *FRT* (FLP-recognition target)-sites, die sich auf gegenüberliegenden Seiten des Plasmids innerhalb größerer invertiert orientierter Repeatregionen befinden. Da die Rekombination umgekehrt ausgerichteter *FRT*-sites in einer Inversion des dazwischenliegenden DNA-Segmentes resultiert, ändert sich durch ihre Rekombination die Orientierung der einen Plasmidhälfte zur anderen. Nach einem Modell von Futcher (1986) stellt dieser Vorgang einen Mechanismus zur Plasmid-Amplifikation dar. Danach bedingt eine FLP-vermittelte Inversion einer Plasmidhälfte während der bidirektionalen Replikation des Plasmids auch eine Umkehr der Wanderungsrichtung einer der beiden Replikationsgabeln. Die Replikationsgabeln bewegen sich nun nicht mehr aufeinander zu, sondern wandern in die gleiche Richtung und können so unter kontinuierlicher Replikation multimere Replikationsintermediate bilden. Eine erneute FLP-

Aktivität kann den Vorgang durch Herstellung der ursprünglichen Orientierung wieder abrechen. Das Ergebnis der Rekombination wird prinzipiell durch die Orientierung der Zielsequenzen der Rekombinase bestimmt. Anders als bei einer Inversion resultiert die Rekombination direkt orientierter *FRT*-sites innerhalb eines DNA-Moleküls in einer Deletion des flankierten DNA-Segmentes. Eine Umkehr des Vorgangs, theoretisch zwar möglich, sollte in Reportersystemen nicht zu erwarten sein, da der deletierte Bereich als nicht-replizierendes zirkuläres Molekül verloren geht und zudem eine Exzision als intramolekulares Ereignis gegenüber einer Integration begünstigt ist.

### **Reportersysteme in *C. albicans***

Durch Einführung verschiedener molekularer Techniken wurde die Pathogenitätsanalyse von *C. albicans* in den letzten Jahren zunehmend vorangetrieben (De Backer *et al.*, 2000). Doch trotz etablierter Methoden zur Transformation und der gezielten Geninaktivierung ist die genetische Manipulation dieses Organismus mit Schwierigkeiten verbunden. Dies liegt zum einen daran, dass *C. albicans* ein diploider Organismus ist und die Erzeugung von Mutanten die Inaktivierung beider Allele eines Gens erfordert. Erschwerend kommt hinzu, dass genetische Arbeiten in der Regel auf die Verwendung auxotropher Stämme beschränkt sind, da bislang keine dominanten Selektionsmarker zur Verfügung standen (Fonzi and Irwin, 1993; Morschhäuser *et al.*, 1999; Wirsching *et al.*, 2000b). Ein Grund hierfür besteht darin, dass heterologe Gene in *C. albicans* nicht oder nur ineffizient exprimiert werden (Leuker *et al.*, 1992; Srikantha *et al.*, 1995). Dementsprechend konnten auch nur wenige Reportergene funktionell in *C. albicans* exprimiert werden, so dass auch ein geeignetes Reportersystem für die Untersuchung einer *in vivo*-Genexpression nicht zur Verfügung stand. Für die Schwierigkeit der Expression von Fremdgenen in diesem Organismus scheint ein ungewöhnlicher Codon-Gebrauch verantwortlich zu sein, der in *C. albicans* und den meisten anderen *Candida*-Arten wie z.B. *C. tropicalis* und *C. parapsilosis* beobachtet werden konnte (Sugita and Nakase, 1999). Abweichend vom universalen Codon-Gebrauch wird hier unter Verwendung einer speziellen tRNA das ansonsten als Leucin decodierte CTG-Codon in Serin übersetzt (Santos *et al.*, 1993).

Als erstes heterologes Reportersystem in *C. albicans* wurde die funktionelle Expression des *LAC4*-Gens aus *Kluyveromyces lactis* beschrieben, das für eine  $\beta$ -Galactosidase codiert (Leuker *et al.*, 1992). Allerdings wurde ein phänotypischer Nachweis einer Expression dieses Reporters nur unter Verwendung von multicopy-Plasmiden erzielt. Da diese jedoch in *C. albicans* ohne Selektionsdruck höchst instabil sind und verloren gehen können, sind

Variationen in der Plasmid-Kopienzahl der Zellen einer zu analysierenden Population die Folge (Cannon *et al.*, 1992). Aus diesem Grund wurden andere Reportergene sofern möglich als stabil chromosomal integrierte Einzelkopie eingesetzt. Mit der Expression des Luciferase-Gens *RLUC* aus *Renilla reniformis*, das keine CTG-Codons enthält, wurde ein entsprechendes Reportersystem vorgestellt und seine Verwendbarkeit am Beispiel unterschiedlich regulierter *C. albicans*-Gene demonstriert (Srikantha *et al.*, 1996). Unter Laborbedingungen konnte auch das GFP zum Studium der Genregulation in *C. albicans* verwendet werden (Morschhäuser *et al.*, 1998; Wirsching *et al.*, 2000a; Strauß *et al.*, 2001). Zu seiner funktionellen Expression als stabil chromosomal integrierte Einzelkopie wurde die Sequenz des *GFP*-Gens durch Austausch des einzigen CTG-Codons gegen TTG an den Codon-Gebrauch von *C. albicans* adaptiert. Eine Verwendung dieses Reporters unter *in vivo*-Bedingungen konnte für *C. albicans* allerdings nicht gezeigt werden.

In meiner Diplomarbeit konnte bereits erfolgreich die site-spezifische Rekombinase FLP als zentrales Werkzeug eines Reportersystems in *C. albicans* exprimiert werden, nachdem die DNA-Sequenz des *FLP*-Gens an den ungewöhnlichen Codon-Gebrauch von *C. albicans* angepaßt wurde (*caFLP* = *C. albicans* adapted *FLP*). Mit einem Stamm, der ein von den Erkennungssequenzen der Rekombinase flankiertes DNA-Segment enthält, konnte auch ein FLP-vermitteltes Rekombinationsereignis genotypisch nachgewiesen werden. Um jedoch das Reportersystem für die Analyse einer *in vivo*-Genexpression anwenden zu können, mußte ein Detektionssystem entwickelt werden, das einen einfachen phänotypischen Nachweis des Rekombinationsereignisses erlaubt und dadurch die Analyse einer großen Anzahl von Zellen in einer Population ermöglicht. Zu diesem Zweck sollte ein durch die FLP-Rekombinase aktivierbares *GFP*-Gen verwendet werden. Die Induktion des zu untersuchenden Promotors resultierte in einer Expression der Rekombinase, die nun ihrerseits eine von *FRT*-sites flankierte Transkriptions-Terminationssequenz aus dem Genom deletierte, die zwischen dem *C. albicans*-Aktin-Promotor und dem *GFP*-Gen plazierte wurde. Dies führte zu einer konstitutiven Expression des *GFP*-Gens, so dass entsprechende Zellen bei fluoreszenzmikroskopischer Betrachtung leuchteten. Aufgrund des insgesamt aber schwach ausgeprägten Phänotyps mußte festgestellt werden, dass eine Unterscheidung von induzierten gegenüber nicht-induzierten Zellen äußerst schwierig war. Eine Analyse der Genexpression innerhalb einer Zellpopulation wäre mit diesem Detektionssystem ohnehin kaum möglich gewesen, da jeder Klon gesondert fluoreszenzmikroskopisch überprüft werden müßte.

## 2.4 Zielsetzung dieser Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, bei der opportunistisch humanpathogenen Hefe *C. albicans* die Expression individueller Mitglieder der Familie von Genen, die für sekretorische Aspartylproteasen codieren, während der Infektion zu studieren. Unter Verwendung verschiedener Infektionsmodelle sollte dabei geprüft werden, ob die einzelnen Protease-Isogene in Abhängigkeit des Infektionsverlaufs möglicherweise differentiell und stadienspezifisch in den Pilzzellen reguliert werden. Dadurch sollten Hinweise auf die spezifische Bedeutung der individuellen Isoenzyme während der Infektion erhalten werden. Durch Experimente mit definierten regulatorischen Mutanten sollte darüberhinaus die *in vivo*-Proteasegenexpression in *C. albicans* auch im Zusammenhang mit der Hyphenbildung der Zellen überprüft werden, einer ebenfalls als Virulenzfaktor diskutierten Eigenschaft dieses Erregers. Die Ergebnisse sollten dadurch auch zum Verständnis der komplizierten regulatorischen Zusammenhänge beitragen, die in *C. albicans* auf molekularer Ebene die Koordination verschiedenster Pathogenitätsmerkmale während der komplexen Erreger-Wirts-Interaktion steuern. Um eine *in vivo*-Genexpressionsanalyse vornehmen zu können, sollte zunächst ein praktikables Reportersystem für *C. albicans* analog zu der von Camilli *et al.* beschriebenen IVET-Strategie entwickelt werden.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Verwendete Bakterienstämme und Plasmide

#### 3.1.1 *Escherichia coli* K12-Stamm

Für die Klonierungsarbeiten in *E. coli* diente der Stamm DH5 $\alpha$  (F<sup>-</sup>, *endA1*, *hdsR17* [*r<sub>k</sub>*<sup>-</sup>, *m<sub>k</sub>*<sup>-</sup>], *supE44*, *thi-1*, *recA1*, *gyrA96*, *relA1*,  $\Delta$ [*argF-lac*]U169,  $\lambda$ <sup>-</sup>,  $\phi$ 80*dlacZ* $\Delta$ M15) (Bethesda Research Laboratories, 1986).

#### 3.1.2 Plasmide

Als Klonierungsvektor für die Herstellung der in dieser Arbeit verwendeten Plasmide diente das Plasmid pBluescript (Stratagene, Heidelberg, Germany).

Erklärung der relevanten Abkürzungen (Genbezeichnungen in kursiver Schrift):

*ACT1P*, 3`*ACT1*, *ACT1T*: Promotor, 3`-Bereich bzw. Terminator des Aktin-Gens; *caFLP* bzw. *ecaFLP*: an *C. albicans*-adaptiertes *FLP*-Gen mit den drei CTG-TTG-Austauschen bzw. „enhanced“ *caFLP* mit vier zusätzlichen Mutationen; *FRT*: (FLP-recognition target) minimale Erkennungssequenz der FLP-Rekombinase; *GFP*: Gen des „Grünfluoreszierenden Proteins“; *MPA<sup>R</sup>*: Mycophenolsäure-Resistenzgen; *SAP1-SAP6*: Gene für Sekretorische Aspartylproteasen, *P* = Promotor (für *SAP2* teilweise mit Angabe der Kopienzahl der pentameren Repeats [R1/R2]), 3`= 3`-Bereich; *URA3*: Gen für die Orotidin-5`Phosphat-Decarboxylase, dient als Selektionsmarker in *ura3*<sup>-</sup>-*C. albicans*-Stämmen; bp: Basenpaar; kb: Kilobasenpaare

**Tab. 1** In dieser Arbeit verwendete Plasmide.

<b>Bezeichnung</b>	<b>Relevante Eigenschaften</b>	<b>Referenz</b>
pACT5	3` <i>ACT1</i> -Fragment	Morschhäuser
pAFI3	[ <i>ACT1P-FRT-MPA<sup>R</sup>-FRT-3`ACT1</i> ]-Fragment	Morschhäuser
pFLP1	unverändertes <i>FLP</i> -Gen	Morschhäuser
pFLP6123	<i>caFLP</i> -Gen (drei CTG→TTG-Austausche im <i>FLP</i> -Gen)	Staub P, Diplomarbeit (1997)
pFLPT12	<i>caFLP</i> -Gen mit P2S- und L33S-Mutationen	diese Arbeit
pFLPT123	<i>caFLP</i> -Gen mit P2S-, L33S- und Y108N-Mutationen	diese Arbeit
pFLPT4	<i>caFLP</i> -Gen mit S294P-Mutation	diese Arbeit
pFLPT1234	<i>ecaFLP</i> -Gen = <i>caFLP</i> -Gen mit den vier Mutationen P2S, L33S, Y108N und S294P	diese Arbeit
pGFP26A	Vektor mit deletierter <i>SalI</i> -site im Polylinker, Quelle für ein [ <i>ACT1T-URA3-3`ACT1</i> ]-Fragment	Morschhäuser <i>et al.</i> (1998)
pGFP41	[ <i>SAP2P-GFP-ACT1T-URA3-3`SAP2</i> ]-Fragment; <i>SAP2P</i> stammt aus <i>C. albicans</i> -Stamm 1161, GFP mit CTG-TTG-Austausch an Pos. 626-628 und den drei Aminosäureaustauschen S65A, V68L und S72A	Morschhäuser <i>et al.</i> (1998)
pGFP44	enthält <i>ACT1P</i> -Fragment	Staub P, Diplomarbeit (1997)
pGFP55	[ <i>SAP2P-GFP-ACT1T-URA3-3`SAP2</i> ]-Fragment; <i>SAP2P</i> entspricht <i>SAP2P</i> des Allels <i>SAP2-1</i> ; <i>GFP</i> aus pGFP41	diese Arbeit
pSAP2-1	enthält die codierende Region des Allels <i>SAP2-1</i>	diese Arbeit
pSAP2-2	enthält die codierende Region des Allels <i>SAP2-2</i>	diese Arbeit
pSAP2-4	enthält 5` <i>SAP2-1</i> -Fragment	diese Arbeit
pSAP2-6	enthält 5` <i>SAP2-2</i> -Fragment	diese Arbeit
pSAP2-7	enthält [3` <i>SAP2-1-ACT1T</i> ]-Fragment	diese Arbeit
pSAP2-1K	[ <i>ACT1P-SAP2-1-ACT1T-URA3-3`ACT1</i> ]-Fragment	diese Arbeit
pSAP2-2K	[ <i>ACT1P-SAP2-2-ACT1T-URA3-3`ACT1</i> ]-Fragment	diese Arbeit
pSAP2M1	[ <i>SAP2P-FRT-SAP2P-caFLP-ACT1T-URA3-FRT-3`CDR4</i> ]-Fragment	diese Arbeit

<b>Bezeichnung</b>	<b>Relevante Eigenschaften</b>	<b>Referenz</b>
pSAP2M2	[ <i>SAP2P-FRT-SAP2P-caFLP-ACT1T-URA3-FRT-3`SAP2</i> ]-Fragment	diese Arbeit
pSAP2PFIA	[ <i>SAP2-1P</i> ]-Fragment der <i>SAP2P-caFLP</i> -Fusion des <i>C. albicans</i> -Stammes S2FI1A mit der Repeatstruktur 4/6	diese Arbeit
pSAP2PFID	[ <i>SAP2P</i> ]-Fragment der <i>SAP2P-caFLP</i> -Fusion des <i>C. albicans</i> -Stammes S2FI1D mit der Repeatstruktur 4/5	diese Arbeit
pSAP2PΔR2	[ <i>SAP2P</i> ]-Fragment mit der Repeatstruktur 4/4	diese Arbeit
pSFL11	[ <i>SAP2P-caFLP-ACT1T-URA3-3`SAP1</i> ]-Fragment	diese Arbeit
pSFL12	[ <i>SAP1P-caFLP-ACT1T-URA3-3`SAP1</i> ]-Fragment	diese Arbeit
pSFL13	[ <i>SAP1P-ecaFLP-ACT1T-URA3-3`SAP1</i> ]-Fragment	diese Arbeit
pSFL26	[ <i>SAP2P-caFLP-ACT1T-URA3-3`SAP2</i> ]-Fragment; <i>SAP2P</i> stammt aus <i>C. albicans</i> -Stamm 1161	diese Arbeit
pSFL27	entspricht pSFL26, nur dass hier die <i>SalI</i> -site im Polylinker deletiert wurde	diese Arbeit
pSFL28	[ <i>SAP2P-URA3-3`SAP2</i> ]-Fragment	diese Arbeit
pSFL29	[ <i>SAP2P-caFLP-ACT1T-URA3-3`SAP2</i> ]-Fragment; <i>SAP2P</i> entspricht <i>SAP2P</i> des Allels <i>SAP2-1</i> mit Repeatstruktur 4/6	diese Arbeit
pSFL210	[ <i>SAP2P-caFLP-ACT1T-URA3-3`SAP2</i> ]-Fragment; <i>SAP2P</i> mit Repeatstruktur 4/4	diese Arbeit
pSFL212	[ <i>SAP2P-caFLP-ACT1T-URA3-3`SAP2</i> ]-Fragment; <i>caFLP</i> enthält die drei Mutationen P2S(T1), L33S(T2), Y108N(T4)	diese Arbeit
pSFL213	[ <i>SAP2P-ecaFLP-ACT1T-URA3-3`SAP2</i> ]-Fragment; <i>SAP2P</i> entspricht <i>SAP2P</i> des Allels <i>SAP2-1</i> mit Repeatstruktur 4/6	diese Arbeit
pSFL214	[ <i>SAP2P-caFLP-ACT1T-URA3-3`SAP2</i> ]-Fragment; <i>SAP2P</i> mit Repeatstruktur 5/6	diese Arbeit
pSFL215	[ <i>SAP2P-ecaFLP-ACT1T-URA3-3`SAP2</i> ]-Fragment; <i>SAP2P</i> entspricht <i>SAP2P</i> des Allels <i>SAP2-2</i> mit Repeatstruktur 5/5	diese Arbeit
pSFL31	[ <i>SAP2P-caFLP-ACT1T-URA3-3`SAP3</i> ]-Fragment	diese Arbeit
pSFL32	[ <i>SAP3P-caFLP-ACT1T-URA3-3`SAP3</i> ]-Fragment	diese Arbeit
pSFL33	[ <i>SAP3P-ecaFLP-ACT1T-URA3-3`SAP3</i> ]-Fragment	diese Arbeit
pSFL41	[ <i>SAP2P-caFLP-ACT1T-URA3-3`SAP4</i> ]-Fragment	diese Arbeit
pSFL42	[ <i>SAP4P-caFLP-ACT1T-URA3-3`SAP4</i> ]-Fragment	diese Arbeit
pSFL43	[ <i>SAP4P-ecaFLP-ACT1T-URA3-3`SAP4</i> ]-Fragment	diese Arbeit



<b>Bezeichnung</b>	<b>Relevante Eigenschaften</b>	<b>Referenz</b>
pSFL51	[SAP2P- <i>caFLP-ACT1T-URA3-3`SAP5</i> ]-Fragment	diese Arbeit
pSFL52	[SAP5P- <i>caFLP-ACT1T-URA3-3`SAP5</i> ]-Fragment	diese Arbeit
pSFL53	[SAP5P- <i>ecaFLP-ACT1T-URA3-3`SAP5</i> ]-Fragment	diese Arbeit
pSFL61	[SAP2P- <i>caFLP-ACT1T-URA3-3`SAP6</i> ]-Fragment	diese Arbeit
pSFL62	[SAP6P- <i>caFLP-ACT1T-URA3-3`SAP6</i> ]-Fragment	diese Arbeit
pSFL63	[SAP6P- <i>ecaFLP-ACT1T-URA3-3`SAP6</i> ]-Fragment	diese Arbeit
pSFUC2	Quelle für den <i>URA3</i> -Flipper: [ <i>FRT-SAP2P-caFLP-ACT1T-URA3-FRT</i> ]	Morschhäuser <i>et al.</i> (1999)

### 3.2 Verwendete *Candida albicans*-Stämme

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

<b>Stamm</b>	<b>Ausgangs- stamm</b>	<b>Genotyp</b>	<b>Referenz</b>
CAI4	SC5314	$\Delta$ <i>ura3::imm434/</i> $\Delta$ <i>ura3::imm434</i>	Fonzi and Irwin (1993)
CAG55A	CAI4	<i>SAP2-1/sap2-2::P<sub>sap2-1</sub>(4/6)-GFP-ACT1T-URA3</i>	diese Arbeit
CAG55B	CAI4	<i>sap2-1::P<sub>sap2-1</sub>(4/6)::GFP-ACT1T-URA3/SAP2-2</i>	diese Arbeit
CAG55E	CAI4	<i>SAP2-1/sap2-2::P<sub>sap2-2</sub>(5/5)-GFP-ACT1T-URA3</i>	diese Arbeit
CAG551A	SAP2M2A	<i>sap2-1::P<sub>sap2-1</sub>(4/6)::GFP-ACT1T-URA3/sap2-2::FRT</i>	diese Arbeit
CAG551D1	SAP2M2D	<i>sap2-1::FRT/sap2-2::P<sub>sap2-1</sub>(4/6)::GFP-ACT1T-URA3</i>	diese Arbeit
CAG551D4	SAP2M2D	<i>sap2-1::FRT/sap2-2::P<sub>sap2-2</sub>(5/5)::GFP-ACT1T-URA3</i>	diese Arbeit
C2S2F1A	CFI2	<i>sap2-1::P<sub>sap2-1</sub>(4/6)::ecaFLP-ACT1T-URA3/SAP2-2</i>	diese Arbeit

<b>Stamm</b>	<b>Ausgangs- stamm</b>	<b>Genotyp</b>	<b>Referenz</b>
C2S2F1B	CFI2	<i>sap2-1::P<sub>sap2-1</sub>(4/6)::ecaFLP-ACTIT-URA3/SAP2-2</i>	diese Arbeit
C2S5F1A	CFI2	<i>sap5-1::P<sub>SAP5</sub>-ecaFLP-ACTIT-URA3/SAP5-2</i>	diese Arbeit
C2S5F1B	CFI2	<i>sap5-1::P<sub>SAP5</sub>-ecaFLP-ACTIT-URA3/SAP5-2</i>	diese Arbeit
C3S2F1D	CFI3	<i>sap2-1::P<sub>sap2-1</sub>(4/6)::ecaFLP-ACTIT-URA3/SAP2-2</i>	diese Arbeit
C3S2F1E	CFI3	<i>sap2-1::P<sub>sap2-1</sub>(4/6)::ecaFLP-ACTIT-URA3/SAP2-2</i>	diese Arbeit
C3S5F1A	CFI3	<i>SAP5-1/sap5-2::P<sub>SAP5</sub>-ecaFLP-ACTIT-URA3</i>	diese Arbeit
C3S5F1B	CFI3	<i>sap5-1::P<sub>SAP5</sub>-ecaFLP-ACTIT-URA3/SAP5-2</i>	diese Arbeit
C4S2F1B	CFI4	<i>sap2-1::P<sub>sap2-1</sub>(4/6)::ecaFLP-ACTIT-URA3/SAP2-2</i>	diese Arbeit
C4S2F1C	CFI4	<i>sap2-1::P<sub>sap2-1</sub>(4/6)::ecaFLP-ACTIT-URA3/SAP2-2</i>	diese Arbeit
C4S5F1A	CFI4	<i>SAP5-1/sap5-2::P<sub>SAP5</sub>-ecaFLP-ACTIT-URA3</i>	diese Arbeit
C4S5F1B	CFI4	<i>sap5-1::P<sub>SAP5</sub>-ecaFLP-ACTIT-URA3/SAP5-2</i>	diese Arbeit
CFI1	CAI4	<i>ACT1/act1::FRT-MPA<sup>R</sup>-FRT</i>	diese Arbeit
CFI2	JKC18	<i>ACT1/act1::FRT-MPA<sup>R</sup>-FRT</i>	diese Arbeit
CFI3	HLC67	<i>ACT1/act1::FRT-MPA<sup>R</sup>-FRT</i>	diese Arbeit
CFI4	HLC69	<i>ACT1/act1::FRT-MPA<sup>R</sup>-FRT</i>	diese Arbeit
HLC67	CAI4	<i>efg1::hisG/efg1::hisG</i>	Lo <i>et al.</i> (1997)
HLC69	CAI4	<i>cph1::hisG/cph1::hisG, efg1::hisG/efg1::hisG</i>	Lo <i>et al.</i> (1997)
JKC18	CAI4	<i>cph1::hisG/cph1::hisG</i>	Liu <i>et al.</i> (1994)
S1FI2A	CFI1	<i>SAP1-1/sap1-2::P<sub>SAP1</sub>-ecaFLP-ACTIT-URA3</i>	diese Arbeit
S1FI2B	CFI1	<i>sap1-1::P<sub>SAP1</sub>-ecaFLP-ACTIT-URA3/SAP1-2</i>	diese Arbeit
S2FI1A	CFI1	<i>sap2-1::P<sub>sap2-1</sub>(4/6)::caFLP-ACTIT-URA3/SAP2-2</i>	diese Arbeit
S2FI1 <sup>S</sup>	S2FI1A	<i>ACT1/act1::FRT</i>	diese Arbeit

<b>Stamm</b>	<b>Ausgangs- stamm</b>	<b>Genotyp</b>	<b>Referenz</b>
S2FI1D	CFI1	<i>sap2-1::P<sub>sap2</sub>(4/5)::caFLP-ACT1T-URA3/SAP2-2</i>	diese Arbeit
S2FI2	CFI1	<i>sap2-1::P<sub>sap2</sub>(4/4)::caFLP-ACT1T-URA3/SAP2-2</i>	diese Arbeit
S2FI3A	CFI1	<i>SAP2-1/sap2-2::P<sub>sap2-1</sub>(4/6)::caFLP-ACT1T-URA3</i>	diese Arbeit
S2FI3B	CFI1	<i>SAP2-1/sap2-2::P<sub>sap2-2</sub>(5/5)::caFLP-ACT1T-URA3</i>	diese Arbeit
S2FI4A	CFI1	<i>SAP2-1/sap2-2::P<sub>sap2</sub>(5/6)::caFLP-ACT1T-URA3</i>	diese Arbeit
S2FI4B	CFI1	<i>sap2-1::P<sub>sap2</sub>(5/6)::caFLP-ACT1T-URA3/SAP2-2</i>	diese Arbeit
S2FI5B	CFI1	<i>sap2-1::P<sub>sap2-1</sub>(4/6)::ecaFLP-ACT1T-URA3/SAP2-2</i>	diese Arbeit
S2FI5G	CFI1	<i>SAP2-1/sap2-2::P<sub>sap2-1</sub>(4/6)::ecaFLP-ACT1T-URA3</i>	diese Arbeit
S2FI6A	CFI1	<i>sap2-1::P<sub>sap2-1</sub>(4/6)::caFLP-ACT1T-URA3/sap2-2::FRT</i>	diese Arbeit
S2FI7A	CFI1	<i>SAP2-1/sap2-2::P<sub>sap2-2</sub>(5/5)::ecaFLP-ACT1T-URA3</i>	diese Arbeit
S2UI1A	CFI1	<i>sap2::URA3/SAP2</i>	diese Arbeit
S3FI2B	CFI1	<i>SAP3/sap3::P<sub>SAP3</sub>-ecaFLP-ACT1T-URA3</i>	diese Arbeit
S3FI2C	CFI1	<i>SAP3/sap3::P<sub>SAP3</sub>-ecaFLP-ACT1T-URA3</i>	diese Arbeit
S4FI2A	CFI1	<i>SAP4-1/sap4-2::P<sub>SAP4</sub>-ecaFLP-ACT1T-URA3</i>	diese Arbeit
S4FI2B	CFI1	<i>sap4-1::P<sub>SAP4</sub>-ecaFLP-ACT1T-URA3/SAP4-2</i>	diese Arbeit
S5FI2A	CFI1	<i>sap5-1::P<sub>SAP5</sub>-ecaFLP-ACT1T-URA3/SAP5-2</i>	diese Arbeit
S5FI2B	CFI1	<i>SAP5-1/sap5-2::P<sub>SAP5</sub>-ecaFLP-ACT1T-URA3</i>	diese Arbeit
S6FI2A	CFI1	<i>SAP6/sap6::P<sub>SAP6</sub>-ecaFLP-ACT1T-URA3</i>	diese Arbeit
S6FI2B	CFI1	<i>SAP6/sap6::P<sub>SAP6</sub>-ecaFLP-ACT1T-URA3</i>	diese Arbeit
SAP2K1	SAP2M4A	<i>ACT1/act1::P<sub>ACT1</sub>-SAP2-1-ACT1T</i>	diese Arbeit
SAP2K2	SAP2M4A	<i>ACT1/act1::P<sub>ACT1</sub>-SAP2-2-ACT1T</i>	diese Arbeit

<b>Stamm</b>	<b>Ausgangs- stamm</b>	<b>Genotyp</b>	<b>Referenz</b>
SAP2M1A	CFI1	<i>SAP2-1/sap2-2::FRT-SAP2P-caFLP-ACTIT-URA3-FRT</i>	diese Arbeit
SAP2M1D	CFI1	<i>sap2-1::FRT-SAP2P-caFLP-ACTIT-URA3-FRT/SAP2-2</i>	diese Arbeit
SAP2M2A	SAP2M1A	<i>SAP2-1/sap2-2::FRT</i>	diese Arbeit
SAP2M2D	SAP2M1D	<i>sap2-1::FRT/SAP2-2</i>	diese Arbeit
SAP2M3A	SAP2M2A	<i>sap2-1::FRT-SAP2P-caFLP-ACTIT-URA3-FRT/sap2-2::FRT</i>	diese Arbeit
SAP2M4A	SAP2M3A	<i>sap2-1::FRT/sap2-2::FRT</i>	diese Arbeit
SC5314		wildtypisch	Gillum <i>et al.</i> (1984)

### 3.3 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide (Tab. 3) wurden von den Firmen MWG und ARK bezogen. Erkennungssequenzen von Restriktionsendonukleasen sind mit fettgedruckten Buchstaben eingetragen, Nukleotidsubstitutionen für die Einführung von Restriktionsschnittstellen bzw. zur site-spezifischen Mutagenese sind unterstrichen.  $T_A$  bezeichnet die Annealing-Temperatur bei der PCR bzw. der Sequenzierreaktion.

**Tab. 3** In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide.

<b>Bezeichnung</b>	<b>Nukleotidzahl</b>	<b><math>T_A</math> (°C)</b>	<b>Sequenz (5' → 3')</b>
ACT3	24	55	CAGCAATACCG <u>CG</u> GGAACATGGTAG
ACT4	25	59	CCAAGAGCTGCAGTCCCATCTCTTG
ACT10	33	50	AGAGAGTCGACATTTTATGATGGAATGAATGGG
ACT16	28	52	TTCTAAGATCTAAATTCTGGAAATCTGG

Bezeichnung	Nukleotidzahl	T <sub>A</sub> (°C)	Sequenz (5' → 3')
FLP9	20	56	CGAACAAGCACCTTAGGTGG
FLP12	23	48	CAGCAGCACATGATGCTATTTTC
FLP13	20	48	AACTAACCTATTTATGTTGG
FLP14	39	48	TCGAGGTCGACAAAATGTCACAATTTGATATATTATG TA
FLP15	38	48	ATCAGATTGATGTTTTTGTCCATTGTAAGGAATAATTG
FLP16	42	48	CAATAAAGCTTTGAAGAAAATGCTCCTTATCCAATC TTTGC
GFP7	20	50	ACAAGTGTTGGCCATGGAAC
IPCR1	29	50	TGTGTGTCGACAATGGTGATGTCTAGTGG
SAP1C	25	50	GTTATGCTGCAGACATCACTATTGG
SAP1D	25	50	GACCGTTAGCGGAGCTCAACGGAGC
SAP1P1	27	48	GGTTACGGAAAATCTAGAAGATGGCCC
SAP1RB	29	48	TGTGTGTCGACTTAGAAATGGAAGAGTGA
SAP22	26	52	ACTTTCACTTCTAGATTTTTGCAAGC
SAP23	26	48	TTTAATTTTAACTTTATCAATTATAG
SAP24	28	52	TTGATTTGAATTGAATTGAATGAAATGC
SAP27	19	53	CAACCCACTAGACATCACC
SAP28	19	51	TTTATTCCACCCCTTCATC
SAP2C	23	55	AAGGGGACATAGGATCCAAGTGG
SAP2K	39	50	ATCACGAATTCAAAATGTTTTTAAAGAATATTTTCATT G
SAP2L	29	50	CCCCTAGATCTTAGGTCAAGGCAGAAATA
SAP3C	27	50	TGATTCTGCAGTTTCATGTCAAGCTGG
SAP3D	28	50	TATAGGCTGAGCTCAAGAAATTATCACC
SAP3P1	22	50	CATTGTTATCTAGACGTGGTGG
SAP3P2	34	50	AACATGTCGACTATATATGTGTATGTGTGTGTGG
SAP4C	28	50	CGGTTCCATTCTGCAGCTGCTTCTAGC

Bezeichnung	Nukleotidzahl	T <sub>A</sub> (°C)	Sequenz (5' → 3')
SAP4D	26	50	GAGCCATGGAG <u>CT</u> CTTTCTATCATCC
SAP4P1	25	50	CGGGAAGG <u>CT</u> CTAGAATGTATACCC
SAP4P2	32	50	AACATG <u>TCGACT</u> TTGAGTTGAACTTTGGATTAG
SAP5C	30	50	ACCTG <u>CTGCAG</u> TTACTTTGCACAATGAAGC
SAP5D	27	50	GGAACGGAG <u>CT</u> CTTGAGGTTATTACCA
SAP5P3	29	50	GTATAAATGCT <u>CT</u> AGAATTCTGTTTGGCG
SAP5P2	32	50	ACATTG <u>TCGACT</u> TTGAGCTTAACTTTGGATTAG
SAP6C	28	50	CCCGTCGATGATACTG <u>CAG</u> AAATGTAGG
SAP6D	27	50	AAGCAGGAACGGAG <u>CT</u> CTTGAGGTTTT
SAP6P1	25	50	TCTCGGGAGG <u>CT</u> CTAGAATGTATCA
SAP6P2	32	50	ACATTG <u>TCGACT</u> TTGAGCTTAACTTTAGATTAG

Herkunft der DNA-Sequenzen (accession-number der publizierten Sequenz bzw. verantwortliche Personen):

*ACT1* (X16377); *FLP* (J01347); *GFP* (M62653); *SAP1P* (L12451); *SAP1* (X56867); *SAP2* (M83663); *SAP3P* wurde in einer *C. albicans*-Genbank (K. Scherer, Acacia, Biosciences, Richmond, CA, USA) identifiziert, die DNA-Sequenz anschließend abgeleitet aus der *CDR1*-downstream-Sequenz (X77589); *SAP3* (L22358); *SAP4P*, *SAP5P*, *SAP6P* (K. Schröppel, Institut für Klinische Mikrobiologie und Immunologie, Erlangen); *SAP4* (L25388); *SAP5* (Z30191); *SAP6* (Z30192); *URA3* (X14198);

### 3.4 Geräte und Chemikalien

Die Hersteller bzw. Vertreiber von benötigten Chemikalien sind an geeigneter Stelle im Methodenteil angegeben, die der Geräte in der folgenden Tabelle (Tab. 4). Alle nicht erwähnten Geräte, Chemikalien und sonstigen Materialien wurden von den Firmen Amersham, Biometra, Boehringer, Difco, Eppendorf, Gibco, Gilson, Greiner, Merck, MWG, Oxoid, Pharmacia, Roth, Serva und Sigma bezogen.

**Tab. 4** In dieser Arbeit benötigte Geräte.

Gerät	Hersteller bzw. Anbieter
Brutschränke für <i>E. coli</i> (37°C) (Typ B6200) für <i>C. albicans</i> (30°C) (Modell 400)	Heraeus Memmert
Elektrophoresekammern Agarosegele (DNA Sub Cell/GNA 100) Polyacrylamidgele (Mini Protean3) Agarose-Formaldehyd-Gele	Bio-Rad/Pharmacia Bio-Rad Fröbel
Elektroporationsgerät (Easyject prima)	Equibio
Farbvideokamera (Seascan) für mikroskopische Aufnahmen	Intas
Fluoreszenzmikroskop (Zeiss MC80, Axiolab Fluoreszenz, ausgestattet Quecksilber-Kurzbogenlampe HB050 und Zeiss Fluorescein-spezifischem Filter-Set 09)	Zeiss
Geldokumentationsanlage	Bio-Rad
Hybridisierungsöfen (Mini 10)	MWG
Photometer (Unicam Ultrospec 3000)	Pharmacia
Schüttelinkubatoren für <i>E. coli</i> (37°C) Innova 4300 für <i>C. albicans</i> (30°C) Innova 4230	New Brunswick Scientific
Thermocycler (Progene)	Techne
UV-Crosslinker (GS Gene linker)	Bio-Rad
Zentrifugen Tischzentrifuge (Biofuge 13) Kühlzentrifuge (Megafuge 2.0R)	Heraeus Sepatech

### 3.5 Mikrobiologisch-molekularbiologische Methoden (*E. coli*)

Sofern nicht im Einzelnen beschrieben, wurden molekulargenetische Methoden für die Klonierung von DNA-Fragmenten nach Standardprotokollen durchgeführt (Sambrook *et al.*, 1989). Dazu gehören Phenolisieren von Plasmid-DNA, alkoholische Fällung, Spaltung mit Restriktionsendonukleasen, Phosphorylierung und Ligation von DNA-Fragmenten, sowie

Auffüllen von DNA-Fragmenten mit 5'-überstehenden Enden bzw. Abdauen von DNA-Fragmenten mit 3'-überstehenden Enden.

### 3.5.1 Anzucht der *E. coli*-Stämme

Für die Flüssigkultur wurden *E. coli*-Zellen bei 37°C unter Schütteln (180 rpm) in LB-Medium (1% Pepton aus Casein, 0.5% Hefeextrakt, 0.5% NaCl) über Nacht inkubiert, mit *E. coli*-Zellen beimpfte LB-Agarplatten (1.5% Agar) wurden über Nacht bei 37°C im Inkubator bebrütet. *E. coli*-Stämme, die Plasmide enthalten, wurden unter Selektionsdruck kultiviert (100 µg/ml Ampicillin).

### 3.5.2 Plasmidisolierung

Die Plasmidisolierung aus *E. coli*-Zellen wurde nach einer abgewandelten Methode der alkalischen Lyse (Birnboim and Doly, 1979) durchgeführt. Dabei wurden 1.5 ml einer *E. coli*-über-Nacht-Kultur in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß abzentrifugiert (2 min, 13000 rpm) und das Zell-Pellet für 5 min bei Raumtemperatur in 100 µl Lösung 1 (50 mM Tris/HCl, 10 mM EDTA pH 8.0, 25 mM Tris/HCl pH 7.5) inkubiert. Nach Abkühlen der Suspension auf Eis wurden zunächst 200 µl Lösung 2 (200 mM NaOH, 1% SDS) zugegeben, um nach Mischen und Zugabe von 150 µl Lösung 3 (3 M Na-Ac) den Ansatz für 5 min auf Eis zu inkubieren. Nach Zentrifugation (5 min, 13000 rpm) wurde der wässrige Überstand vom Pellet abgezogen, 1x in 200 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) extrahiert und in 1 ml 100% Ethanol gefällt. Nach Zentrifugation (10 min, 13000 rpm) wurde das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in 50 µl bidest H<sub>2</sub>O aufgenommen (100-200 ng/µl DNA). Für den Abbau der RNA wurden die gelöste Plasmid-DNA (50 µl) 30 min bei 37°C mit 1 µl RNaseA (50 mg/ml) behandelt.

### 3.5.3 Polymerase chain reaction (PCR)

Amplifizierung von bestimmten DNA-Sequenzen wurde nach der Methode von Saiki *et al.* (1988) durchgeführt. Für PCR-Reaktionen wurde der Elongase-Enzym-Mix (Gibco) und die



Pfu-DNA-Polymerase (Promega) verwendet, die beide eine proof-reading-Aktivität aufweisen. Entsprechende Herstellerangaben wurden beachtet. Generell wurden je PCR-Reaktion 30 Amplifikations-Zyklen durchgeführt, wobei jeder Zyklus 1 min Denaturierung bei 95°C, 1 min Primer-Annealing und 1 min Extensionszeit pro kb des zu amplifizierenden DNA-Fragmentes bei 68°C umfaßte (bzw. bei Verwendung der Pfu-Polymerase Extensionszeit 2 min bei 72°C). Anschließend an die Amplifikations-Zyklen wurde ein zusätzlicher Extensionsschritt von 5 min bei 68°C (bzw. 72°C für Pfu-Polymerase) durchgeführt. Die Annealing-Temperaturen der verwendeten Primer sind in Tab. 3 angegeben. Als template wurden in einem 50 µl-PCR-Ansatz 1-2 ng Plasmid-DNA bzw. 0.1-1.0 µg chromosomaler *C. albicans*-DNA sowie je 0.2 mM der Desoxyribonukleotide ATP, CTP, GTP und TTP sowie 10 µl Puffer B des Elongase-Kits bzw. 5 µl des 10x Pfu-Puffers eingesetzt.

### **3.5.4 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen**

Für Spaltungen von Plasmid-DNA wurden ca. 15 units/Restriktionsendonuklease eingesetzt, wobei aber pro Restriktionsansatz die insgesamt zugesetzte Enzymmenge maximal 10% des Gesamtvolumens betrug. Bei einer Temperatur von 37°C wurden Kontrollspaltungen 1-2 h, Spaltungen für präparative Zwecke 4-5 h inkubiert. Dabei wurde beachtet, dass für Kontrollspaltungen in 20 µl-Ansätzen je 4 µl (100-200 ng/µl) Plasmid-DNA, für präparative Zwecke bei Klonierungen in Spaltansätzen von 50 µl Gesamtvolumen je 15 µl Plasmid-DNA für die Spaltung zur anschließenden Gelaufreinigung von Vektoren und 35 µl für die von DNA-Inserts eingesetzt wurden. Für die Herstellung der linearen DNA-Kassetten für die Transformation von *C. albicans*-Zellen wurden in 50 µl-Spaltansätzen je 40 µl Plasmid-DNA für die Spaltung und anschließende Aufreinigung durch Agarose-Gelelektrophorese eingesetzt. PCR-Produkte wurden gespalten, nachdem der entsprechende 50 µl-PCR-Ansatz nach Zugabe von 150 µl bidest H<sub>2</sub>O mit 200 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) extrahiert und für 30 min bei -70°C gefällt (in 400 µl 100% Ethanol mit 40 µl 3 M Na-AC pH 4.8) wurde. Nach Zentrifugation (10 min, 13000 rpm) wurden die PCR-Produkte mit 70% Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und nach Aufnehmen in 40 µl bidest H<sub>2</sub>O in einem 50 µl-Restriktionsansatz gespalten. Als Reaktionspuffer diente ein 10x Spaltpuffer (330 mM Tris-Ac pH 7.9, 660 mM K-Ac, 100 mM Mg-Ac, 5 mM DTT, 0.1% BSA), der in sämtlichen

Restriktionsansätzen als 1x Spaltpuffer eingesetzt wurde. Als DNA-Größenstandard diente für die Agarose-Gelelektrophorese eine 1 kb DNA-Leiter (Gibco).

### 3.5.5 Aufreinigung von DNA durch Agarose-Gelelektrophorese

Restriktions- bzw. PCR-Ansätze wurden mit 1x Auftragepuffer (6x Puffer: 25 mg Bromphenolblau, 25 mg Xylencyanol, 2.5 g Ficoll Typ 400, ad 10 ml dest H<sub>2</sub>O) versetzt, bevor die DNA-Fragmente in 1% Agarosegelen in 1x TAE-Puffer aufgetrennt wurden (50x TAE-Stocklösung: 242 g Tris, 57.1 ml Eisessig, 100 ml 0.5 M EDTA pH 8.0, ad 1 l dest H<sub>2</sub>O). Für die Elution von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen wurde der „Gene Clean Kit“ (Dianova) verwendet. Dabei wurden nach Färben des Gels mit Ethidiumbromid die ausgeschnittenen Gelstücke mit den entsprechenden DNA-Banden während Inkubation bei 50°C in je 400 µl NaJ gelöst, mit 7 µl Glasmilch versetzt und nach Vortexen für 5 min auf Eis inkubiert. Nach 3x Waschen mit je 200 µl der vorgegebenen „New Wash“-Lösung wurde das Pellet in 14 µl bidest H<sub>2</sub>O aufgenommen, der Ansatz für 5 min bei 50°C inkubiert, dann abzentrifugiert (2 min, 13000 rpm), um den wässrigen DNA-haltigen Überstand abzuziehen. Gel-gereinigte, lineare DNA-Fragmente, die als Integrationskassetten bei der Transformation von *C. albicans*-Zellen Verwendung fanden, wurden anstelle in 14 µl bidest H<sub>2</sub>O in nur 6 µl aufgenommen (enthalten ca. 1 µg DNA).

### 3.5.6 Ligation und Transformation von Plasmid-DNA

Die Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen wurde nach der CaCl<sub>2</sub>-Methode durchgeführt. Dazu wurden 0.5 ml einer 10 ml *E. coli* über-Nacht-Kultur in 50 ml frischem LB-Medium verdünnt und für 3-4 h (bis OD<sub>600</sub>= 0.7-0.9) unter Schütteln bei 37°C inkubiert. Die folgenden Schritte wurden bei 4°C bzw. auf Eis durchgeführt: Zentrifugation der Kultur in einem 50 ml Greiner-Röhrchen (10 min, 3000 rpm), Aufnehmen des Pellets in 20 ml 100 mM CaCl<sub>2</sub>, Inkubation der Suspension für 30 min (auf Eis), Zentrifugation des Ansatzes (10 min, 3000 rpm) und Aufnehmen des Pellets in 2.5 ml 100 mM CaCl<sub>2</sub>. Zum Endvolumen werden 15% Glycerin (86%) zugegeben und die Suspension zu je 200 µl in Eppendorf-Reaktionsgefäßen aliquotiert und bei -80°C eingefroren.

Von den eluierten DNA-Fragmenten wurden in Ligationsansätzen zu je 15 µl Gesamtvolumen jeweils 1-2 µl gelgereinigte Vektor-DNA und 5-9 µl Insert-DNA eingesetzt, sowie 3 µl 5x T4-DNA-Ligationspuffer (Gibco) und 1 µl T4-DNA-Ligase (1 u/µl, Gibco). Ligationsansätze

wurden für 3-4 h bei Raumtemperatur inkubiert. Für die Ligation von PCR-Produkten in den Vektor pUC18 des „Sure Clone Ligation Kit“ (Amersham Pharmacia) wurden die Herstellervorschriften beachtet. Die hier eingesetzten PCR-Produkte wurden zuvor phenolisiert, gefällt (siehe hierzu Kapitel 3.5.4) und anschließend nach Aufnahme in 16 µl bidest H<sub>2</sub>O phosphoryliert. Für die Phosphorylierung wurde die DNA mit 2 µl B/K-Puffer, 1 µl Klenow und 1 µl Kinase („Sure clone kit“) bei 37°C für 30 min inkubiert und anschließend durch Agarose-Gelelektrophorese aufgereinigt.

Für die Transformation mittels Hitzeschock wurden 8 µl des Ligationsansatzes mit 200 µl kompetenten *E. coli*-Zellen (auf Eis aufgetaut) vermischt und 30 min auf Eis inkubiert. Nach Hitzeschock (90 s, 42°C), kurzer Inkubation auf Eis (10 s), Zugabe von 1 ml LB-Medium und Inkubation für 1 h bei 37°C wurden die Zellen auf Ampicillin-haltigen Selektions-Agarplatten ausplattiert.

### 3.5.7 DNA-Sequenzierung

DNA-Sequenzierungen für die Überprüfung von Nukleotidsequenzen wurden nach der Kettenabbruch-Methode unter Verwendung von Didesoxynukleotiden durchgeführt (Sanger *et al.*, 1977). Sequenziert wurden *SAP*-Sequenzen, die nach PCR mit 0.1-1.0 µg chromosomaler *C. albicans*-DNA als template erhalten und in Plasmid-Vektoren kloniert wurden. Die Promotoren der wildtypischen *SAP2*-Allele des *C. albicans*-Stammes CA14 wurden mit den Primern *SAP22* und *IPCR1* angereichert, *SAP2*-Promotoren, die in den *C. albicans*-Reporterstämmen das *FLP*- bzw. *GFP*-Gen kontrollieren, spezifisch mit den Primern *SAP22* und *FLP9* bzw. *SAP22* und *GFP7*. Für die Klonierung der *SAP*-Promotoren wurden die PCR-Produkte mit den Restriktionsendonukleasen *Xba*I und *Sal*I gespalten und in das Plasmid pKSII kloniert. *SAP2*-Promotoren wurden von beiden Richtungen mit den fluoreszenzmarkierten Primern *Universal* und *Reverse* überprüft, Promotoren der anderen *SAP*-Gene nach Fusion mit dem *FLP*-Gen mit dem *Reverse*- und dem *FLP9*-Primer. Die durch PCR erhaltenen 3`*SAP*-Sequenzen der spezifischen Reporterfusionen wurden mit dem *Universal*-Primer sequenziert. Sequenzierung der codierenden Regionen der beiden *SAP2*-Allele erfolgte mit den Primern *Universal* und *Reverse* (Pharmacia) nach Klonierung der PCR-Produkte in das Plasmid pUC18.

Als template für die Sequenzierreaktionen diente Plasmid-DNA, die zusätzlich aufgereinigt wurde, indem je 50 µl isolierte, RNase-behandelte Plasmid-DNA mit 150 µl bidest H<sub>2</sub>O

versetzt wurden und anschließend je 1x mit 200 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) und 200 µl Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) extrahiert wurden, dann in einem Ethanol-Na-Ac-Gemisch (400 µl 100% Ethanol mit 40 µl 3 M Na-AC pH 4.8) für 30 min bei -70°C (oder über Nacht bei -20°C) gefällt, nach Zentrifugation (10 min, 13000 rpm) mit 70% Ethanol gewaschen und nach Lufttrocknen in 26 µl bidest H<sub>2</sub>O aufgenommen wurden. Unter Verwendung des „Thermo-Sequenase fluorescent labeled primer cycle sequencing kit with 7-deaza-dGTP“ (RPN 2438) von Amersham wurden für jeden Sequenzierungsansatz, der 1 pmol des fluoreszenzmarkierten (IRD 800) Sequenzier-Primers (MWG) enthielt, 6 µl der gereinigten Plasmid-DNA (entspricht ca. 500 ng) eingesetzt. Sequenzierreaktionen erfolgten in einem Thermocycler, wobei 30 Zyklen der Schritte Denaturierung (30 s, 95°C), Primer-Annealing (30 s, Primer-abhängige Temperatur) und Polymerisation (30 s, 70°C) durchgeführt wurden. Für die Auftrennung der fluoreszenzmarkierten DNA-Produkte in einem Polyacrylamidgel wie auch die Analyse der erhaltenen Daten nach automatischer Sequenzierung diente das Sequenziergerät „LI-COR model 4000 automated sequencer“ (MWG).

### 3.5.8 Site-spezifische Mutagenese

Diese Methode wurde eingesetzt, um vier Mutationen innerhalb der codierenden Region des *caFLP*-Gens einzuführen, um dadurch das *ecaFLP*-Gen herzustellen. In dieser Mutagenese-Prozedur, die auf einer PCR basiert, wurden durch sukzessive Amplifizierungen von Bereichen des *caFLP*-Gens mit Primern, in die jeweils einer der Basenaustausche eingeführt wurde, schrittweise die gewünschten Mutationen eingeführt, die durch anschließende Sequenzierung überprüft wurden. Dabei wurde auch beachtet, dass keine unerwünschten Sequenzveränderungen aufgetreten waren. Durch eine Mutagenese-Prozedur, die auf einer inversen PCR beruht, wurden zwei Kopien der R2-Repeat-Region des *C. albicans*-*SAP2*-Promotors des Allels *SAP2-1* deletiert. Dabei wurde ein gesamtes Plasmid mit einem Paar divergent orientierten phosphorylierten Primern, deren Abstand voneinander in dem zu deletierenden DNA-Bereich bestand, amplifiziert und nach Aufreinigung durch Agarose-Gelelektrophorese religiert. Die DNA-Sequenz des mutierten Promotorbereiches wurde durch Sequenzierung überprüft.

## 3.6 Mikrobiologisch-molekularbiologische Methoden (*C. albicans*)

### 3.6.1 Anzucht der *C. albicans*-Stämme

Im Folgenden werden Medien beschrieben, die für die Anzucht der *C. albicans*-Stämme verwendet wurden. Zur Herstellung entsprechender Agarplatten wurden je 1.5% Agar zugesetzt. Flüssigkulturen wurden bei 30°C in einem Schüttler (250 rpm) inkubiert, beimpfte Agarplatten bei 30°C in einem Brutschrank. Als Vollmedium diente YPD-Medium (2% Pepton aus Casein, 1% Hefe-Extrakt, 2% Glucose); Minimalmedium (0.67% YNB [Yeast Nitrogen Base; BIO 101 Vista, Calif.], 2% Glucose, 100 ml URA-drop out 10x [BIO101]) wurde zur Selektion und Propagation von *URA3*-prototrophen *C. albicans*-Transformanten, mit 100 µg/ml Uridin supplementiertes Minimalmedium zur Anzucht von *ura3*-auxotrophen *C. albicans*-Stämmen verwendet. YCB-BSA-Medium (2.34% YCB [Yeast Carbon Base, Difco], 0.4% BSA (Bovine Serum Albumin, Fraktion V, Gerbu), pH 4.0, ohne oder mit Zusatz von 2% Hefeextrakt) diente zur Induktion des *C. albicans*-*SAP2*-Promotors. Bei der Herstellung von *C. albicans*-Mutanten wurden für die Unterscheidung *ura3*-negativer Derivate von Stämmen, die eine „*URA3*-Flipper-Kassette“ enthielten, entsprechende YCB-BSA-Kulturen auf Minimalagarplatten ausplattiert, die 10 µg/ml Uridin enthalten; auf diesen Platten bilden *URA3*-positive Klone größere Kolonien als *ura3*-negative Klone. Für die Transformation von *ura3*-negativen *C. albicans*-Stämmen bei Verwendung des *MPA<sup>R</sup>*-Gens als Selektionsmarker wurden Minimalagarplatten mit einem Zusatz von 100 µg/ml Uridin und 10 µg/ml Mycophenolsäure verwendet. Als Indikatorplatten innerhalb des etablierten Reportersystems dienten Minimalagarplatten mit Zusatz von 1 µg/ml Mycophenolsäure, auf denen *MPA*-resistente und -sensitive Klone anhand ihrer Koloniegröße unterschieden werden können. Zur Kontrolle wurden *C. albicans*-Kolonien großer bzw. kleiner Koloniegröße in Einzelfällen auch auf Minimalagarplatten überimpft, die 10 µg/ml Mycophenolsäure enthalten und nur Wachstum *MPA*-resistenter Klone erlauben.

### 3.6.2 Genetische Transformation von *C. albicans* durch Elektroporation

In der Regel wurden für die Transformation auxotrophe, *ura3*-negative *C. albicans*-Stämme eingesetzt. Eine Selektion von Klonen nach Elektroporation mit einem DNA-Fragment, das als Selektionsmarker ein intaktes *C. albicans*-*URA3*-Gen enthält, beruht darauf, dass *URA3*-prototrophe Transformanten auf Minimalagarplatten, die kein Uridin enthalten, im Gegensatz zum *ura3*-negativen Ausgangsstamm wachsen können. Bei Transformationen von *ura3*-negativen *C. albicans*-Stämmen mit einem DNA-Fragment, das als Selektionsmarker das *MPA<sup>R</sup>*-Gen enthält, wurden *MPA*-resistente, *ura3*-negative Klone auf Mycophenolsäure- und Uridin-haltigen Minimalagarplatten von nichttransformierten Zellen des Ausgangsstammes selektioniert. Für die Transformation von *C. albicans* wurden stets lineare, durch Agarose-Gelelektrophorese aufgereinigte DNA-Fragmente verwendet. Flankierung dieser Fragmente mit 5'- und 3'-Sequenzen des Zielgens, in dem die Insertion stattfinden soll, ermöglicht eine chromosomale Integration am Zielort durch homologe Rekombination.

Zur Herstellung elektroporationskompetenter *C. albicans*-Zellen wurden 10 ml YPD-Medium (mit 100 µg/ml Uridin) mit einer Kolonie des zu transformierenden *ura3*-negativen *C. albicans*-Stammes beimpft und über Nacht bei 30°C unter Schütteln gezüchtet. Am nächsten Abend wurden von dieser Vorkultur 5 µl abgenommen und in 50 ml frischem YPD-Medium (mit 100 µg/ml Uridin) verdünnt und bei 30°C unter Schütteln weiterkultiviert. Am darauffolgenden Tag sollte die Kultur eine OD<sub>600</sub> von 1.6-2.2 erreicht haben. Zur Kontrolle wurden 100 µl der Kultur auf einer Minimalplatte ausplattiert (ein Wachstum darf nicht stattfinden).

Die Kultur wurde in ein 50 ml-Greiner-Röhrchen überführt und abzentrifugiert (5 min, 4000 rpm, 4°C). Nach Aufnahme des Pellets in 8 ml sterilem bidest H<sub>2</sub>O und Zugabe von je 1 ml 10x TE-Puffer (100 mM Tris-Cl pH 7.5, 10 mM EDTA pH 7.5) und 1 M Lithiumacetat pH 7.5 (mit Essigsäure eingestellt) wurde die Zellsuspension unter leichtem Schütteln für 60 min bei 30°C im Wasserbad inkubiert. Nach Zugabe von 250 µl 1 M DTT wurden die Zellen für weitere 30 min unter leichtem Schütteln bei 30°C weiterinkubiert. Anschließend wurden 40 ml steriles kaltes bidest H<sub>2</sub>O zugegeben und nach Mischen durch Invertieren des Röhrchens wurden die Zellen abzentrifugiert (5 min, 4000 rpm, 4°C). Nach zwei Waschschritten mit 25 ml sterilem kaltem bidest H<sub>2</sub>O bzw. mit 5 ml sterilem kaltem 1 M Sorbitol wurde das Pellet in ca. 100 µl sterilem kaltem 1 M Sorbitol aufgenommen.

Für die Transformation der kompetenten *C. albicans*-Zellen durch Elektroporation wurden 40 µl der Zellsuspension mit 5 µl der linearisierten, gelgereinigten DNA-Integrationskassette

vermischt und in eine auf Eis vorgekühlte Elektroporationsküvette (0.2 cm Durchmesser, Eurogentech) überführt. Die Elektroporation wurde mit dem Elektroporationsgerät bei 1.8 kV durchgeführt. Zur Kontrolle wurde eine Transformation der Zellen mit bidest H<sub>2</sub>O ohne DNA durchgeführt. Nach Verdünnung der Zellen in 1 ml 1 M Sorbitol und Überführen in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß wurden jeweils 100 µl der Suspension auf entsprechenden Selektionsagarplatten ausplattiert, von denen nach 3-5 tägiger (bei Selektion *URA3*-prototropher Klone) bzw. 5-7 tägiger (bei Selektion MPA-resistenter Klone) Inkubation bei 30°C die Transformanten gepickt und auf Selektionsagarplatten überstrichen wurden.

### 3.6.3 Isolierung chromosomaler DNA aus *C. albicans*

Die *C. albicans*-Zellen wurden nach Anzucht bei 30°C unter Schütteln über Nacht in YPD-Medium in ein Greiner-Röhrchen überführt und abzentrifugiert (5 min, 4000 rpm). Nach einem Waschschrift mit 1 ml 1 M Sorbitol wurden die Zellen in ein 2 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und nach Zentrifugation (2 min, 13000 rpm) in 1 ml Lyse-Puffer (1 M Sorbitol, 100 mM Natriumcitrat pH 5.8, 50 mM EDTA pH 8.0, 2% β-Mercaptoethanol, 500 u/ml Lyticase) resuspendiert und für 45 min bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden dann abzentrifugiert (5 min, 13000 rpm), in 800 µl Proteinase-Puffer (10 mM Tris-Cl pH 7.5, 50 mM EDTA pH 7.5, 0.5% SDS, 1 mg/ml Proteinase K) aufgenommen und bei 60°C für 30 min inkubiert. Nach 2x Extraktion mit je 800 µl bzw. 700 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) wurde die DNA in 600 µl Isopropanol ausgefällt und abzentrifugiert (5 min, 13000 rpm). Das DNA-Pellet wurde mit 70% Ethanol gewaschen, der Überstand abgezogen und die DNA kurz luftgetrocknet. Für die RNase-Behandlung wurde die chromosomale DNA in 200 µl TE-Puffer (10 mM Tris-Cl pH 7.5, 1 mM EDTA) gelöst, mit 2 µl RNase A (50 mg/ml) versetzt und für 30 min bei 37°C inkubiert. Die DNA wurde dann je 1x mit 200 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) bzw. mit 200 µl Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) extrahiert, in 200 µl Isopropanol gefällt und abzentrifugiert (5 min, 13000 rpm). Nach Waschen mit 70% Ethanol und Lufttrocknen wurde die chromosomale DNA in 100 µl bidest H<sub>2</sub>O gelöst. Die DNA-Konzentration wurde photometrisch bestimmt (OD<sub>260</sub> von 1.0 entspricht 50 µg/ml).

### 3.6.4 Southern-Hybridisierung

In einem 30 µl Restriktionsansatz wurden 10 µg chromosomale *C. albicans*-DNA über Nacht bei 37°C mit der entsprechenden Restriktionsendonuklease gespalten und auf einem 1% Agarosegel bei 40 V über Nacht in 1x TAE-Laufpuffer (50x TAE-Stocklösung: 242 g Tris, 57.1 ml Eisessig, 100 ml 0.5 M EDTA pH 8.0, ad 1 l dest H<sub>2</sub>O) aufgetrennt. Zur späteren Größenbestimmung der hybridisierenden DNA-Fragmente wurde ein DNA-Größenmarker (1 kb-Leiter, Gibco) mit aufgetragen. Nach Färben des Gels mit Ethidiumbromid wurde das Gel zusammen mit einem Lineal fotografiert. Anschließend wurde die DNA mit einem Vakuum-Blot-Gerät auf eine zuvor für je 30 s mit dest H<sub>2</sub>O bzw. 20x SSC (0.3 M Na-Citrat, 3 M NaCl) behandelte Nylon-Membran (Schleicher und Schuell) transferiert (Southern blot, nach Southern, 1975). Hierfür wurde das Gel unter Vakuum für je 15 min mit folgenden Lösungen nacheinander behandelt: Lösung A (250 mM HCl) zur Depurinierung der DNA, Lösung B (1.5 M NaCl, 0.5 M NaOH) zur Denaturierung der DNA und Lösung C (1.5 M NaCl, 0.5 M Tris-Cl pH 7.5) zur Neutralisierung. Der eigentliche Transfer der DNA auf die Membran erfolgte während 90 min Behandlung des Gels mit 20x SSC. Nach Inkubation der Membran für je 30 s in 0.4 N NaOH bzw. 0.2 M Tris-Cl pH 7.5 wurde die DNA mittels eines UV-Crosslinkers fixiert. Die Membran wurde dann gemäß Herstellervorschrift des „ECL-labeling and detection-Kit“ (Amersham) zunächst während Inkubation bei 42°C in einem Rotationsofen für 1-2 h vorhybridisiert, bevor die markierte Sonde für die Hybridisierung zugegeben wurde. Als Sonde dienten ca. 100 ng eines durch Agarose-Gelelektrophorese gereinigten DNA-Fragmentes. Nach Hybridisierung über Nacht wurde die Membran 3x bei 42°C im Hybridisierungsröhrchen für 1x 20 min und 2x 10 min mit Waschpuffer I (6 M Harnstoff, 0.4% SDS, 0.5x SSC), sowie 2x bei Raumtemperatur in einer Schale mit Waschpuffer 2 (2x SSC) für je 5 min gewaschen. Signaldetektion für 1 min wurde ebenfalls nach Herstellervorschrift durchgeführt. Die ECL-Filme (Amersham Hyperfilm ECL) wurden je nach Signalstärke für 5-90 min exponiert. Vor einer Wiederverwendung wurden die Nylonfilter über Nacht zusammen mit der gebrauchten Detektionslösung in Folie eingeschweißt, um die restlichen Signale zu eliminieren. Vor Rehybridisierung mit einer anderen Sonde wurden die Nylonfilter für 1 min mit 5x SSC gewaschen.



### 3.6.5 Isolierung von Gesamt-RNA aus *C. albicans*

Für die Bestimmung der *SAP2*-Expression von *C. albicans* während des Wachstums unter *SAP2*-induzierenden Bedingungen wurde eine *C. albicans*-YPD über Nacht-Vorkultur 1:200 in 400 ml YCB-BSA-Medium überführt und unter Schütteln bei 30°C weiterkultiviert. Alle 2 h nach Überführen der *C. albicans*-Zellen in dieses Induktionsmedium wurden jeweils 50 ml Kultur für die RNA-Isolierung entnommen. Hierfür wurden die Zellen in ein JA-20- oder Greinerröhrchen überführt und abzentrifugiert (5 min, 4000 rpm, 4°C). Das Pellet wurde in 1 ml dest DEPC-H<sub>2</sub>O (2 ml DEPC/ 1 l dest H<sub>2</sub>O, über Nacht bei 37°C inkubiert, dann autoklaviert) resuspendiert und nach Überführen in ein 2 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß 1 min abzentrifugiert und in 600 µl TES (10 mM TRIS-Cl pH 7.5, 0.1 mM EDTA, 0.5% SDS) aufgenommen. Die Suspension wurde mit 600 µl saurem Phenol versetzt, dann durch Vortexen gemischt und für 60 min bei 65°C inkubiert. Nach Abkühlen für 10 s in Ethanol/Trockeneis bei -70°C wurde der Ansatz 5 min abzentrifugiert, 600 µl der wässrigen Phase abgezogen und mit 600 µl saurem Phenol vermischt. Durch Vortexen wurde die Suspension gemischt, dann 10 s in Ethanol/Trockeneis bei -70°C inkubiert und 5 min abzentrifugiert. Die RNA wurde 2x mit neutralem Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) extrahiert und in einem Ethanol-Na-Ac-Gemisch (1 ml 100% Ethanol mit 40 µl 3 M Na-AC pH 5.2) für 5 min bei -70°C ausgefällt, mit 70% Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in 60-120 µl dest DEPC-H<sub>2</sub>O gelöst. Die RNA-Konzentration wurde photometrisch bestimmt (eine OD von 1.0 entspricht 40 µg/ml RNA).

### 3.6.6 Northern-Hybridisierung

Für die Northern-Hybridisierung (Ausubel *et al.*, 1989, Sambrook *et al.*, 1989) wurde die RNA in einem 1.2% Agarose-Formaldehyd-Gel für 3 h bei 150 V in 1x MOPS-Laufpuffer aufgetrennt. Hierfür wurden je 15 µg RNA in 11.25 µl dest DEPC-H<sub>2</sub>O mit 5 µl 10x MOPS-Puffer, 8.75 µl 37% Formaldehyd und 25 µl deionisiertem Formamid versetzt. Nach Inkubation für 15 min bei 55°C wurde die RNA nach Zugabe von 10 µl Formaldehyd-Auftragepuffer (1 mM EDTA pH 8.0, 0.25% Bromphenolblau, 0.25% Xylen-Cyanol, 50% Glycerin) auf das Gel neben einem RNA-Größenmarker (Gibco BRL, 0.16-1.77 kb) aufgetragen. Nach Waschen des Gels 2x für je 30 min bei Raumtemperatur mit dest DEPC-H<sub>2</sub>O und 1x mit DEPC-behandeltem 10x SSC für 45 min wurde die RNA mit DEPC-behandeltem 20x SSC mittels Kapillar-Blot über Nacht auf eine Nylon-Membran übertragen

und am nächsten Tag durch UV-Crosslinking fixiert. Für die Northern Hybridisierung (Hybridisierungslösung: 50% Formamid, 5x SSC, 0.1% SDS, 1mM EDTA pH 8.0, 5x Denhardt's [100x Denhardt's: 2 g Polyvinyl-Pyrrolidon, 2 g Ficoll Typ 400, 2 g BSA, ad 100 ml dest H<sub>2</sub>O], 50 mM Tris-Cl pH 7.5, 100 µg/ml denaturierte Heringssperma-DNA) wurden die Sonden radioaktiv markiert, wofür der „Random primed DNA labeling kit“ (Boehringer, Mannheim, FRG) unter Beachtung der Herstellerangaben verwendet wurde. Als Sonden dienten je 200 ng eines Gel-gereinigten DNA-Fragmentes. Hybridisierung der Nylon-Membran erfolgte über Nacht im Rotationsofen bei 42°C, ebenso 1x Waschen mit Waschpuffer 1 (2x SSC, 0.1% SDS) für 30 min. Nach 2x Waschen des RNA-Blots in einer Schale bei 56°C mit Waschpuffer 2 (0.1x SSC, 0.1% SDS) wurde ein Röntgenfilm für zwei Tage bei -80°C exponiert.

### 3.6.7 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Für den Nachweis der Sekretion bzw. Aktivität der Protease SAP2 während des Wachstums von *C. albicans* unter SAP2-induzierenden Bedingungen wurden Aliquots des Überstandes einer *C. albicans*-YCB-BSA-Kultur auf einem Polyacrylamid-Gel (Maniatis *et al.*, 1982) aufgetrennt, um die typische Bande der Protease SAP2 bzw. den proteolytisch bedingten Abbau des BSA im Medium nachzuweisen. Hierfür wurden je 15 µl Kulturüberstand mit 4 µl Probenpuffer (5x Probenpuffer: 1.1 g SDS, 0.41 g EDTA, 0.17 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O, 1.1 ml β-Mercaptoethanol, ad 10 ml dest H<sub>2</sub>O, 20 mg Bromphenolblau in 10 ml 50% Glycerin) versetzt und neben einem Protein-Größenmarker (10 kDa-Leiter, Gibco) auf ein 12% Polyacrylamidgel aufgetragen (Trenngel: 2.5 ml Lösung B [1.5 M Tris-Cl pH 8.8, 0.4% SDS], 4.0 ml Gelstock (30% Acrylamid-/ 0.8% Bisacrylamid-Stammlösung [Roth]), 50 µl 10% APS, 5 µl Temed, ad 10 ml dest H<sub>2</sub>O); Sammelgel: 1.25 ml Lösung C [0.5 M Tris-Cl pH 6.8, 0.4% SDS], 0.65 ml Gelstock, 25 µl 10% APS, 5 µl Temed, ad 5 ml dest H<sub>2</sub>O). Die Proteine wurden im Gel bei 25 mA für 1 h in 1x SDS-Laufpuffer aufgetrennt und nach Proteinfärbung detektiert.

Für eine Färbung mit Coomassie-Brilliant-Blau wurde das Gel für 1-2 h in der Färbelösung (0.2% Coomassie-Brilliant-Blue R250 [Serva], 40% Methanol, 10% Essigsäure) inkubiert, dann zweimal mit Entfärber (40% Methanol, 10% Essigsäure) für je 20 min bzw. 40 min entfärbt. Um schwächere Proteinbanden im Gel sichtbar zu machen, wurden die Gele versilbert. Folgende Schritte wurden hierbei eingehalten: nach Fixierung des Gels in Fixierer

(300 ml 100% Ethanol, 100 ml Essigsäure, ad 1 l H<sub>2</sub>O dest) folgte für 30 min eine Behandlung mit Inkubationslösung (75 ml 100% Ethanol, 17 g Na-Ac, 1.25 ml 25% Glutaraldehyd, 0.5 g Na<sub>2</sub>S<sub>5</sub>O<sub>3</sub>·5H<sub>2</sub>O, ad 250 ml dest H<sub>2</sub>O). Nach 3x Waschen mit dest H<sub>2</sub>O folgte die Versilberung (0.5 g AgNO<sub>3</sub>, 50 µl frisch zugesetztes 37% Formaldehyd, ad 250 ml dest H<sub>2</sub>O) für 20 min, gefolgt von 2x Waschen mit dest H<sub>2</sub>O für je 1 min. Nach Zugabe des Entwicklers (7.5 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 30 µl 37% Formaldehyd, ad 300 ml dest H<sub>2</sub>O) wurde die Reaktion nach 2-5 min durch Inkubation des Gels für 10 min in einer Glycinlösung (2.5 g Glycin ad 250 ml dest H<sub>2</sub>O) gestoppt, das Gel anschließend 3x mit dest H<sub>2</sub>O für je 5 min gewaschen und gegebenenfalls nach Inkubation in 20% Glycerin an der Luft getrocknet.

### 3.6.8 Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis der GFP-Expression

Eine Fluoreszenz von *C. albicans*-Zellen, die das GFP-Reportergen exprimieren, wurde mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops nachgewiesen. Entsprechende Zellen sind aufgrund des GFP-vermittelten grünen Leuchtens leicht von Zellen zu unterscheiden, die das GFP-Gen nicht exprimieren bzw. nicht enthalten. Für eine fluoreszenzmikroskopische Betrachtung wurden Aliquots der zu untersuchenden *C. albicans*-Kulturen auf Objektträger pipettiert und mit einem Deckglas bedeckt. Die Fluoreszenz- und zugehörigen Phasenkontrastaufnahmen wurden bei 400-facher Vergrößerung mit Ölimmersion aufgenommen.

## 3.7 *In vivo*-Experimente

Sämtliche Tierexperimente wurden in Zusammenarbeit mit Herrn Prof. Dr. Hof (Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Universitätsklinikum Mannheim) von Frau Dr. Kretschmar und Herrn Dr. Nichterlein durchgeführt.

Für die Tierversuche wurden 8-12-Wochen alte BALB/c- bzw. DBA/2-Mäuse von Harlan (Borchen, Germany) bezogen. Insgesamt wurden drei *C. albicans*-Infektionsmodelle verwendet, zwei davon zur Untersuchung einer Infektion mit disseminierendem Krankheitsverlauf nach intraperitonealer bzw. intravenöser Infektion, eines zum Studium einer Schleimhautinfektion des Ösophagus nach oraler Infektion. Für die Vorbereitung des Inokulums wurden Zellen der zu untersuchenden *C. albicans*-Stämme über Nacht in YPD-

Medium bei 30°C oder 37°C unter Schütteln kultiviert, 2x in PBS (Gibco) gewaschen und in PBS resuspendiert. Aliquots der Inokula wurden immer parallel auf Indikatorplatten ausplattiert, um sicherzustellen, dass keine FLP-Aktivität während der über Nacht-Vorkultur stattgefunden hatte.

Infektion der Ösophagus-Mukosa wurde in DBA/2-Mäusen hervorgerufen, die 7 Tage und 24 h vor Infektion intraperitoneal Cyclophosphamid in einer Dosis von 150 mg/kg bzw. 100 mg/kg erhielten und zudem 24 h vor Infektion oral mit Amoxycillin (10 mg/Tier), Gentamicin (8 mg/Tier) und Clindamycin (10 mg/Tier) vorbehandelt wurden. Die Mäuse wurden oral mit jeweils  $1 \times 10^8$  Blastokonidien infiziert. 3-10 Tage nach Infektion wurden die Tiere getötet, der Ösophagus aseptisch entnommen und mit einem Glas-Homogenator (Tenbroeck tissue grinders, Wheaton Scientific) in 5 ml sterilem, mit 5 µg/ml Gentamicin supplementiertem dest H<sub>2</sub>O homogenisiert. Aliquots des Homogenats wurden auf den Indikatoragarplatten (Minimalagar mit 1 µg/ml Mycophenolsäure) ausplattiert, um nach 2 d Inkubation bei 30°C den Anteil kleiner, MPA-sensitiver Kolonien zu bestimmen.

Für die systemische Infektion nach intraperitonealer Infektion wurden unbehandelte BALB/c-Mäuse mit  $5 \times 10^7$  Blastokonidien in 0.5 ml PBS infiziert. 30 min nach Infektion wurden die *C. albicans*-Zellen durch Peritoneallavage mit 10 ml PBS wiedergewonnen. Zellen, die 4 h nach Infektion Leber-adhärenz waren, ohne jedoch in das Gewebe zu invadieren, wurden reisoliert, nachdem zunächst nicht-adhärenz *C. albicans*-Zellen durch Peritoneallavage entfernt wurden, und die Leber anschließend entnommen und in 10 ml sterilem dest H<sub>2</sub>O homogenisiert und dann auf Indikatorplatten ausplattiert wurde. 48 h nach Infektion wurden Mesenteriallymphknoten und die infiltrierten Organe Leber, Pankreas und Milz im Ganzen entnommen, homogenisiert und ausplattiert. Die befallenen Nieren wurden getrennt entnommen und in gleicher Weise behandelt. Für die systemische *C. albicans*-Infektion nach intravenöser Infektion erhielten unbehandelte BALB/c-Mäuse  $2 \times 10^5$ ,  $3 \times 10^5$  oder  $4 \times 10^5$  Blastokonidien in 0.2 ml PBS über die laterale Schwanzvene. 3-6 Tage nach Infektion wurden die Organe Leber, Nieren und Gehirn der Tiere aseptisch getrennt entnommen, in je 5 ml PBS homogenisiert, um Aliquots auf den Indikatorplatten auszuplattieren. Der Anteil MPA-sensitiver Klone des Reporterstammes als Hinweis auf eine zuvor erfolgte Aktivierung des jeweils untersuchten Zielgens während der Infektion erfolgte auch hier nach Inkubation der Indikatorplatten und Auszählen großer und kleiner Kolonien.

Abweichungen von den aufgeführten Angaben für die Durchführung der Tierversuche werden im Einzelnen an den entsprechenden Stellen im Ergebnisteil dieser Arbeit berücksichtigt.

## 4 Ergebnisse

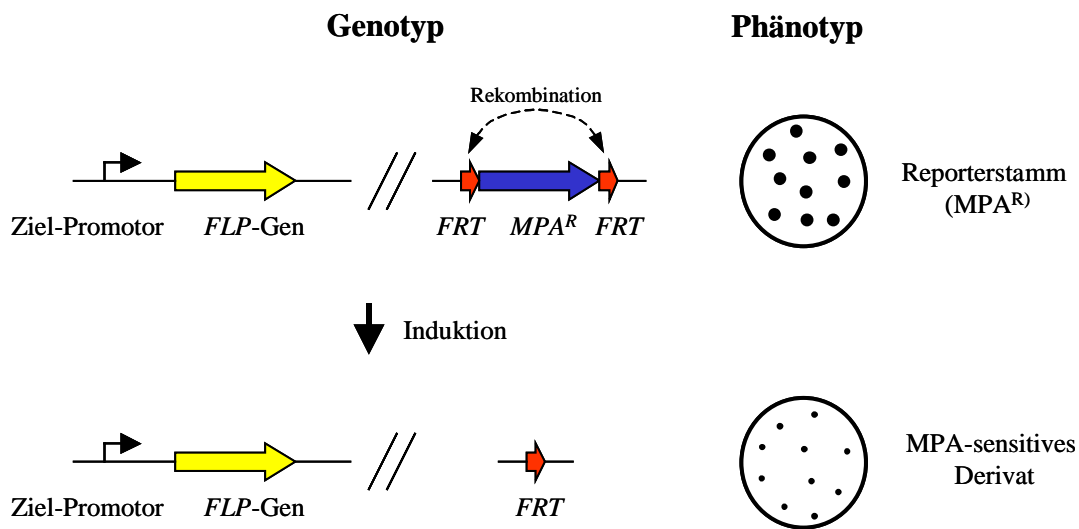
### 4.1 Etablierung einer *in vivo*-Expressionstechnologie (IVET) für *C. albicans*

Die Etablierung eines praktikablen IVET-Systems für *C. albicans* unter Verwendung der site-spezifischen Rekombinase FLP als Reporter einer Genexpression wurde aufgrund der Entwicklung eines Resistenzgens für *C. albicans* ermöglicht (Köhler *et al.*, 1997), das in dieser Arbeit als Marker diente. Dabei handelt sich um eine mutierte Version des *C. albicans*-Gens, das für die Inosinmonophosphatdehydrogenase codiert, ein Enzym, das an der Guaninbiosynthese beteiligt ist und durch den spezifischen Inhibitor Mycophenolsäure (MPA) in seiner Aktivität gehemmt wird. Auf Agarplatten mit hoher Mycophenolsäurekonzentration wachsen *C. albicans*-Zellen, die eine chromosomal integrierte Kopie dieses Resistenzgens ( $MPA^R$ -Marker) besitzen, wildtypischen Zellen dagegen nicht.

#### 4.1.1 Funktionsprinzip des Reportersystems

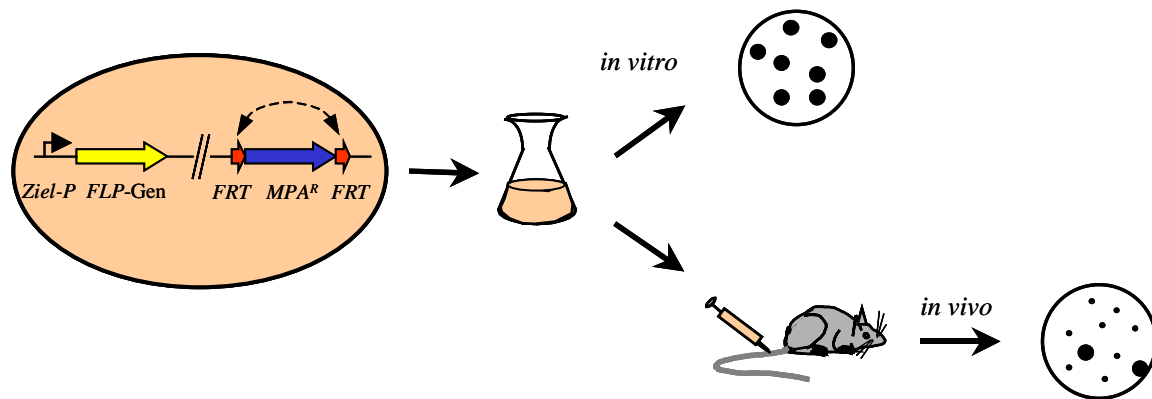
Der Promotor des Zielgens, dessen Expression untersucht werden soll, wird mit dem *caFLP* (= *C. albicans* adapted *FLP*)-Rekombinasegen fusioniert und stabil chromosomal in eines der wildtypischen Allele des Zielgens integriert. Da *C. albicans* diploid ist, bleibt demnach die Kopie des zweiten Allels unversehrt. Um eine Expression des Reportergens detektieren zu können, wurde zuvor ein von *FRT* (FLP recognition target)-sites flankiertes  $MPA^R$ -Resistenzgen im Genom des entsprechenden Reporterstammes plaziert. Eine Expression des Zielgens führt somit aufgrund der FLP-vermittelten Rekombination der *FRT*-sites zu einer irreversiblen Deletion des Markers aus dem Genom dieser Zelle, die nun Mycophenolsäure-sensitiv ist. Auf Indikatorplatten mit geringer MPA-Konzentration wachsen diese Zellen schlechter und bilden kleine Kolonien. Zellen hingegen, in denen das Zielgen nicht aktiviert wurde, sind Mycophenolsäure-resistent und bilden hier große Kolonien. Phänotypische Unterscheidung großer und kleiner Kolonien nach Ausplattieren auf den Indikatorplatten erlaubt eine einfache und schnelle Bestimmung des Prozentsatzes der Zellen in einer Population, die in einem vorhergehenden Untersuchungszeitraum das zu analysierende

Zielgen aktiviert hatten. Die Funktionsweise des Reportersystems ist schematisch in Abb. 1 dargestellt.



**Abb. 1** Schema zur Funktionsweise des Reportersystems; Erklärung im Text.

Ein großer Vorteil dieses Reportersystems liegt darin, dass auch eine vorübergehende Geninduktion nachweisbar ist, da der Markerverlust aus dem Genom einer Zelle als irreversibles Ereignis an ihre Nachkommen weitervererbt wird. Daher kann durch Analyse von Nachkommenklonen auch zu einem späteren Zeitpunkt eine zuvor erfolgte Induktion des Zielgens auf Einzelzellebene nachgewiesen werden. In einem *in vivo*-Infektionsmodell können somit Zellen eines Reporterstammes zu verschiedenen Zeitpunkten, bzw. aus verschiedenen Organen, nach Infektion reisoliert und durch Ausplattieren auf den Indikatorplatten auf eine wirtsabhängige Genaktivierung im Infektionsverlauf untersucht werden (Abb. 2). Nach Auszählen großer und kleiner Kolonien kann dann festgestellt werden, wieviel Prozent der jeweils reisolierten Zellen das Zielgen aktiviert hatten. Eine wichtige Voraussetzung für das Reportersystem besteht darin, dass Zellen mit bzw. ohne Marker sich weder in Wachstumsverhalten und -geschwindigkeit noch in ihrer Virulenz unterscheiden dürfen.

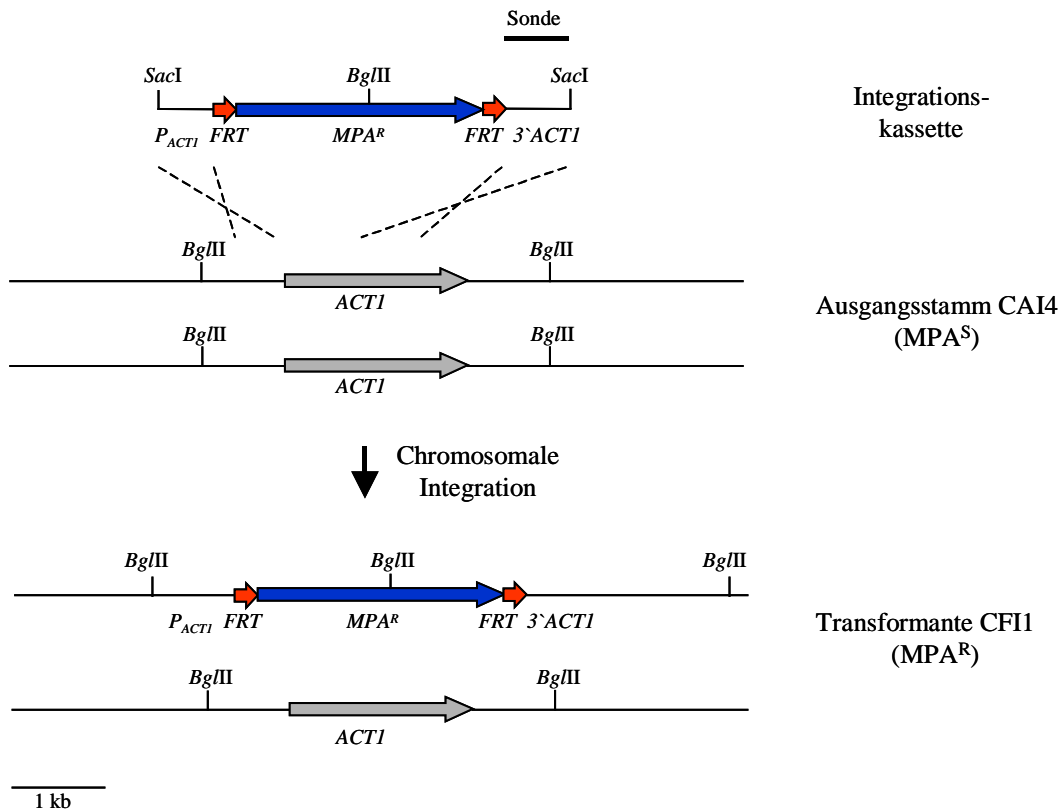


**Abb. 2** Schematische Darstellung zur Anwendung des Reportersystems *in vivo*. Zellen, die während der Infektion infolge Aktivierung des untersuchten Zielpromotors das  $MPA^R$ -Gen verloren haben, bilden nach Reisolieren und Ausplattieren auf MPA-haltigen Indikatorplatten kleine Kolonien.

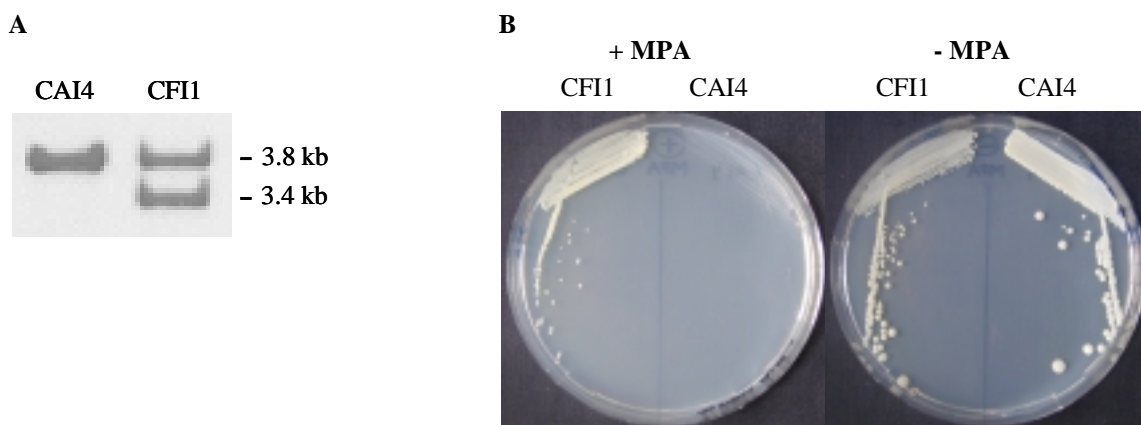
#### 4.1.2 Herstellung eines *C. albicans*-Stammes mit deletierbarem Marker

Ein *C. albicans*-Stamm, der einen deletierbaren Marker enthält, wurde schon vor Beginn dieser Arbeit hergestellt und mir freundlicherweise zur Verfügung gestellt (S. Michel und J. Morschhäuser). Es handelt sich dabei um den Stamm CFI1, eine *C. albicans*-Transformante des Stammes CAI4, der eine chromosomal integrierte Kopie des von *FRT*-sites flankierten  $MPA^R$ -Gens in einem der beiden Aktin-Allele enthält (Abb. 3 und Abb. 4).

MPA-positive Transformanten des Stammes CAI4 konnten nach Integration der DNA-Kassette aus dem Plasmid pAFI3 auf Agarplatten mit entsprechend hoher Konzentration Mycophenolsäure selektioniert werden. Die korrekte Integration des Markers in eines der beiden *ACT1*-Allele des resultierenden Stammes CFI1 wurde durch Southern-Hybridisierung mit einer 3'-Aktin-Sonde überprüft. Hierfür wurde ein PCR-Produkt verwendet, das mit den Primern ACT3 und ACT4 und dem Plasmid pACT5 als template erhalten wurde (Abb. 4A). Verglichen mit dem Ausgangsstamm CAI4, der auf Agarplatten mit hoher Konzentration Mycophenolsäure kein Wachstum zeigt, wächst der *C. albicans*-Stamm CFI1 hier gut (Abb. 4B). Dagegen zeigte sich bei Anzucht der beiden Stämme CAI4 und CFI1 in Abwesenheit von Mycophenolsäure kein Wachstumsunterschied. Wie der *C. albicans*-Stamm CAI4 ist auch der Stamm CFI1 *ura3*-negativ, so dass für weitere Transformationen dieses Stammes das *C. albicans-URA3*-Gen als Selektionsmarker verwendet werden konnte.



**Abb. 3** Integration des *MPA<sup>R</sup>*-Markers in den Stamm CAI4 zur Herstellung des *C. albicans*-Stammes CFI1. Dargestellt ist die Integrationskassette sowie die genetische Struktur des Aktin-Lokus des transformierten *C. albicans*-Stammes vor und nach chromosomaler Integration des von *FRT*-sites flankierten *MPA<sup>R</sup>*-Markers. Die Bindungsstelle der zur Southern-Analyse eingesetzten Sonde sowie relevante Restriktionsschnittstellen sind angegeben. Die jeweils 34 bp großen *FRT*-sites sind in sämtlichen Abb. nicht maßstabsgetreu eingetragen.

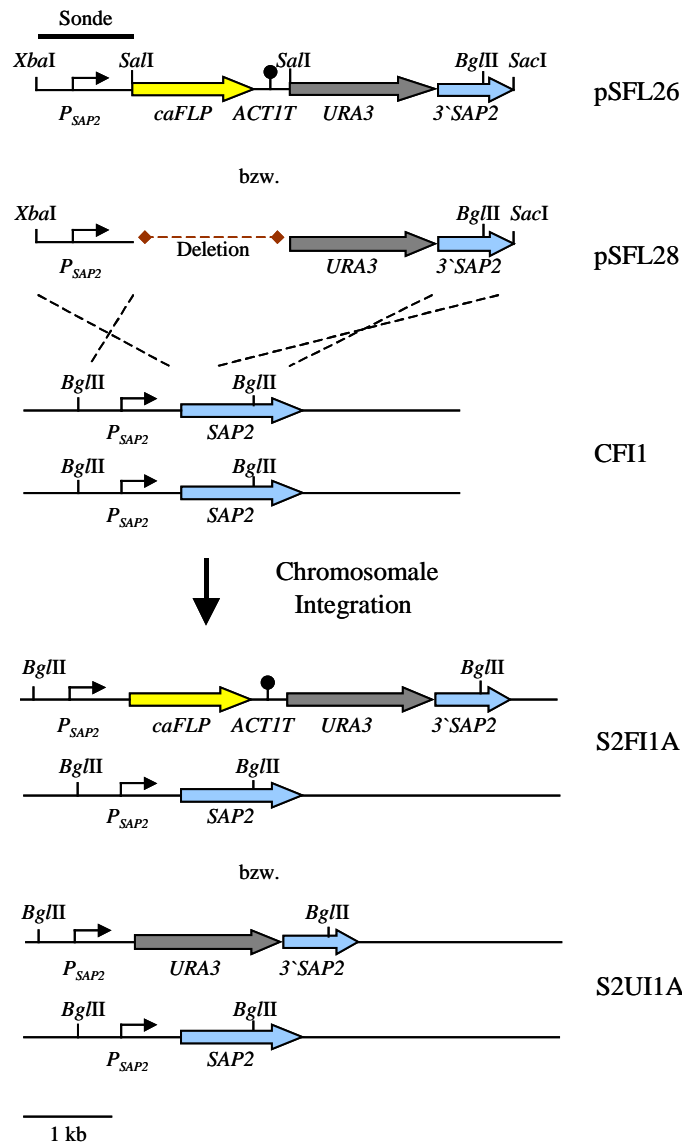


**Abb. 4** (A) Nachweis der Integration des *MPA<sup>R</sup>*-Markers in eines der beiden *ACT1*-Allele in dem Stamm CFI1 durch Southern-Hybridisierung *Bgl*III-gespaltener chromosomaler DNA mit einer *ACT1*-spezifischen Sonde. (B) Wachstum der Stämme CAI4 und CFI1 auf Minimalagarplatten (mit 100 µg/ml Uridin supplementiert) mit bzw. ohne Zusatz von 10 µg/ml MPA (3 Tage, 30°C; Petrischalendurchmesser: 8 cm).

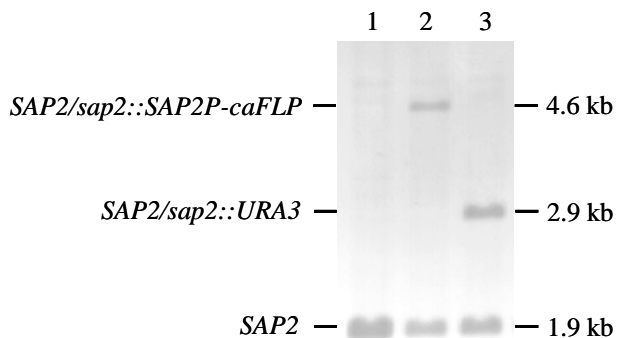


### 4.1.3 Integration des *caFLP*-Gens in den *C. albicans*-*SAP2*-Lokus

Um die Funktionalität des Reportersystems *in vitro* überprüfen zu können, wurde nun ein *C. albicans*-Stamm hergestellt, der eine Fusion aus *SAP2*-Promotor und *caFLP*-Rekombinase-Gen enthält. Das Proteasegen *SAP2* wurde deswegen ausgewählt, da *in vitro*-Bedingungen zur Induktion bzw. Repression dieses Gens bekannt sind. Als Ausgangsstamm diente der *C. albicans*-Stamm CFI1, der den deletierbaren *MPA<sup>R</sup>*-Marker enthält. Zusätzlich wurde ein *C. albicans*-Kontrollstamm hergestellt, der wie der Reporterstamm den deletierbaren Marker im Aktin-Gen und auch eine Insertion eines DNA-Fragments im *SAP2*-Gen, jedoch nicht das *caFLP*-Gen besitzt. Mit diesem Stamm konnte gezeigt werden, dass weder *in vitro* noch *in vivo* während der Infektion ein Markerverlust in Abwesenheit der Rekombinase stattfindet. Zur Herstellung des Stammes S2FI1A mit einer Fusion aus *SAP2*-Promotor und *caFLP*-Gen, wurde ein Fragment aus Plasmid pSFL26 verwendet, das bereits in meiner Diplomarbeit konstruiert wurde (Abb. 5). Es enthält eine Fusion des *C. albicans*-*SAP2*-Promotors mit dem modifizierten, d.h. an den *C. albicans*-Codon-Gebrauch angepassten *caFLP*-Gen. Zur Optimierung der Transkription wurde das *caFLP*-Gen direkt hinter dem Stop-Codon mit der Transkriptions-Terminationssequenz des *C. albicans*-Aktin-Gens fusioniert (Abb. 5). Zur Herstellung eines Kontrollstammes wurde ein Fragment aus Plasmid pSFL28 verwendet (Abb. 5), das durch Deletion des *SalI*-[*caFLP-ACT1*]-Fragments im Plasmid pSFL26 hergestellt wurde und somit nur ein von *SAP2*-Promotor und 3`*SAP2*-Sequenzen flankiertes *C. albicans URA3*-Gen enthält. Die Transformation des *ura3*-negativen, *MPA*-positiven Stammes CFI1 mit den Fragmenten aus den Plasmiden pSFL26 bzw. pSFL28 führte zur Herstellung der Stämme S2FI1A bzw. S2UI1A. Zur Überprüfung der Integration der Fragmente in je eines der beiden *SAP2*-Allele wurden die erhaltenen *URA3*-positiven Klone durch Southern-Hybridisierung überprüft (Abb. 6). Dazu wurde die *BglIII*-gespaltene chromosomale DNA der Transformanten mit einer *SAP2*-spezifischen Sonde hybridisiert, wofür das 1.1 kb [*XbaI-SalI*]-*SAP2P*-Fragment aus Plasmid pSFL26 diente. Abb. 6 (Spur 1) zeigt, dass im Ausgangsstamm CFI1 beide *SAP2*-Allele auf einem 1.9 kb großen *BglIII*-DNA-Fragment lokalisiert sind. Der Austausch eines der beiden wildtypischen *SAP2*-Allele durch die *SAP2P-caFLP*-Fusion führte im Stamm S2FI1A zu einer Vergrößerung eines der beiden hybridisierenden *BglIII*-Fragmente auf 4.6 kb (Abb. 6, Spur 2). Im Stamm S2UI1A wurde eines der *SAP2*-Allele durch das *SAP2P-URA3*-Fragment ersetzt, so dass hier ein hybridisierendes Fragment der Größe 2.9 kb entstand (Abb. 6, Spur 3).



**Abb. 5** Integrationsschema zur Herstellung des *SAP2P-caFLP*-Reporterstammes S2FI1A und des Kontrollstammes S2UI1A. Dargestellt sind die Integrationskassetten der Plasmide pSFL26 und pSFL28, deren Integration zu den Transformanten S2FI1A bzw. S2UI1A führte. Die Bindungsstelle der Sonde für die Southern-Analyse und die relevanten Restriktionsschnittstellen sind eingetragen.



**Abb. 6** Southern-Hybridisierung *Bgl*III-gespaltener chromosomaler DNA des Stammes CFI1 (Spur 1) und der Transformanten S2FI1A (Spur 2) und S2UI1A (Spur 3) mit einer *SAP2*-spezifischen Sonde.

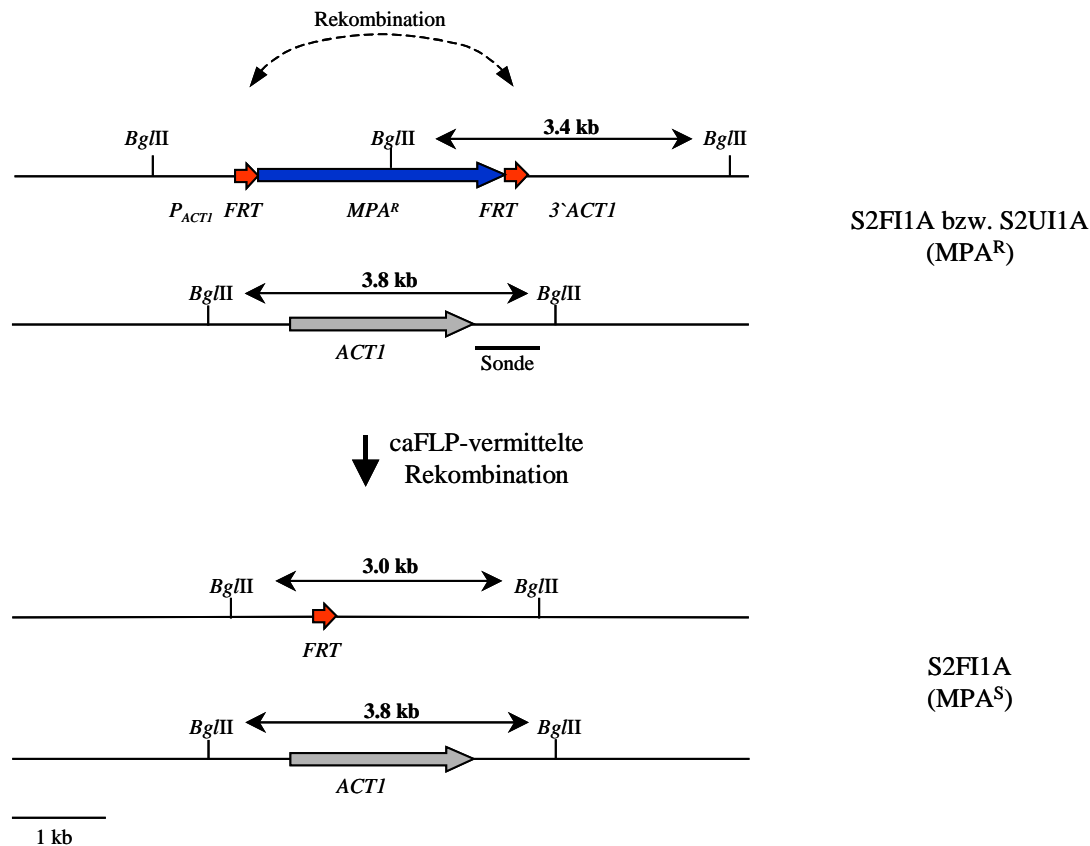
Die *C. albicans*-Stämme S2FI1A und S2UI1A enthalten wie der Ausgangsstamm CF11 ein von *FRT*-sites flankiertes *MPA<sup>R</sup>*-Gen im Aktin-Lokus. Während der Stamm S2FI1A in einem der beiden *SAP2*-Allele zusätzlich eine *SAP2P-caFLP*-Fusion enthält, wurde in Stamm S2UI1A an gleicher Stelle nur das *URA3*-Gen integriert.

#### 4.1.4 Überprüfung des Reportersystems *in vitro*

Bevor das für *C. albicans* entwickelte IVET-System im Tiermodell eingesetzt wurde, sollte es zunächst *in vitro* auf seine Funktionalität überprüft werden. Während das *SAP2*-Gen in einem Medium mit saurem pH-Wert, in dem ein Protein wie Rinderserumalbumin (BSA) die alleinige Stickstoffquelle darstellt, induziert wird, wird es in herkömmlichen Medien, wie z.B. YPD- oder Minimalmedium, reprimiert.

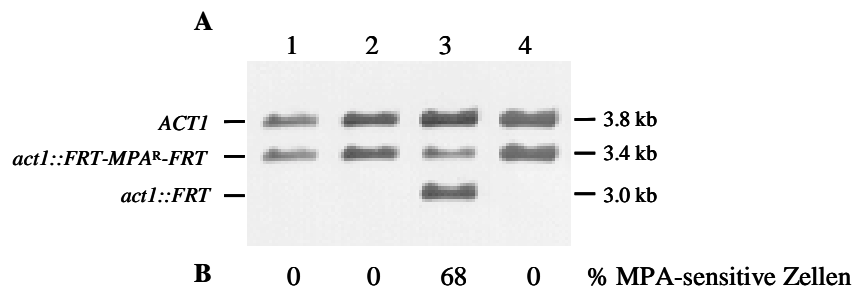
##### 4.1.4.1 Spezifische FLP-vermittelte Deletion des *MPA<sup>R</sup>*-Markers

Da in dem Reporterstamm S2FI1A das *caFLP*-Gen durch den *SAP2*-Promotor kontrolliert wird, sollte in Zellen dieses Stammes, die unter *SAP2*-induzierenden Bedingungen kultiviert wurden, auch eine spezifische FLP-vermittelte Deletion des *MPA<sup>R</sup>*-Markers genotypisch nachweisbar sein (Abb. 7). Dagegen sollte in Zellen des Kontrollstammes S2UI1A, der den Marker, jedoch nicht das *caFLP*-Gen besitzt, unter gleichen Bedingungen kein Markerverlust stattfinden. Unter *SAP2*-reprimierenden Bedingungen sollte das *caFLP*-Gen in Zellen des Reporterstammes S2FI1A nicht exprimiert werden und demnach eine Exzision des Markers nicht detektierbar sein. Die genetische Struktur des Aktin-Lokus vor bzw. nach Aktivierung des *caFLP*-Rekombinasegens in Stamm S2FI1A ist schematisch in Abb. 7 dargestellt.



**Abb. 7** Genetische Struktur des Aktin-Lokus in den Stämmen S2FI1A und S2UI1A und eines MPA-sensitiven Derivates des Stammes S2FI1A nach FLP-vermittelter Deletion des  $MPA^R$ -Gens. Die Bindungsstelle der Sonde für die Southern-Analyse ist eingetragen, ebenso die Größen der zu erwartenden Aktin-spezifischen Fragmente vor bzw. nach Marker-Deletion. Relevante Restriktionsschnittstellen sind angegeben.

Die Stämme S2FI1A und S2UI1A wurden nach über Nacht Vorkultur in YPD-Medium parallel 1:100 in frischem YPD-Medium bzw. YCB-BSA-Induktionsmedium verdünnt und für 24 h weiterkultiviert. Nach Isolierung und *Bgl*III-Spaltung der chromosomalen DNA der YPD-Vorkultur sowie der für weitere 24 h in YPD gewachsenen Kultur konnte durch Southern-Hybridisierung gezeigt werden, dass unter reprimierenden Bedingungen keine Exzision des  $MPA^R$ -Markers im Stamm S2FI1A stattgefunden hat (Abb. 8). Mit einer 3'-*ACT1*-spezifischen Sonde konnte nur das wildtypische 3,8 kb *ACT1*-DNA-Fragment und das 3,4 kb DNA-Fragment, das den  $MPA^R$ -Marker enthält, detektiert werden (Abb. 8, Spur 2). Im Gegensatz dazu konnte nach Wachstum des Reporterstammes unter *SAP2*-induzierenden Bedingungen durch Southern-Hybridisierung eine FLP-vermittelte  $MPA^R$ -Marker-Deletion nachgewiesen werden, da hier zusätzlich das zu erwartende 3,0 kb DNA-Fragment auftrat (Abb. 8, Spur 3). Der Zusammenhang zwischen  $MPA^R$ -Marker-Deletion und FLP-Aktivität wurde durch den Kontrollstamm S2UI1A bestätigt, für den nach Wachstum unter gleichen Bedingungen keine Marker-Excision nachgewiesen werden konnte (Abb. 8, Spur 4).

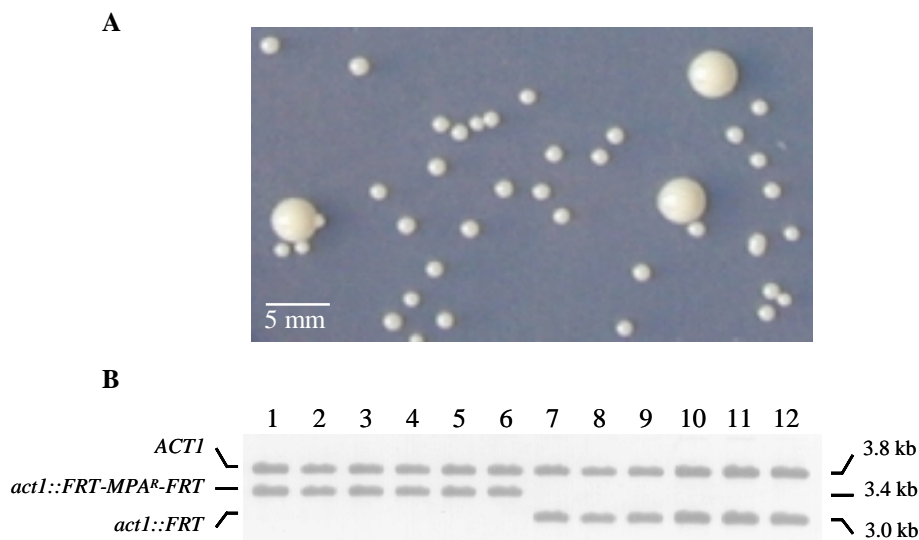


**Abb. 8** (A) Southern-Hybridisierung *Bgl*III-gespaltener chromosomaler DNA des Stammes S2FI1A (Spur 1-3) und des Kontrollstammes S2UI1A (Spur 4) nach YPD-Vorkultur (Spur 1) und nach 24 h in frischem YPD-(Spur 2) bzw. YCB-BSA-Medium (Spur 3 und 4) mit einer *ACTI*-spezifischen Sonde. Der Prozentsatz MPA-sensitiver Zellen in der jeweiligen Kultur ist angegeben (B).

#### 4.1.4.2 Detektion der *SAP2P*-induzierten FLP-Aktivität auf Einzelzellebene

Abb. 8 zeigt, dass in der YCB-BSA über Nacht Kultur des Stammes S2FI1A offensichtlich nicht in allen Zellen das *SAP2*-Gen aktiviert wurde, denn durch Southern-Analyse wurde sowohl das *ACTI*-Fragment, in dem der Marker deletiert wurde, als auch das Fragment, das den Marker noch enthält, detektiert (Abb. 8A, Spur 3). Um auf Einzelzellebene eine zuvor erfolgte *SAP2*-Induktion nachzuweisen, wurde die YCB-BSA-Kultur des Stammes S2FI1A verdünnt und auf YPD-Agarplatten ausplattiert. Von den einheitlich wachsenden Kolonien wurden je 100 auf Agarplatten mit hoher Mycophenolsäure-Konzentration überstrichen, um so den Prozentsatz MPA-sensitiver Klone der Kultur zu bestimmen (Abb. 8B). Ungefähr 70% der Zellen des Reporterstammes S2FI1A wurden während des Wachstums im YCB-BSA-Induktions-Medium MPA-sensitiv. Dieser Anteil spiegelte auch ungefähr die Signalstärke der durch Southern-Analyse detektierten 3.0 kb-Bande wider, verglichen mit dem 3.4 kb DNA-Fragment, das den Marker noch enthält (Abb. 8A, Spur 3). Hingegen wurden bei gleicher Vorgehensweise nach Kultivierung des Reporterstammes S2FI1A in YPD-Medium nur MPA-resistente Kolonien identifiziert, da keine Induktion des *SAP2*-Gens während des Wachstums über Nacht in YPD stattgefunden hatte (Abb. 8B, Spuren 1 und 2). Unabhängig vom Medium bildete der Kontrollstamm S2UI1A ausschließlich MPA-resistente Kolonien (Abb. 8B, Spur 4). Um schnell und einfach eine große Anzahl von Zellen auf An- bzw. Abwesenheit des *MPA<sup>R</sup>*-Markers untersuchen zu können, wurden Indikatorplatten mit geringer Mycophenolsäure-Konzentration (1 µg/ml) verwendet, auf denen MPA-resistente Klone große, MPA-sensitive Klone dagegen kleine Kolonien bilden (Abb. 9A). Nach Ausplattieren einer geeigneten Verdünnung der S2FI1A-YCB-BSA-Kultur auf den Indikatorplatten, konnte nach zweitägiger Inkubation durch Auszählen großer und kleiner Kolonien der Anteil MPA-

sensitiver Zellen der untersuchten Population, d.h. der Anteil, der zuvor *SAP2* aktiviert hatte, bestimmt werden. Um zu bestätigen, dass die Koloniegröße mit der An- bzw. Abwesenheit des *MPA<sup>R</sup>*-Markers korrelierte, wurde von jeweils sechs unabhängigen großen und kleinen Kolonien nach über Nacht Anzucht in YPD-Medium die chromosomale DNA isoliert und durch Southern-Analyse überprüft (Abb. 9B). Dabei konnte mit einer *ACT1*-spezifischen Sonde in Zellen großer Kolonien neben dem wildtypischen 3.8 kb *ACT1*-Fragment nur das 3.4 kb *BglIII*-*ACT1*-Fragment nachgewiesen werden, das den *MPA<sup>R</sup>*-Marker enthält (Abb. 9B, Spuren 1-6). Anstelle dieses 3.4 kb spezifischen *ACT1*-Fragmentes wurde in Zellen kleiner Kolonien nur das 3.0 kb-Fragment detektiert. Dadurch konnte bestätigt werden, dass kleine Kolonien auf den Indikatorplatten aus Zellen hervorgegangen sind, in denen zuvor eine *SAP2*-Induktion in einer Marker-Deletion resultierte (Abb. 9B, Spuren 7-12).

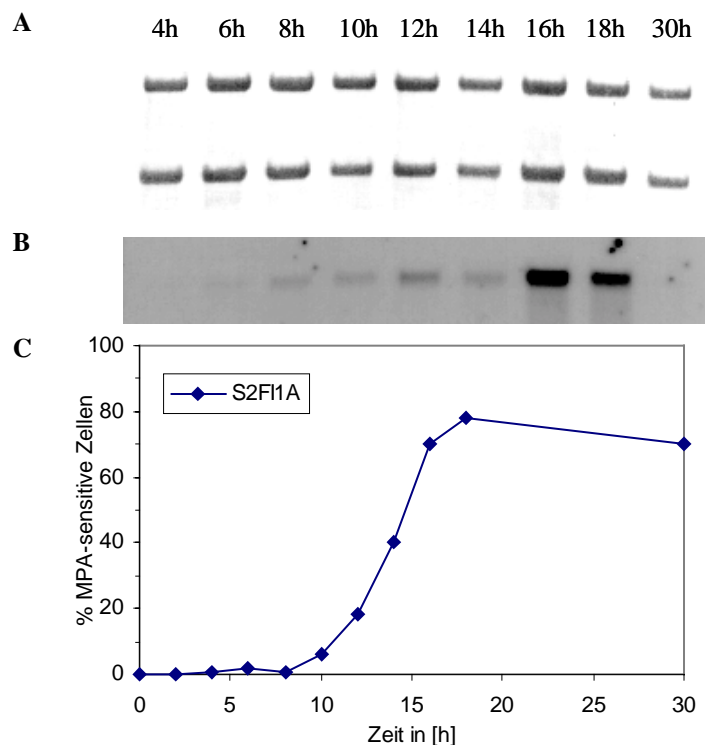


**Abb. 9** (A) Unterscheidung *MPA*-resistenter und -sensitiver Klone des Stammes S2FI1A nach Ausplattieren eines Aliquots einer YCB-BSA-Kultur auf einer *MPA*-haltigen Indikatorplatte. (B) Southern-Hybridisierung *BglIII*-gespaltener chromosomaler DNA von 6 großen (Spur 1-6) bzw. 6 kleinen Kolonien einer *MPA*-haltigen Indikatorplatte mit einer *ACT1*-spezifischen Sonde.

Gelegentlich wurden nach Wachstum der Stämme S2FI1A und S2UI1A in YPD-Medium auf den Indikatorplatten kleinere Kolonien uneinheitlicher Größe beobachtet, die jedoch nach Überstreichen auf *MPA*-Platten mit hoher Mycophenolsäurekonzentration einen resistenten Phänotyp aufwiesen. Dabei konnte auch durch Southern-Analyse bestätigt werden, dass in entsprechenden Zellen keine Marker-Deletion stattgefunden hat. Mit gleicher Frequenz (< 2.5%) wurden unspezifisch langsam wachsende Kolonien auch auf Agarplatten ohne Mycophenolsäure beobachtet. Jedoch erschien der äußerst geringe Anteil unspezifisch kleiner Kolonien auf den Indikatorplatten vernachlässigbar, verglichen mit dem Vorteil der einfachen phänotypischen Unterscheidung *MPA*-positiver und -negativer Klone anhand ihrer Größe.

#### 4.1.4.3 Korrelation der FLP-Aktivität mit der SAP2-Expression

Da der Stamm S2FI1A in einem der beiden *SAP2*-Allele die Reporterfusion enthält, das andere Allel aber intakt ist, sollten während des Wachstums unter *SAP2*-induzierenden Bedingungen *SAP2*- und *caFLP*-Gen gleichermaßen exprimiert werden, d.h. das Auftreten des *SAP2*-spezifischen Transkripts sollte mit der Bildung MPA-sensitiver Klone korrelieren. Für diese *in vitro*-Überprüfung des Reportersystems wurde eine YPD-Vorkultur des Stammes S2FI1A in YCB-BSA-Medium verdünnt und weiterkultiviert, um dann zu verschiedenen Zeitpunkten Aliquots zu entnehmen und parallel auf den Indikatorplatten auszuplattieren bzw. die mRNA der Zellen zu isolieren. Dadurch konnte die *SAP2*-Expression durch Nachweis der *SAP2*-mRNA nach Northern-Hybridisierung mit der FLP-Aktivität anhand des Auftretens MPA-sensitiver Kolonien auf den Indikatorplatten verglichen werden (Abb. 10).



**Abb. 10** Vergleich des Auftretens des *SAP2*-spezifischen Transkripts und der *caFLP*-Aktivität im Stamm S2FI1A nach Transfer von *SAP2*-reprimierendem YPD- in induzierendes YCB-BSA-Medium. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Proben zur Northern-Analyse mit einer *SAP2*-spezifischen Sonde entnommen (B). Der Blot wurde zuvor mit Methylenblau gefärbt, um 28S- und 18S-rRNA-Banden sichtbar zu machen (A). Aliquots der Proben wurden parallel auf Indikatorplatten ausplattiert, um jeweils den Anteil MPA-sensitiver Zellen zu bestimmen (C).

Als Sonde für die Northern-Hybridisierung diente das (*Pst*I-*Sac*I)-3`*SAP2*-Fragment aus dem Plasmid pSFL28. Die *SAP2*-mRNA konnte erst nach 6 h Wachstum der Zellen in *SAP2*-induzierendem Medium als schwaches Signal nachgewiesen werden, das in seiner Intensität in der Folgezeit zunahm und sein Maximum nach 16 h erreichte (Abb. 10B). Die *SAP2*-

spezifische Bande wurde nach 18 h wieder schwächer und konnte nach 30 h Wachstum der Zellen nicht mehr detektiert werden. Aufgrund *SAP2P*-induzierter FLP-Aktivität konnten 10 h nach Überführen der Zellen des Reporterstammes in YCB-BSA-Medium kleine, d.h. MPA-sensitive Kolonien auf den Indikatorplatten beobachtet werden (Abb. 10C). Deren Anteil an der Gesamtkolonienzahl stieg einhergehend mit der Zunahme an *SAP2*-mRNA in der Folgezeit an und erreichte nach 18 h einen Höchstwert mit etwa 70-80% (vgl. Abb. 10B und C). In Wiederholungsversuchen konnte die gleiche Kinetik der *SAP2P-caFLP*-Induktion beobachtet werden. Geringfügige Unterschiede zeigten sich bezüglich des Zeitpunktes, an dem erstmals MPA-sensitive Kolonien auftraten (zwischen 8-10 h), und auch der zum Ende erreichte Maximalwert MPA-sensitiver Kolonien schwankte leicht (zwischen 70-80%). Um ausschließen zu können, daß die verbliebenen MPA-resistenten Klone prinzipiell nicht induzierbar waren, wurde eine MPA-resistente Kolonie erneut in frischem YCB-BSA-Medium kultiviert, woraufhin MPA-sensitive Klone mit der gleichen Frequenz auftraten wie nach Wachstum des Originalstammes S2FI1A. Diese Ergebnisse für die *SAP2*-Induktion auf Einzelzellebene zeigen, dass während des Wachstums in YCB-BSA das hier untersuchte Proteasegen in den individuellen Zellen unterschiedlich schnell induziert wird, und dass in einigen Zellen diese Induktion nicht ausreicht, um in einer ausreichenden FLP-Aktivität zu resultieren. Da die Expression des intakten *SAP2*-Gens mit der Bildung MPA-sensitiver Klone unter diesen *in vitro*-Bedingungen korrelierte, konnte die Verwendbarkeit der FLP-Rekombinase als Reporter der Genexpression bestätigt werden.

#### **4.1.5 Verwendung des Reportersystems *in vivo***

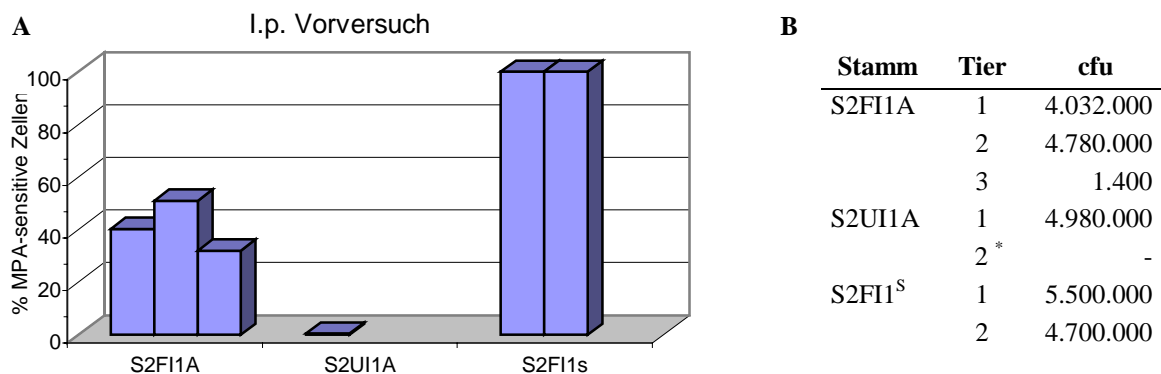
Nachdem die Funktionalität des Reportersystems durch *in vitro*-Versuche bestätigt werden konnte, wurde der Reporterstamm mit der *SAP2P-caFLP*-Fusion in verschiedenen experimentellen Tiermodellen eingesetzt, um die Expression des *SAP2*-Gens während der Infektion zu analysieren. Als Tiermodelle dienten drei verschiedene Maus-Modelle, zwei davon als Modelle einer systemischen Infektion, eines als Schleimhautmodell für eine oberflächliche Infektion. Infektionen mit disseminierendem Verlauf wurden sowohl durch intraperitoneale als auch intravenöse Infektion hervorgerufen. Nach Infektion der Tiere mit dem *C. albicans*-Reporterstamm wurden zu verschiedenen Zeitpunkten während des Infektionsverlaufs bzw. aus verschiedenen Organen der Tiere *C. albicans*-Zellen reisoliert und durch Ausplattieren auf den Indikatorplatten auf eine Expression des *SAP2*-Gens analysiert.



Alle Versuche wurden parallel auch mit zwei Kontrollstämmen durchgeführt. Zum einen mit dem Stamm S2UI1A, der den deletierbaren Marker, jedoch kein *caFLP*-Gen enthält und demnach auf den Indikatorplatten nur große Kolonien bilden darf. Zum anderen mit dem Stamm S2FI1<sup>S</sup>, bei dem es sich um ein MPA-sensitives Derivat des Stammes S2FI1A handelt, das entsprechend auf Indikatorplatten nur kleine Kolonien bildet. Um auszuschließen, dass sich bereits vor Infektion der Tiere MPA-sensitive Klone unter den Zellen des Reporterstammes S2FI1A befanden, wurden Aliquots der *C. albicans*-Zellen, die in die Maus inokuliert wurden, parallel auf Indikatorplatten ausplattiert.

#### 4.1.5.1 Analyse der *SAP2*-Expression nach intraperitonealer Infektion

Im ersten Versuchsansatz wurde die *SAP2*-Expression nach intraperitonealer (i.p.) Infektion von Mäusen mit je  $5 \times 10^7$  Zellen der *C. albicans*-Stämme S2FI1A, S2UI1A und S2FI1<sup>S</sup> nach einem Infektionsverlauf von 48 h analysiert. Dazu wurden die Pilz-befallenen Organe Leber, Milz, Pankreas und die Mesenteriallymphknoten homogenisiert und nach Verdünnung auf den Indikatorplatten ausplattiert. Dabei wurde beobachtet, dass im Durchschnitt 41.1% der reisolierten Zellen des Stammes S2FI1A MPA-sensitiv waren, was verdeutlicht, dass das *SAP2*-Gen während der disseminierenden Infektion signifikant aktiviert worden war (Abb. 11).

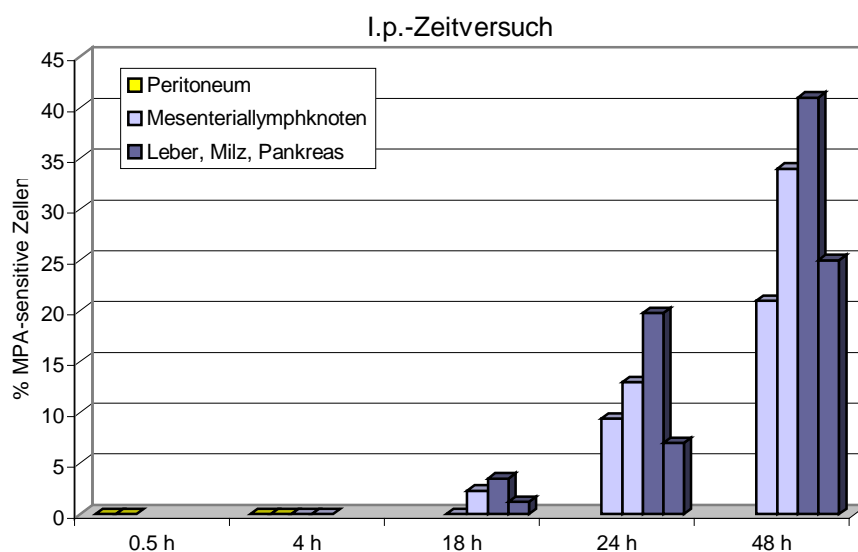


**Abb. 11** *SAP2*-Aktivierung nach i.p.-Infektion. Gruppen von Mäusen wurden i.p. je mit  $5 \times 10^7$  Zellen der angegebenen Stämme infiziert. Nach 48 h wurden nach Entnahme, Homogenisieren und Ausplattieren der Organe Leber, Milz, Pankreas und Mesenteriallymphknoten auf den Indikatorplatten der Anteil MPA-sensitiver Zellen bestimmt (**A**). Die angegebenen cfu-Werte zeigen jeweils den Organbefall (**B**). Für Stamm S2UI1A starb eines der Tiere vor 48 h (**B**\*). Jeder Balken in A stellt die Ergebnisse aus einem Tier dar, wobei die Reihenfolge der in B entspricht.

Parallel wurde durch Bestimmung der Anzahl koloniebildungsfähiger Einheiten (colony forming units, cfu) gezeigt, dass der Organbefall nach Infektion mit den drei eingesetzten *C. albicans*-Stämmen vergleichbar war, mit Ausnahme von einem Tier, aus dem nach

Infektion mit dem Stamm S2FI1A nur eine geringe Zahl von Zellen reisolieren konnte (Abb. 11B). Dadurch wurde bestätigt, dass An- bzw. Abwesenheit des Markers keinen Einfluß auf die Virulenz der Stämme hat. Wie erwartet, bildeten reisolierete Zellen des Stammes S2FI1<sup>S</sup> auf den Indikatorplatten nur kleine Kolonien, dagegen Zellen des Stammes S2UI1A mit Ausnahme vereinzelter kleiner Kolonien nur große (Abb. 11A). Diese ersten Ergebnisse aus den Tierexperimenten wiesen bereits darauf hin, dass das IVET-System auch *in vivo* als Reporter einer Genexpression einsetzbar ist.

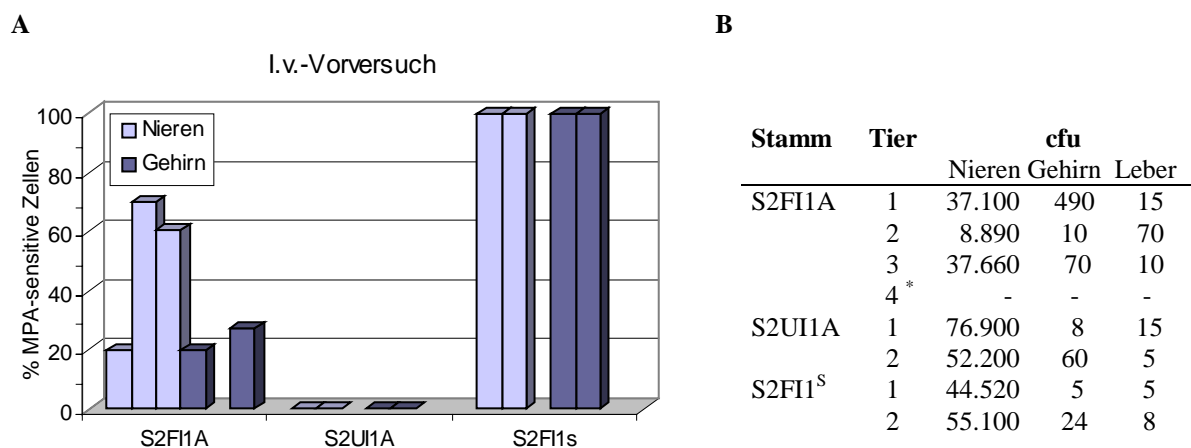
In einem weiteren Versuch sollten Hinweise gefunden werden, in welchem Stadium des Infektionsverlaufs *SAP2* aktiviert wird, d.h. sofort nach Wirtskontakt, während der Invasion in tiefer liegendes Gewebe, oder erst nach Befall der inneren Organe. Um dieser Frage nachzugehen, wurde die *SAP2*-Aktivierung im zeitlichen Verlauf der Infektion analysiert. Dazu wurden insgesamt 10 Mäuse i.p. mit jeweils  $5 \times 10^7$  Zellen des *C. albicans*-Stammes S2FI1A infiziert und zu den angegebenen Zeitpunkten (Abb. 12) aus je zwei der Tiere aus den angegebenen Organen wiedergewonnen und auf eine bereits erfolgte *SAP2*-Aktivierung untersucht. Keine *SAP2*-Induktion konnte in den durch Peritoneallavage wiedergewonnenen Zellen 30 min. bzw. 4 h nach i.p.-Infektion nachgewiesen werden. Auch 18 h nach Infektion hatte in den *C. albicans*-Zellen, die sich inzwischen in Mesenteriallymphknoten und Leber ausgebreitet hatten, noch keine signifikante Expression des untersuchten Proteasegens stattgefunden. 24 h nach Infektion war jedoch in einem großen Anteil der disseminierenden Pilzzellen das *SAP2*-Gen aktiviert worden. Dieser Anteil nahm auch im weiteren Verlauf der Infektion noch zu (Abb. 12).



**Abb. 12** Stadienspezifische *SAP2*-Aktivierung nach i.p.-Infektion. Zehn Mäuse wurden mit je  $5 \times 10^7$  Zellen des Stammes S2FI1A infiziert, um zu jedem angegebenen Zeitpunkt die *SAP2*-Induktion in je zwei Mäusen zu analysieren.

#### 4.1.5.2 Analyse der *SAP2*-Expression nach intravenöser Infektion

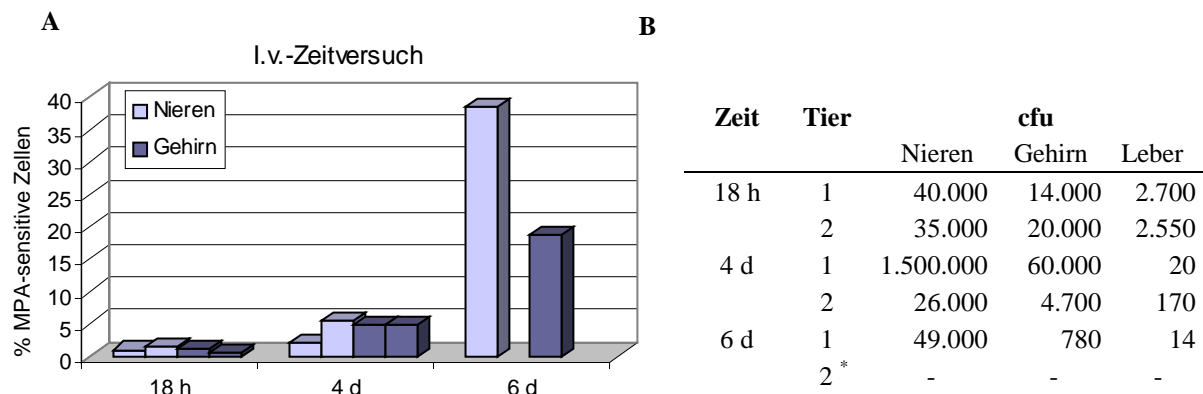
Um die *C. albicans*-*SAP2*-Expression während des disseminierenden Krankheitsverlaufs nach intravenöser (i.v.) Infektion studieren zu können, wurden zunächst Gruppen von Mäusen mit je  $3 \times 10^5$  Zellen der Stämme S2FI1A, S2UI1A und S2FI1<sup>S</sup> infiziert. Nach 6-tägigem Krankheitsverlauf wurden die cfu-Werte bestimmt und gleichzeitig die Aktivität des *SAP2*-Promotors in Zellen des Stammes S2FI1A nach Homogenisieren und Ausplattieren der infizierten Gewebe auf Indikatorplatten ermittelt. Dabei wurden die Organe Leber, Gehirn und Nieren getrennt behandelt. Aus Abb. 13A geht hervor, dass auch nach i.v.-Infektion das *SAP2*-Gen in den *C. albicans*-Zellen signifikant aktiviert wurde, da durchschnittlich 50% der aus den Nieren reisolierten Pilzzellen MPA-sensitiv waren. In weitaus geringerer Anzahl konnten die *C. albicans*-Zellen aus dem Gehirn der Mäuse wiedergewonnen werden, von denen aber ein beträchtlicher Anteil das *SAP2*-Gen induziert hatte. Zu gering jedoch für eine zuverlässige Bestimmung der *SAP2*-Aktivierung war die aus der Leber wiedergewonnene Anzahl an Zellen des Reporterstammes S2FI1A (Abb. 13B).



**Abb. 13** *SAP2*-Aktivierung nach i.v.-Infektion. Gruppen von Mäusen wurden mit je  $3 \times 10^5$  Zellen der angegebenen Stämme infiziert, um nach 6-tägigem Infektionsverlauf die *SAP2*-Induktion (A) und den Organbefall (B) in den angegebenen Organen zu bestimmen. Bei zu niedrigen cfu-Werten war eine zuverlässige Bestimmung des Anteils MPA-sensitiver Zellen nicht möglich. Tier 4 für Stamm S2FI1A starb bereits vorher (B\*). Jeder Balken in A stellt die Ergebnisse aus einem Tier dar, wobei die Reihenfolge der in B entspricht.

Um wie nach i.p.-Infektion bestimmen zu können, in welchem Stadium der i.v.-Infektion das *C. albicans*-*SAP2*-Gen exprimiert wird, wurden Gruppen von Mäusen intravenös mit je  $3 \times 10^5$  Zellen des Reporterstammes S2FI1A infiziert. Zu den verschiedenen Zeitpunkten (Abb. 14) wurden je zwei der Mäuse getötet und hinsichtlich Organbefall und *SAP2*-Expression in den Organen Leber, Gehirn und Nieren untersucht. Zu einem früheren Zeitpunkt (2 h nach Infektion) konnten nach Ausbluten der Tiere nur sehr wenige Zellen (<10 cfu/ml) aus dem Blut reisolieren werden, da vermutlich der Hauptteil der Pilzzellen entweder in

den Blutgefäßen adhären oder aber diese bereits verlassen hatte. 18 h nach Infektion wurden hohe Keimzahlen aus Nieren, Gehirn und Leber wiedergewonnen, jedoch noch keine Induktion des *SAP2*-Promotors in den Zellen des Reporterstammes S2FI1A detektiert. Auch 4 d nach Infektion war der Anteil MPA-sensitiver Klone nach Ausplattieren auf den Indikatorplatten noch sehr gering, stieg jedoch nach 6 d an, was darauf hindeutet, dass in Gehirn und Nieren der Mäuse die *C. albicans*-Zellen das *SAP2*-Gen stark aktiviert hatten. Die nach 4 d und 6 d aus der Leber wiedergewonnenen Keimzahlen waren für eine Bestimmung der *SAP2*-Aktivierung zu gering (Abb. 14B).



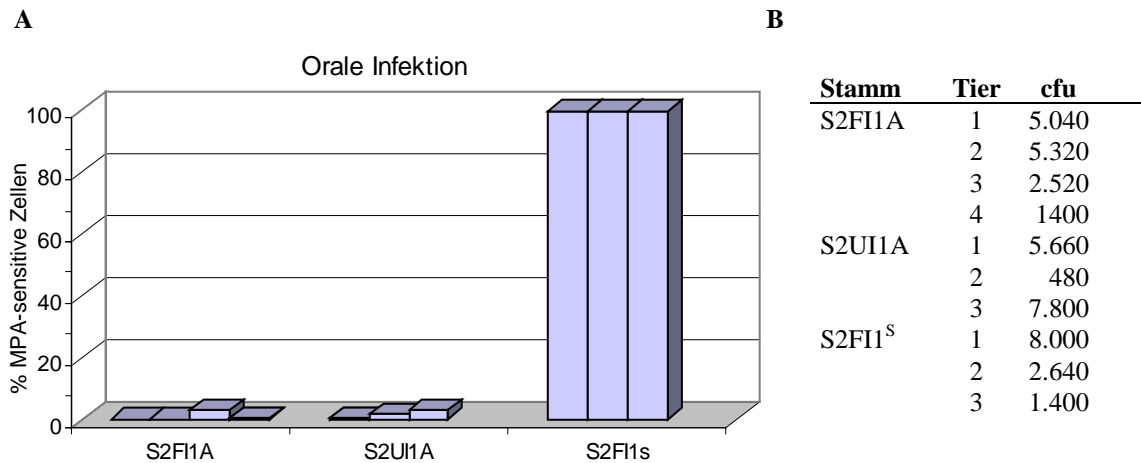
**Abb. 14** Stadienspezifische *SAP2*-Aktivierung nach i.v.-Infektion. Sechs Mäuse wurden mit je  $3 \times 10^5$  Zellen des Stammes S2FI1A infiziert und die *SAP2*-Aktivierung (A) und der Organbefall (B) zu den angegebenen Zeitpunkten in je zwei Tieren bestimmt. Die Zahl der aus der Leber reisolierten Pilzzellen war für die eine zuverlässige Bestimmung des Anteils MPA-sensitiver Zellen zu gering. Eines der Tiere starb bereits vor Tag 6 (B\*). Jeder Balken in A stellt die Ergebnisse aus einem Tier dar, wobei die Reihenfolge der in B entspricht.

#### 4.1.5.3 Analyse der *SAP2*-Expression nach oraler Infektion

Die Ergebnisse aus den i.p.- und i.v.-Infektionsmodellen mit systemischem Verlauf der *Candida*-Mykose in der Maus ließen vermuten, dass eine signifikante Aktivierung des *SAP2*-Gens in *C. albicans* offensichtlich erst nach Befall innerer Organe erfolgte, und *SAP2* daher keinen bedeutenden Beitrag zu den initialen Infektionsschritten der Ausbreitung, Besiedlung und Penetration von Gewebsbarrieren lieferte.

Um diese Annahme zu bestärken, wurde der *C. albicans*-Reporterstamm S2FI1A auch in einem Schleimhautmodell für eine orale bzw. oropharyngeale *Candida*-Mykose eingesetzt, in dem *C. albicans* die Schleimhäute zwar kolonisiert und auch in das Epithel invadiert, aber kaum systemisch disseminiert. Für diesen Versuch wurden Gruppen von Mäusen oral mit jeweils  $1 \times 10^8$  Zellen des Reporterstammes S2FI1A und der beiden Kontrollstämme S2UI1A und S2FI1<sup>S</sup> infiziert. Nach 10 Tagen wurden die *C. albicans*-Zellen reisoliert, um Keimzahlen und *SAP2*-Aktivierung im Ösophagus zu bestimmen (Abb. 15). Jedoch konnte in Zellen des

Stammes S2FI1A keine FLP-Aktivität nachgewiesen werden. Die Zellen der Kontrollstämme wurden in vergleichbarer Anzahl aus den infizierten Schleimhäuten wiedergewonnen und zeigten nach Ausplattieren auf den Indikatorplatten auch in diesem Infektionsmodell den erwarteten Phänotyp. Die Ergebnisse aus dem Schleimhautmodell verdeutlichten, dass während Besiedlung und Invasion des Ösophagusepithels durch *C. albicans* keine signifikante Induktion des *SAP2*-Gens stattgefunden hat.



**Abb. 15** *SAP2*-Aktivierung nach oraler Infektion. Gruppen von Mäusen wurden mit je  $1 \times 10^8$  Zellen der angegebenen Stämme infiziert, um nach 10 Tagen den Befall des Ösophagus (**B**) sowie den Anteil MPA-sensitiver Zellen (**A**) zu ermitteln. Jeder Balken in A stellt die Ergebnisse aus einem Tier dar, wobei die Reihenfolge der in B entspricht.

## 4.2 Analyse der *in vitro*- und *in vivo*-Regulation des *SAP2*-Gens

Die Ergebnisse, die während der Untersuchung zur *SAP2*-Aktivierung in den verschiedenen Tiermodellen gesammelt wurden, bestätigten die Funktionalität des Reportersystems und zeigten, dass *SAP2* in bestimmten Stadien einer Infektion stark induziert wird und demnach für den Krankheitsverlauf der *Candida*-Mykose von Bedeutung zu sein scheint. Daher sollten die genetischen Strukturen der *C. albicans*-Zelle näher analysiert werden, die an der *in vivo*-Regulation des *SAP2*-Gens beteiligt sind, darunter insbesondere die Promotorsequenz dieses Gens. Da *C. albicans* ein diploider Organismus ist, stellte sich auch die Frage, ob die beiden Allele des *SAP2*-Lokus gleichermaßen reguliert werden, oder ob eine differentielle Regulation der beiden Allele dieses Gens beobachtet werden kann. Für diese Untersuchungen diente das etablierte Reportersystem als praktikables Werkzeug, da durch Studien mit FLP-Reporterfusionen mit veränderten *SAP2*-Promotoren deren *in vivo*-Aktivierbarkeit in Abhängigkeit ihrer genauen Promotorstruktur und auch ihres Integrationsortes auf Allelebene möglich waren.

### 4.2.1 Identifizierung einer auffälligen Repeatstruktur im *SAP2*-Promotor

Bei der Herstellung des Reporterstammes S2FI1A wurde durch Southern-Analyse die korrekte Integration der *SAP2P-caFLP*-Fusion aus dem Plasmid pSFL26 in den *C. albicans*-Stamm CF11 auch in anderen unabhängigen Klonen bestätigt. In dem Stamm S2FI1D erfolgte die Integration der DNA-Kassette im gleichen *SAP2*-Allel wie in Stamm S2FI1A (vgl. Abb. 18), und auch die Kinetik der *SAP2P*-induzierten FLP-Aktivität während des Wachstums der beiden Stämme in YCB-BSA-Medium war vergleichbar (vgl. Abb. 19). Jedoch konnte im Gegensatz zu Stamm S2FI1A in dem Stamm S2FI1D in den Tierexperimenten nur eine sehr geringe Induktion des *SAP2*-Promotors nachgewiesen werden.

Die unterschiedliche *in vivo*-Induzierbarkeit dieser beiden Stämme konnte dadurch erklärt werden, dass die *SAP2*-Promotorsequenzen der jeweiligen Reporterfusionen möglicherweise nicht identisch sind. Eine solche Differenz war möglich, da für die Herstellung des Plasmids pSFL26 ein *SAP2*-Promotor aus der Fosmid-Genbank eines anderen *C. albicans*-Stammes verwendet wurde (Stamm 1161). Für den Fall, dass sich dieser *SAP2*-Promotor von dem des *SAP2*-Allels des Stammes CF11 unterscheidet, in das die Integration der Reporterfusion erfolgte, bestand die Möglichkeit, dass bei diesem Vorgang durchaus verschiedene Promotorstrukturen erzeugt würden. Dabei wäre die resultierende Promotorstruktur letztlich

von der genauen Stelle in der Promotorsequenz abhängig, an der der Strangaustausch der homologen Basenabfolgen bei der Integration stattgefunden hatte. Für die weitere Untersuchung wurden daher die Promotoren der beiden wildtypischen *SAP2*-Allele des Stammes CAI4 sowie die Promotor-Bereiche, die in den Stämmen S2FI1A und S2FI1D die *caFLP*-Expression kontrollieren, durch Sequenzierung näher charakterisiert. Die 1.1 kb großen *SAP2P*-Fragmente der Reporterfusionen wurden hierfür spezifisch angereichert und unter Herstellung der Plasmide pSAP2PFIA und pSAP2PFID kloniert.

Neben dem Auftreten einiger polymorpher Nukleotide, verteilt über den gesamten 1.1 kb *SAP2*-Promotorbereich, fiel bei Vergleich der Sequenzdaten ein besonders bemerkenswerter Unterschied auf. Der *C. albicans*-*SAP2*-Promotor weist zwei Bereiche mit pentameren Wiederholungssequenzen, sog. Repeats, auf, die hier als R1 (GCTTT) und R2 (TTGAT/A) bezeichnet werden (Tab. 5). Der *SAP2*-Promotor des Genbank-Klons des Stammes 1161, der zur Herstellung von pSFL26, und damit auch der Stämme S2FI1A und S2FI1D diente, enthält fünf Kopien von R1 und fünf Kopien von R2 (=5/5). Das wildtypische *SAP2-1*-Allel des Stammes CAI4 (und CF11), in welches das Reporterengenkonstrukt aus pSFL26 zur Herstellung von S2FI1A und SF2FI1D integriert wurde, enthält vier Kopien von R1 und sechs Kopien von R2 (=4/6). Diese Repeat-Kombination wies auch der *SAP2*-Promotor der Reporterfusion des Stammes S2FI1A auf (Tab. 5). Das bedeutet, dass in Stamm S2FI1A der ursprüngliche Promotor des Allels *SAP2-1* erhalten wurde, da der Strangaustausch bei der Integration des Reporterengenkonstrukts nahe dem *caFLP*-Startcodon erfolgte und das *caFLP*-Gen somit von dem wildtypischen Promotor mit (4/6)-Struktur kontrolliert wird. Dagegen wurde deutlich, dass in Stamm S2FI1D das crossing-over zwischen Reporterengenkonstrukt und wildtypischem *SAP2-1*-Allel offensichtlich genau zwischen den beiden Repeat-Regionen R1 und R2 des *SAP2-1*-Allels stattgefunden hatte, so dass hier das *caFLP*-Gen von einem künstlichen Hybrid-*SAP2*-Promotor kontrolliert wird, der vier Kopien von R1 und fünf Kopien von R2 (=4/5) enthält (Tab. 5). Zudem zeigte die Sequenzierung, dass der wildtypische Promotor des *SAP2-2*-Allels des Stammes CAI4 wie der Promotor des Genbank-Klons fünf Kopien R1 und fünf Kopien R2 (=5/5) enthält, nur mit dem Unterschied, dass  $P_{SAP2-2}$  in CAI4 in der letzten Kopie von R2 zwei Nukleotidaustausche gegenüber dem Fosmidklon-Promotor aufweist (Tab. 5).

**Tab. 5** Struktur verschiedener Varianten des *SAP2*-Promotors.

<i>SAP2</i> -Allel	Repeatstruktur <sup>a</sup>													
	R1					R2								
Stamm 1161	GCTTT	GCTTT	GCTTT	GCTTT	GCTTT	N <sub>(313)</sub>	TTGAT	TTGAA	TTGAT	TTGAA	TTGAA		N <sub>(299)</sub>	ATG
<i>SAP2-1</i> (CAI4), <i>P<sub>SAP2FLP</sub></i> in S2FI1A/ S2FI6A		GCTTT	GCTTT	GCTTT	GCTTT	N <sub>(313)</sub>	TTGAT	TTGAA	TTGAT	TTGAA	TTGAA	TTGAA	N <sub>(299)</sub>	ATG
<i>SAP2-2</i> (CAI4), <i>P<sub>SAP2FLP</sub></i> in S2FI3B	GCTTT	GCTTT	GCTTT	GCTTT	GCTTT	N <sub>(313)</sub>	TTGAT	TTGAA	TTGAT	TTGAA	TGAAA		N <sub>(299)</sub>	ATG
<i>P<sub>SAP2FLP</sub></i> in S2FI1D		GCTTT	GCTTT	GCTTT	GCTTT	N <sub>(313)</sub>	TTGAT	TTGAA	TTGAT	TTGAA	TTGAA		N <sub>(299)</sub>	ATG
<i>P<sub>SAP2FLP</sub></i> in S2FI2		GCTTT	GCTTT	GCTTT	GCTTT	N <sub>(313)</sub>			TTGAT	TTGAA	TTGAA	TTGAA	N <sub>(299)</sub>	ATG
<i>P<sub>SAP2FLP</sub></i> in S2FI4A/S2FI4B	GCTTT	GCTTT	GCTTT	GCTTT	GCTTT	N <sub>(313)</sub>	TTGAT	TTGAA	TTGAT	TTGAA	TTGAA	TTGAA	N <sub>(299)</sub>	ATG

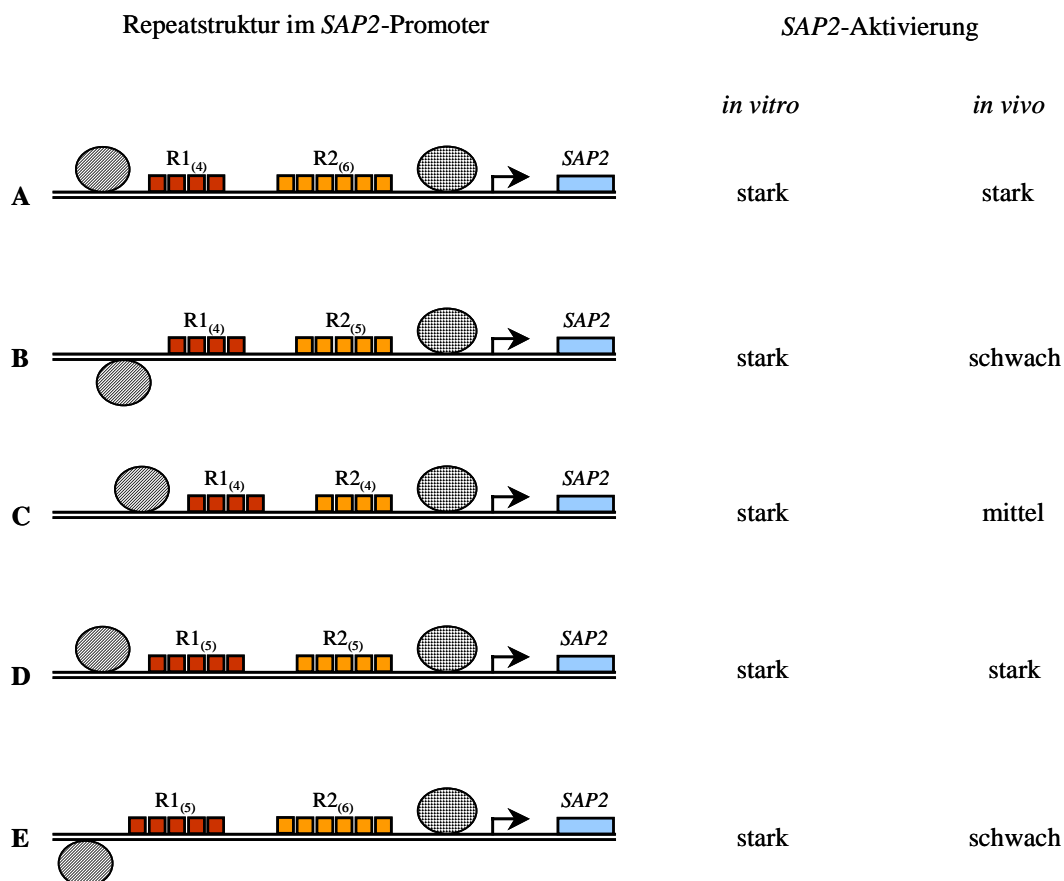
<sup>a</sup>Angegeben ist die Repeatstruktur des *SAP2*-Promotors des Genbank-Klons des Stammes 1161 und die der *SAP2*-Promotoren des Stammes CAI4 (beide Allele), sowie die Struktur in den *SAP2*-Promotoren, die in den Reporterstämmen das *caFLP*-Gen kontrollieren. R1 bzw. R2 bezeichnen die beiden Repeats, N bedeutet Nukleotide.

#### 4.2.2 Einfluß der Gesamtrepeatzahl auf die *SAP2*-Promotorinduktion *in vivo*

Es wurde vermutet, dass der Verlust einer Kopie von Repeat R2 im *SAP2*-Promotor für die verminderte Aktivierbarkeit der Reporterfusion im Stamm S2FI1D während der Infektion verantwortlich war. Zwar weist auch der Promotor im *SAP2-2*-Allel an dieser Stelle nur fünf Repeats auf, enthält dafür jedoch eine zusätzliche Kopie von Repeat R1. Das konnte bedeuten, dass die Gesamtrepeatzahl im *SAP2*-Promotor für die *in vivo*-Induktion wichtig ist. Dies schien möglich, da der Verlust eines Repeats den Abstand der Sequenzen vor den R1 Repeats von den Sequenzen hinter den R2 Repeats um fünf Nukleotide verringerte und Auswirkungen auf Interaktionen von hier bindenden regulatorischen Proteinen haben könnte, da fünf Nukleotide ungefähr einer halben Windung der DNA-Helix entsprechen. Für die Orientierung solcher Proteine zueinander könnte das eine Bindung auf gegenüberliegenden Seiten der DNA-Helix bedeuten (Abb. 16). Diese Situation liegt in keinem der beiden wildtypischen *SAP2*-Promotoren vor, da im Wildtyp-Stamm CAI4 die Gesamtrepeatzahl in *P<sub>SAP2-1</sub>* (4/6) und auch in *P<sub>SAP2-2</sub>* (5/5) insgesamt zehn beträgt (Abb. 16A und D), wie auch im Promotor der Reporterfusion im Stamm S2FI1A, der ja *P<sub>SAP2-1</sub>* entspricht. Vereinfacht sagt diese Hypothese zur *in vivo*-*SAP2*-Aktivierung für einen *SAP2*-Promotor mit gerader Repeat-Gesamtzahl eine gute *in vivo*-Induzierbarkeit voraus, gegeben in den wildtypischen *SAP2*-Promotoren des



Stammes CAI4 und auch im Reporterstamm S2FI1A. Umgekehrt wurde für eine ungerade Repeatzahl wie im *SAP2*-Promotor der Reporterfusion in Stamm S2FI1D eine sehr schlechte *in vivo*-Induzierbarkeit postuliert (Abb. 16). Nach diesem Modell sollte verglichen mit der (4/5)-Repeatkombination eine (4/4)-Struktur die *in vivo*-Aktivierbarkeit zumindest wieder teilweise regenerieren. Zwar entspricht auch in diesem veränderten Promotor der Abstand der DNA-Sequenzen ober- und unterhalb der Repeatregionen nicht dem in den wildtypischen *SAP2*-Promotoren, dafür aber ihre Lage zueinander. Wenn also nicht allein die Anzahl der Kopien von R2, sondern die Gesamtzahl der Kopien von R1 und R2 entscheidend ist, sollte umgekehrt auch eine zusätzliche Kopie von R1 in *P<sub>SAP2-1</sub>* eine signifikante *in vivo*-Induktion eines *SAP2*-Promotors mit (5/6)-Repeatstruktur nicht ermöglichen. Zur Überprüfung dieser Theorie wurden Reporterstämme hergestellt, in denen das *caFLP*-Reportergen von entsprechend mutagenisierten *SAP2*-Promotoren kontrolliert wird. Diese Stämme sollten im Tierversuch auf ihre *SAP2P*-induzierte FLP-Aktivität unter *in vivo*-Bedingungen geprüft werden.

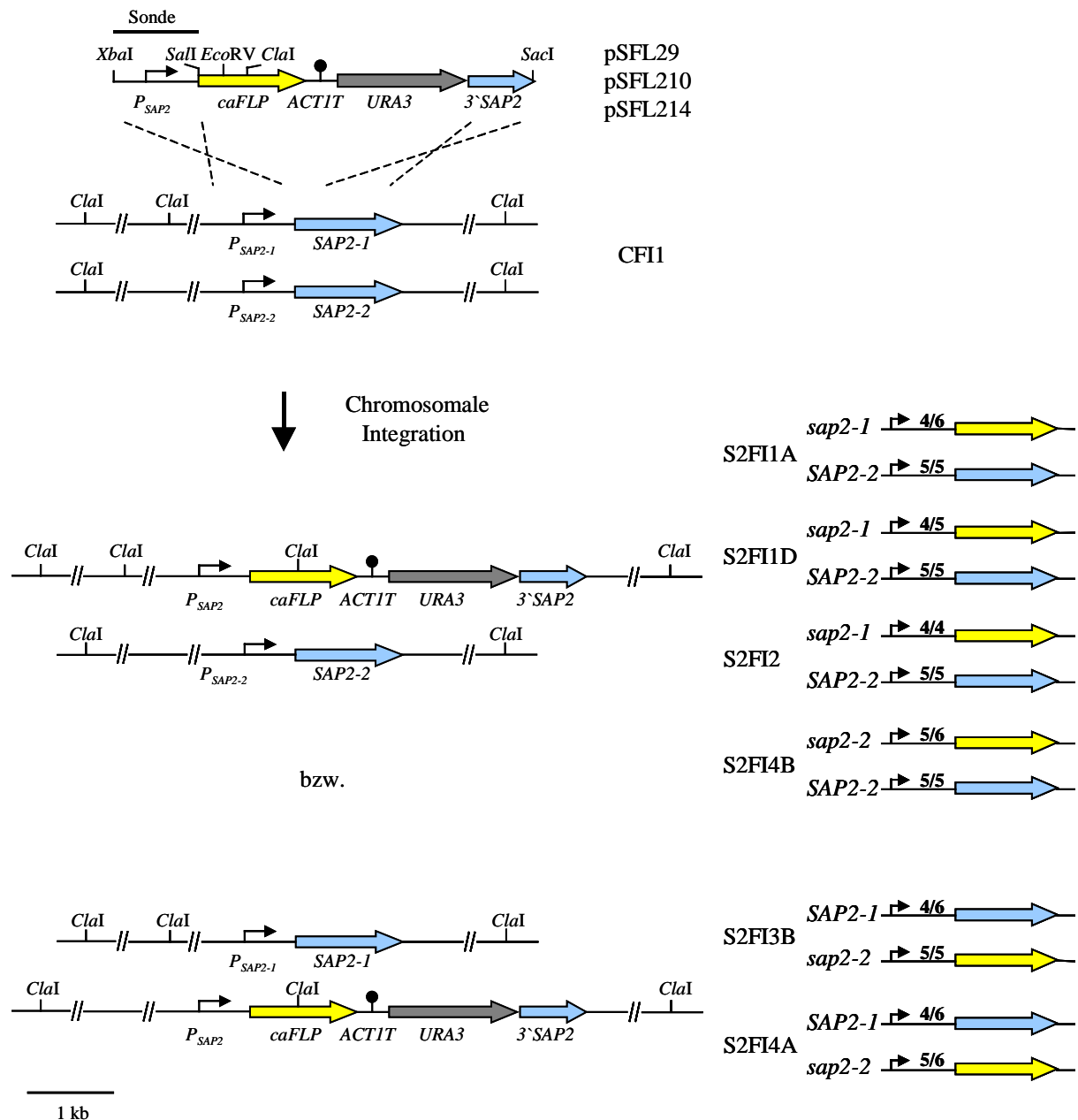


**Abb. 16** Promotorstruktur in den beiden wildtypischen *SAP2*-Allelen (A und D) und in mutierten Versionen (B, C, E). Die Repeats sind durch farbige Quadrate dargestellt, die gemusterten Ovale stellen hypothetische regulatorische Proteine dar, die vor bzw. hinter der Repeatregion an die DNA binden. Der Pfeil markiert das Start-Codon.

#### 4.2.2.1 Herstellung von Reporterstämmen mit veränderten *SAP2*-Promotoren

Für die Herstellung eines *SAP2*-Promotors mit einer (4/4)-Repeatstruktur wurden in dem Plasmid pSAP2PFIA, das den Original-*SAP2-1* Promotor mit der (4/6)-Repeatstruktur enthält, durch Mutagenese zwei R2-Repeats deletiert. Hierfür wurde mit pSAP2PFIA als Template eine inverse PCR mit den divergierenden Primern SAP23 und SAP24 durchgeführt, bei der das gesamte Plasmid amplifiziert wurde. Primer SAP23 enthält Sequenzen des *SAP2*-Promotors von Position -330 bis -355 (-Strang), SAP24 enthält *SAP2P*-Sequenzen von Position -319 bis -292 (+Strang). Das PCR-Produkt wurde zum Plasmid pSAP2PΔR2 religiert, das einen *SAP2*-Promotor mit (4/4)-Repeatstruktur enthält. Ein *SAP2*-Promotor mit der Repeat-Struktur (5/6) wurde bereits als Hybrid der Promotoren  $P_{SAP2-1}$  und  $P_{SAP2-2}$  bei der PCR zur Anreicherung des *SAP2*-Promotors aus dem Stamm CAI4 erhalten.

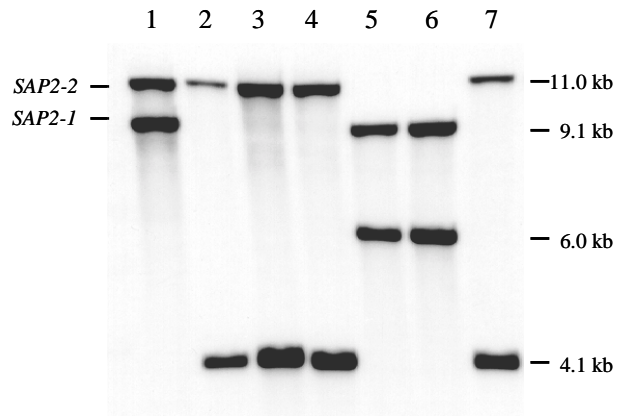
Für die Fusion der unterschiedlichen *SAP2*-Promotoren mit dem *caFLP*-Gen diente das Plasmid pSFL27. Es handelt sich dabei um ein Derivat von pSFL26, in dem ein Teil des Polylinkers durch *XhoI/BamHI*-Spaltung, Auffüllen der überstehenden Enden und anschließender Religation deletiert wurde. In Plasmid pSFL27 wurde dann jeweils das [*XbaI/SalI*]-*SAP2P*-Fragment gegen die entsprechenden *SAP2P*-Varianten ausgetauscht. Dazu wurden die [*XbaI/SalI*]-gespaltenen *SAP2P*-Fragmente zusammen mit dem [*SalI/EcoRV*]-5`*caFLP*-Fragment in den [*XbaI/EcoRV*]-gespaltenen Vektor pSFL27 kloniert, um so die folgenden *SAP2P-caFLP*-Reporterfusionen zu erhalten: Plasmid pSFL29 enthält den originalen *SAP2*-Promotor aus dem *SAP2-1*-Allel des Stammes CAI4 mit der (4/6)-Repeatstruktur, pSFL210 enthält den Promotor aus *SAP2-1*, in dem zwei R2-Repeats deletiert wurden und der somit die Repeatstruktur (4/4) aufweist, und pSFL214 enthält einen künstlichen Hybrid-*SAP2*-Promotor der Allele *SAP2-1* und *SAP2-2* mit der Repeatstruktur (5/6). Die *SAP2P-caFLP*-Fusionen der Plasmide pSFL29, pSFL210 und pSFL214 wurden jeweils in den *C. albicans*-Stamm CFI1 integriert (Abb. 17).



**Abb. 17** Integration von *SAP2P-caFLP*-Fusionen mit verschiedenen Promotorstrukturen in den Stamm CFI1. Dargestellt ist die Struktur der DNA-Kassette sowie die genomische Struktur des Rezipientenstammes und der resultierenden Transformanten. Neben der Allelstruktur ist dabei auch die Promotorstruktur angegeben, die jeweils das *caFLP*-Gen bzw. das intakt erhaltene *SAP2*-Allel kontrolliert. Relevante Restriktionsschnittstellen sind angegeben, wie auch die Bindungsstelle der Sonde zur Southern-Analyse.

Für die Southern-Hybridisierung wurde die chromosomale DNA der erhaltenen Transformanten mit *ClaI* gespalten, da ein entsprechender Restriktionspolymorphismus eine Unterscheidung der beiden *SAP2*-Allele nach Hybridisierung mit dem [*XbaI/SalI*]-*SAP2P*-Fragment aus pSFL27 als Sonde ermöglichte (Abb. 18). In den *C. albicans*-Reporterstämmen S2FI1A, S2FI1D, S2FI2 und S2FI4B (Abb. 18, Spuren 2, 3, 4 bzw. 7) erfolgte die Integration des *SAP2P-caFLP*-Fragments in Allel *SAP2-1* des Stammes CFI1 (Spur 1), so dass die

wildtypische *SAP2-1*-spezifische Bande aufgrund der internen *ClaI*-Restriktionsschnittstelle im *caFLP*-Gen auf 4.1 kb verkleinert wurde. Entsprechend wurde in den Stämmen S2FI3B und S2FI4A (Abb. 18, Spuren 5 bzw. 6) die für Allel *SAP2-2*-spezifische Bande durch ein verkleinertes Fragment mit einer Größe von 6.0 kb ersetzt.



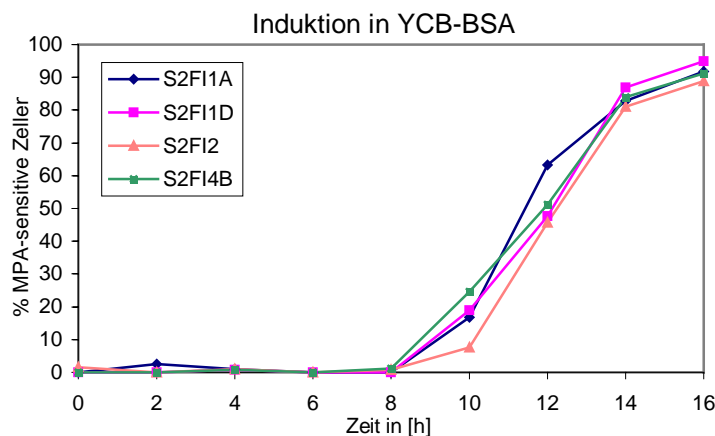
**Abb. 18** Southern-Hybridisierung *ClaI*-gespaltener chromosomaler DNA mit einer *SAP2*-spezifischen Sonde zum Nachweis der Integration der *SAP2P-caFLP*-Fusionen mit verschiedenen Promotorstrukturen in eines der beiden *SAP2*-Allele des Stammes CF11 (1) in verschiedenen Transformanten: (2) S2FI1A, (3) S2FI1D, (4) S2FI2, (5) S2FI3B, (6) S2FI4A, (7) S2FI4B.

In dem Reporterstamm S2FI2, in dem eine Integration des DNA-Fragments aus dem Plasmid pSFL210 erfolgte, wird das *caFLP*-Gen durch den *SAP2*-Promotor mit (4/4)-Repeatstruktur kontrolliert. In den Stämmen S2FI4A und S2FI4B erfolgte die Integration der Kassette aus Plasmid pSFL214, so dass hier das *caFLP*-Gen von einem Hybrid-*SAP2*-Promotor mit der Repeatstruktur (5/6) kontrolliert wird. Der Stamm S2FI3B wurde nach Transformation des Stammes CF11 mit der Reporterfusion aus Plasmid pSFL29 erhalten. Obwohl der *SAP2*-Promotor in pSFL29 den *SAP2*-Promotor aus Allel *SAP2-1* mit der Repeatstruktur (4/6) enthält, wird das *caFLP*-Gen im Stamm S2FI3B von dem originalen *SAP2-2*-Promotor mit der Repeatstruktur (5/5) kontrolliert, da offensichtlich der Strangaustausch bei der Integration des linearen Reporter-genkonstrukts unmittelbar vor dem *caFLP*-Gen erfolgte. Der *SAP2*-Promotorbereich, der für die Aktivierung des *caFLP*-Gens verantwortlich ist, wurde in sämtlichen Reporterstämmen durch Sequenzierung überprüft.

#### 4.2.2.2 Repeatzahl-abhängige *in vivo*-Induzierbarkeit des *SAP2*-Promotors

Die Aktivierbarkeit der verschiedenen *SAP2*-Promotorversionen in Allel *SAP2-1* des Stammes CF11 wurde zunächst *in vitro* untersucht. Die Stämme S2FI3B und S2FI4A, die eine Integration der Reporterfusion im *SAP2-2*-Allel enthalten, wurden in diesem Versuch nicht berücksichtigt. Dadurch wurde für den Vergleich der *SAP2P*-Induzierbarkeit ein möglicher Einfluß des Integrationsortes der jeweiligen Reporterfusion, in diesem Fall Allel *SAP2-1* bzw. *SAP2-2*, ausgeschlossen. Dadurch sollte ein direkter Vergleich der Promotorvarianten gewährleistet werden, da umgekehrt eine Integration eines Reporter-genkonstrukts auch eine

Inaktivierung des betreffenden *SAP2*-Allels bedeutet. Auf diese Tatsache wird an dieser Stelle hingewiesen, da auch Unterschiede in der *SAP2*-Regulation auf Allelebene beobachtet wurden (vgl. Kapitel 4.2.3). Hier soll jedoch die Untersuchung der Abhängigkeit der *SAP2P*-Induzierbarkeit von der Promotorstruktur im Vordergrund stehen. In diesem *in vitro*-Vorversuch wurden die Reporterstämme S2FI1A, S2FI1D, S2FI2 und S2FI4B nach über-Nacht-Vorkultur in Minimalmedium 1:100 in YCB-BSA-Induktionsmedium verdünnt und weiterkultiviert. Zu verschiedenen Zeitpunkten nach Überimpfen wurden Aliquots der Kulturen entnommen und nach Ausplattieren auf den MPA-haltigen Indikatorplatten durch Auszählen großer und kleiner Kolonien der jeweilige Anteil MPA-sensitiver Klone bestimmt (Abb. 19).

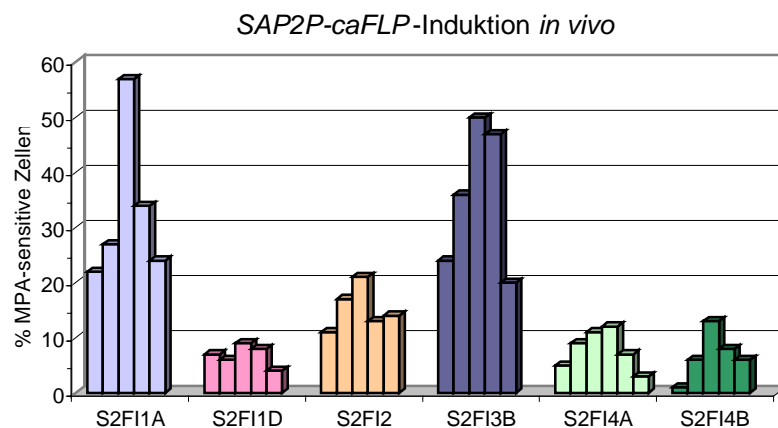


**Abb. 19** FLP-Aktivität in Reporterstämmen mit unterschiedlicher *SAP2*-Promotorstruktur. Die Zellen wurden nach Vorkultur in Minimalmedium in YCB-BSA-Medium überführt; *SAP2P-caFLP*-vermittelte *MPA<sup>R</sup>*-Marker-Deletion wurde durch Ausplattieren von Aliquots der Kulturen auf Indikatorplatten bestimmt.

In den Zellen der Reporterstämme S2FI1D, S2FI2 und S2FI4B, in denen das *caFLP*-Gen von veränderten *SAP2*-Promotoren kontrolliert wird, konnte die *in vitro*-*SAP2P*-Induzierbarkeit in YCB-BSA-Medium nicht von der in Zellen des Stammes S2FI1A unterschieden werden, dessen *caFLP*-Gen von dem originalen *SAP2-1*-Promotor des Stammes CAI4 kontrolliert wird (Abb. 19). Ein Einfluß der Repeatzahl auf die Induzierbarkeit des *SAP2*-Promotors konnte demnach unter diesen *in vitro*-Bedingungen nicht festgestellt werden.

In den vorangegangenen Tierexperimenten zur Analyse der *in vivo*-*SAP2*-Expression wurde bereits gezeigt, dass eine signifikante Aktivierung des *SAP2*-Gens besonders im Spätstadium einer Infektion der Maus stattfindet. Daher wurde die Induktion der wildtypischen bzw. veränderten *SAP2*-Promotoren auch nur zu einem späten Zeitpunkt der Infektion analysiert. Dadurch sollte weniger die Kinetik der *SAP2P*-Induktion im Krankheitsverlauf, als vielmehr eine prinzipiell mögliche Induzierbarkeit der verschiedenen Promotorvarianten überprüft

werden. In den Tierexperimenten wurden Gruppen von Mäusen intravenös mit den Reporterstämmen infiziert. Neben den Stämmen S2FI1A, S2FI1D, S2FI2 und S2FI4B wurden für die *in vivo*-Versuche auch die Stämme S2FI3B und S2FI4A berücksichtigt, die jeweils eine Reporterfusion im *SAP2-2*-Allel enthalten. Die Pilzzellen, die während des systemischen Infektionsverlaufs in die Nieren der Mäuse disseminierten, wurden nach 3-5-tägiger Infektion reisoliert, um den Prozentsatz MPA-sensitiver Kolonien zu bestimmen. Hierfür wurden nur stark erkrankte Tiere herangezogen, bei denen nach Keimzahlbestimmung ein starker Befall der Nieren ( $>5 \times 10^5$  cfu) beobachtet werden konnte (sechs Tiere für den Stamm S2FI4A und je fünf für alle anderen Stämme). Die Ergebnisse aus den *in vivo*-Experimenten mit den verschiedenen *SAP2P-caFLP*-Reporterstämmen sind in Abb. 20 dargestellt.



**Abb. 20** *In vivo*-Aktivierung von veränderten *SAP2*-Promotoren. Nach i.v.-Infektion (mit je  $3 \times 10^5$  Blastosporen) wurden die Zellen der verschiedenen Reporterstämmen nach 3-5 Tagen aus den Nieren der stark erkrankten Mäuse (6 Tiere für S2FI4A und je 5 Tiere für die anderen Stämme) reisoliert, um durch Ausplattieren auf Indikatorplatten den Anteil MPA-sensitiver Kolonien zu bestimmen. Jeder Balken stellt das Ergebnis aus einem Tier dar.

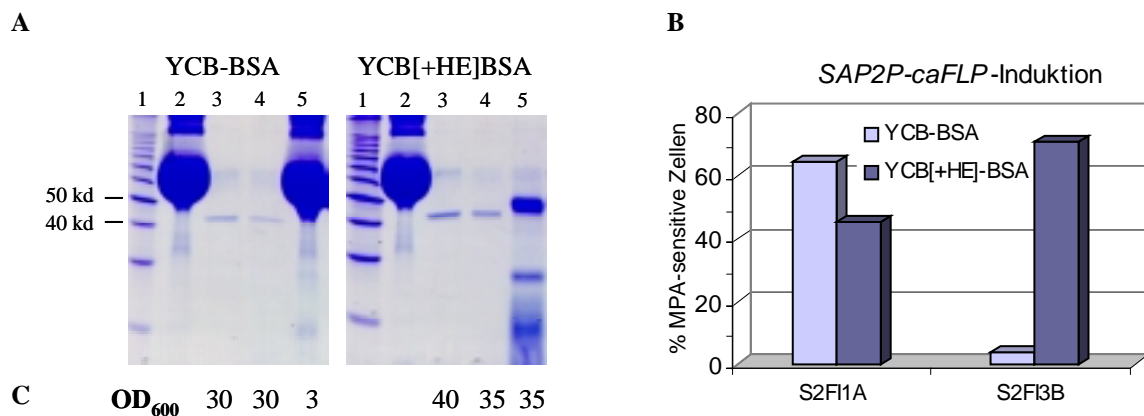
Nachdem aufgrund der *SAP2P*-Induktion durchschnittlich 33% der reisolierten *C. albicans*-Zellen des Stammes S2FI1A den *MPA<sup>R</sup>*-Marker verloren hatten (Abb. 20), wurden die bereits in vorangegangenen Versuchen mit diesem Reporterstamm erzielten Ergebnisse reproduziert (vgl. Kapitel 4.1.5). Ähnliche Induktionsraten wie für den Stamm S2FI1A, dessen Reporterfusion den wildtypischen *SAP2-1*-Promotor mit der Repeatstruktur (4/6) enthält, wurden auch für den Stamm S2FI3B mit 35% MPA-sensitiver Kolonien ermittelt. In Stamm S2FI3B kontrolliert der originale *SAP2-2*-Promotor mit der Repeatstruktur (5/5) das *caFLP*-Gen, das entsprechend auch im *SAP2-2*-Allel integriert wurde. Wie bereits theoretisch postuliert, waren die wildtypischen Promotoren beider *SAP2*-Allele des Stammes CAI4 *in vivo* gut induzierbar, obwohl die Kombination ihrer R1- und R2-Repeats zwar verschieden, d.h. (4/6) in  $P_{SAP2-1}$  bzw. (5/5) in  $P_{SAP2-2}$ , mit insgesamt je 10 Repeats ihre Gesamtkopienzahl

aber dieselbe ist (vgl. Abb. 16A und D). In Zellen des Stammes S2FI1D (7% MPA-sensitive Kolonien), in dem das *caFLP*-Gen von einem Hybrid-*SAP2*-Promotor mit der Repeatstruktur (4/5) kontrolliert wird, wurde dagegen *in vivo* eine stark verminderte Induktion des *SAP2*-Promotors nachgewiesen (Abb. 20), ebenso in Zellen der Stämme S2FI4A und S2FI4B (Abb. 20). Dadurch wurde bestätigt, dass die Aktivierung des *SAP2*-Promotors bei ungeradzahlig (5/6)-Hybrid-Kombination der Repeats R1 und R2 ebenfalls *in vivo* sehr stark verringert wurde, unabhängig, ob in Allel 1 oder Allel 2 des *SAP2*-Gens. Dagegen war mit 15% MPA-sensitiven Kolonien in Zellen des Stammes S2FI2 eine mittelmäßige, aber deutliche *in vivo*-Induktion des *SAP2*-Promotors mit der Repeatkombination (4/4) festzustellen. Bei geradzahlig Gesamt kopienzahl war demnach unabhängig von ihrem Abstand allein durch Wiederherstellen der Symmetrie der upstream und downstream zu den Repeatregionen gelegenen DNA-Sequenzen eine gewisse Aktivierbarkeit des *SAP2*-Promotors möglich (vgl. Abb. 16). Möglicherweise ist eine Gesamt kopienzahl der Repeats R1 und R2 von insgesamt 10 für eine signifikante Induzierbarkeit des *SAP2*-Promotors während der Infektion notwendig, während eine ungerade Repeatanzahl eine signifikante Induktion nicht ermöglicht. Nachdem die unterschiedlichen Promotorvarianten aber während des Wachstums der Reporterstämme in YCB-BSA-Medium gleich gut aktivierbar waren, zeigten die Ergebnisse auch, dass bei der Aktivierung des *SAP2*-Gens unter *in vitro*- bzw. *in vivo*-Bedingungen offensichtlich verschiedene regulatorische Mechanismen beteiligt waren.

#### 4.2.3 Differentielle *in vitro*-Regulation der wildtypischen *SAP2*-Allele

Während der Analyse der verschiedenen *SAP2*-Reporterstämme wurde die erstaunliche Beobachtung gemacht, dass sämtliche Transformanten des Stammes CFI1 mit Integration eines DNA-Fragments im *SAP2-2*-Allel, z.B. die Stämme S2FI3B und S2FI4A, nach über-Nacht-Kultur in YCB-BSA-Medium nur sehr schwach wuchsen. Hingegen zeigten heterozygote *SAP2*-Mutanten mit einer Integration in Allel *SAP2-1* in diesem Medium, in dem BSA die alleinige Stickstoffquelle darstellt, genauso starkes Wachstum wie der Wildtyp-Stamm SC5314. Im Proteingel konnte für die Stämme SC5314 und S2FI1A die typische Bande von der Größe der sekretierten Protease *SAP2* im Überstand des YCB-BSA-Mediums nach 18 h Wachstum nachgewiesen werden, und auch indirekt konnte durch den vollständigen BSA-Abbau in den entsprechenden Kulturen dieser Stämme eine proteolytische Aktivität gezeigt werden, nicht jedoch für den Stamm S2FI3B (Abb. 21A, vgl. Spuren 3/4 mit 5). Auch

konnte nach YCB-BSA über-Nacht-Kultur in Zellen des Stammes S2FI3B nach Ausplattieren auf Indikatorplatten zumindest mit dem hier verwendeten Reportersystem keine signifikante Induktion des *SAP2*-Promotors detektiert werden (Abb. 21B). Nach Zusatz von 0.2% Hefeextrakt zum YCB-BSA-Medium (= YCB[+HE]BSA), ließ sich jedoch sowohl Wachstum der Stämme, die kein intaktes *SAP2-2*-Allel besitzen, als auch Induktion des *SAP2*-Promotors ihrer Reporterfusionen wiederherstellen (Abb. 21B und C). Offensichtlich erleichterte ein aktives Wachstum in dem mit Hefeextrakt supplementierten Medium die Induktion des *SAP2*-Promotors der Reporterfusion in Allel *SAP2-2*, auch ohne dass eine starke Expression des *SAP2-1*-Allels erfolgte, da nach Wachstum des Stammes S2FI3B in YCB[+HE]-BSA das zugesetzte BSA nach 18 h nicht vollständig abgebaut war (Abb. 22A, Spur 5).



**Abb. 21** Allel-abhängige *SAP2*-Aktivierung im *C. albicans*-Stamm CAI4. Überprüfung der *SAP2*-Induktion durch Nachweis der *SAP2*-spezifischen 43 kd-Bande bzw. des BSA-Abbaus im Überstand von Kulturen des Wildtyp-Stammes SC5314 (A, Spur 3) sowie der Stämme S2FI1A mit inaktiviertem Allel *SAP2-1* (A, Spur 4) bzw. S2FI3B mit inaktiviertem Allel *SAP2-2* (A, Spur 5) nach 18 h Wachstum in YCB-BSA- bzw. YCB[+HE]-BSA-Medium. In Spur 1 ist der Größenmarker, in Spur 2 nicht-beimpftes Medium aufgetragen; die Gele wurden mit Coomassie-blau gefärbt. Parallel wurde durch Ausplattieren von Aliquots der Kulturen der Stämme S2FI1A bzw. S2FI3B auf Indikatorplatten die *SAP2P-caFLP*-Induktion bestimmt (B). Das Wachstum der Stämme wurde durch Messung der optischen Dichte der Kulturen ermittelt (C).

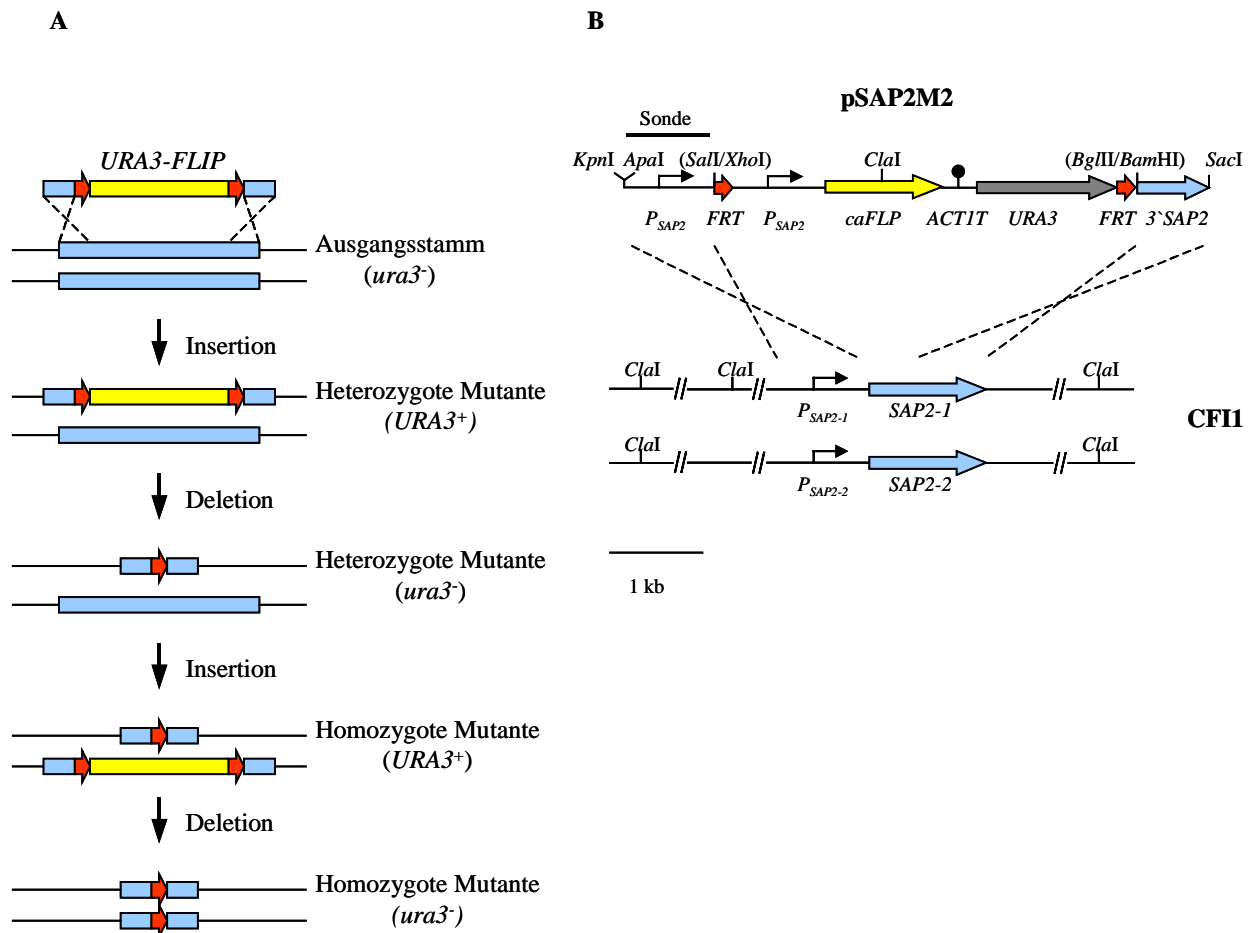
Aufgrund der Integration einer Reporterfusion in eines der beiden Allele stellten die Reporterstämme gleichzeitig auch heterozygote *SAP2*-Mutanten dar. Für das auffallend unterschiedliche Verhalten der Stämme mit inaktiviertem Allel *SAP2-1* bzw. *SAP2-2* waren zwei Erklärungen denkbar. Zum einen bestand die Möglichkeit, dass die beiden *SAP2*-Allele unterschiedlich reguliert werden und Allel *SAP2-2* möglicherweise leichter aktivierbar ist als Allel *SAP2-1*. Da in Stamm S2FI1A  $P_{SAP2-1}$  signifikant induziert wurde, würde das bedeuten, dass eine starke Expression des Allels *SAP2-1* von einem intakten *SAP2-2*-Allel abhängig wäre. Demnach sollte eine Induktion des Promotors in Allel *SAP2-1* in Stämmen mit defektem *SAP2-2*-Allel daher nicht möglich sein. Andererseits konnte aber auch vermutet werden, dass beide Allele gleichermaßen reguliert werden, aber ihre jeweils codierenden



Regionen nicht identisch sind und möglicherweise die durch Allel *SAP2-1* codierte Protease nicht voll funktionell ist bzw. sekretiert wird. Beide Möglichkeiten sollten überprüft werden. Für diese Versuchsvorhaben war es notwendig, heterozygote und homozygote *SAP2*-Mutanten herzustellen. Dadurch konnte einerseits mit entsprechenden Reporterstämmen geprüft werden, ob Allel *SAP2-1* nach Inaktivierung von Allel *SAP2-2* aktivierbar ist. Andererseits dienen homozygote *SAP2*-Mutanten dazu, um nach Sequenzierung der codierenden Regionen der beiden *SAP2*-Allele Stämme zu konstruieren, in denen jeweils eines der beiden Allele konstitutiv exprimiert wird. Dadurch sollte geprüft werden, ob beide Allele für aktive Proteasen codieren. Da für beide Vorhaben eine Inaktivierung der *SAP2*-Allele notwendig war, wird zunächst die Herstellung einer *SAP2*-Nullmutante des Stammes CF11 beschrieben.

#### 4.2.3.1 Sequentielle Inaktivierung der beiden *SAP2*-Allele

Da *Candida albicans* ein diploider Organismus ist, ergibt sich bei der Herstellung von homozygoten *C. albicans*-Mutanten das Problem, dass erst eine Inaktivierung beider Allele eines zu untersuchenden Gens zum Phänotyp einer Nullmutante führt. Hat man zur Selektion nach Transformation eines auxotrophen Stammes wie z.B. des hier verwendeten *ura3*-negativen Stammes CAI4 bzw. CF11 nur einen Selektionsmarker zur Verfügung, muß dieser nach Inaktivierung des ersten Allels zunächst wieder aus der prototrophen heterozygoten Mutante entfernt, d.h. regeneriert werden. Erst dann kann der gleiche Selektionsmarker zum Ausschalten des verbleibenden intakten Allels der nun wiederum auxotrophen heterozygoten Mutante verwendet werden. Eine sehr elegante Alternative zur der seit einigen Jahren standardisierten „*URA3*-blasting“-Methode der Markerregenerierung stellt die Strategie des „*URA3*-Flipping“ dar (Morschhäuser *et al.*, 1999) (Abb. 22A). Diese neue Methode beruht auf der Verwendung einer DNA-Kassette, die neben dem *URA3*-Marker die *SAP2P-caFLP*-Fusion enthält und zudem von den Erkennungssequenzen der FLP-Rekombinase flankiert ist. Wird diese Kassette über homologe Rekombination in eines der beiden Allele eines Gens inseriert, kann nach Selektion und Überprüfung der heterozygoten prototrophen Mutanten der Marker durch *SAP2P*-induzierte FLP-Aktivität wieder deletiert werden, um so für die zweite Mutageneserunde zur Verfügung zu stehen.

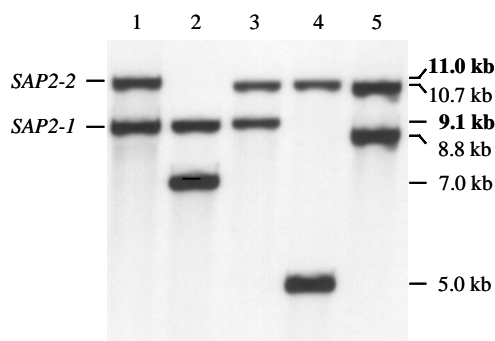


**Abb. 22** Sequentielle Inaktivierung der *SAP2*-Allele in Stamm CFI1 durch „*URA3*-Flipping“. In (A) ist schematisch die Funktionsweise der Mutagenese-Strategie dargestellt, (B) zeigt die genaue Struktur der *SAP2*-spezifischen „*URA3*-Flipping“-Kassette und die ihres Insertionsortes im Rezipienten-Stamm CFI1. Relevante Restriktionsschnittstellen zur Herstellung der Kassette und zur Überprüfung ihrer Integration durch Southern-Analyse sind angegeben, wie auch die Bindungsstelle der hierfür verwendeten Sonde. Die eingeklammerten Restriktionsschnittstellen wurden während der Herstellung zerstört.

Für die Inaktivierung der beiden *SAP2*-Allele des Stammes CFI1 wurde die „*URA3*-Flipping“-Kassette entsprechend mit 5'- und 3'-Sequenzen des *SAP2*-Gens flankiert. Als Ausgangsplasmid für weitere Klonierungsschritte diente hierzu das Plasmid pSFUC2, das die vollständige „*URA3*-Flipping“-Kassette zur Inaktivierung des *C. albicans* *CDR4*-Gens beinhaltet. In Plasmid pSAP2M1 wurde der *CDR4*-Promotor durch das [*KpnI/SalI*]-*SAP2P*-Fragment aus Plasmid pSFL29 ersetzt. Ein Fragment mit Sequenzen der codierenden Region des *SAP2*-Gens wurde durch PCR unter Verwendung von Plasmid pSFL29 als template mit den Primern SAP2C und dem Universalprimer angereichert. Primer SAP2C enthält *SAP2*-Sequenzen von Position 352-374, an Position 363 wurde eine *BamHI*-Restriktionsschnittstelle eingeführt. Mit dem *BamHI/SacI*-gespaltenen PCR-Produkt wurde das [*BglII-SacI*]-3'*CDR4*-Fragment in pSAP2M1 ersetzt und führte so zu Plasmid pSAP2M2. Es enthält eine „*URA3*-Flipping“-Kassette, die von 5'- und 3'*SAP2*-Sequenzen flankiert ist. Das gesamte [*ApaI/SacI*]-

gespaltene DNA-Konstrukt aus pSAP2M2 wurde verwendet, um die wildtypischen *SAP2*-Allele des Stammes CFI1 zu ersetzen (Abb. 22B).

Insertion der Mutagenese-Kassette aus pSAP2M2 in Allel *SAP2-2* des Stammes CFI1 führte zur heterozygoten Transformante SAP2M1A (Abb. 23, Spur 2). Zur Southern-Analyse wurde die chromosomale DNA mit *ClaI* gespalten und mit dem [*XbaI/SalI*]-*SAP2P*-Fragment aus dem Plasmid pSFL29 als Sonde hybridisiert. Während die wildtypische *SAP2*-spezifische 9.1 kb-Bande des *SAP2-1*-Allels erhalten blieb, wurde das wildtypische 11.0 kb *SAP2-2*-Fragment in SAP2M1A auf 7 kb verkleinert, da sich im *caFLP*-Gen der Mutagenese-Kassette eine *ClaI*-Restriktionsschnittstelle befindet. Der *URA3*-prototrophe Stamm SAP2M1A wurde in *SAP2P*-induzierendem YCB-BSA-Medium über Nacht kultiviert, um so durch FLP-Aktivität die „*URA3*-Flipping“-Kassette zu deletieren. Die Klone des resultierenden Stammes SAP2M2A, die auf diese Weise den Selektionsmarker verloren hatten, konnten nach Ausplattieren der YCB-BSA-Kultur auf Minimalagarplatten mit Zusatz von nur 10 µg/ml Uridin anhand ihrer kleinen Koloniegröße leicht von den *URA3*-prototrophen großen Kolonien unterschieden werden. Das FLP-vermittelte Deletionsereignis in dem Stamm SAP2M2A wurde durch Southern-Analyse bestätigt (Abb. 23, Spur 4). Durch Deletion von 0.35 kb der codierenden Region in Allel *SAP2-2* hybridisierte in SAP2M2A entsprechend ein im Vergleich zum wildtypischen *SAP2-2*-Fragment leicht verkleinertes *SAP2*-spezifisches Fragment. Aufgrund des Rekombinationsereignisses blieb in dem inaktivierten Allel *SAP2-2* des Stammes SAP2M2A eine *FRT*-site zurück.



**Abb. 23** Southern-Hybridisierung *ClaI*-gespaltener chromosomaler DNA des Ausgangsstammes und seiner mutierten Derivate mit einer *SAP2*-spezifischen Sonde. (1) CFI1, (2) SAP2M1A, (3) SAP2M2A, (4) SAP2M3A, (5) SAP2M4A. Die in fetter Schrift angegebenen Größen repräsentieren die wildtypischen *SAP2*-Allele.

Die DNA-Kassette aus Plasmid pSAP2M2 wurde auch für die zweite Mutageneserunde verwendet, um das wildtypische *SAP2-1*-Allel in Stamm SAP2M2A zu inaktivieren. Ihre korrekte Integration in Allel *SAP2-1* im resultierenden Stamm SAP2M3A wurde bestätigt, da das wildtypische *SAP2-1*-Fragment wie bereits in der ersten Mutageneserunde zur Inaktivierung von Allel *SAP2-2* durch Integration der „Flipping-Kassette“ um die entsprechend gleiche Größe verschoben wurde (Abb. 23, Spur 4). In dem *URA3*-prototrophen

Stamm SAP2M3A sind beide *SAP2*-Allele inaktiviert, wobei Allel *SAP2-2* eine *FRT*-site, Allel *SAP2-1* die gesamte „*URA3*-Flipping“-Kassette enthält. Wie bei der Inaktivierung von Allel *SAP2-2* beschrieben, wurde die Mutagenese-Kassette auch aus Allel *SAP2-1* deletiert, was zur Herstellung des Stammes SAP2M4A führte. Die Exzision des Markers in diesem Stamm wurde durch Southern-Hybridisierung überprüft (Abb. 23, Spur 5). Da wie in Allel *SAP2-2* nun auch in Allel *SAP2-1* 0.35 kb der codierenden Region deletiert wurden, sind in SAP2M4A beide hybridisierenden Fragmente gegenüber den beiden wildtypischen Banden um den deletierten Bereich abzüglich je einer zurückbleibenden *FRT*-site von 34 bp verkleinert. In der *ura3*-auxotrophen homozygoten *SAP2*-Mutante SAP2M4A sind beide *SAP2*-Allele inaktiviert, beide enthalten je eine *FRT*-site.

#### **4.2.3.2 Beide *SAP2*-Allele werden funktionell exprimiert**

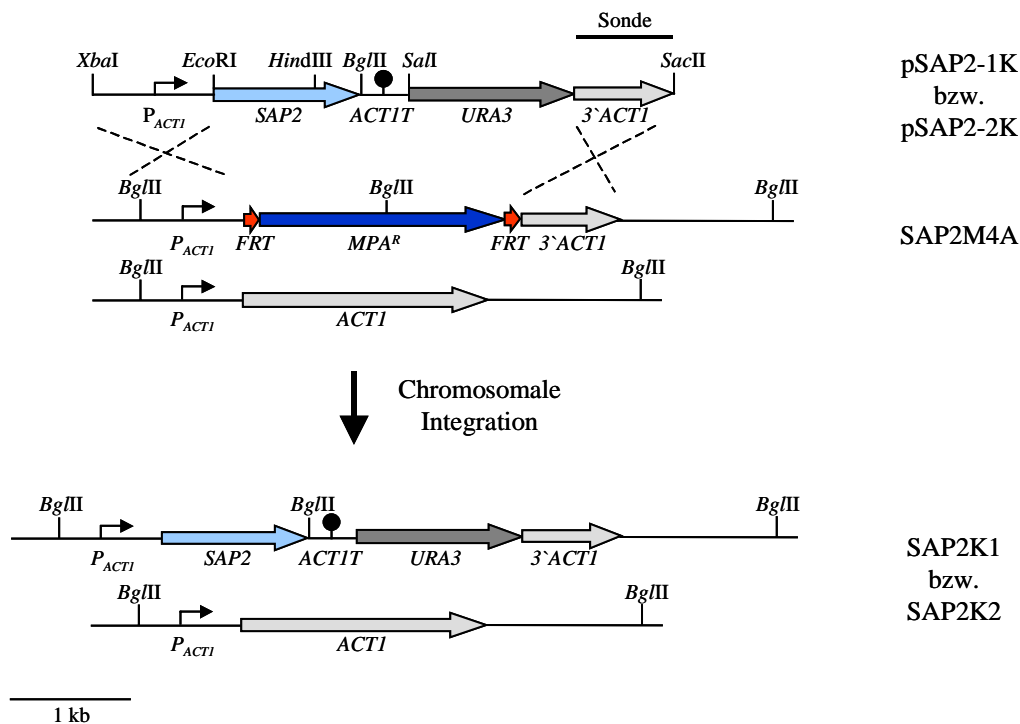
Bevor die Hinweise auf eine differentielle Regulation der beiden *SAP2*-Allele des Stammes CAI4 eingehend untersucht wurden, sollte zunächst überprüft werden, ob beide *SAP2*-Allele für sekretierte und funktionelle Proteasen codieren. Dazu wurden zunächst die codierenden Regionen der Allele *SAP2-1* bzw. *SAP2-2* spezifisch kloniert und durch Sequenzierung verglichen.

Hierfür wurden die beiden *SAP2*-Allele durch PCR mit den Primern SAP27 und SAP28 angereichert. Primer SAP27 enthält *SAP2*-Sequenzen vor dem Startcodon von Position -27 bis -9 (+Strang), Primer SAP28 enthält *SAP2*-Sequenzen um das Stopcodon von Position 1216-1198 (-Strang). Als template diente für die Klonierung der *SAP2-1*-Sequenzen chromosomale DNA des Stammes S2FI3A, der wie S2FI3B infolge Insertion einer *SAP2P-caFLP*-Fusion ein inaktiviertes *SAP2-2*-Allel enthält. Für die Klonierung der *SAP2-2*-Sequenzen wurde chromosomale DNA des Stammes S2FI1A verwendet, in dem Allel *SAP2-1* inaktiviert vorliegt. Die erhaltenen PCR-Produkte wurden phosphoryliert und jeweils in die *Sma*I-Restriktionsschnittstelle des Plasmids pUC18 kloniert, um so die Plasmide p*SAP2-1* und p*SAP2-2* herzustellen. Das Plasmid p*SAP2-1* enthält die codierende Region des *SAP2-1*-Allels, Plasmid p*SAP2-2* entsprechend die des *SAP2-2*-Allels des *C. albicans*-Stammes CAI4. Durch Sequenzierung der klonierten *SAP2*-Sequenzen beider Allele mit den Primern Universal und Reverse konnten nur zwei konservierte Aminosäure-Austausche detektiert werden. Innerhalb der Signalsequenz an Position 9 enthält das durch Allel *SAP2-1* codierte Enzym die Aminosäure Alanin, das durch Allel *SAP2-2* codierte dagegen Glycin. Ein weiterer

Unterschied wurde an Position 258 des reifen Proteins gefunden, nachdem Allel *SAP2-1* hier für Valin, Allel *SAP2-2* für Leucin codiert.

Um zu prüfen, ob die in den *SAP2*-Sequenzen gefundenen Allelunterschiede die Sekretion bzw. Aktivität der jeweiligen Protease beeinflussen, wurden die beiden *SAP2*-Allele unabhängig mit dem *ACT1*-Promotor fusioniert und in den Aktin-Lokus der *ura3*-negativen *SAP2*-Nullmutante *SAP2M4A* integriert. Für die Herstellung der entsprechenden Integrations-Kassetten wurden die codierenden Regionen der beiden *SAP2*-Allele über PCR mit den Primern *SAP2K* und *SAP2L* angereichert. Als template diente für die Amplifizierung des *SAP2-1*-Allels chromosomale DNA des Stammes *S2FI3B* mit inaktiviertem Allel *SAP2-2*; für die Anreicherung des *SAP2-2*-Allels diente entsprechend chromosomale DNA des Stammes *S2FI1A*. Primer *SAP2K* enthält *SAP2*-Sequenzen von Position +1 bis +25 (+Strang) und davor eine *EcoRI*-Restriktionsschnittstelle und drei Adenosin-Reste zur optimalen Translation. Primer *SAP2L* enthält *SAP2*-Sequenzen von Position 1207 bis 1178 (-Strang), wobei an Position 1197 hinter dem Stopcodon eine *BglIII*-Restriktionsschnittstelle eingeführt wurde. Die erhaltenen PCR-Produkte wurden mit *EcoRI* und *HindIII* (Position 875 der *SAP2*-Sequenz) gespalten, in pKSII kloniert und führten so zu den Plasmiden p*SAP2-4*, das 5'-Sequenzen von Allel *SAP2-1*, bzw. p*SAP2-6*, das 5'-Sequenzen von Allel *SAP2-2* enthält. Die Sequenz des 3'codierenden *SAP2*-Bereichs, die für die beiden Allele identisch ist, wurde zunächst in einem unabhängigen Schritt am Stop-Codon mit der *ACT1*-Transkriptions-Terminationssequenz fusioniert. Hierzu wurde das PCR-Produkt, das mit den Primern *SAP2K* und *SAP2L* sowie chromosomaler DNA des Stammes *S2FI1A* als template erhalten wurde, an der internen *HindIII*- und der in Primer *SAP2L* hinter dem Stop-Codon eingeführten *BglIII*-Restriktionsschnittstelle gespalten. Das *ACT1T*-Fragment wurde über PCR mit den Primern *ACT16* und *ACT10* erhalten. Als template diente chromosomale DNA des Stammes *CAI4*. Primer *ACT16* enthält *ACT1*-Sequenzen ab dem Stop-Codon von Position 1783-1810 (+Strang), wobei an Position 1788 eine *BglIII*-Restriktionsschnittstelle eingeführt wurde. Primer *ACT10* enthält *ACT1*-Sequenzen von Position 2182-2154 (-Strang) einschließlich der *SalI*-Restriktionsschnittstelle an Position 2177. Das [*HindIII*-*BglIII*]-3'-*SAP2*-Fragment wurde zusammen mit dem [*BglIII*-*SalI*]-*ACT1T*-Fragment in den *HindIII*/*SalI*-gespaltenen pKSII-Vektor kloniert und führte zur Herstellung des Plasmids p*SAP2-7*. Es enthält den für beide Allele identischen 3'*SAP2*-Bereich, der direkt hinter dem Stop-Codon mit der Aktin-Terminationssequenz fusioniert wurde. In unabhängigen Klonierungsschritten wurden nun die unterschiedlichen 5'-Sequenzen der Allele *SAP2-1* und *SAP2-2* am Start-Codon mit dem

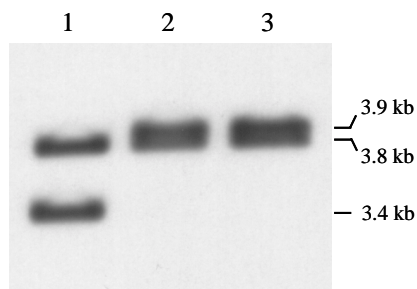
Aktin-Promotor fusioniert. Hierfür wurde ein [*Xba*I-*Eco*RI]-*ACT1P*-Fragment aus dem Plasmid pGFP44 zusammen mit dem [*Eco*RI-*Hind*III]-5`*SAP2*-Fragment aus Plasmid pSAP2-4 bzw. pSAP2-6 und dem [*Hind*III-*Sal*I]-[3`*SAP2-ACT1T*]-Fragment aus Plasmid pSAP2-7 in das *Xba*I/*Sal*I-gespaltene Plasmid pGFP26A kloniert. Es entstanden so die Plasmide pSAP2-1K bzw. pSAP2-2K, in denen die codierenden Regionen der Allele *SAP2-1* bzw. *SAP2-2* des Stammes CAI4 unter Kontrolle des CAI4-*ACT1*-Promotors stehen. Ihre *Xba*I/*Sac*II-gespaltenen DNA-Kassetten wurden für die Integration in den *ACT1*-Lokus der homozygoten, *ura3*-negativen *SAP2*-Mutante *SAP2M4A* verwendet (Abb. 24).



**Abb. 24** Herstellung der Stämme SAP2K1 und SAP2K2, in denen die wildtypischen Allele des *SAP2*-Lokus inaktiviert vorliegen, dafür jeweils eines der beiden *SAP2*-Allele konstitutiv durch den *ACT1*-Promotor aus *C. albicans* exprimiert wird. Dargestellt ist die Struktur der zur Transformation eingesetzten DNA-Kassette aus den Plasmiden pSAP2-1K bzw. pSAP2-2K sowie die genetische Struktur des Rezipientenstammes *SAP2M4A* vor und nach Insertion der DNA-Kassette im Aktin-Lokus. Relevante Restriktionsschnittstellen sind eingetragen, ebenso die Bindungsstelle der Sonde für die Southern-Analyse.

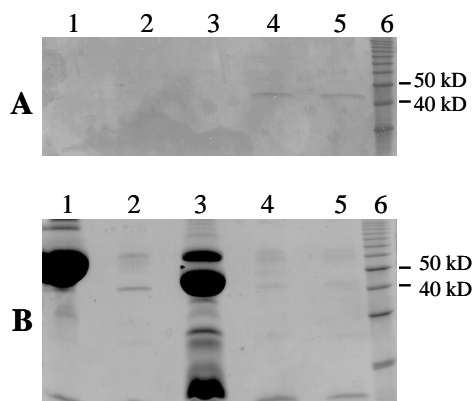
Die Hybridisierung *Bgl*III-gespaltener chromosomalen DNA der Transformanten mit einer 3`-*ACT1*-Sonde (ein PCR-Produkt, das mit den Primern ACT3 und ACT4 sowie pACT5-Plasmid-DNA als template erhalten wurde) bestätigte die korrekte Integration der *ACT1P-SAP2-1*- bzw. *ACT1P-SAP2-2*-Fusion (Abb. 25). Durch Insertion der Kassette in das Aktin-Allel in *SAP2M4A*, das den *MPA*<sup>R</sup>-Marker enthält, wurde in den Stämmen *SAP2K1* und *SAP2K2* die 3.4 kb *ACT1*-Bande durch eine neue, um 0.5 kb vergrößerte Bande ersetzt

(Abb. 25, Spuren 2 und 3). In den resultierenden Transformanten SAP2K1 und SAP2K2 werden die Allele *SAP2-1* bzw. *SAP2-2* durch den Aktin-Promotor kontrolliert.



**Abb. 25** Nachweis der Integration der codierenden Regionen der individuellen *SAP2*-Allele unter Kontrolle des *ACT1*-Promotors in eines der beiden *ACT1*-Allele in Stamm SAP2M4A durch Southern-Hybridisierung *Bgl*III-gespaltener chromosomaler DNA mit einer *ACT1*-spezifischen Sonde. (1) SAP2M4A, (2) SAP2K1, (3) SAP2K2

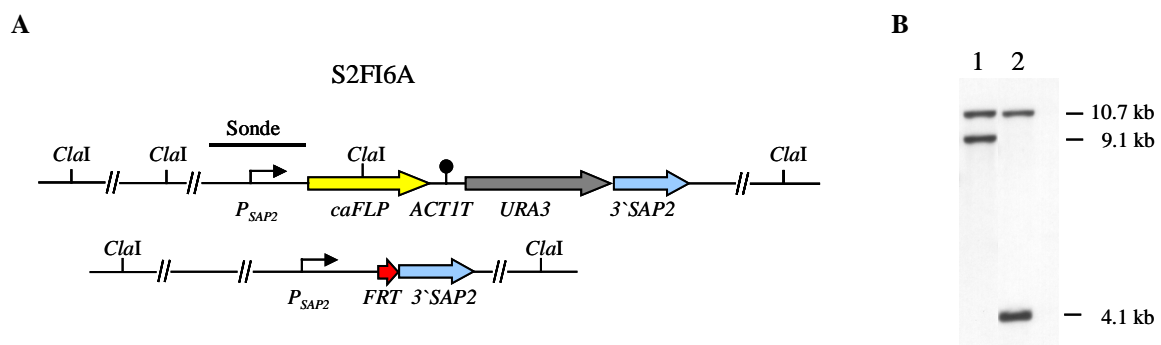
Aufgrund konstitutiver Expression der unabhängigen *SAP2*-Allele in einem *C. albicans*-Stamm, der selbst kein intaktes *SAP2*-Gen besitzt, konnte die Funktionalität der beiden *SAP2*-Allele nun geprüft werden. Nach Anzucht der Stämme SAP2K1 und SAP2K2 in YPD-Medium wurde die *SAP2*-typische Proteinbande im Kulturüberstand nachgewiesen, wodurch demonstriert wurde, dass beide *SAP2*-Allele konstitutiv exprimiert und sekretiert wurden (Abb. 26A, Spuren 4 und 5). Unter diesen *SAP2*-reprimierenden Bedingungen wurde die entsprechende Bande weder im Kulturüberstand des Wildtyps SC5314 noch der *SAP2*-Nullmutante SAP2M3A detektiert (Abb. 26A, Spuren 2 und 3). Zudem konnte auch gezeigt werden, dass beide *SAP2*-Allele für funktionelle Proteasen codieren, da nach Wachstum der Stämme SAP2K1 und SAP2K2 in YCB-BSA und YCB[+HE]-BSA-Medium das zugesetzte BSA vollständig abgebaut wurde, während dies in der Kultur der homozygoten *SAP2*-Mutante SAP2M3A nicht der Fall war (Abb. 26B, Spuren 3-5). Diese Ergebnisse machten deutlich, dass beide *SAP2*-Allele im *C. albicans*-Stamm CAI4 für sekretorische, aktive Proteasen codieren. Dies unterstützte wiederum die Annahme ihrer differentiellen Regulation.



**Abb. 26** Überprüfung der konstitutiven *SAP2*-Expression und proteolytischen Aktivität der Stämme SAP2K1 und SAP2K2 in *SAP2*-reprimierendem YPD-Medium (**A**) bzw. *SAP2*-induzierendem YCB[+HE]-BSA-Medium (**B**), verglichen mit dem Wildtyp SC5314 und der *SAP2*-Mutante SAP2M3A. Die Kulturüberstände wurden mit SDS 12%-igen Polyacrylamid-Gelen untersucht, die mit Silber (**A**) bzw. Coomassie-Blau (**B**) gefärbt wurden. (1) Medium, (2) SC5314, (3) SAP2M3A, (4) SAP2K1, (5) SAP2K2, (6) Größenmarker.

#### 4.2.3.3 Abhängigkeit der Expression des *SAP2-1*-Allels von Allel *SAP2-2*

Die Stämme S2FI1A, S2FI1D, S2FI2 und S2FI4B mit jeweils einer *SAP2P-caFLP*-Reporterfusion in Allel *SAP2-1*, stellten gleichzeitig heterozygote *SAP2*-Mutanten des Stammes CFI1 bzw. CAI4 dar, in denen nur Allel *SAP2-2* intakt erhalten war. Entsprechend war die durch Allel *SAP2-2* codierte Protease für den raschen BSA-Abbau und das gute Wachstum dieser Transformanten in YCB-BSA-Medium verantwortlich. Umgekehrt erlaubte das intakt erhaltene *SAP2-1*-Allel in den Stämmen S2FI3B und S2FI4A in diesem Medium kein starkes über Nacht-Wachstum. Da aber der in Allel *SAP2-1* inserierte Reporter gut induzierbar war, wie z.B. in Stamm S2FI1A, lag die Vermutung nahe, dass eine signifikante Induktion des *SAP2-1*-Allels von einem intakten *SAP2-2*-Allel abhängig ist. Für die Überprüfung dieser Annahme diente der Reporterstamm S2FI6A, der dem Stamm S2FI1A entspricht, mit dem Unterschied, dass er kein funktionelles Proteasegen im Allel *SAP2-2* besitzt (Abb. 27A). Zu seiner Herstellung wurde die *SAP2P-caFLP*-Reporterfusion aus Plasmid pSFL29 in Allel *SAP2-1* der *ura3*-negativen, heterozygoten *SAP2*-Mutante SAP2M2A integriert, in der Allel *SAP2-2* bereits inaktiviert wurde. Southern-Hybridisierung mit dem [*Xba*I-*Sal*I]-*SAP2P*-Fragment aus Plasmid pSFL29 als Sonde bestätigte die Insertion der *SAP2P-caFLP*-Fusion in das intakte *SAP2-1*-Allel in Stamm SAP2M2A, da die wildtypische *SAP2*-spezifische 9.1 kb-Bande durch eine neue Bande der Größe 4.1 kb ersetzt wurde (Abb. 27).



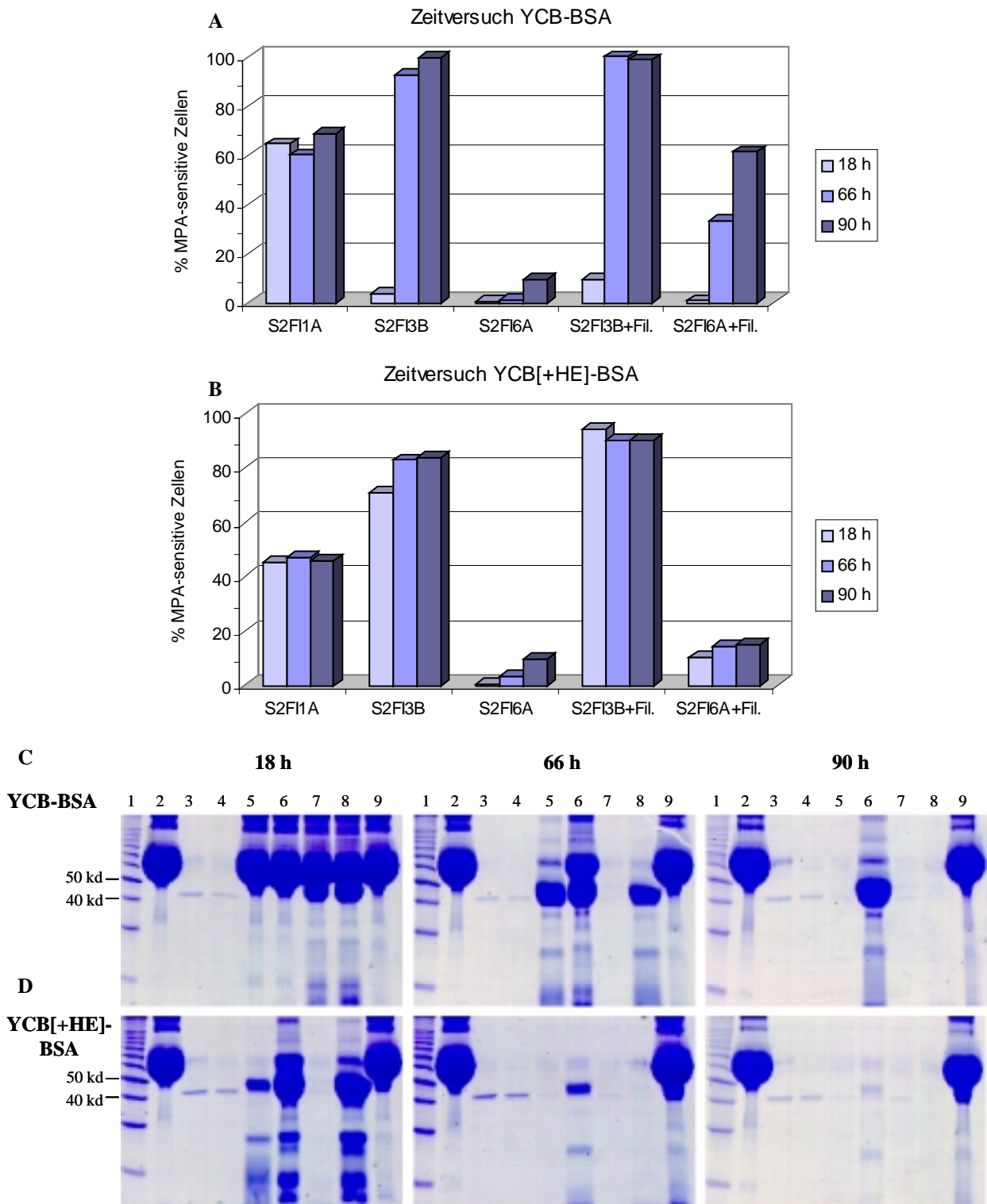
**Abb. 27** Herstellung des Stammes S2FI6A, der in Allel *SAP2-1* die *SAP2P-caFLP*-Fusion aus Plasmid pSFL29 enthält, während Allel *SAP2-2* inaktiviert ist. Dargestellt ist schematisch die genetische Struktur des *SAP2*-Lokus in Stamm S2FI6A (A). Relevante Restriktionsschnittstellen und die Bindungsstelle der Sonde sind angegeben. Die Integration der Reporterfusion in den Stamm SAP2M2A wurde durch Southern-Hybridisierung *Cla*I-gespaltener chromosomaler DNA mit einer *SAP2*-spezifischen Sonde überprüft (B); (1) SAP2M2A, (2) S2FI6A.

Wie in Stamm S2FI1A enthält auch die Reporterfusion in S2FI6A ein *caFLP*-Gen, das durch den Promotor des Allels *SAP2-1* des Stammes CAI4 kontrolliert wird. Nachdem S2FI6A kein intaktes *SAP2*-Allel besitzt, entspricht der Stamm einer *SAP2*-Nullmutante. Durch Analyse



der *SAP2P*-Induktion in Zellen des Stammes S2FI6A während des Wachstums unter *SAP2*-induzierenden Bedingungen, konnte nun die Aktivierbarkeit des *SAP2-I*-Promotors bei Abwesenheit eines funktionellen *SAP2-2*-Allels überprüft werden. Nach Vorkultur in *SAP2*-reprimierendem Minimalmedium wurden neben dem Stamm S2FI6A auch die Stämme S2FI1A und S2FI3B 1:100 in *SAP2*-induzierendes YCB-BSA und YCB[+HE]-BSA-Medium überimpft und über einen Wachstumszeitraum von 90 h beobachtet. Als Kontrolle diente der Wildtyp-Stamm SC5314. In diesem Versuch wurde auch überprüft, in wieweit die Zugabe von aktiver Protease bzw. Proteolyse-bedingter BSA-Abbau-Produkte die Induktion des *SAP2*-Promotors beeinflusst. Hier interessierte einerseits die Induktion der *SAP2P-caFLP*-Fusion in den Stämmen S2FI3B und S2FI6A, andererseits aber auch die Expression des intakten *SAP2-I*-Allels in Stamm S2FI3B. Die Induktionsmedien wurden dazu mit 1% des sterilfiltrierten Überstandes einer YCB-BSA über Nacht Kultur des Stammes SC5314 versetzt.

Zum Zeitpunkt Null nach Überimpfen, sowie nach 18 h, 66 h und 90 h wurden Aliquots sämtlicher Kulturen entnommen, um durch Ausplattieren auf Indikatorplatten die FLP-Aktivität in den drei Reporterstämmen zu analysieren (Abb. 28A und B). Parallel wurden Aliquots der Kulturüberstände auf Proteingelen aufgetragen, um auf Proteinebene den Abbau des BSA als Folge proteolytischer Aktivität der Stämme während des Wachstums verfolgen zu können (Abb. 28C). Als Kontrolle wurden auch die verwendeten Medien mit aufgetragen. Durch den Stamm S2FI6A konnte gezeigt werden, dass die Expression des Allels *SAP2-I* in der Tat von einem intakten *SAP2-2*-Allel abhängig zu sein scheint, da eine *SAP2P-caFLP*-Induktion in beiden Medien kaum nachweisbar war, und erst nach 90 h ca. 10% der Zellen einen MPA-sensitiven Phänotyp aufwiesen (Abb. 28A und B). Eine erhöhte FLP-Aktivität konnte für S2FI6A dagegen nach Zugabe des Proteolysefiltrates beobachtet werden, besonders im YCB-BSA-Medium (Abb. 28A). Diese verstärkte *SAP2P*-Aktivierung korrelierte auch auf Proteinebene mit dem beschleunigten BSA-Abbau in der YCB-BSA-Kultur des Stammes S2FI3B nach Proteolysefiltrat-Zusatz, da hier die Expression des *SAP2-I*-Allels, dessen Promotoraktivität mit dem Stamm S2FI6A überprüft wurde, für den Abbau des BSA verantwortlich war (Abb. 28C und D). In Stamm S2FI1A, der ein intaktes *SAP2-2*-Allel enthält, war die *SAP2P*-induzierte Reporteraktivität in Allel *SAP2-I* im Gegensatz zu der in S2FI6A in viel mehr Zellen nachweisbar (Abb. 28A und B).



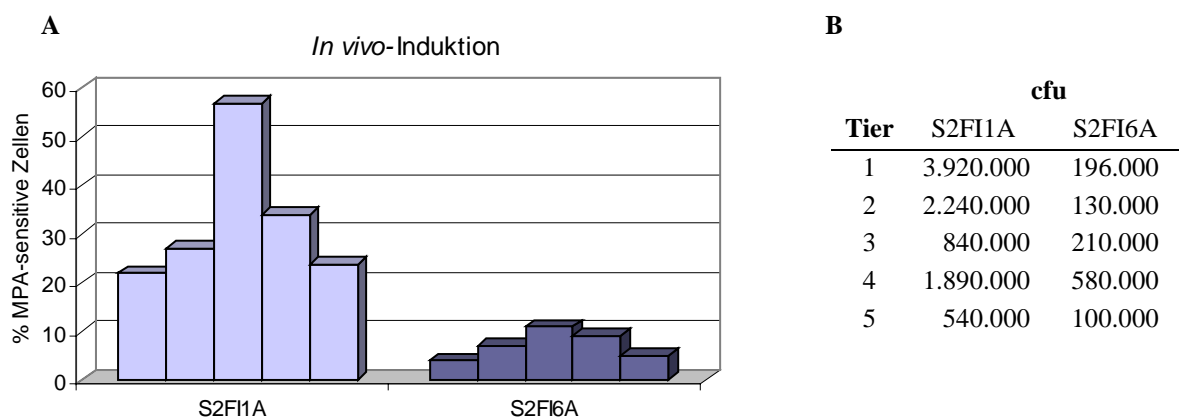
**Abb. 28** Differentielle Aktivierung der *SAP2*-Allele im Stamm CAI4. Nach Vorkultur in Minimalmedium wurden in den Stämmen S2F11A, S2F13B und S2F16A nach 18 h, 66 h und 90 h die *SAP2P-caFLP*-Induktion in YCB-BSA- und YCB[+HE]-BSA-Medium durch Ausplattieren auf Indikatorplatten bestimmt (**A** und **B**). Parallel wurde in diesen Stämmen und im Wildtyp SC5314 jeweils die proteolytische Aktivität anhand des BSA-Abbaus bestimmt bzw. die *SAP2*-spezifische Proteasebande im Überstand der Kulturen mit SDS 12%-igen, Coomassieblau gefärbten Proteingelen nachgewiesen (**C** und **D**). Die *SAP2*-Induktion in den beiden Induktionsmedien wurde für die Stämme S2F13B und S2F16A auch nach Zugabe von 1% des sterilfiltrierten Überstandes einer YCB-BSA-Kultur des Stammes SC5314 beobachtet (in **A** und **B** mit „+Fil.“ bezeichnet). (1) Größenmarker, (2) Medium, (3) SC5314, (4) S2F11A, (5) S2F13B, (6) S2F16A, (7) S2F13B+Fil., (8) S2F16A+Fil., (9) Medium+Fil.

Die Analyse des proteolytisch bedingten BSA-Abbaus zeigte, dass nach 18 h Wachstum in YCB-BSA und YCB[+HE]-BSA der Wildtyp SC5314 und der Reporterstamm S2FI1A, der die Reporterfusion in Allel *SAP2-1* enthält, das BSA im Medium vollständig und rasch abgebaut hatten. Im Überstand der Kulturen dieser Stämme wurde auch die sekretierte SAP2-Protease nachgewiesen, erkennbar an der 43 kD Proteinbande (Abb. 28C und D, Spuren 3 und 4). Daher wurde die intakte Kopie des *SAP2*-Gens in Allel *SAP2-2* auch in Abwesenheit eines intakten *SAP2-1*-Allels deutlich aktiviert. Dagegen hat während des schwachen Wachstums innerhalb der ersten 18 h des Stammes S2FI3B in YCB-BSA-Medium ein Abbau des BSA nicht stattgefunden, verglichen mit unbeimpftem Medium und der YCB-BSA-Kultur der *SAP2*-Nullmutante S2FI6A (Abb. 28C, vgl. Spuren 2, 5 und 6). Offensichtlich war das intakt erhaltene *SAP2-1*-Allel in Stamm S2FI3B in diesem Zeitraum allein nicht für eine proteolytische Aktivität ausreichend. Auch die Zugabe des Proteolysefiltrates zum YCB-BSA-Medium konnte in dieser Zeit keine deutliche Proteaseaktivität in Stamm S2FI3B induzieren (Abb. 28C, vgl. Spuren 5 und 7). Dagegen bewirkte dieser Zusatz zum YCB[+HE]-BSA-Medium im gleichen Zeitraum eine deutliche Induktion des *SAP2-1*-Allels in den Zellen dieses Stammes, da hier das BSA abgebaut wurde und auch die Protease-typische Bande im Kulturüberstand schwach nachweisbar war. Ohne Zugabe des Proteolyse-Filtrates wurde dagegen das BSA im YCB[+HE]-BSA-Medium der Kultur des Stammes S2FI3B nach 18 h noch nicht vollständig abgebaut (Abb. 28D, vgl. Spuren 5 und 7). Nach 66 h Wachstum in YCB-BSA war die proteolytische Aktivität der Stämme SC5314, S2FI1A, S2FI3B und S2FI6A vergleichbar mit der, die nach 18 h Wachstum in YCB[+HE]-BSA beobachtet wurde. Nach 90 h Wachstum in YCB-BSA zeigte wie auch nach 66 h in YCB[+HE]-BSA-Medium der vollständige BSA-Abbau in Kulturen des Stammes S2FI3B, dass Allel *SAP2-1* zwar durchaus funktionell ist, aber ohne intaktes *SAP2-2*-Allel viel schlechter induziert wurde. Die durch Allel *SAP2-1* codierte Protease konnte auch erst nach langer Wachstumszeit im Überstand schwach nachgewiesen werden (Abb. 28C und D, Spur 5). Da auch in Kulturen der *SAP2*-Nullmutante S2FI6A das BSA nach 66 h bzw. 90 h im YCB[+HE]-BSA-Medium sehr stark abgebaut wurde, waren offensichtlich neben SAP2 auch andere Proteasen an der Proteolyse beteiligt. In herkömmlichem YCB-BSA-Medium war auch nach 90 h das BSA in der schwach gewachsenen Kultur des Stammes S2FI6A nur unvollständig abgebaut (Abb. 28C und D, vgl. Spur 6).

Die bisherigen Beobachtungen zur differentiellen Regulation der *SAP2*-Allele zeigten, dass Allel *SAP2-2* *in vitro* offenbar sehr viel leichter induziert wurde als Allel *SAP2-1*. Vermutlich

förderte eine basale Aktivität des Allels *SAP2-2* ein initiales Wachstum der Zellen des Stammes S2FI1A in YCB-BSA-Medium. Dadurch könnte das *SAP2*-Gen dann in einer Art Rückkopplung durch die Protease selbst zusammen mit BSA-Abbauprodukten rasch und stark induziert worden sein. Umgekehrt wäre somit Stamm S2FI3B unter diesen Bedingungen deswegen sehr langsam gewachsen, weil durch eine verminderte Basalaktivität seines intakten *SAP2-1*-Allels eine verstärkte Induktion des Gens zunächst nicht stattgefunden hat. Die Induktion konnte aber durch Hefeextrakt-Zusatz und darüberhinaus durch Zugabe des Proteolysefiltrates einer proteolytisch aktiven *C. albicans*-Kultur beschleunigt werden.

Es stellte sich die Frage, ob die *in vitro* beobachtete Abhängigkeit des Allels *SAP2-1* von Allel *SAP2-2* im Stamm CAI4 auch während der Infektion festzustellen ist. Daher wurde die *SAP2*-Aktivierung in Stamm S2FI6A auch *in vivo* überprüft, und zwar zu einem späten Zeitpunkt der Systeminfektion (3-5 Tage nach i.v.-Infektion) durch Analyse der Pilzzellen der stark befallenen Nieren der Tiere; diese Versuche wurden zusammen mit anderen Reporterstämmen durchgeführt (Kapitel 4.2.2.2, Abb. 20). Da durchschnittlich nur 7% der Zellen des Stammes S2FI6A MPA-sensitiv waren, zeigte sich, dass auch *in vivo* die Induktion von Allel *SAP2-1* in Abwesenheit eines intakten *SAP2-2*-Allels deutlich vermindert wurde, da in der gleichen Zeit 33% der Zellen des Stammes S2FI1A *SAP2* nachweisbar induziert hatten. Offensichtlich scheint auch während der Infektion ein intaktes *SAP2-2*-Allel für eine signifikante Induktion des *SAP2-1*-Allels nötig zu sein, wobei aber diese Abhängigkeit nicht absolut ist, da sonst überhaupt keine FLP-Aktivität in Zellen des Stammes S2FI6A nachweisbar gewesen wäre.

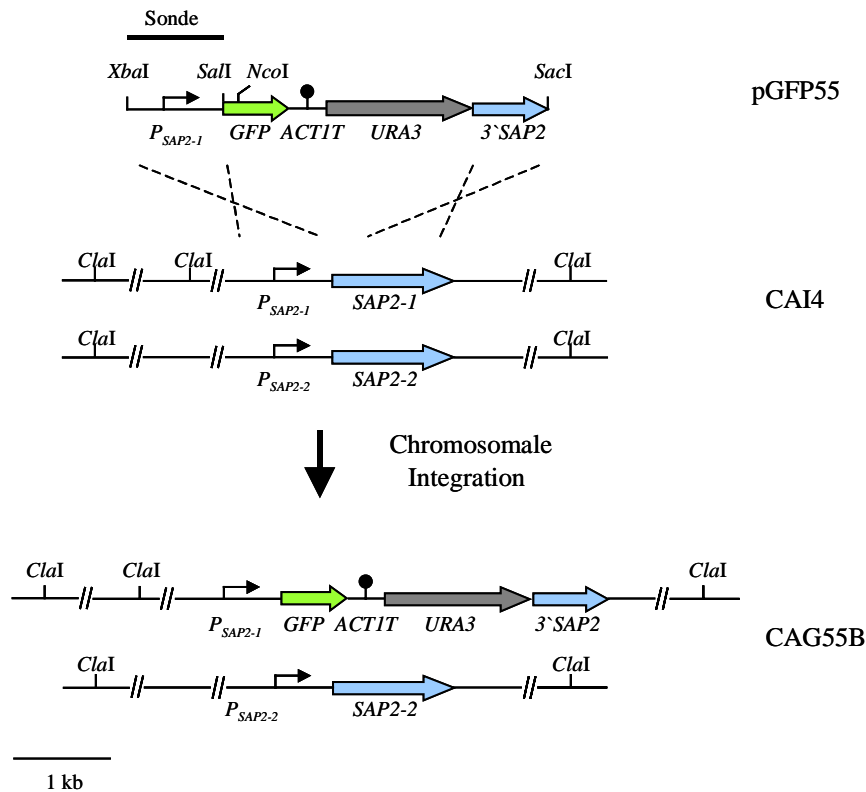


**Abb. 29** Vergleich der *in vivo*-Aktivierung des *SAP2*-Promotors in Allel *SAP2-1* in An- bzw. Abwesenheit eines intakten *SAP2-2*-Allels. Die Zellen der Reporterstämmen S2FI1A bzw. S2FI6A wurden 3-5 Tage nach i.v.-Infektion aus den Nieren der stark erkrankten Mäuse (jeweils 5 Tiere) reisoliert, um durch Ausplattieren auf Indikatorplatten jeweils den Anteil MPA-sensitiver Kolonien (**A**) und den Organbefall (**B**) zu bestimmen. Jeder Balken stellt die Ergebnisse aus einem Tier dar, wobei die Reihenfolge in A der in B entspricht.

#### 4.2.3.4 Differentielle Aktivierbarkeit der wildtypischen *SAP2*-Promotoren

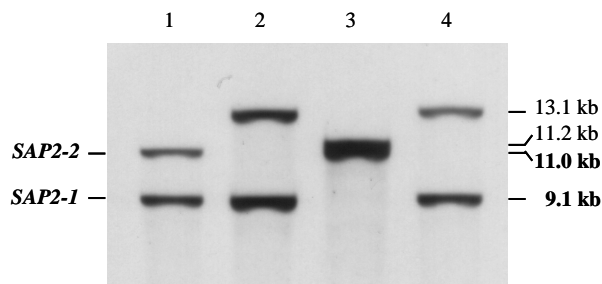
Um die Ursache für die differentielle *in vitro*-Aktivierbarkeit der *SAP2*-Allele des Stammes CAI4 während Wachstums in YCB-BSA-Medium herauszufinden, sollte ein möglicher Zusammenhang zwischen *SAP2*-Induktion und *SAP2*-Promotorstruktur untersucht werden. Obwohl die Promotoren beider Allele prinzipiell induzierbar sind (Kapitel 4.2.2.2), könnte eine verhältnismäßig leichtere Aktivierbarkeit von  $P_{SAP2-2}$  gegenüber  $P_{SAP2-1}$  an diesem regulatorischen Unterschied beteiligt sein. Daher sollte geprüft werden, ob  $P_{SAP2-1}$  nach Integration in Allel *SAP2-2* genauso gut aktivierbar ist wie der dort residente Promotor  $P_{SAP2-2}$ . Sollte dagegen die leichtere Aktivierbarkeit des Allels *SAP2-2* unabhängig von der Promotorstruktur sein, müßten sich beide Promotoren in Allel *SAP2-2* gleich gut induzieren lassen. Für diese Versuche, die auch dazu beitragen sollten, bisherige Beobachtungen zur differentiellen Regulation des *SAP2*-Gens zu bestätigen, wurde das GFP als Reporter einer Genexpression verwendet. Für eine Analyse unter *in vivo*-Bedingungen zwar ungeeignet, kann dieser Reporter *in vitro* sehr praktikabel zum Nachweis einer Genexpression eingesetzt werden, da die Stärke eines GFP-vermittelten Leuchtens einer Zelle als Maß für die Aktivierung des analysierten Zielpromotors gewertet werden kann.

Um eine unterschiedliche Induzierbarkeit der wildtypischen *SAP2*-Promotoren detektieren zu können, wurden in diesem Versuchsvorhaben Reporterstämme mit *SAP2P-GFP*-Fusionen hergestellt. Neben Stämmen, die äquivalent sind zu den bereits vorgestellten *SAP2P-caFLP*-Reporterstämmen, wurden auch Stämme konstruiert, die eine Reporterfusion in Allel *SAP2-2* enthalten, in der das *GFP*-Gen durch den Promotor des Allels *SAP2-1* kontrolliert wird. Zur Konstruktion der *SAP2P-GFP*-Reporterfusion wurde  $P_{SAP2-1}$  des Stammes CAI4 (Repeatstruktur=4/6) mit dem *GFP*-Gen fusioniert (Abb. 30). Dazu wurde das [*XbaI-SalI*]-*SAP2P*-Fragment aus pSAP2PFIA3 zusammen mit dem [*SalI-NcoI*]-5'*GFP*-Fragment aus pGFP41 in den *XbaI/NcoI*-gespaltenen pGFP41 kloniert. Dadurch wurde der *SAP2*-Promotor aus dem Fosmidklon des *C. albicans*-Stammes 1161 durch  $P_{SAP2-1}$  aus dem Stamm CAI4 ersetzt. Das resultierende Plasmid pGFP55 enthält eine Fusion aus  $P_{SAP2-1}$  des Stammes CAI4 mit dem *GFP*-Gen. Die Aktin-Transkriptions-Terminationssequenz hinter dem Stop-Codon des *GFP*-Gens unterstützt dessen optimale Transkription (Abb. 30).



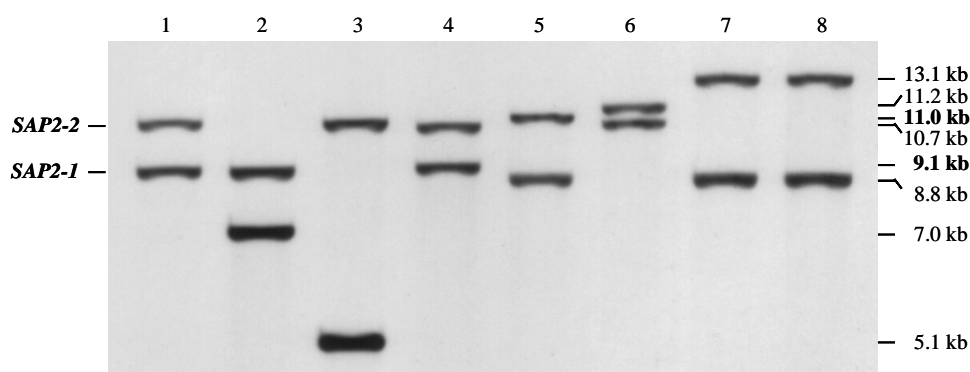
**Abb. 30** Herstellung von Reporterstämmen mit *SAP2P-GFP*-Fusionen im *SAP2*-Lokus. Für alle GFP-Reporterstämmen wurde die DNA-Kassette aus Plasmid pGFP55 verwendet, hier schematisch am Beispiel der Integration in Allel *SAP2-1* im Rezipientenstamm CAI4 dargestellt, was zur Herstellung des Stammes CAG55B führte. Relevante Restriktionsschnittstellen sind eingetragen, wie auch die Bindungsstelle der *SAP2*-spezifischen Sonde bei der Southern-Analyse.

Die Reporterfusion aus Plasmid pGFP55 wurde zunächst in je eines der wildtypischen *SAP2*-Allele des Stammes CAI4 integriert. Dadurch wurden Reporterstämmen erhalten, in denen mit dem *GFP*-Gen Allel-abhängig die Expression des entsprechenden Promotors analysiert werden konnte, während das andere *SAP2*-Allel intakt vorlag (Abb. 31). Überprüfung *Cl*aI-gespaltener chromosomaler DNA der Transformanten mit einer *SAP2P*-spezifischen Sonde bestätigte durch Southern-Hybridisierung die Allel-spezifische Insertion der *SAP2P-GFP*-Fusion in das *SAP2*-Gen (Abb. 31). Da sich innerhalb der Integrationskassette keine *Cl*aI-Schnittstelle befindet, wurde jeweils eines der beiden *SAP2*-spezifischen Allele des Ausgangsstammes um die Größe des [*GFP-ACT1T-URA3*]-Fragmentes abzüglich des deletierten *SAP2*-Bereiches vergrößert. Daher wurde in den Transformanten CAG55A und CAG55E die wildtypische 11.0 kb-Bande des Allels *SAP2-2* durch eine neue Bande der Größe von 13.1 kb ersetzt (Abb. 31, Spur 2 und 4), entsprechend in CAG55B die wildtypische 9.1 kb *SAP2-1*-Bande durch ein 11.2 kb-Fragment (Abb. 31, Spur 3).



**Abb. 31** Nachweis der Integration der *SAP2P-GFP*-Fusion aus Plasmid pGFP55 in eines der beiden *SAP2*-Allele des Stammes CAI4 durch Southern-Hybridisierung *Cla*I-gespaltener chromosomaler DNA des Stammes CAI4 (Spur 1) und der Transformanten CAG55A, CAG55B und CAG55E (Spuren 2-4). Die Größen der beiden wildtypischen *SAP2*-Allele sind fett gedruckt.

Zur Analyse der *SAP2P*-Aktivierung in homozygoten *SAP2*-Mutanten wurde die Fusion aus Plasmid pGFP55 auch in die Stämme *SAP2M2A* und *SAP2M2D* eingeführt. Der bereits während der *SAP2*-Mutagenese hergestellte Stamm *SAP2M2A* enthält ein inaktiviertes Allel *SAP2-2*. Auf gleiche Weise wurde in Stamm *SAP2M2D* Allel *SAP2-1* inaktiviert. Dazu wurde die *URA3*-Flipping-Kassette (vgl. auch Abb. 22) aus Plasmid p*SAP2M2* in Allel *SAP2-1* des Stammes CFI1 unter Herstellung des Stammes *SAP2M1D* inseriert. Diese Insertion führte in *SAP2M1D* bzw. *SAP2M1A* zu einer Verkleinerung der *SAP2-1*- bzw. *SAP2-2*-spezifischen Bande um 4 kb, wie die Southern-Analyse zeigte (Abb. 32, vgl. Spuren 2 und 3). Die *URA3*-Flipping-Kassette in Allel *SAP2-1* der heterozygoten *SAP2*-Mutante *SAP2M1D* wurde anschließend durch Kultivierung der Zellen unter *SAP2*-induzierenden Bedingungen aufgrund FLP-Aktivität deletiert. Dadurch entstand der *ura3*-negative Stamm *SAP2M2D*, in dem nach der Exzision der *SAP2*-Mutagenese-Kassette durch die Deletion eines 0.35 kb-Bereiches der codierenden *SAP2*-Region die Original-*SAP2-1*-Bande letztlich von 9.1 kb in Stamm CFI1 bzw. CAI4 auf 8.8 kb verkleinert wurde (Abb. 32, Spur 5). Während in Stamm *SAP2M2A* Allel *SAP2-2* inaktiviert vorliegt, enthält *SAP2M2D* ein inaktiviertes *SAP2-1*-Allel.

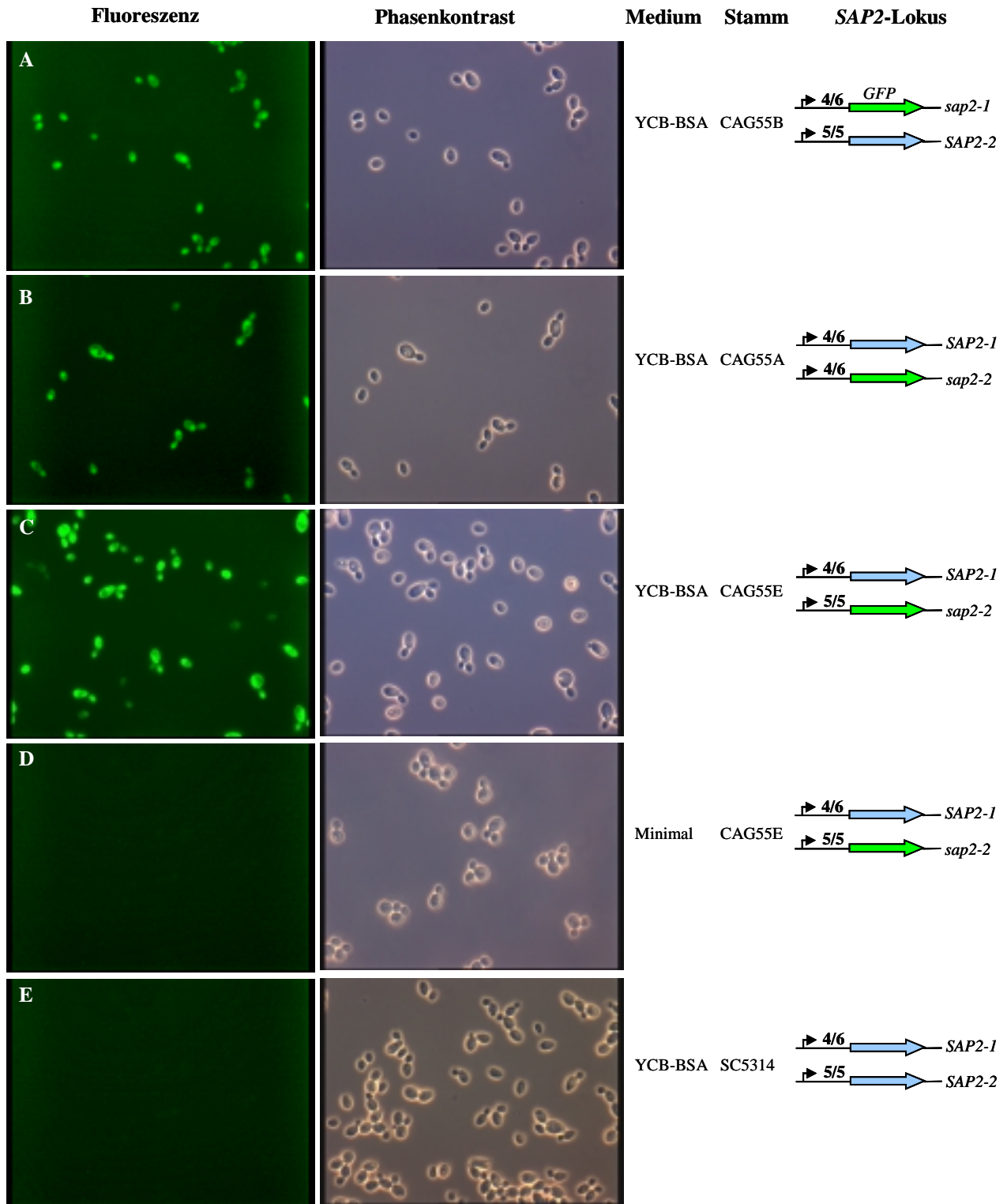


**Abb. 32** Nachweis der Inaktivierung von Allel *SAP2-1* im Stamm CFI1 und Integration der *SAP2P-GFP*-Fusion aus Plasmid pGFP55 in die Stämme *SAP2M2A* und *SAP2M2D*, in denen Allel *SAP2-2* bzw. *SAP2-1* inaktiviert vorliegt, durch Southern-Hybridisierung *Cla*I-gespaltener chromosomaler DNA der Ausgangsstämme und Transformanten mit einer *SAP2*-spezifischen Sonde. Die Größen der wildtypischen *SAP2*-Allele sind fett gedruckt. (1) CFI1, (2) *SAP2M1A*, (3) *SAP2M1D*, (4) *SAP2M2A*, (5) *SAP2M2D*, (6) CAG551A, (7) CAG551D1, (8) CAG551D4.

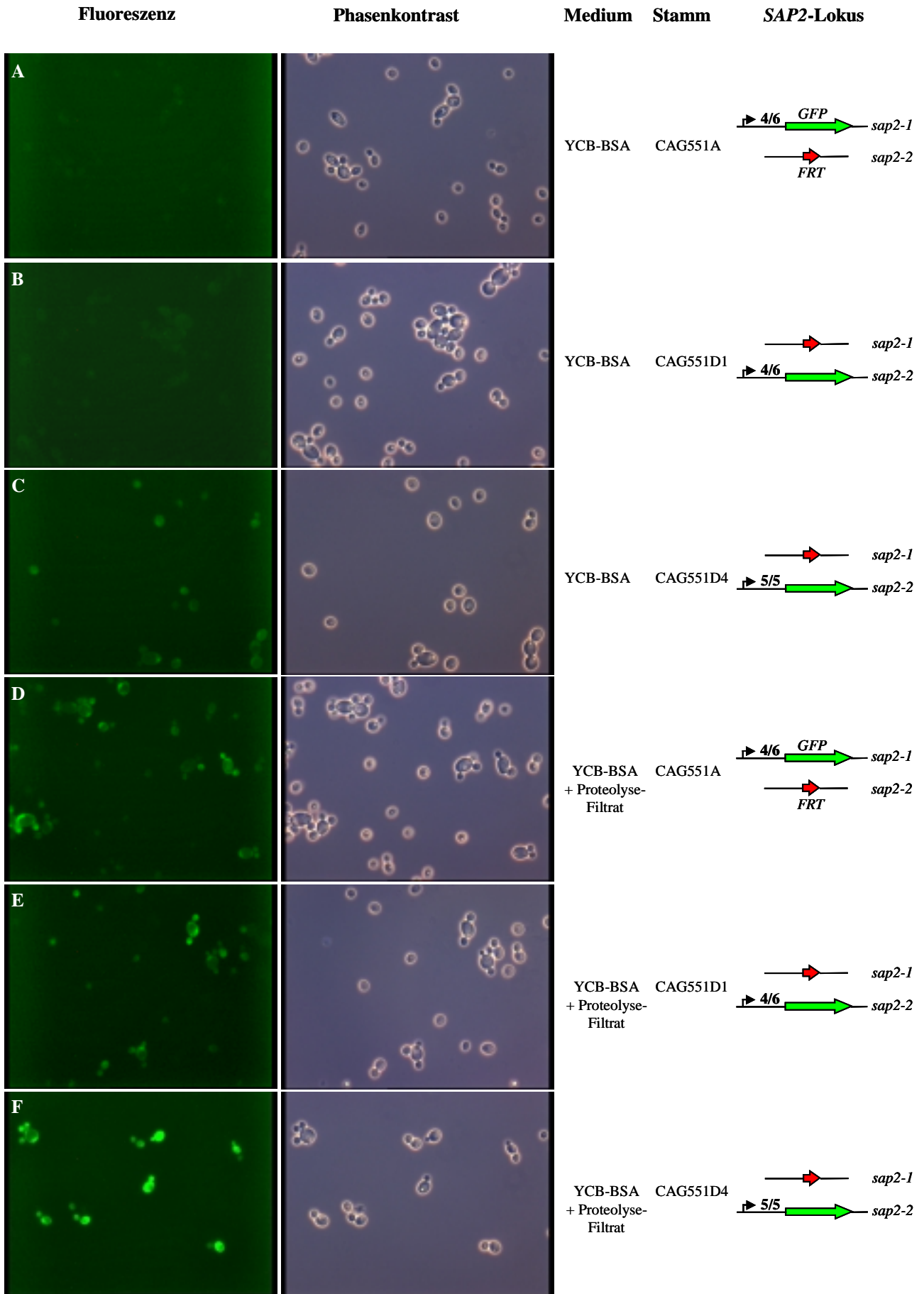
Die *XbaI/SacI*-gespaltene DNA-Kassette aus Plasmid pGFP55 mit der *SAP2P-GFP*-Fusion wurde nun in diese beiden Ausgangsstämme in das jeweils intakt erhaltene *SAP2*-Allel integriert, d.h. in Stamm SAP2M2A in Allel *SAP2-1* und in SAP2M2D in Allel *SAP2-2*. Southern-Analyse der resultierenden Stämme CAG551A und CAG551D1 bzw. CAG551D4 bestätigte die korrekte Insertion der Reporterfusion, da jeweils die wildtypischen *SAP2*-Allele durch die entsprechend vergrößerten Fragmente ersetzt wurden (Abb. 32, Spuren 6-8). Da  $P_{SAP2-1}$  in Plasmid pGFP55 die Repeatstruktur (4/6) enthält, wurden die Promotoren der *SAP2P-GFP*-Fusionen der erhaltenen Transformanten mit Integration in Allel *SAP2-2* sequenziert. Dies war notwendig, da der wildtypische Promotor in Allel *SAP2-2* des Stammes CF11 die Repeatstruktur (5/5) aufweist. Entsprechend konnten je nach spezifischem Ort des Strangaustausches bei der Integration des Reporterengenkonstruktes verschiedene Repeatkombinationen entstehen. Der Original-*SAP2-2*-Promotor mit (5/5)-Repeatstruktur konnte erhalten bleiben, durch  $P_{SAP2-1}$  der Reporterfusion mit (4/6)-Repeatstruktur komplett ersetzt werden, oder aber ein künstlicher Hybridpromotor aus beiden entstehen. Der Stamm CAG55B, der bei intaktem *SAP2-2*-Allel eine *SAP2P-GFP*-Fusion in Allel *SAP2-1* enthält, entspricht dem *SAP2P-caFLP*-Reporterstamm S2FI1A. In beiden kontrolliert  $P_{SAP2-1}$  mit der Repeatstruktur (4/6) das jeweilige Reporter-gen. Der Stamm CAG551A ist äquivalent zu S2FI6A, da  $P_{SAP2-1}$  das *GFP*-Gen in Allel *SAP2-1* kontrolliert, gleichzeitig jedoch Allel *SAP2-2* zerstört ist. Der Stamm CAG55E entspricht dem Stamm S2FI3B. In beiden wird das Reporter-gen von  $P_{SAP2-2}$  mit Repeatstruktur (5/5) in Allel *SAP2-2* kontrolliert, während Allel *SAP2-1* intakt ist. Für den direkten Vergleich der Induzierbarkeit der wildtypischen *SAP2*-Promotoren dienten die Stämme CAG55A bzw. CAG55E mit dem *GFP*-Gen in Allel *SAP2-2*, das durch  $P_{SAP2-1}$  bzw.  $P_{SAP2-2}$  kontrolliert wird, und die Stämme CAG551D1 und CAG551D4, die diesen beiden entsprechen, aber kein intaktes Allel *SAP2-1* besitzen.

Für den Induktionsversuch wurden die *GFP*-Reporterstämme nach Vorkultur in Minimalmedium in *SAP2*-induzierendem YCB-BSA-Medium 1:100 verdünnt. Nach 18 h wurden jeweils Aliquots der Kulturen entnommen und fluoreszenzmikroskopisch betrachtet. Als Negativkontrolle diente der Stamm SC5314. Alle Reporterstämme wurden auch bereits nach Vorkultur fluoreszenzmikroskopisch überprüft, um eine während der Vorkultur induzierte *GFP*-Expression auszuschließen. Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen mit den zugehörigen Phasenkontrastaufnahmen sind in Abb. 33 und Abb. 34 dargestellt, in denen auch die genetische Struktur des *SAP2*-Gens der verwendeten *GFP*-Reporterstämme gezeigt ist.





**Abb. 33** *SAP2P*-induzierte *GFP*-Expression in Zellen der Reporterstämme CAG55B (A), CAG55A (B) und CAG55E (C) nach Überführen von Minimalmedium und 18 h Wachstum in *SAP2*-induzierendem YCB-BSA-Medium. Rechts neben jeder Fluoreszenzaufnahme ist die zugehörige Phasenkontrastaufnahme und schematisch die genetische Struktur des *SAP2*-Gens der verwendeten Stämme gezeigt. (D) zeigt, dass in Minimalmedium keine *SAP2P*-Induktion stattfindet, als Negativkontrolle diente der Wildtyp SC5314, der kein *GFP*-Gen besitzt und daher auch unter *SAP2*-induzierenden Bedingungen nicht leuchtet (E). Die Aufnahmen wurden bei 400-facher Vergrößerung (Ölimmersion) angefertigt.



**Abb. 34** Differentielle Aktivierbarkeit der wildtypischen *SAP2*-Promotoren im Stamm CAI4. Dargestellt sind Fluoreszenz- und Phasenkontrastaufnahmen von Zellen verschiedener Stämme mit *SAP2P-GFP*-Reporterfusionen in einem der beiden *SAP2*-Allele, während das *SAP2*-Allel des homologen Chromosoms deletiert ist, nach Vorkultur in Minimalmedium und 18 h Wachstum in *SAP2*-induzierendem YCB-BSA-Medium bzw. YCB-BSA-Medium, das 1% des sterilfiltrierten Überstandes einer SC5314-YCB-BSA-Kultur enthält. Medium, Stammbezeichnung und genetische Struktur des entsprechenden *SAP2*-Gens sind angegeben. Die Aufnahmen wurden bei 400-facher Vergrößerung (Ölimmersion) angefertigt.

Verglichen mit CAG55B wurde aufgrund des schwachen Wachstums der Stämme CAG55A und CAG55E mit Integration der Fusion in Allel *SAP2-2* wiederholt bestätigt, dass ein gutes Wachstum unter diesen Bedingungen durch das erhaltene *SAP2-1*-Allel nicht gewährleistet wurde. Dennoch wurde auch in Zellen der Stämme CAG55A und CAG55E das *GFP*-Gen ausreichend stark exprimiert, um in einer nachweisbaren Fluoreszenz der Zellen zu resultieren (Abb. 33B und C). In Zellen äquivalenter FLP-Reporterstämmen konnte nach 18 h Wachstum in YCB-BSA-Medium keine signifikante *caFLP*-Induktion nachgewiesen werden (Kapitel 4.2.3.3), was darauf hinwies, dass das GFP in diesem Versuch einen sensitiveren *in vitro*-Reporter darstellte. Eine *GFP*-Expression in Zellen der Stämme CAG55B, CAG55A und CAG55E bestätigte, dass beide wildtypischen *SAP2*-Promotoren deutlich induziert wurden, dass aber Zellen des Stammes CAG55E, in denen  $P_{SAP2-2}$  das *GFP*-Gen kontrolliert, etwas stärker leuchteten als Zellen des Stammes CAG55A (Abb. 33, vgl. B und C). Das bedeutet, dass  $P_{SAP2-1}$  trotz Insertion in Allel *SAP2-2* unter gleichen Bedingungen offensichtlich nicht genauso stark induziert wurde. Diese Beobachtung wurde durch Vergleich der Stämme CAG551D1 und CAG551D4 bestätigt. Bei entsprechender Promotorstruktur wie in den Stämmen CAG55A und CAG55E sind sie aber gleichzeitig auch *SAP2*-Nullmutanten, da auch Allel *SAP2-1* inaktiviert vorliegt. In Abb. 34 wird deutlich, dass nach 18 h Wachstum in YCB-BSA-Medium die Fluoreszenz der Zellen des Stammes CAG551D1 kaum, die der Zellen des Stammes CAG551D4 aber schwach nachweisbar war. Nach Stimulation der *SAP2*-Induktion in diesen Stämmen mit dem Proteolysefiltrat einer SC5314-YCB-BSA-Kultur wurde jedoch auch in Abwesenheit eines intakten *SAP2*-Allels  $P_{SAP2-2}$  in Allel *SAP2-2* stärker aktiviert als  $P_{SAP2-1}$  am identischen Gen-Lokus (Abb. 34, vgl. E und F). Eine ebenso schwache Induktion wie in Zellen des Stammes CAG551D1 wurde nach *SAP2*-Stimulierung mit Proteolysefiltrat auch in den Zellen des Stammes CAG551A beobachtet, der die  $P_{SAP2-1-GFP}$ -Fusion in Allel *SAP2-1* trägt und wie CAG551D1 und CAG551D4 kein intaktes *SAP2*-Allel besitzt (Abb. 34, vgl. D und E). Diese Beobachtung zeigte, dass offensichtlich  $P_{SAP2-1}$  unabhängig vom Allel-Lokus weniger stark induziert wurde als  $P_{SAP2-2}$  unter gleichen Bedingungen.

Wenn die geringere Induktion von Allel *SAP2-1* nur vom Promotor, nicht aber vom Allel-Lokus abhängig ist, würde die *GFP*-Expression in Stamm CAG55A genau die Induktion des Allels *SAP2-1* anzeigen, die in Abwesenheit eines intakten *SAP2-2*-Allels stattfindet. Das würde bedeuten, dass die gleiche Induktion, die in CAG55A zu einer schwachen Fluoreszenz der Zellen führte, nicht ausreichte, um gleichzeitig Allel *SAP2-1* während 18 h Wachstums so stark zu aktivieren, dass genügend Protease für ein starkes Wachstum unter diesen Bedingungen gebildet wurde. Dennoch mußte der Promotor des intakten *SAP2-1*-Allels leicht induziert worden sein, da sonst die Zellen des Stammes CAG55A und die des Stammes CAG551D1, die kein intaktes *SAP2-1*-Allel besitzen, gleich stark geleuchtet hätten (vgl. Abb. 33B mit Abb. 34B). Diese Annahme stimmt auch mit Beobachtungen auf Proteinebene überein (vgl. Kapitel 4.2.3.3), da hier gezeigt werden konnte, dass Allel *SAP2-1* durchaus auch bei inaktiviertem *SAP2-2*-Allel induziert wurde, nur eben viel schlechter als Allel *SAP2-2*. Die Stärke des Leuchtens der Zellen des Stammes CAG55B konnte nicht mit dem Phänotyp der anderen Reporterstämmen verglichen werden, da CAG55B als einziger *GFP*-Reporterstamm ein intaktes *SAP2-2*-Allel besitzt und daher nach 18 h gut gewachsen ist.

Faßt man die mit den *GFP*-Reporterstämmen gewonnenen Ergebnisse zur *in vitro*-Regulation des *SAP2*-Gens zusammen, fällt auf, dass die differentielle Aktivierung der wildtypischen *SAP2*-Allele möglicherweise mit der Struktur der jeweiligen Promotoren zusammenhängt. Obwohl beide aktivierbar waren, wurde  $P_{SAP2-1}$  unabhängig vom Allel-Lokus weniger stark induziert als  $P_{SAP2-2}$ . Aufgrund ihrer unterschiedlichen Repeatstruktur war denkbar, dass die Repeatkombination (5/5) in  $P_{SAP2-2}$  unter den beobachteten *in vitro*-Bedingungen eine leichtere Aktivierbarkeit ermöglichte als die (4/6)-Repeatstruktur in  $P_{SAP2-1}$ . Es stellte sich nun die interessante Frage, ob die differentielle Aktivierung der beiden *SAP2*-Allele nur *in vitro* oder aber auch während der Infektion nachweisbar ist. Diese Frage konnte durch die bislang durchgeführten Tierversuche nicht beantwortet werden. Bei der *in vivo*-Überprüfung der verschiedenen *SAP2*-Promotorvarianten wurde zwar auch die Induktion des *SAP2-2*-Allels durch den Stamm S2FI3B untersucht, jedoch nur zu einem späten Zeitpunkt des Infektionsverlaufs. Daher konnte eine mögliche Expression des Allels *SAP2-2* zu einem früheren Zeitpunkt der Infektion als Allel *SAP2-1* nicht erfaßt werden. Um im Tierversuch auch geringfügige Unterschiede in der *SAP2*-Aktivierung auf Allelebene detektieren zu können, wurde zunächst eine sensitivere Version des *FLP*-Reportersystems für *C. albicans* etabliert.

#### 4.2.4 Etablierung einer sensitiveren Version des IVET-Systems

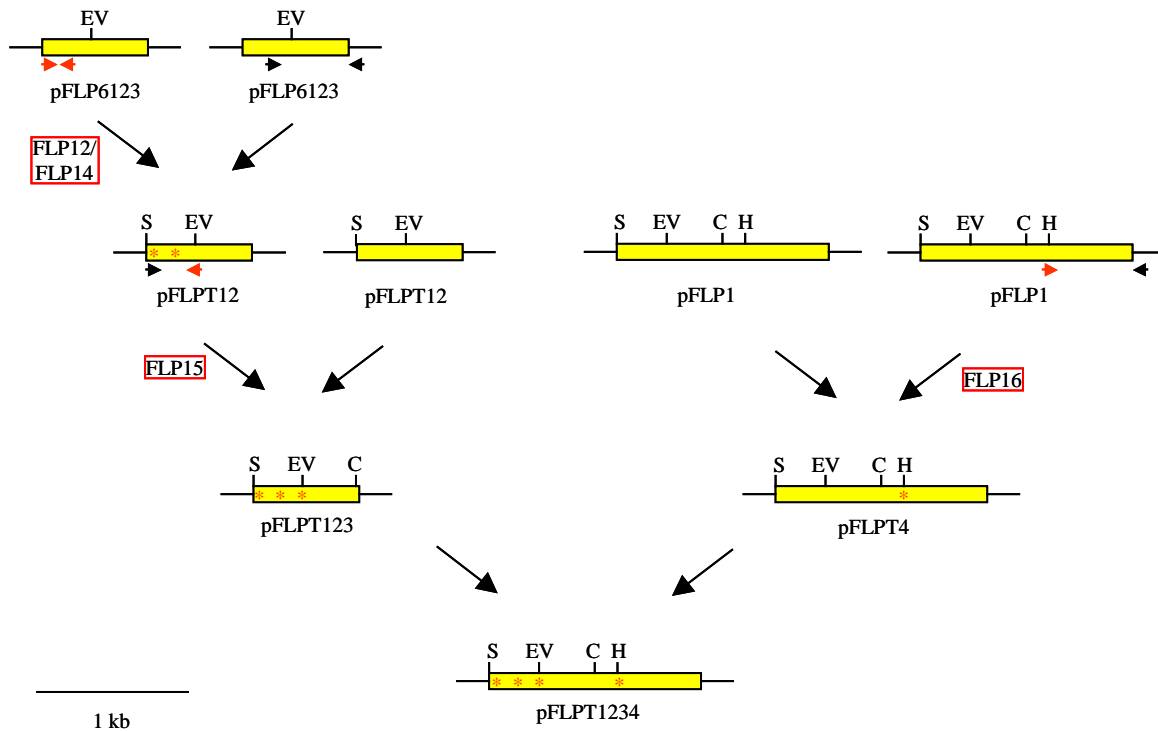
Da nach Wachstum von Reporterstämmen mit *SAP2P-caFLP*-Fusionen unter induzierenden Bedingungen selten mehr als 70-80% der Klone auf den Indikatorplatten MPA-sensitiv waren, hatte offensichtlich eine deutliche *SAP2*-Induktion nicht in allen Zellen in einer ausreichend hohen FLP-Aktivität resultiert. Dagegen fiel bei fluoreszenzmikroskopischer Betrachtung von Zellen entsprechender *SAP2P-GFP*-Reporterstämmen auf, dass unter gleichen Bedingungen in fast allen Zellen eine Fluoreszenz beobachtet werden, wenn auch in variierender Stärke. Dies führte zu der Annahme, dass das bisher verwendete IVET-System offensichtlich nicht sensitiv genug ist, um eine geringfügige Induktion eines Promotors detektieren zu können. In der Zwischenzeit wurde eine mutierte Version der FLP-Rekombinase beschrieben (Buchholz *et al.*, 1998), die aufgrund von vier Aminosäureaustauschen eine erhöhte Aktivität aufweist (eFLP = "enhanced FLP"). Um die Sensitivität des für *C. albicans* etablierten IVET-Systems zu erhöhen, wurden diese vier Austausche in das bereits an den Codon-Gebrauch von *C. albicans* adaptierte *caFLP*-Gen eingeführt, was zur Herstellung von *ecaFLP* führte (= enhanced *C. albicans*-adapted *FLP*). Mit einer dadurch verbesserten Version des Reportersystems sollte die Untersuchung der *in vivo*-*SAP2*-Regulation abgeschlossen werden, um dann nach Herstellung weiterer Reporterstämmen auch die *in vivo*-Genexpression der anderen Mitglieder der *SAP*-Genfamilie zu untersuchen.

##### 4.2.4.1 Herstellung des *ecaFLP*-Gens durch site-spezifische Mutagenese

Die vier Aminosäureaustausche P2S, L33S, Y108N und S294P wurden in aufeinanderfolgenden Schritten durch site-spezifische Mutagenese in das *caFLP*-Gen eingeführt. Als Ausgangsplasmide dienten hierfür die Plasmide pFLP6123 und pFLP1. Plasmid pFLP6123 enthält den vorderen Bereich des *caFLP*-Gens mit den drei CTG-TTG-Austauschen, pFLP1 enthält das gesamte unveränderte *FLP*-Gen. Die Mutageneseschritte sind in Abb. 35 dargestellt. Im ersten Mutageneseschritt wurden mit der Konstruktion des Plasmids pFLPT12 die Austausche P2S und L33S eingeführt. Mit Plasmid pFLP6123 als template wurden hierfür zwei *FLP*-Fragmente mit den Primerpaaren FLP12 und FLP14 sowie FLP13 und Universal-Primer angereichert. Der phosphorylierte Primer FLP12 enthält *caFLP*-Sequenzen von Position 109-87 (-Strang), wobei das T an Position 98 gegen C ausgetauscht wurde. Primer FLP14 enthält *caFLP*-Sequenzen ab dem Startcodon von Position 1-25 (+Strang), wobei das C an Position 4 gegen T ausgetauscht und zudem davor die Translations-Konsensus-Sequenz AAA und eine *SalI*-Restriktionsschnittstelle eingeführt wurde. Dieses

[*FLP14-FLP12*]-PCR-Produkt wurde mit *SaII* gespalten. Der phosphorylierte Primer FLP13 enthält *caFLP*-Sequenzen von Position 110-129 (+Strang). Das [*FLP13-Universal-Primer*]-PCR-Produkt wurde mit *SacI* gespalten. Die [*SaII*-blunt]- und [blunt-*SacI*]-PCR-Produkte wurden zusammen in das *SaII/SacI*-gespaltene Plasmid pKSII unter Herstellung des Plasmids pFLPT12 kloniert. Plasmid pFLPT12 enthält zusätzlich zu den bereits eingeführten CTG-TTG-Austauschen noch die P2S- und L33S- Mutationen.

Im zweiten Mutageneseschritt zur Einführung des Y108N-Austausches diente Plasmid pFLPT12 als template für die PCR mit den Primern FLP14 und FLP15. Primer FLP15 enthält *caFLP*-Sequenzen ab der Mitte der *EcoRV*-Restriktionsschnittstelle von Position 345-308 (-Strang), wobei das T an Position 322 gegen A ausgetauscht wurde. Das PCR-Produkt wurde mit *SaII* gespalten und in das *SaII/EcoRV*-gespaltene Plasmid pFLPT12 kloniert, was zur Herstellung des Plasmids pFLPT123 führte. Plasmid pFLPT123 enthält zusätzlich zu den drei CTG-TTG-Austauschen in *caFLP* nun auch die P2S-, L33S- und Y108-Mutationen (Abb. 35). Für den letzten Mutageneseschritt zur Einführung des S294P-Austausches diente das Plasmid pFLP1, welches das Original-*FLP*-Gen enthält, als template für die PCR mit den Primern FLP16 und dem Universal-Primer. Primer FLP16 enthält *FLP*-Sequenzen von Position 849-890 (+Strang) einschließlich der *HindIII*-Restriktionsschnittstelle an Position 854. Gleichzeitig wurden das G an Position 873 gegen T (resultiert in einem häufiger verwendeten Alanin-Codon) und das T an Position 880 gegen C ausgetauscht. Das PCR-Produkt wurde *HindIII/XbaI* gespalten und in das *HindIII/XbaI*-gespaltene Plasmid pFLP1 kloniert, was in der Herstellung des Plasmids pFLPT4 resultierte. Das Plasmid pFLPT4 enthält die S294P-Mutation. In einem Klonierungsschritt wurden die vier neu eingeführten Mutationen mit den bereits eingeführten CTG-TTG-Austauschen in dem Plasmid pFLPT1234 kombiniert. Hierfür wurde das [*SaII-ClaI*]-5`*FLPT123*-Fragment aus dem Plasmid pFLPT123 in das *SaII/ClaI*-gespaltene Plasmid pFLPT4 kloniert. Das Plasmid pFLPT1234 enthält zusätzlich zu den drei CTG-TTG-Austauschen die P2S-, L33S-, Y108N- und S294-Mutationen, die der *FLP*-Rekombinase eine erhöhte Aktivität und Temperaturstabilität verleihen (Abb. 35).

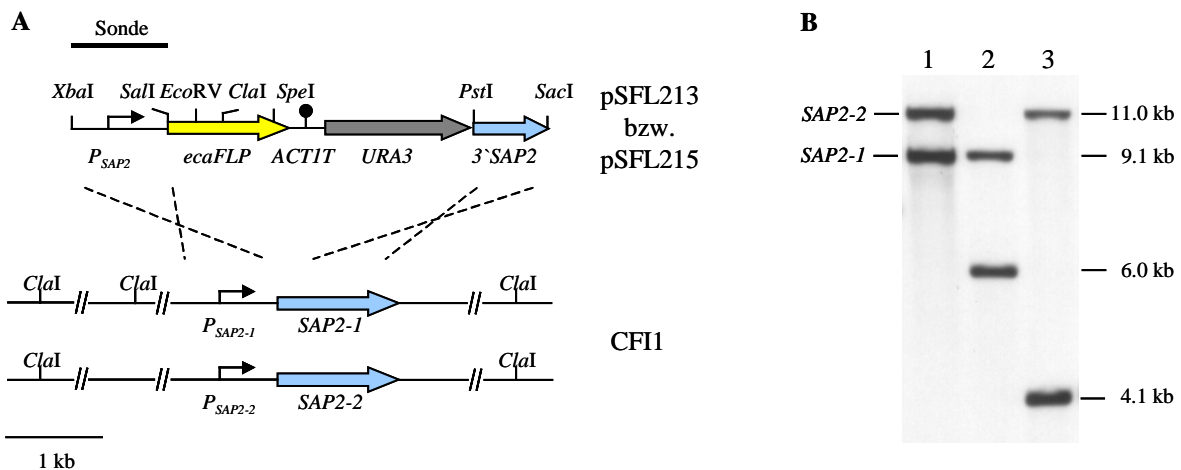


**Abb. 35** Einführung von vier Mutationen in das *caFLP*-Gen durch site-spezifische Mutagenese führte zur Herstellung des *ecaFLP*-Gens. Die Primer für die PCR-Reaktionen sind als kleine Pfeilspitzen dargestellt, wobei rot-gefärbte zur Einführung einer Mutation dienten; eingeführte Mutationen sind durch \* (rot) markiert, relevante Restriktionsschnittstellen sind eingetragen (C=*Cla*I, H=*Hind*III, EV=*Eco*RV, S=*Sal*I).

#### 4.2.4.2 Integration des *ecaFLP*-Gens in den *SAP2*-Lokus

Da das *ecaFLP*-Gen als Reporter zur Untersuchung der *in vivo*-Regulation der beiden wildtypischen *SAP2*-Allele des Stammes CAI4 verwendet werden sollte, wurden unabhängig zwei Reporter-genkonstrukte hergestellt, in denen jeweils die Promotoren  $P_{SAP2-1}$  bzw.  $P_{SAP2-2}$  die Expression des *ecaFLP*-Gens kontrollieren (Abb. 36A und 37). Für die Konstruktion der Fusion von  $P_{SAP2-1}$  mit dem *ecaFLP*-Gen wurde das [*Xba*I/*Sal*I]-Fragment aus Plasmid pSFL29 zusammen mit dem [*Sal*I-*Eco*RV]-5' *ecaFLP*-Fragment aus Plasmid pFLPT123 in das *Xba*I/*Eco*RV-gespaltene Plasmid pSFL29 kloniert. Dies führte zur Herstellung des Plasmids pSFL212. Es entspricht dem Plasmid pSFL29, nur enthält das *caFLP*-Gen noch die P2S-, L33S- und Y108N-Mutationen, aber noch nicht die S294P-Mutation. Das [*Cla*I-*Spe*I]-*ecaFLP*-Fragment aus pFLPT4, das die S294P-Mutation enthält, wurde zusammen mit dem [*Spe*I-*Pst*I]-[3' *ecaFLP*-*ACT1T*-*URA3*]-Fragment aus Plasmid pSFL212 in das *Cla*I/*Pst*I-gespaltene Plasmid pSFL212 kloniert. Hierdurch entstand Plasmid pSFL213. Es entspricht pSFL29, nur enthält es anstelle des *caFLP*-Gens das *ecaFLP*-Gen. Wie auch Plasmid pSFL29 enthält pSFL213 das wildtypische *SAP2P*-Fragment aus Allel *SAP2-1* des Stammes CAI4 mit

der Repeatstruktur (4/6). Im Gegensatz dazu wurde in Plasmid pSFL215  $P_{SAP2-2}$  mit dem *ecaFLP*-Gen fusioniert. Dazu wurde das entsprechende 1.1 kb *SAP2P*-Fragment mit den Primern SAP22 und FLP9 unter Verwendung von chromosomaler DNA des Stammes S2FI3B als template angereichert. Das PCR-Produkt wurde sequenziert und als [*XbaI-SalI*]-*SAP2P*-Fragment anschließend zusammen mit dem [*SalI-EcoRV*]-5' *ecaFLP*-Fragment aus dem Plasmid pSFL213 in das *XbaI/EcoRV*-gespaltene Plasmid pSFL213 kloniert, wodurch letztlich das Plasmid pSFL215 entstand. Es entspricht pSFL213, nur enthält es das wildtypische *SAP2P*-Fragment aus Allel *SAP2-2* des Stammes CAI4 mit der Repeatstruktur (5/5). Die *XbaI/SacI*-gespaltenen Reportergerkonstrukte der Plasmide pSFL213 und pSFL215 wurden für die Transformation des Stammes CFI1 eingesetzt (Abb. 36).

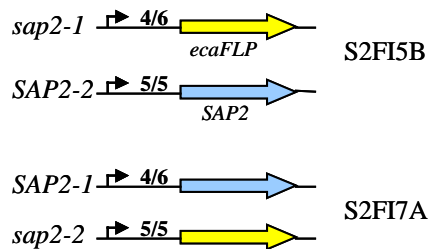


**Abb. 36** Herstellung von *SAP2*-Reporterstämmen, in denen das *ecaFLP*-Gen von den wildtypischen *SAP2*-Promotoren im jeweils entsprechenden *SAP2*-Allel kontrolliert wird. Dargestellt ist die Struktur der Integrationskassetten der Plasmide pSFL213 bzw. pSFL215, die sich nur im *SAP2P*-Fragment unterscheiden, sowie die genetische Struktur des *SAP2*-Lokus im Rezipientenstamm CFI1 (A); relevante Restriktionsschnittstellen und die Bindungsstelle der Sonde für die Southern-Analyse sind angegeben. (B) zeigt das Ergebnis der Überprüfung der Integration nach Southern-Hybridisierung *ClaI*-gespaltener chromosomaler DNA des Ausgangsstammes CFI1 (Spur 1) und der Transformanten S2FI7A (Spur 2) und S2FI5B (Spur 3) mit einer *SAP2*-spezifischen Sonde.

Die Transformanten wurden durch Southern-Analyse *ClaI*-gespaltener chromosomaler DNA mit einer *SAP2P*-spezifischen Sonde überprüft, wofür das [*XbaI-SalI*]-*SAP2P*-Fragment aus dem Plasmid pSFL213 verwendet wurde (Abb. 36B). In dem Reporterstamm S2FI5B erfolgte die Integration des *SAP2P-ecaFLP*-Fragments aus Plasmid pSFL213 in Allel *SAP2-1* des Stammes CFI1, so dass hier die wildtypische *SAP2-1*-spezifische Bande aufgrund der internen *ClaI*-Restriktionsschnittstelle im *ecaFLP*-Gen auf 4.1 kb verkleinert wurde (Abb36B, Spur 3). Entsprechend wurde in dem Stamm S2FI7A nach Integration der Fusion aus Plasmid pSFL215 die für Allel *SAP2-2*-spezifische Bande durch ein verkleinertes Fragment mit einer



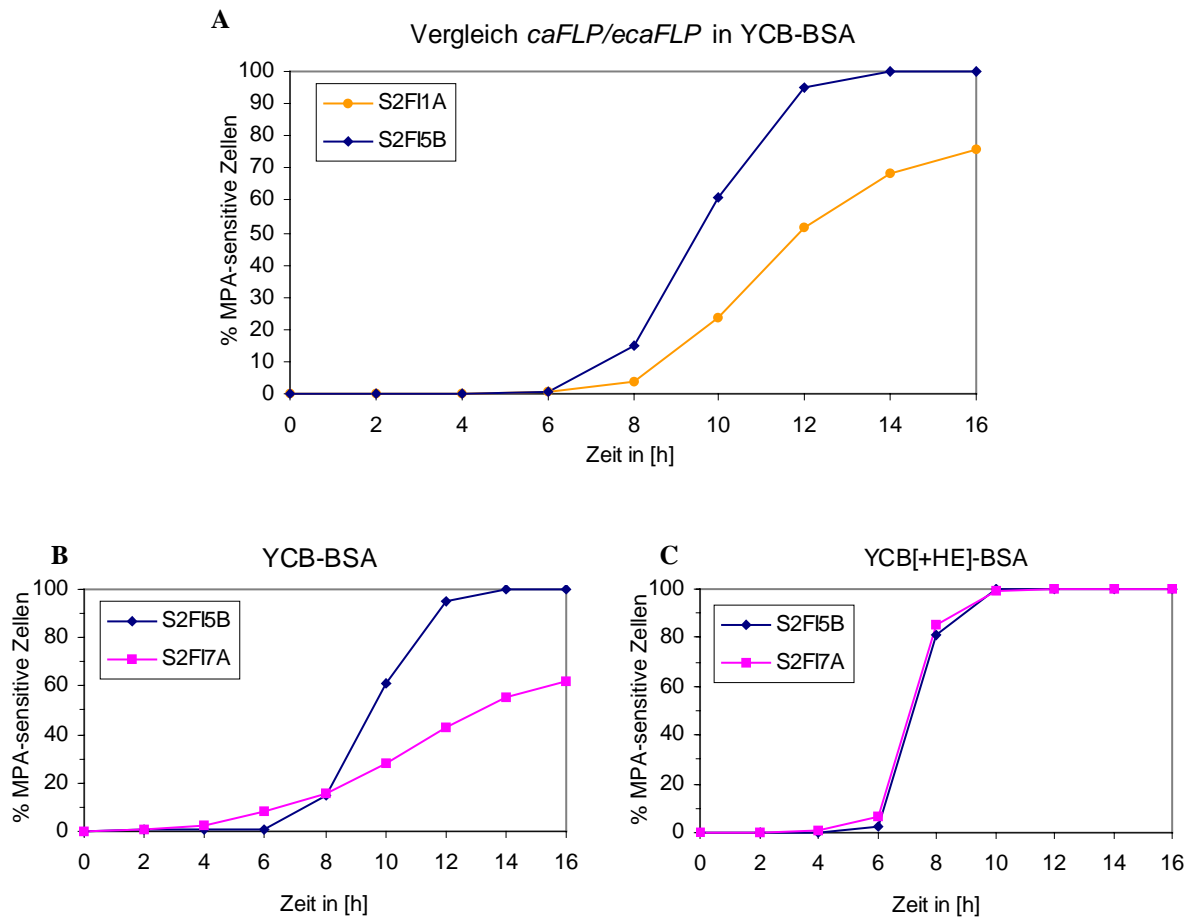
Größe von 6.0 kb ersetzt (Abb. 36B, Spur 2). Demnach wird in Stamm S2FI5B das *ecaFLP*-Gen in Allel *SAP2-1* von dem originalen *SAP2-1*-Promotor kontrolliert, während in Stamm S2FI7A das *ecaFLP*-Gen in Allel *SAP2-2* unter der Kontrolle des wildtypischen *SAP2-2*-Promotors steht. Die Reporterstämme S2FI5B und S2FI7A entsprechen somit den bereits vorgestellten Stämmen S2FI1A und S2FI3B, nur dass erstere das *ecaFLP*-Gen anstelle des *caFLP*-Gens in ihren Reporterfusionen enthalten (Abb. 37).



**Abb. 37** Genetische Struktur des *SAP2*-Lokus in den Reporterstämmen S2FI5B und S2FI7A. Die inaktiven *SAP2*-Allele sind mit Kleinbuchstaben bezeichnet, die Repeatkombination in den *SAP2*-Promotoren mit fatter Schrift.

#### 4.2.4.3 Erhöhte Aktivität der veränderten FLP-Rekombinase

Vor Einsatz der Stämme S2FI5B und S2FI7A im Tiermodell sollte zunächst *in vitro* getestet werden, ob die FLP-Rekombinase in *C. albicans* nach Einführung der vier Aminosäureaustausche tatsächlich eine erhöhte Aktivität aufweist. Zu diesem Zweck wurde die *SAP2P*-induzierte FLP-Aktivität in Zellen der Stämme S2FI5B und S2FI7A unter *SAP2*-induzierenden Bedingungen analysiert und auch mit der FLP-Aktivität in Zellen des Stammes S2FI1A verglichen. Nach über Nacht Vorkultur in *SAP2*-reprimierendem Minimalmedium wurden die Stämme S2FI5B und S2FI7A 1:100 in *SAP2*-induzierendes YCB[+HE]-BSA-Medium und parallel neben Stamm S2FI1A auch in YCB-BSA-Medium überführt. Zum Zeitpunkt null nach Überführen und zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Aliquots der Kulturen auf MPA-haltigen Indikatorplatten ausplattiert, um den Anteil an MPA-sensitiven Klonen zu bestimmen, in denen die *SAP2P*-induzierte FLP-Aktivität zu einer Deletion des Resistenzgens führte (Abb. 38).



**Abb. 38** *In vitro*-Überprüfung der Funktionalität der *ecaFLP*-Rekombinase: *SAP2P*-induzierte *caFLP*- bzw. *ecaFLP*-Aktivität in den Stämmen S2FI1A bzw. S2FI5B und S2FI7A nach Überführen von *SAP2*-reprimierendem Minimalmedium in *SAP2*-induzierendes YCB-BSA- (**A** und **B**) bzw. YCB[+HE]-BSA-Medium (**C**). Die FLP-vermittelte Deletion des *MPA<sup>R</sup>*-Markers wurde durch Bestimmung des Anteils MPA-sensitiver Kolonien nach Ausplattieren von Aliquots der Kulturen zu den angegebenen Zeitpunkten auf Indikatorplatten ermittelt.

Der Induktionsversuch zeigte, dass im Vergleich zum *caFLP*-Gen das *ecaFLP*-Gen einen sensitiveren Reporter einer Genexpression darstellte. Während des Wachstums in YCB-BSA-Medium waren nach 14 h bereits 100% der Zellen des Stammes S2FI5B MPA-sensitiv, während unter gleichen Bedingungen, wie bereits gezeigt, die *SAP2P*-Induktion nicht in allen Zellen des Stammes S2FI1A zu einer *MPA<sup>R</sup>*-Deletion führte (Abb. 38A). Eine höhere Aktivität der veränderten Rekombinase zeigte sich auch dadurch, dass MPA-sensitive Zellen des Stammes S2FI5B zu einem früheren Zeitpunkt auftraten. Auch während des Wachstums in YCB[+HE]-BSA-Medium führte die *SAP2*-Induktion bereits nach 10 h in allen Zellen der Reporterstämme S2FI5B und S2FI7A zu einer Marker-Deletion (Abb. 38C). In diesem Versuch wurde auch die differentielle Regulation der beide *SAP2*-Allele in Stamm CAI4 bestätigt, da in herkömmlichem YCB-BSA-Medium der Stamm S2FI5B sehr gut wuchs im Gegensatz zu dem Stamm S2FI7A, in dem durch Integration der Fusion Allel *SAP2-2*

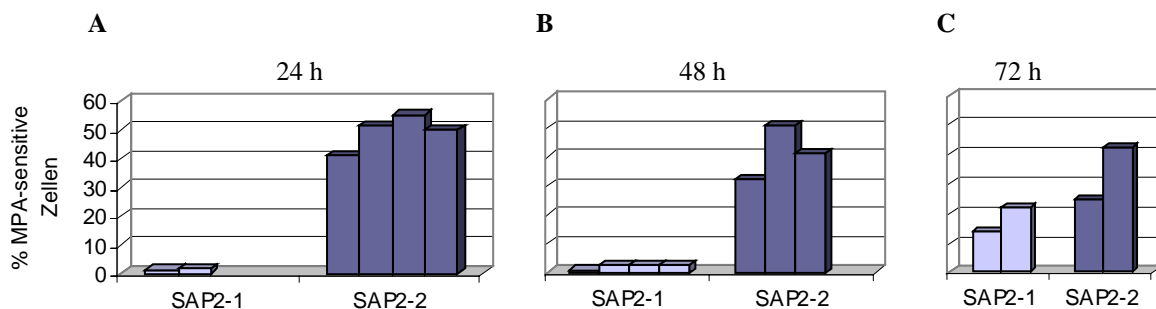
inaktiviert wurde. Dennoch wurde in Zellen des Stammes S2FI7A in diesem Medium eine signifikante *SAP2P*-Induktion beobachtet (Abb. 38B), während unter gleichen Bedingungen mit dem *caFLP*-Gen in Zellen des entsprechenden Stammes S2FI3B keine *SAP2*-Promotoraktivität nachweisbar war (vgl. Kapitel 4.2.3). Dass aber trotz des sehr schlechten Wachstums der Reporterstämme mit Integration in Allel *SAP2-2* eine Induktion dieses Allels stattfindet, konnte bereits mit dem GFP als Reporter der *SAP2*-Expression gezeigt werden (vgl. Kapitel 4.2.3.4).

#### 4.2.5 Differentielle Regulation der beiden *SAP2*-Allele während der Infektion

Um herauszufinden, ob die beiden *SAP2*-Allele im Stamm CAI4 auch während der Infektion unterschiedlich reguliert werden, wurde die *SAP2P*-Induktion in Zellen der Reporterstämme S2FI5B und S2FI7A in verschiedenen Stadien einer systemischen Infektion der Maus untersucht. Nach intravenöser Infektion wurden die *C. albicans*-Zellen der beiden Reporterstämme an drei aufeinanderfolgenden Tagen aus den Nieren erkrankter Tiere reisoliert und der Anteil MPA-sensitiver Klone bestimmt (Abb. 39). Mit dem Stamm S2FI5B, der die *SAP2P-ecaFLP*-Fusion in Allel *SAP2-1* enthält, konnten die Ergebnisse der *in vivo*-Experimente bestätigt werden, die bereits mit dem Stamm S2FI1A erhalten wurden, der sich von S2FI5B nur durch das *caFLP*-Gen als Reporter unterscheidet. Allel *SAP2-1* wurde während der ersten beiden Tage nach Infektion nicht signifikant induziert, einhergehend mit einem geringem Befall der Nieren. Die cfu-Werte lagen am ersten Tag zwischen  $3 \times 10^4$  und  $6 \times 10^4$ , am zweiten Tag zwischen  $1.2 \times 10^5$  und  $4 \times 10^5$ . Gegenüber Allel *SAP2-1* wurde Allel *SAP2-2* in diesem Zeitraum bereits stark induziert, da durchschnittlich 50% der Zellen des Stammes S2FI7A nach einem bzw. 41% der Zellen nach zwei Tagen MPA-sensitiv waren (Abb. 39A und B). Organbefall und Nierenschädigung durch die Pilzzellen waren für beide Reporterstämme vergleichbar. Die cfu-Werte des Stammes S2FI7A schwankten am ersten Tag zwischen  $3.8 \times 10^4$  und  $1.5 \times 10^5$ , am zweiten Tag zwischen  $3.7 \times 10^4$  und  $3.5 \times 10^5$ . Als die Zellen der Reporterstämme drei Tage nach i.v.-Infektion aus den inzwischen stark befallenen Nieren der Mäuse reisoliert wurden, konnte neben einer Expression des Allels *SAP2-2* nun auch eine signifikante Aktivierung von Allel *SAP2-1* nachgewiesen werden (Abb. 39C), die wie bereits berichtet mit einem verstärktem Organbefall korrelierte. Für den Stamm S2FI5B wurden in den beiden untersuchten Mäusen Nieren-cfu-Werte von  $3 \times 10^6$  beobachtet, für

Stamm S2FI7A, dessen Zellen sich ebenfalls stark vermehrten, entsprechend Werte zwischen  $2 \times 10^6$  und  $4 \times 10^6$ .

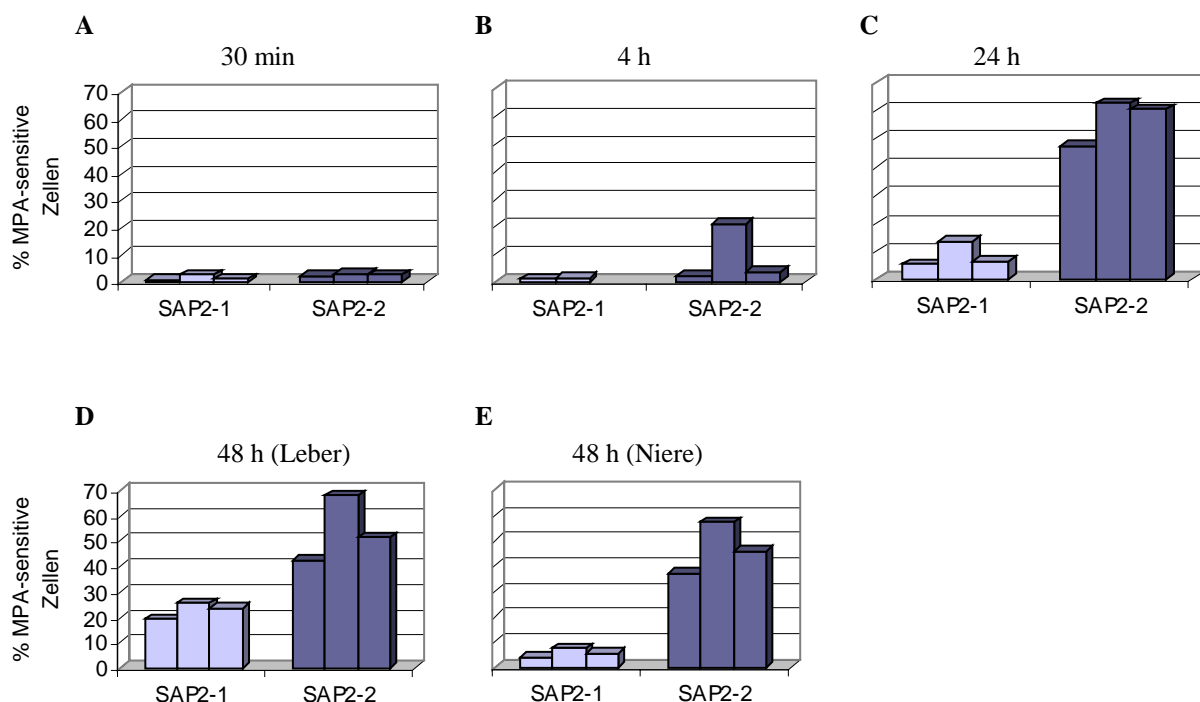
Das i.v.-Experiment konnte insgesamt deutlich machen, dass bei gleicher Virulenz der Reporterstämme die beiden *SAP2*-Allele während der Infektion differentiell reguliert wurden. Während Allel *SAP2-1* erst zu einem späten Zeitpunkt der Infektion signifikant exprimiert wurde, hatte in einem Großteil der Zellen bereits in früheren Stadien der Infektion eine Induktion von Allel *SAP2-2* stattgefunden, als noch keine starke Vermehrung der Pilzzellen und auch keine sichtbare Organschädigung zu beobachten war.



**Abb. 39** Differentielle Aktivierung der *SAP2*-Allele während des disseminierenden Krankheitsverlaufs nach intravenöser Infektion. Nach Infektion der Mäuse (mit je  $3 \times 10^5$  Blastokonidien) wurden an drei aufeinanderfolgenden Tagen (A, B, C) die Zellen der Stämme S2FI5B bzw. S2FI7A aus den Nieren reisoliert und durch Ausplattieren auf Indikatorplatten bezüglich der Allel-spezifischen *SAP2*-Aktivierung analysiert.

Die differentielle Expression der beiden *SAP2*-Allele wurde auch im *Candida*-Peritonitis-Modell beobachtet (Abb. 40). Durch Analyse von reisolierten Zellen der Reporterstämme S2FI5B bzw. S2FI7A aus der Bauchhöhle der infizierten Tiere 30 min nach Infektion konnte keine signifikante Induktion der *SAP2*-Allele beobachtet werden (Abb. 40A). Auch nach 4 h, als der Großteil der Pilzzellen an der Leber adhärenzte, wurde noch keine *SAP2*-Aktivierung in den Zellen des Stammes S2FI5B beobachtet, ebenso in den Zellen des Stammes S2FI7A in zwei der drei infizierten Tiere. In dem dritten Tier wurde jedoch bereits 4 h nach i.p.-Infektion eine deutliche Induktion des Allels *SAP2-2* nachgewiesen, da 21% der Leber-adhärenzten Zellen des Stammes S2FI7A MPA-sensitiv waren (Abb. 40B). Nach 24 h, als die Pilzzellen in die Leber der Tiere invadierten, wurde in einem der Großteil (57%) der Zellen Allel *SAP2-2* aktiviert, während eine Induktion von Allel *SAP2-1* aber nur in 9% der Zellen nachgewiesen wurde (Abb. 40C). Nach 48 h hatten 23% bzw. 54% der reisolierten Zellen der Stämme S2FI5B bzw. S2FI7A *SAP2* deutlich aktiviert. Demnach wurden beide *SAP2*-Allele in diesem Zeitraum deutlich induziert, wobei aber der Prozentsatz MPA-sensitiver Klone des Stammes S2FI5B geringer war als der von S2FI7A (Abb. 40D). In diesem Stadium der Infektion konnte

bereits eine Disseminierung der Pilzzellen in die Nieren der erkrankten Tiere beobachtet werden, wobei hier aber mit  $3.6 \times 10^4$  bis  $1.5 \times 10^5$  weitaus weniger koloniebildungsfähige Einheiten reisoliert werden konnten als aus der Leber mit  $6.3 \times 10^5$  bis  $4.8 \times 10^6$ . Durch Analyse von *C. albicans*-Zellen, die aus den nicht sichtbar geschädigten Nieren reisoliert wurden, konnte gezeigt werden, dass ähnlich wie innerhalb der ersten beiden Tage nach intravenöser Infektion Allel *SAP2-1* nur von einem geringen Anteil der Zellen induziert wurde (6%), wohingegen mit 47% ein großer Anteil der Zellen Allel *SAP2-2* im diesem Infektionsschritt aktiviert hatte (Abb. 40E).



**Abb. 40** Differentielle Aktivierung der *SAP2*-Allele während des disseminierenden Krankheitsverlaufs nach intraperitonealer Infektion. Nach Infektion der Mäuse wurden Zellen der Stämme S2FI5B bzw. S2FI7A zu verschiedenen Zeitpunkten bzw. aus unterschiedlichen Organen reisoliert und bezüglich einer Allel-spezifischen *SAP2*-Aktivierung durch Ausplattieren auf Indikatorplatten untersucht: (A) durch Peritoneallavage wiedergewonnene Zellen, (B) Leber-adhärente Zellen, (C) und (D) in die Leber invadierte Zellen, (E) in die Nieren disseminierte Zellen.

Die in diesen Tierexperimenten erhaltenen Ergebnisse zur *SAP2*-Regulation zeigten, dass ähnlich wie *in vitro* auch während der Infektion eine unterschiedliche Aktivierung der beiden *SAP2*-Allele im *C. albicans*-Stamm CAI4 zu beobachten ist. Allel *SAP2-1* wurde in den Pilzzellen erst in einem späten Stadium des Krankheitsverlaufes induziert, während Allel *SAP2-2* schon viel früher deutlich aktiviert wurde. Eine Deletion von Allel *SAP2-1* bzw. *SAP2-2* hatte keinen Einfluß auf die Virulenz der Stämme, da sich beide Reporterstämme in den Tierexperimenten ähnlich verhielten.

### 4.3 Analyse der *in vivo*-Expression der Gene *SAP1-SAP6*

Als häufiger Erreger einer *Candida*-Mykose des abwehrgeschwächten Menschen ist *C. albicans* vermutlich weniger durch den Besitz eines einzelnen dominanten Virulenzfaktors gekennzeichnet, als vielmehr durch eine hohe Anpassungsfähigkeit an die unterschiedlichsten Wirtsnischen. Das setzt voraus, dass *C. albicans* in Abhängigkeit von komplexen Umweltsignalen während Besiedlung und Infektion des Wirtes virulenzassoziierte und auch andere Gene in geeigneter Weise exprimieren muß, um so eine Vielzahl von Infektionsschritten bewerkstelligen zu können. Den sekretorischen Aspartylproteasen (SAPs) von *C. albicans* wird eine ganze Reihe möglicher Funktionen im Infektionsverlauf zugeschrieben, die von Nährstoffbereitstellung bis hin zu einer Beteiligung an Adhärenz, Invasion, Organzerstörung und Immunevasion reichen. Da *C. albicans* eine ganze Familie von *SAP*-Genen besitzt, wurde vermutet, dass den durch sie codierten Isoenzymen möglicherweise spezifische Aufgaben während der Infektion des Wirts zukommen. Dementsprechend könnten die *SAP*-Gene im Krankheitsverlauf differentiell in den Erregern exprimiert werden. Vor diesem Hintergrund schien es äußerst interessant, neben dem *SAP2*-Gen nun auch die Expression von weiteren Proteasegenen während der experimentellen Infektion zu studieren. Dadurch sollten Hinweise zur spezifischen Bedeutung der individuellen Proteasegene während der Infektion erhalten werden, um dadurch auch den Beitrag dieser diskutierten Virulenzfaktoren zur Pathogenität von *C. albicans* besser verstehen zu können. Bei dieser *in vivo*-Analyse interessierte vor allem die Expression der Isogene *SAP4*, *SAP5* und *SAP6*, die bislang nur im Zusammenhang mit dem Auftreten von *C. albicans*-Hyphen beobachtet wurde, einer Morphologievariation, die ebenfalls zu den diskutierten Virulenzfaktoren von *C. albicans* zählt.

#### 4.3.1 Integration des *ecaFLP*-Gens in die Gene *SAP1-SAP6*

Um die Expression der individuellen Mitglieder der *SAP*-Genfamilie während der Infektion analysieren zu können, wurde wie für die Untersuchung des *SAP2*-Gens das *ecaFLP*-Reporter-gen nun mit den Promotoren der Proteasegene *SAP1* und *SAP3-SAP6* fusioniert und in je eines der entsprechenden *SAP*-Allele des *C. albicans*-Stammes CFI1 integriert, der den deletierbaren *MPA<sup>R</sup>*-Marker enthält.

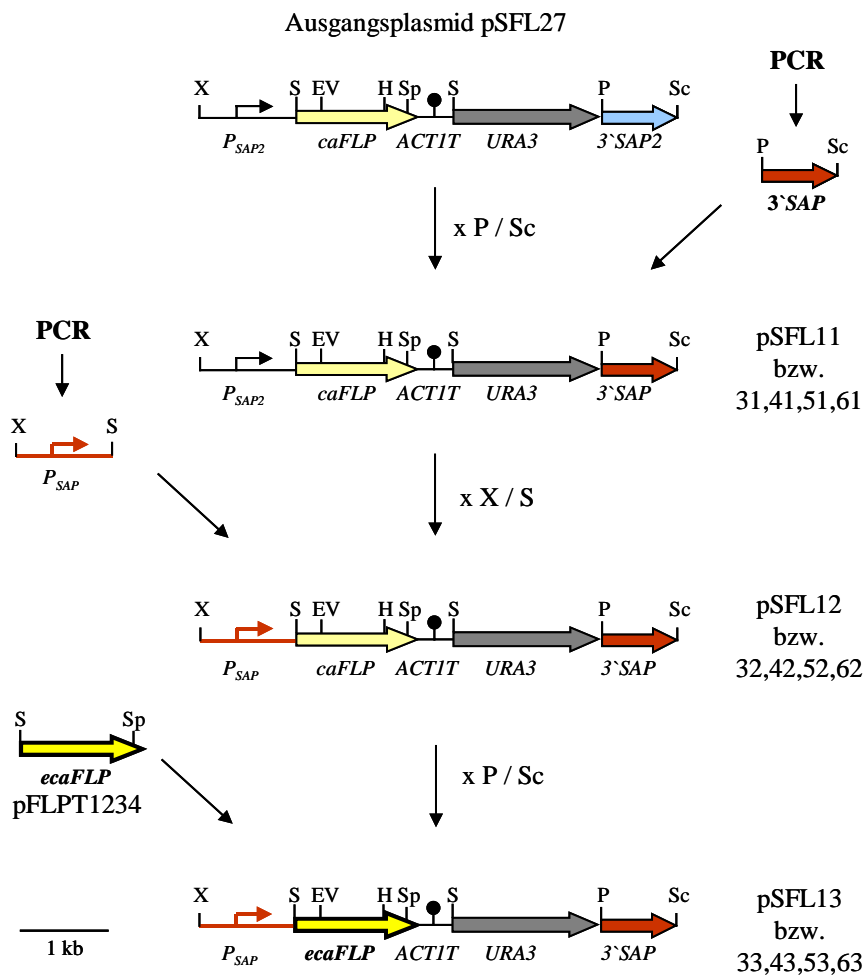
#### 4.3.1.1 Konstruktion der Plasmide

Als Ausgangsplasmid für die Herstellung der verschiedenen Reportergenkonstrukte diente das Plasmid pSFL27. Es enthält die bereits beschriebene *SAP2P-caFLP*-Fusion, das *C. albicans* *URA3*-Gen als Selektionsmarker sowie den 3`*SAP2*-Bereich, der zusammen mit dem Promotor für die Integration durch homologe Rekombination notwendig ist. In den folgenden Schritten wurde in dem Plasmid pSFL27 zunächst der 3`*SAP2*-Bereich durch die 3`-Sequenzen der Gene *SAP1*, *SAP3*, *SAP4*, *SAP5* und *SAP6* ersetzt, anschließend entsprechend die zugehörigen Promotoren. Zuletzt wurde das *caFLP*-Gen durch das *ecaFLP*-Gen ausgetauscht (Abb. 41).

Zur Klonierung der 3`-Bereiche der Gene *SAP1*, *SAP3*, *SAP4*, *SAP5* und *SAP6* wurde durch PCR unter Verwendung chromosomaler DNA des Stammes CFI1 als template ein Bereich der jeweils codierenden Region mit den Primerpaaren SAP1C/SAP1D, SAP3C/SAP3D, SAP4C/SAP4D, SAP5C/SAP5D und SAP6C/SAP6D angereichert. Die erhaltenen PCR-Produkte wurden an den in die Primer eingeführten *Pst*I- (jeweils in Primer „C“) bzw. *Sac*I- (jeweils in Primer „D“) Restriktionsschnittstellen gespalten, um jeweils den 3`*SAP2*-Bereich in Plasmid pSFL27 zu ersetzen und so die Plasmide pSFL11, pSFL31, pSFL41, pSFL51 und pSFL61 herzustellen. Die in diesen Plasmiden klonierten 3`-Bereiche der Gene *SAP1*, *SAP3*, *SAP4*, *SAP5* bzw. *SAP6* besitzen Größen von 802 bp, 799 bp, 785 bp, 805 bp bzw. 840 bp.

Die *SAP*-Promotorregionen der Gene *SAP1*, *SAP3*, *SAP4*, *SAP5* und *SAP6* wurden ebenfalls durch PCR unter Verwendung chromosomaler DNA des Stammes CFI1 als template angereichert. Hierfür dienten die Primerpaare SAP1P1/SAP1RB, SAP3P1/SAP3P2, SAP4P1/SAP4P2, SAP5P3/SAP5P2 und SAP6P1/SAP6P2, wobei in die erstgenannten jedes Paares jeweils eine *Xba*I-, in die anderen eine *Sal*I-Restriktionsschnittstelle eingeführt wurde. Die Sequenzen des Primerpaares zur Anreicherung des *SAP3*-Promotors wurden ermittelt, nachdem ein Klon (1H10) einer *C. albicans*-Fosmid-Genbank mit einer *SAP3*-spezifischen Sonde identifiziert werden konnte. Der Vergleich der dadurch erhaltenen DNA-Sequenz mit der publizierten *C. albicans*-Sequenz ergab, dass das *SAP3*-Gen 1.1 kb downstream des *CDR1*-Gens lokalisiert ist, so dass Primer SAP3P1 von downstream *CDR1*-Sequenzen der publizierten Sequenz abgeleitet werden konnte. Die *Xba*I/*Sal*I-gespaltenen Promotorfragmente der Gene *SAP1*, *SAP3*, *SAP4*, *SAP5* bzw. *SAP6* der Größe 902 bp, 900 bp, 1054 bp, 800 bp bzw. 1082 bp wurden nun in die entsprechenden Plasmide pSFL11, pSFL31, pSFL41, pSFL51 bzw. pSFL61 kloniert, um jeweils den *SAP2*-Promotor zu ersetzen. Zur Klonierung des *SAP1*-Promotors wurde das [*Xba*I-*Sal*I]-*SAP1P*-Fragment zusammen mit dem [*Sal*I-

*HindIII*]-5`*caFLP*-Fragment aus dem Plasmid pSFL11 in das *XbaI/HindIII*-gespaltene Plasmid pSFL11 kloniert. Für die Klonierung der Promotoren der Gene *SAP3*, *SAP4*, *SAP5* und *SAP6* wurde jeweils das [*XbaI-SalI*]-*SAP*-Promotor-Fragment zusammen mit dem [*SalI-EcoRV*]-5`*caFLP*-Fragment in das entsprechende *XbaI/EcoRV*-gespaltene Plasmid pSFL31, pSFL41, pSFL51 bzw. pSFL61 kloniert. Die so hergestellten Plasmide pSFL12, pSFL32, pSFL42, pSFL52 und pSFL62 enthalten neben einer Fusion der entsprechenden Promotoren der Gene *SAP1*, *SAP3*, *SAP4*, *SAP5* und *SAP6* mit dem *caFLP*-Gen auch die entsprechenden 3`*SAP*-Sequenzen.



**Abb. 41** Herstellung der Plasmide pSFL13, pSFL33, pSFL43, pSFL53 und pSFL63, die Fusionen der Promotoren  $P_{SAP1}$ ,  $P_{SAP3}$ ,  $P_{SAP4}$ ,  $P_{SAP5}$  bzw.  $P_{SAP6}$  mit dem *ecaFLP*-Gen enthalten. Die Plasmide enthalten jeweils die korrespondierenden 3`*SAP*-Sequenzen (Die Primer zur Anreicherung der *SAP*-Promotoren und 3`*SAP*-Sequenzen aus dem Stamm CF11 sind im Text angegeben). Relevante Restriktionsschnittstellen sind eingetragen (EV=*EcoRV*, H=*HindIII*, P=*PstI*, S=*SalI*, Sc=*SacI*, Sp=*SpeI*, X=*XbaI*)

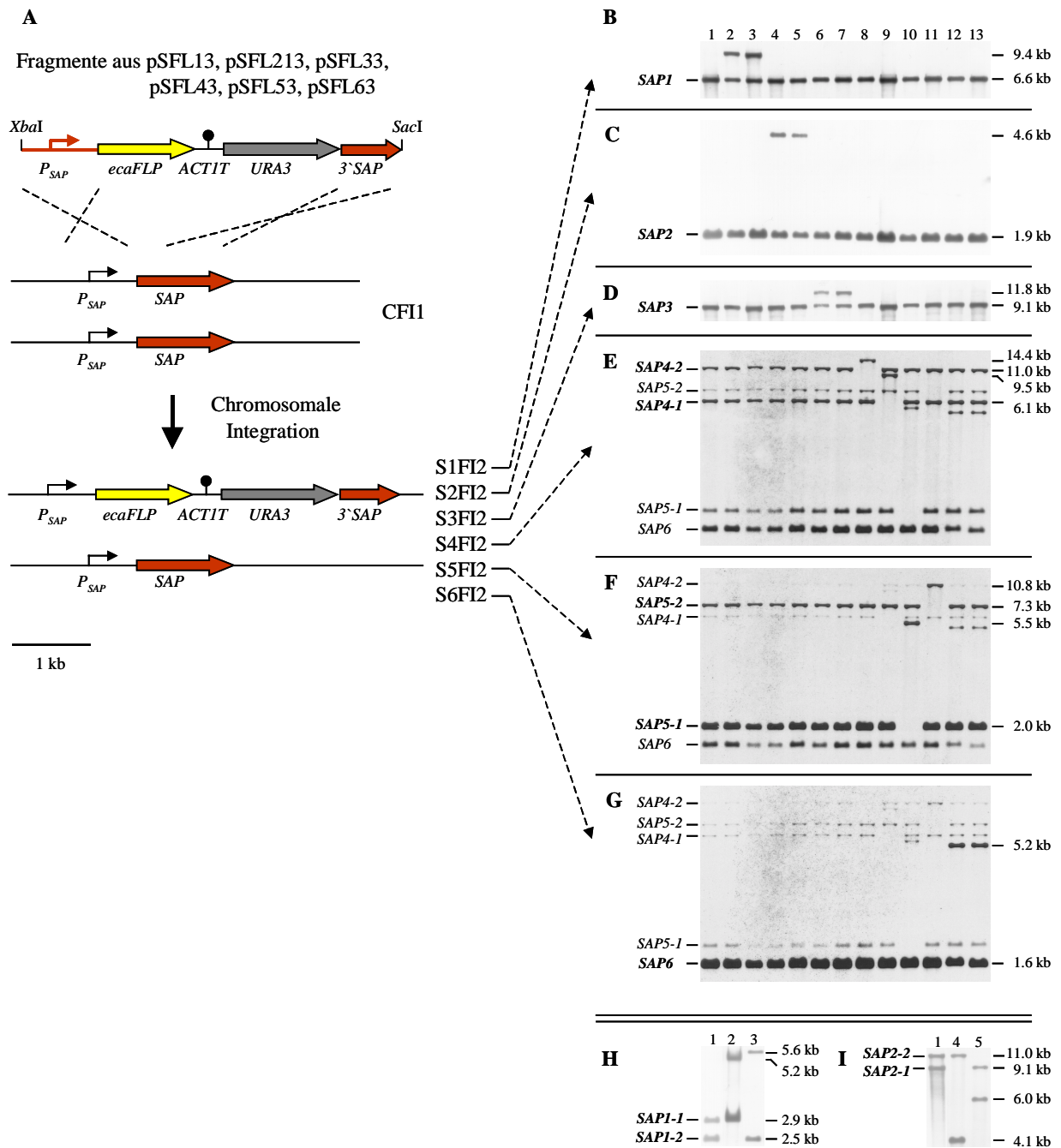
Im letzten Klonierungsschritt wurde in den Plasmiden pSFL12, pSFL32, pSFL42, pSFL52 und pSFL62 das *caFLP*-Gen gegen das *ecaFLP*-Gen ausgetauscht. Hierfür wurde jeweils das [*SalI-SpeI*]-5`*ecaFLP*-Fragment aus dem Plasmid pFLPT1234 zusammen mit dem [*SpeI-PstI*]-[3`*ecaFLP*-*ACT1T*-*URA3*]-Fragment aus dem Plasmid pSFL213 in die jeweils *SalI/PstI*-



gespaltenen Plasmide pSFL12, pSFL32, pSFL42, pSFL52 bzw. pSFL62 kloniert. Wie das bereits beschriebene Plasmid pSFL213, das eine Fusion des *SAP2*-Promotors mit dem *ecaFLP*-Gen enthält, tragen die entstandenen Plasmide pSFL13, pSFL33, pSFL43, pSFL53 und pSFL63 entsprechend Fusionen der Promotoren der Gene *SAP1*, *SAP3*, *SAP4*, *SAP5* und *SAP6* mit dem *ecaFLP*-Gen, die zusammen mit den jeweiligen 3`*SAP*-Sequenzen für die chromosomale Integration der Reportergenkonstrukte durch homologe Rekombination notwendig sind. Die Aktin-Transkriptions-Terminationsequenz ermöglicht eine optimale Transkription des *ecaFLP*-Gens (Abb. 41 und 42A).

#### 4.3.1.2 Integration der Reporterfusionen in die entsprechenden *SAP*-Gene

Die [*XbaI*-*SacI*]-Fragmente aus den Plasmiden pSFL13, pSFL213, pSFL33, pSFL43, pSFL53 bzw. pSFL63 wurden verwendet, um die jeweiligen *SAP-ecaFLP*-Fusionen in eines der beiden Allele der entsprechenden *SAP*-Gene des Stammes CFI1 zu integrieren (Abb. 42A). Durch Southern-Hybridisierung wurde die korrekte Integration der jeweiligen *SAP-ecaFLP*-Fusionen in die entsprechenden *SAP*-Gene bestätigt und zudem auch gezeigt, dass die anderen *SAP*-Gene dabei unversehrt blieben (Abb. 42B-G). Als Sonden für die Hybridisierungen dienten die jeweiligen *XbaI/SalI*-gespaltenen *SAP*-Promotorfragmente aus den Plasmiden pSFL13, pSFL213, pSFL33, pSFL43, pSFL53 bzw. pSFL63. Die chromosomale DNA sämtlicher Transformanten wurde für die Southern-Analyse mit der Restriktionsendonuklease *BglIII* gespalten. Ein *BglIII*-Restriktionspolymorphismus erlaubte für die integrativen Transformanten in den Genen *SAP4* und *SAP5* gleichzeitig eine Unterscheidung der jeweiligen Allele. Wegen der hohen Sequenzhomologie der Isogene *SAP4-SAP6* hybridisierten trotz Verwendung der spezifischen Promotoren als Sonde bei den Southern-Analysen dieser Transformanten auch die entsprechend unversehrten Gene. Aufgrund eines *KpnI*-Restriktionspolymorphismus konnten auch die Transformanten im *SAP1*-Gen auf Allelebene unterschieden werden (Abb. 42H). Wie bereits erklärt, erlaubte die *ClaI*-Spaltung eine Unterscheidung der *SAP2*-Allele (Abb. 42I). Für die Gene *SAP1*, *SAP2*, *SAP4* und *SAP5* wurden je zwei Transformanten aufgehoben, die eine Integration in unterschiedlichen Allelen enthielten. Da für die Gene *SAP3* und *SAP6* kein Restriktionspolymorphismus bekannt war, wurden hier zwei zufällig ausgewählte Transformanten mit korrekter Integration aufgehoben.



**Abb. 42** Herstellung von *C. albicans*-Stämmen mit Fusionen der Promotoren der Gene *SAP1*-*SAP6* mit dem *ecaFLP*-Gen. (A) zeigt schematisch die spezifische Integration eines Reportergenkonstruktes durch homologe Rekombination in das entsprechende *SAP*-Gen des Rezipientenstammes CFI1. In (B-G) sind die Ergebnisse der Southern-Hybridisierungen *Bgl*II-gespaltener chromosomaler DNA des Ausgangsstammes und der Transformanten mit den jeweils zugehörigen Promotorfragmenten der Gene *SAP1*-*SAP6* dargestellt. Für die Allelunterscheidung der Gene *SAP1* und *SAP2* wurde die DNA der entsprechenden Transformanten zusätzlich nach *Kpn*I- bzw. *Cla*I-Spaltung überprüft (H bzw. I). (1) CFI1, (2) S1FI2A, (3) S1FI2B, (4) S2FI5B, (5) S2FI5G, (6) S3FI2B, (7) S3FI2C, (8) S4FI2A, (9) S4FI2B, (10) S5FI2A, (11) S5FI2B, (12) S6FI2A, (13) S6FI2B.

Die erhaltenen Transformanten mit den *SAP*-Promotor-*ecaFLP*-Fusionen in den Genen *SAP1-SAP6* wurden folgendermaßen bezeichnet: S1FI2A, S1FI2B, S2FI5B, S2FI5G, S3FI2B, S3FI2C, S4FI2A, S4FI2B, S5FI2A, S5FI2B, S6FI2A und S6FI2B (Abb. 42).

Integration der *SAP1P-ecaFLP*-Fusion in das *SAP1*-Gen des Stammes CFI1 führte in den Stämmen S1FI2A und S1FI2B zu einer Vergrößerung je eines der wildtypischen *SAP1*-spezifischen *BgIII*-Fragmente von 6.6 kb auf 9.4 kb, d.h. um die Größe des ca. 3 kb großen *ecaFLP-ACT1T-URA3*-Fragmentes abzüglich des deletierten Bereiches aus der codierenden Region des *SAP1*-Gens von ca. 0.2 kb (Abb. 42B, Spuren 2 und 3). Eine zusätzliche Hybridisierung *KpnI*-gespaltener chromosomaler DNA des Ausgangsstammes CFI1 und der Transformanten S1FI2A und S2FI2B erlaubte eine Unterscheidung der beiden wildtypischen *SAP1*-Allele aufgrund eines Restriktionspolymorphismus an Position 382 der codierenden *SAP1*-Region (Abb. 42H). Der Nachweis der Integration der Reporterfusion in den *SAP2*-Lokus wurde bereits in Kapitel 4.1 und 4.2 ausführlich beschrieben. Für die Insertion der Integrationskassette in das *SAP3*-Gen der Stämme S3FI2B und S3FI2C galt entsprechend wie bei Integration in das *SAP1*-Gen eine Vergrößerung eines der wildtypischen *SAP3*-spezifischen *BgIII*-Fragmente von 9.1 kb um die Größe des Reportergenkonstrukts abzüglich einer Deletion von ca. 0.3 kb auf letztlich 11.8 kb (Abb. 42D, Spuren 6 und 7). Auch bei den Stämmen S4FI2A und S4FI2B führte die Integration des entsprechenden Fragmentes zu einer Vergrößerung eines der beiden wildtypischen *SAP4*-spezifischen *BgIII*-Fragmente, die aufgrund des Restriktionspolymorphismus von unterschiedlicher Größe waren. Da aufgrund Deletion eines ca. 0.4 kb-DNA-Bereiches aus der codierenden Region gleichzeitig die entsprechende *BgIII*-Restriktionsschnittstelle verlorenging, verschob sich die Größe des neu auftretenden *SAP4*-spezifischen Fragmentes zusätzlich um den Abstand bis zur nächstgelegenen *BgIII*-Restriktionsschnittstelle, so dass letztlich eine Vergrößerung der Ausgangsfragmente um ca. 3.4 kb zu den nun hybridisierenden Fragmenten der Größe 14.4 kb bzw. 9.5 kb in den Transformanten S4FI2A bzw. S4FI2B führte (Abb. 42E, Spuren 8 und 9). Ähnliches galt auch für die *SAP5*-Transformanten S5FI2A und S2FI5B, in denen ebenfalls ein *BgIII*-Restriktionspolymorphismus ein Unterscheiden der beiden *SAP5*-spezifischen Allele ermöglichte. Auch hier wurde durch Deletion des ca. 0.23 kb-DNA-Bereiches aus der codierenden *SAP5*-Region eine *BgIII*-Restriktionsschnittstelle entfernt. Dadurch betrug die Vergrößerung letztlich ca. 3.5 kb und führte in den Stämmen S5FI2A bzw. S5FI2B zum Auftreten der hybridisierenden Banden der Größe 5.5 kb bzw. 10.8 kb anstelle der jeweils wildtypischen Ausgangsfragmente (Abb. 42F, Spuren 10 und 11). Die beiden wildtypischen

*SAP6*-spezifischen Sequenzen hybridisierten beide auf 1.6 kb großen *Bgl*III-DNA-Fragmenten. Nachdem auch hier die entsprechende *Bgl*III-Restriktionsschnittstelle innerhalb des ca. 0.2 kb großen deletierten Bereiches lag, ergab sich bei der Überprüfung der Transformanten S6FI2A und S6FI2B eine Verschiebung je einer der wildtypischen Banden um 3.4 kb auf 5.2 kb (Abb. 42G, Spuren 12 und 13).

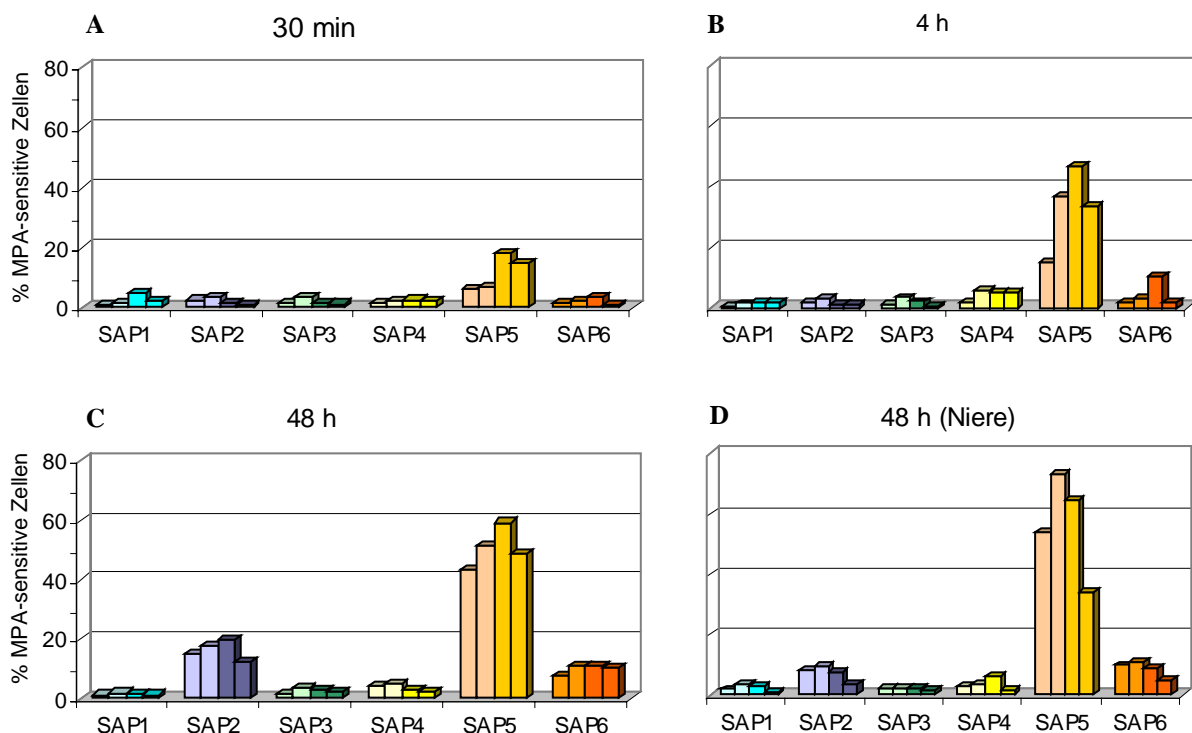
Da zum Zeitpunkt der Herstellung dieser Stämme ein Zusammenhang zwischen *SAP2*-Promotorstruktur und differentieller Regulation der beiden *SAP2*-Allele noch nicht bekannt war, wurde bei der Überprüfung der integrativen Transformante des *SAP2-2*-Allels S2FI5G an dieser Stelle nicht die Promotorstruktur der Reporterfusion analysiert (Abb. 42I, Spur 5). Spätere Sequenzierung ergab jedoch, dass bei der Integration der Reporterengkassette aus Plasmid pSFL213 in Allel *SAP2-2* der wildtypische Promotor dieses Allels durch den der Kassette ersetzt wurde, so dass das *ecaFLP*-Gen in Allel *SAP2-2* des Stammes S2FI5G von *P<sub>SAP2-1</sub>* kontrolliert wird. Durch Ausstreichen auf Agarplatten mit hoher Mycophenolsäurekonzentration (10 µg/ml) wurde überprüft, dass keiner der insgesamt zwölf Transformanten während Selektion und anschließendem Überstreichen auf Minimalagarplatten den deletierbaren *MPA<sup>R</sup>*-Marker bereits verloren hatte. Dadurch wurde demonstriert, dass die Reporterstämme trotz erhöhter Aktivität der FLP-Rekombinase bei Verwendung von Protease-reprimierenden Standard-Medien stabil sind.

#### **4.3.2 Differentielle Aktivierung der Gene *SAP1-SAP6* während der Infektion**

In vorhergehenden Tierexperimenten konnte bereits nachgewiesen werden, dass *SAP2* während der systemischen Infektion, insbesondere im Spätstadium, in den *C. albicans*-Zellen signifikant exprimiert wird. Umso spannender war daher die Frage, ob bzw. in welchem Infektionsschritt einer experimentellen Infektion die anderen Mitglieder der hier untersuchten Proteasegenfamilie aktiviert werden. Die hergestellten Reporterstämme S1FI2A, S1FI2B, S2FI5B, S2FI5G, S3FI2B, S3FI2C, S4FI2A, S4FI2B, S5FI2A, S5FI2B, S6FI2A und S6FI2B, die jeweils eine *SAP*-Promotor-*ecaFLP*-Fusion in einem der beiden Allele der Gene *SAP1-SAP6* enthalten, wurden in den bereits gut untersuchten Maus-Infektionsmodellen eingesetzt. Hierbei wurde wiederum durch intraperitoneale bzw. intravenöse Infektion ein systemischer Krankheitsverlauf simuliert, während in einem Schleimhautmodell eine oberflächliche, lokal begrenzte Infektion des Ösophagusepithels untersucht wurde.

#### 4.3.2.1 Stadienspezifische SAP-Aktivierung nach intraperitonealer Infektion

Die Zellen der einzelnen Reporterstämme wurden zu verschiedenen Zeitpunkten aus den infizierten Tieren reisoliert und auf eine SAP-Aktivierung überprüft (Abb. 43). Dabei wurde deutlich, dass *SAP5* bereits 30 min nach i.p.-Infektion, d.h. kurz nach Wirtskontakt, in den Pilzzellen signifikant induziert wurde, während die anderen *SAP*-Gene nur in einigen wenigen Zellen nachweisbar aktiviert wurden. Bemerkenswerterweise wurden zu diesem Zeitpunkt mikroskopisch nur Blastosporen, aber keine Keimschläuche oder -Hyphen identifiziert. Größtenteils myzelartig wuchsen dagegen die Zellen, die 4 h nach Infektion an der Leber adhärten und zu einem hohen Anteil *SAP5* exprimierten (Abb. 43B). Eine zusätzliche *SAP5*-Aktivierung wurde 48 h nach Infektion detektiert, als die Leber der erkrankten Mäuse von den Pilzzellen invadiert wurde. Nun konnte neben *SAP5* auch eine deutliche Aktivierung von *SAP6*, und wie zuvor schon berichtet auch von *SAP2* beobachtet werden (Abb. 43C). In diesem Stadium disseminierten die Erreger bereits in die Nieren, in denen ein ähnliches SAP-Expressionsmuster nachgewiesen wurde wie nach Invasion der Leber (Abb. 43D).

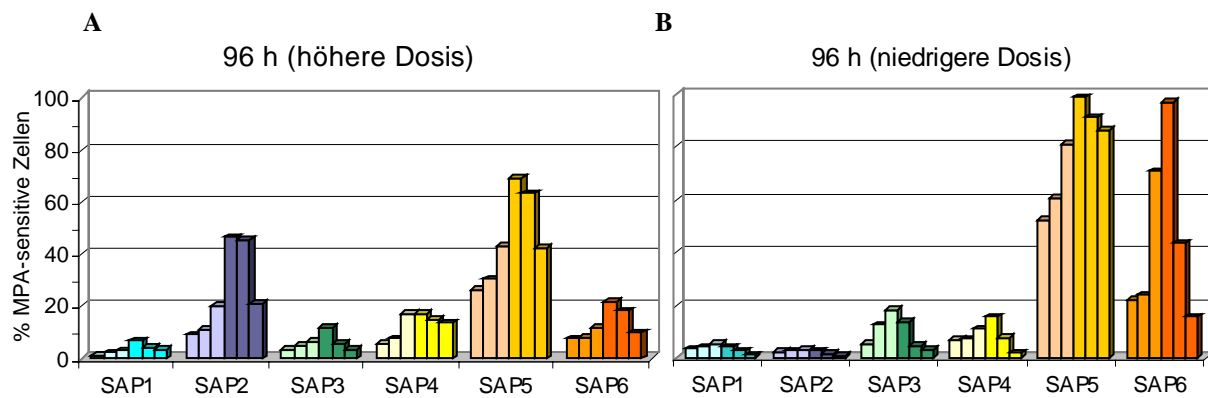


**Abb. 43** Stadienspezifische Aktivierung individueller *SAP*-Gene nach intraperitonealer Infektion. Jeweils zwei Mäuse wurden mit jedem Reporterstamm infiziert, um die *SAP*-Aktivierung in verschiedenen Stadien der Infektion nach Reisolierung der Pilzzellen durch Ausplattieren auf den Indikatorplatten zu bestimmen. (A) Durch Peritoneallavage 30 min nach Infektion wiedergewonnene Zellen, (B) Leber-adhärenente Zellen, (C) in die Leber invadierte Zellen, (D) in die Nieren disseminierte Zellen. Jeder Balken stellt die Ergebnisse aus einem Tier dar, die beiden Stämme pro *SAP*-Gen sind jeweils in hellen bzw. dunklen Farbtönen dargestellt.

#### 4.3.2.2 Differentielle SAP-Aktivierung nach intravenöser Infektion

Nach intraperitonealer Infektion wurde eine frühe Aktivierung insbesondere des *SAP5*-Gens beobachtet und der Anteil MPA-sensitiver Zellen der Stämme S5FI2A bzw. S5FI2B nahm auch im weiteren Krankheitsverlauf noch zu. Da der *MPA<sup>R</sup>*-Verlust infolge *SAP*-Promotor-Induktion ein irreversibles Ereignis darstellt, war schwer zu beurteilen, ob die früh nach i.p.-Infektion exprimierten *SAP*-Gene nur vorübergehend, oder aber auch nach Ausbreitung der Erreger über die Blutbahn erneut aktiviert wurden. Daher schien in diesem Versuch die Expression der *SAP*-Gene auf dem Infektionsweg nach intravenöser Inokulation der Pilze interessant, da hier die frühen Infektionsstadien der i.p.-Infektion umgangen werden.

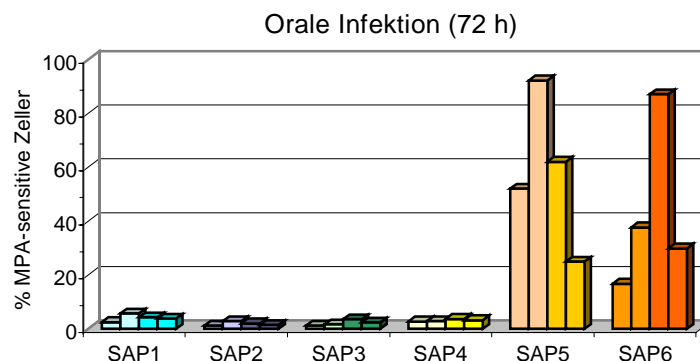
Für den Infektionsverlauf und auch die *SAP*-Expression konnte dabei eine Abhängigkeit von der Infektionsdosis beobachtet werden, die in einem erstaunlich engen Bereich lag. Bei einem Inokulum von  $4 \times 10^5$  Zellen fand nach hämatogener Ausbreitung eine starke Vermehrung der *C. albicans*-Zellen statt, so dass nach 4-tägigem Infektionsverlauf in den befallenen Nieren der Tiere cfu-Werte in einer Größenordnung von  $10^6$  -  $10^7$  bestimmt wurden. Eine Aktivierung des *SAP5*-Gens wurde offenbar auch aufrechterhalten, nachdem die Erreger die Blutbahn erreichten, da auch nach i.v.-Infektion eine deutliche *SAP5*-Aktivierung in den *C. albicans*-Zellen der befallenen Nieren detektiert wurde (Abb. 44). In geringerem Maße, aber ebenfalls signifikant wurden im gleichen Zeitraum auch die Gene *SAP4* und *SAP6* induziert. Die bereits beobachtete Expression des *SAP2*-Gens im Spätstadium der Systeminfektion konnte erneut bestätigt werden (Abb. 44A). Die Aktivierung der Gene *SAP1* und *SAP3* war in einigen Zellen nachweisbar, in der Gesamtheit der untersuchten Population aber insgesamt eher unauffällig. Nach Infektion der Mäuse mit einer nur leicht geringeren Infektionsdosis von  $2 \times 10^5$  Zellen war der Befall der Nieren 4 d nach Infektion mit cfu-Werten in der Größenordnung von  $10^4$  -  $10^5$  weitaus schwächer als nach Infektion mit  $4 \times 10^5$  Zellen. Einhergehend mit einer weitaus geringeren Gewebeschädigung der Nieren wurde auch eine Veränderung im *SAP*-Expressionsmuster festgestellt, dahingehend, dass der Anteil der überprüften Zellen, die das *SAP2*-Gen induziert hatten verhältnismäßig gering war. Dagegen wurden die Gene *SAP5* und *SAP6* in einigen Tieren beinahe von allen aus den Nieren reisolierten *C. albicans*-Zellen aktiviert (Abb. 44B). Die nach i.v.-Infektion beobachteten Unterschiede in der Expression der einzelnen *SAP*-Gene machen deutlich, dass eine Aktivierung von Virulenzgenen in *C. albicans* in enger Beziehung zur gewählten Infektionsdosis steht, die letztlich den Infektionsverlauf und damit auch den Beitrag individueller Virulenzgene bestimmen kann, der zur Aufrechterhaltung eines definierten Infektionsstadiums notwendig ist.



**Abb. 44** Differentielle Aktivierung der *SAP*-Gene während des disseminierenden Krankheitsverlaufs nach intravenöser Infektion. Für jeden Reporterstamm wurden jeweils drei Mäuse infiziert: mit  $4 \times 10^5$  Zellen (**A**) bzw.  $2 \times 10^5$  Zellen (**B**). Die Induktion der individuellen *SAP*-Gene wurde nach Reisolierung der Pilzzellen aus den Nieren der Tiere durch Ausplattieren auf den Indikatorplatten bestimmt. Jeder Balken stellt die Ergebnisse aus einem Tier dar, die beiden Stämme pro *SAP*-Gen sind jeweils in hellen bzw. dunklen Farbtönen dargestellt.

#### 4.3.2.3 Differentielle *SAP*-Aktivierung nach oraler Infektion

Nachdem eine signifikante Expression individueller *C. albicans-SAP*-Gene während der systemischen Infektion nachgewiesen werden konnte, sollte die *SAP*-Expression nun auch in einem Schleimhaut-Modell untersucht werden, in dem die Pilzzellen in das Wirtsepithel, in diesem Fall das Ösophagus-Epithel, invadieren, jedoch eine hämatogene Aussaat kaum stattfindet. Als die Zellen der zwölf Reporterstämme drei Tage nach oraler Infektion der Mäuse aus dem Ösophagus reisoliert wurden, konnte durch mikroskopische Betrachtung eine massive mukosale Invasion der Pilze unter Myzelbildung beobachtet werden. Bei Betrachtung des Expressionsmusters der untersuchten Proteasegene fiel auf, dass auch in diesem Infektionsmodell *SAP5* und auch *SAP6* stark induziert wurden, während die Gene *SAP1-SAP4* nur in einigen wenigen Zellen aktiviert wurden (Abb. 45).



**Abb. 45** Aktivierung der einzelnen *SAP*-Gene während der Infektion des Ösophagus. Für jeden Reporterstamm wurden jeweils zwei Mäuse oral mit den Zellen der zwölf *C. albicans*-Reporterstämme infiziert, die nach 3-tägiger Infektion aus dem invadierten Ösophagus-Epithel reisoliert wurden und nach Ausplattieren auf den Indikatorplatten der Bestimmung der *SAP*-Aktivierung dienten. Jeder Balken stellt die Ergebnisse aus einem Tier dar, die beiden Stämme pro *SAP*-Gen sind jeweils in hellen bzw. dunklen Farbtönen dargestellt.

Die Ergebnisse zur Analyse der Expression der Gene *SAP1-SAP6* in den verschiedenen Infektionsmodellen machten deutlich, dass *C. albicans* während der komplexen Interaktionen mit ihrem Wirt im Verlauf einer Infektion die verschiedenen Proteasen je nach Anforderung offensichtlich sehr gezielt einsetzte. Diese differentielle Aktivierung der individuellen *SAP*-Gene in den verschiedenen Infektionsmodellen erschien dabei umso eindrucksvoller, wenn man die äußerst hohe Homologie der *SAP*-Gene, insbesondere der Gene *SAP4-SAP6* berücksichtigt. So wurden während der Infektion des Ösophagus die Gene *SAP5* und *SAP6*, nicht aber die anderen *SAP*-Gene aktiviert. Nach intraperitonealer Infektion wurde sofort nach Wirtskontakt *SAP5*, aber nicht *SAP6* aktiviert, und zwar zu einem Zeitpunkt, als noch keine Hyphenbildung beobachtet werden konnte. Eine Aktivierung des *SAP6*-Gens konnte dagegen nur bei gleichzeitigem myzelialen Wachstum der *C. albicans*-Zellen beobachtet werden. Während *SAP5* sehr früh während der Infektion aktiviert wurde, konnte die Expression des *SAP2*-Gens zu diesem Zeitpunkt noch nicht nachgewiesen werden. Signifikant war jedoch die *SAP2*-Aktivierung, als bereits eine auffällige Gewebszerstörung durch die *C. albicans*-Zellen beobachtet werden konnte, einhergehend mit einer Vermehrung der Zellen in den befallenen Organen. Eine differentielle Aktivierung der beiden *SAP2*-Allele konnte durch die hier eingesetzten *SAP2*-Reporterstämme S2FI5B und S2FI5G nicht nachgewiesen werden, da die Zellen beider Stämme erst in einem späten Infektionsstadium nach i.p.- bzw. i.v.-Infektion MPA-sensitiv waren. Der Stamm S2FI5G enthält zwar die Reporterfusion im Allel *SAP2-2*, die aber wie in Stamm S2FI5B von  $P_{SAP2-1}$  kontrolliert wird. Diese *in vivo*-Ergebnisse unterstützen den beobachteten Zusammenhang zwischen Promotorstruktur und differentieller Regulation der *SAP2*-Allele (vgl. Kapitel 4.2.3.4), was darauf hinweist, dass die in Kapitel 4.2.5 beobachtete frühzeitige *in vivo*-Induktion des Allels *SAP2-2* möglicherweise von der Promotorstruktur dieses Allels beeinflusst wurde. Bemerkenswert erschien auch die Abhängigkeit der differentiellen *SAP*-Aktivierung von der Erregerzahl, wie Versuche nach intravenöser Infektion mit nur leicht unterschiedlichen Inokula zeigten. So wurde festgestellt, dass bei vergleichsweise niedrigerem Inokulum ein viel größerer Anteil der Zellen *SAP5* exprimiert hatte als bei entsprechend größerem Inokulum. Umgekehrt dagegen hatte bei höherer Infektionsdosis eine verstärkte Aktivierung von *SAP2* stattgefunden, und zwar in Zellen, die aus stark befallenen Organen reisoliert wurden und hier offensichtlich maßgeblich an einer Gewebszerstörung beteiligt waren. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass Infektionsverlauf und Virulenzgenexpression in enger Beziehung zur Erregerzahl stehen.

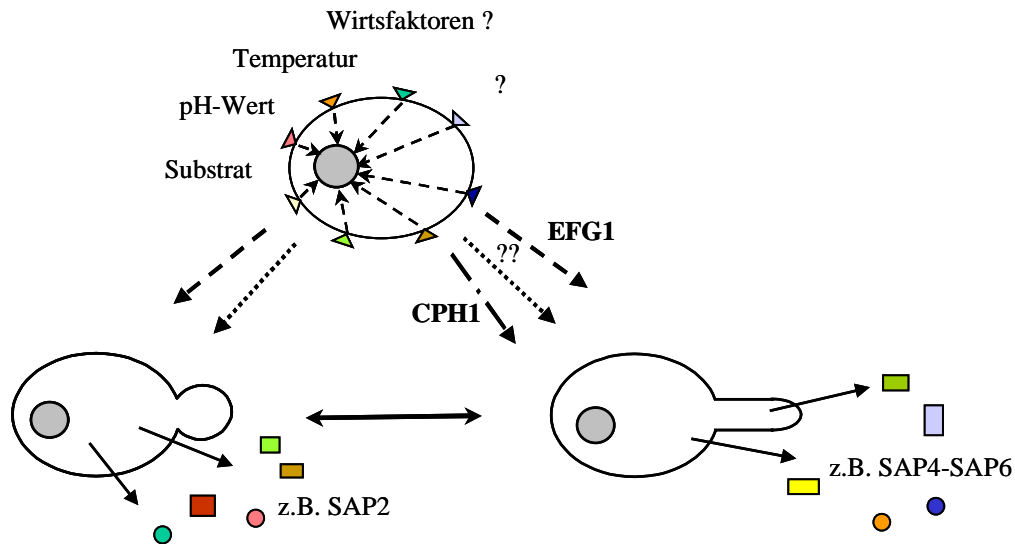


#### 4.4 Einfluß von Signalwegen auf die *SAP5*-Expression während der Infektion

Zur Anpassung an Veränderungen ihrer Umwelt verfügen auch Pilze über Signaltransduktionswege, die wahrgenommene Reize in die Zelle weiterleiten, um dann letztlich mit Reprimierung oder Aktivierung der jeweils notwendigen Gene zu reagieren. Dabei können die auslösenden Signale von unterschiedlicher Natur sein und von Temperatur- oder pH-Wertänderungen über wechselnde Substratangebote bishin zu spezifischen Wirtsfaktoren reichen. Für Krankheitserreger ist hier von besonderem Interesse, wie spezifische Virulenzfaktoren während der Auseinandersetzung mit dem Wirt reguliert werden (Abb. 46). Zwei für *C. albicans* bereits identifizierte, für den Dimorphismus wichtige Regulatoren sind die Transkriptionsfaktoren *CPH1* bzw. *EFG1*, die Komponenten einer Mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK)-Kaskade bzw. eines cAMP-abhängigen Signalweges darstellen.

Da möglicherweise auch ein Zusammenhang zwischen dem Wechsel der Morphologie der Pilzzellen von der Hefen- in die Myzelphase und den *C. albicans*-Proteasen besteht, sollte untersucht werden, ob die Expression ausgewählter Proteasegene während der Infektion von morphogenetischen Regulatoren abhängig ist. Signaltransduktionswege, die zu einer Aktivierung der *SAP*-Gene führen, sind noch weitgehend unerforscht. Bekannt ist, dass die *in vitro*-Expression der Proteasegene *SAP4-SAP6* im Stamm CAI4 bislang nur im Zusammenhang mit dem gleichzeitigen Auftreten von Hyphen beobachtet wurde, und dass unter hypheninduzierenden Bedingungen *in vitro* ein *SAP4-SAP6*-spezifisches Transkript bei der Northern-Analyse von *efg1*-Mutanten im Gegensatz zum Stamm CAI4 nicht nachweisbar war (Schröppel *et al.*, 2000). Während der *in vivo*-Untersuchungen der *SAP*-Expression im Verlauf einer systemischen Infektion der Maus (Kapitel 4.3.2, Abb. 43) war jedoch neben der frühen Aktivierung des *SAP5*-Gens auffällig, dass in diesem Infektionsstadium noch keine Keimschlauchbildung der *C. albicans*-Zellen beobachtet werden konnte. Dieser Widerspruch warf die Frage auf, ob die *SAP5*-Expression von den Regulatoren *CPH1* bzw. *EFG1* abhängig, nur nicht zeitgleich zu beobachten ist, oder aber über einen unabhängigen Signalweg induziert wird, der durch ähnliche Umweltreize gesteuert wird. Zur Klärung dieser Frage sollte die *in vivo*-Expression des *SAP5*-Gens in den *C. albicans*-Stämmen JKC18, HLC67 bzw. HLC69 untersucht werden, in denen jeweils die Gene *CPH1*, *EFG1* oder *CPH1* und *EFG1* inaktiviert vorliegen. In diese *ura3*-auxotrophen Derivate des Stammes CAI4 wurde zunächst wie in Stamm CFI1 der deletierbare *MPA<sup>R</sup>*-Marker stabil chromosomal

integriert, um dann nach Einführung ausgewählter *SAP*-Promotor-*ecaFLP*-Fusionen mit dem etablierten IVET-System die Proteasegenaktivierung während der Infektion analysieren zu können.

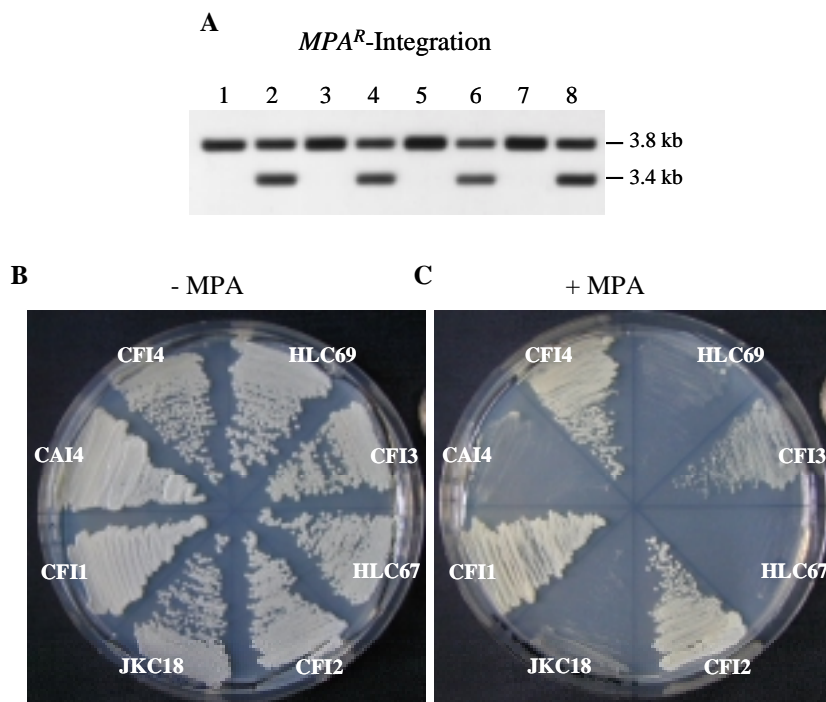


**Abb. 46** *C. albicans* kann je nach Wachstumsbedingung knospende Blastosporen oder nach Keimschlauchinduktion Hyphen ausbilden. Für den Wechsel von der Hefen- zur Hyphenform sind auslösende Bedingungen teilweise bekannt, und für Transkriptionsfaktoren wie z.B. CPH1 und EFG1 als Bestandteile von Signaltransduktionswegen wurde ein Einfluß auf diese Morphologieänderung gezeigt. Ob aber auch die Expression von diskutierten Virulenzfaktoren wie z.B. den Proteasen in den jeweiligen Wachstumsphasen in direkter Beziehung zu diesen Regulatoren steht, ist noch weitgehend unbekannt.

#### 4.4.1 Integration des *MPA<sup>R</sup>*-Markers in *C. albicans-cph1*- und *efg1*-Mutanten

In Kapitel 4.1.2 wurde die Herstellung des *C. albicans*-Stammes CFI1 beschrieben, der ein von *FRT*-sites flankiertes *MPA*-Resistenzgen im Aktin-Lokus enthält. In gleicher Weise dienten hier anstelle des *ura3*-auxotrophen Stammes CAI4 die ebenfalls *ura3*-auxotrophen regulatorischen Mutanten JKC18, HLC67 und HLC69 als Ausgangsstämme für die chromosomale Integration des deletierbaren Markers. Positive Transformanten konnten nach Insertion der Kassette aus dem Plasmid pAFI3 auf Agarplatten mit hoher Mycophenolsäurekonzentration selektiert werden. Die korrekte Integration des Markers in je eines der beiden *ACT1*-Allele der drei Ausgangsstämme wurde durch Southern-Hybridisierung mit einer 3'-*ACT1*-Sonde überprüft (Abb. 47, vgl. auch Abb. 3 und 4). Die Suche nach Klonen mit richtiger Insertion des Resistenzgens erwies sich hier als äußerst schwierig, da insgesamt über einhundert Transformanten überprüft werden mußten, um

letztlich die MPA-resistenten Stämme CFI2, CFI3 und CFI4 als Derivate der Stämme JKC18 (*cph1*), HLC67 (*efg1*) und HLC69 (*cph1/efg1*) zu erhalten. Wie Stamm CFI1 (Abb. 47A, Spur 2) wurde auch in den Stämmen CFI2 (Abb. 47A, Spur 4), CFI3 (Abb. 47A, Spur 6) und CFI4 (Abb. 47A, Spur 8) jeweils eines der beiden wildtypischen 3.8 kb *ACT1*-spezifischen *Bgl*III-DNA-Fragmente durch ein neues Fragment der Größe 3.4 kb ersetzt.



**Abb. 47** Nachweis der Integration des *MPA<sup>R</sup>*-Markers in eines der beiden *ACT1*-Allele in den Stämmen JKC18, HLC67 und HLC69 (A) durch Southern-Hybridisierung *Bgl*III-gespaltener chromosomaler DNA mit einer *ACT1*-spezifischen Sonde: (1) CAI4, (2) CFI1, (3) JKC18, (4) CFI2, (5) HLC67, (6) CFI3, (7) HLC69, (8) CFI4 und durch Wachstumsvergleich dieser Stämme auf Minimalagarplatten (mit 100 µg/ml Uridin supplementiert) ohne (B) bzw. mit (C) Zusatz von 10 µg/ml MPA (Inkubation 3 Tage, 30°C; Petrischalendurchmesser: 8 cm).

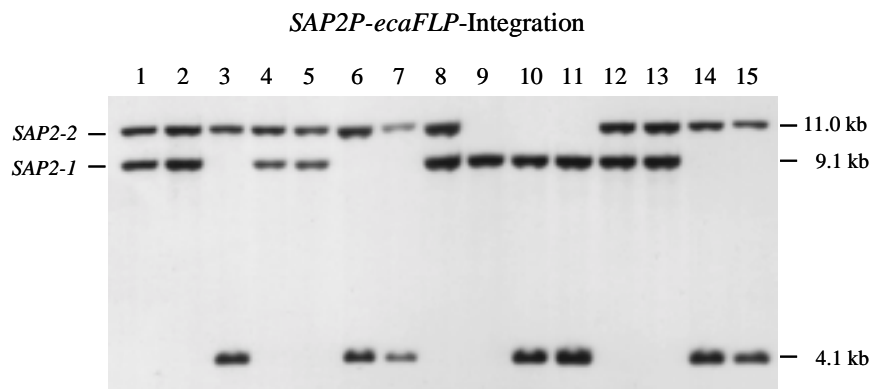
Verglichen mit den zugehörigen Ausgangsstämmen wuchsen die Stämme CFI2, CFI3 und CFI4 wie auch CFI1 auf Agarplatten mit hoher Mycophenolsäurekonzentration (10 µg/ml), während sich dagegen bei Anzucht ohne Selektionsdruck kein Wachstumsunterschied zeigte (Abb. 47C und B). Wie zuvor der *C. albicans*-Stamm CFI1 dienten nun die Stämme CFI2, CFI3 und CFI4 als Ausgangsstämme für die Einführung von *SAP*-Promotor-*ecaFLP*-Fusionen.

#### 4.4.2 *ecaFLP*-Integration in *SAP*-Gene der regulatorischen Mutanten

Da in diesem Versuchsvorhaben besonders die *in vivo*-Expression des *C. albicans*-*SAP5*-Gens interessierte, wurden in die regulatorischen Mutanten jeweils die *SAP5P-ecaFLP*- und *SAP2P-ecaFLP*-Reporterfusionen integriert. Die *SAP2*-Reporterstämme sollten nur zur *in vitro*-Überprüfung der Funktionalität des Reportersystems dienen. Dadurch konnte getestet

werden, ob das im Aktin-Lokus der Stämme CFI2, CFI3 und CFI4 von *FRT*-sites flankierte *MPA*-Resistenzgen durch FLP-Aktivität deletierbar ist. Unter *in vitro*-*SAP2P*-induzierenden Bedingungen sollte daher eine FLP-vermittelte *MPA<sup>R</sup>*-Marker-Deletion in den entsprechenden Stämmen mit *SAP2P-ecaFLP*-Fusionen nachweisbar sein.

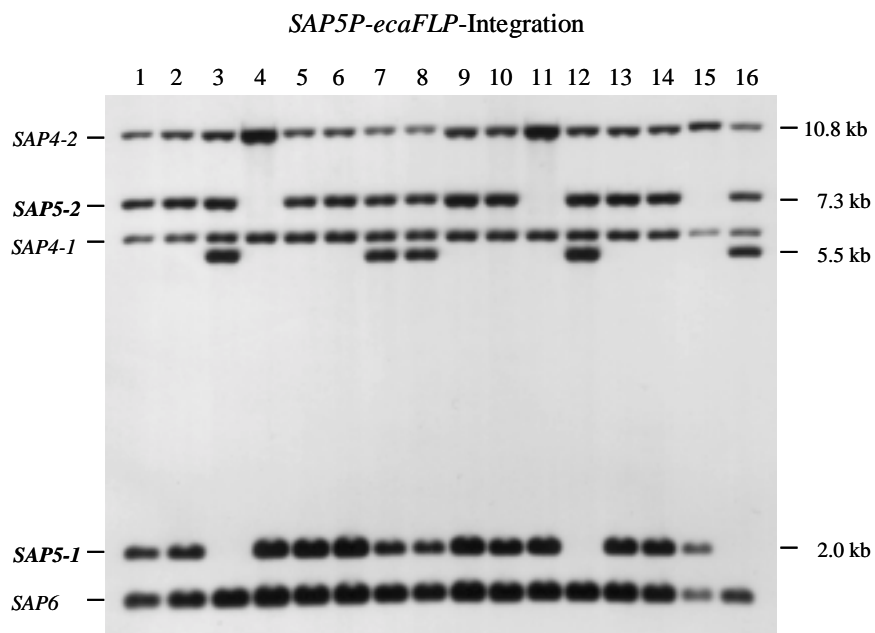
Wie der Stamm S2FI5B als Derivat des Stammes CFI1 mit einer *SAP2P-ecaFLP*-Fusion in Allel *SAP2-1*, wurden nun die entsprechenden *SAP2*-Reporterstämme der Stämme CFI2, CFI3 und CFI4 hergestellt. Für die Transformation diente die Integrationskassette aus Plasmid pSFL213. Die *URA3*-prototrophen Klone wurden durch Southern-Analyse der *Cla*I-gespaltenen chromosomalen DNA mit einer *SAP2*-spezifischen Sonde überprüft, wofür das [*Xba*I-*Sal*I]-*SAP2P*-Fragment aus Plasmid pSFL213 diente. Zur Kontrolle wurden die Stämme CAI4, CFI1 und S2FI5B mitaufgetragen (Abb. 48).



**Abb. 48** Nachweis der Integration der *SAP2P-ecaFLP*-Fusion aus Plasmid pSFL213 in die Stämme CFI2, CFI3 und CFI4 durch Southern-Hybridisierung *Cla*I-gespaltener chromosomaler DNA der Ausgangsstämme und Transformanten mit einer *SAP2*-spezifischen Sonde: (1) CAI4, (2) CFI1, (3) S2FI5B, (4) JKC18, (5) CFI2, (6) C2S2F1A, (7) C2S2F1B, (8) HLC67, (9) CFI3, (10) C3S2F1D, (11) C3S2F1E, (12) HLC69, (13) CFI4, (14) C4S2F1B, (15) C4S2F1C.

Von den erhaltenen Transformanten wurden Stämme ausgewählt, in denen eine Integration der *SAP2P-ecaFLP*-Fusion in Allel *SAP2-1* der jeweiligen Ausgangsstämme erfolgte und dabei entsprechend wie in Stamm S2FI5B ein neues *SAP2*-spezifisches *Cla*I-DNA-Fragment der Größe 4.1 kb auftrat (Abb. 48). Durch den *Cla*I-Restriktionspolymorphismus, der ein Unterscheiden der wildtypischen *SAP2*-Allele erlaubt, konnte dabei gezeigt werden, dass der Stamm CFI3 und seine Derivate C3S2F1D und C3S2F1E offensichtlich für Allel *SAP2-1* homozygot wurden, da bei ihnen das wildtypische *SAP2-2*-Fragment im Gegensatz zum Stamm HLC67 nicht detektiert wurde (Abb. 48, Spuren 9-11).

Die *SAP5*-Reporterstämme wurden in gleicher Weise hergestellt wie bereits zuvor die Stämme S5FI2A bzw. S5FI2B. Dazu wurden die *ura3*-negativen Stämme CFI2, CFI3 und CFI4 jeweils mit der Integrationskassette aus Plasmid pSFL53 transformiert. Für die Bestätigung der korrekten Integration wurde die *Bgl*III-gespaltene chromosomale DNA der *URA3*-positiven Klone durch Southern-Analyse mit einer *SAP5*-spezifischen Sonde überprüft, wofür das [*Xba*I-*Sal*I]-*SAP5P*-Fragment aus Plasmid pSFL53 verwendet wurde (Abb. 49).



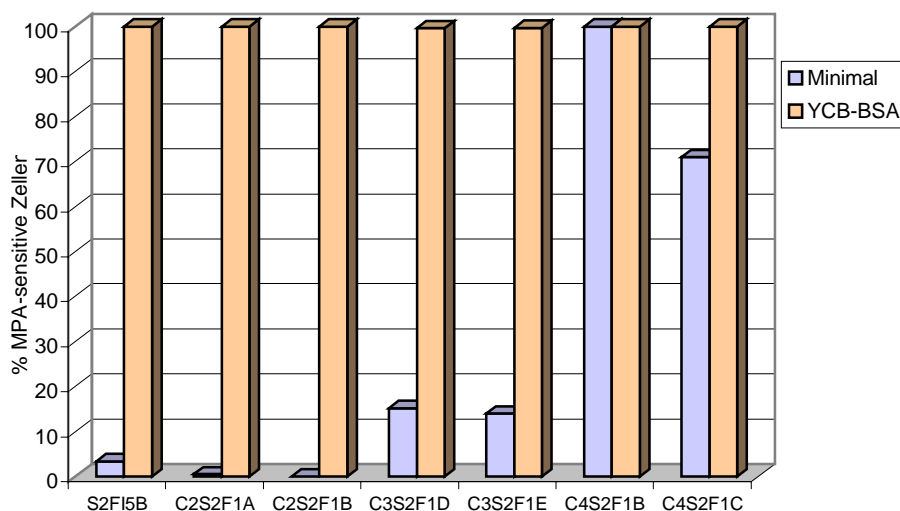
**Abb. 49** Nachweis der Integration der *SAP5P-ecaFLP*-Fusion aus Plasmid pSFL53 in die Stämme CFI2, CFI3 und CFI4 durch Southern-Hybridisierung *Bgl*III-gespaltener chromosomaler DNA der Ausgangsstämme und Transformanten mit einer *SAP5*-spezifischen Sonde (1) CAI4, (2) CFI1, (3) S5FI2A, (4) S5FI2B, (5) JKC18, (6) CFI2, (7) C2S5F1A, (8) C2S5F1B, (9) HLC67, (10) CFI3, (11) C3S5F1A, (12) C3S5F1B, (13) HLC69, (14) CFI4, (15) C4S5F1A, (16) C4S5F1B.

Integration der *SAP5P-ecaFLP*-Fusion in die Stämme CFI2, CFI3 und CFI4 führte entsprechend zur Herstellung der Stämme C2S5F1A/B, C3S5F1A/B und C4S5F1A/B. Durch den *Bgl*III-Restriktionspolymorphismus konnten auch hier die beiden wildtypischen *SAP5*-Allele unterschieden werden. Die Insertion führte wie in den Stämmen S5FI2A/B (Abb. 49, Spuren 3 und 4) zu einer Vergrößerung eines der beiden *SAP5*-spezifischen *Bgl*III-DNA-Fragmente um ca. 3.5 kb und dadurch zum Auftreten der hybridisierenden Banden der Größe 5.5 kb bzw. 10.8 kb anstelle der jeweils wildtypischen Ausgangsfragmente. In den Transformanten C3S5F1A/B (Abb. 49, Spuren 11 und 12) und C4S5F1A/B (Abb. 49, Spuren 15 und 16) erfolgte dabei die Insertion in die jeweils unterschiedlichen *SAP5*-Allele. Die Insertion der *SAP5P-ecaFLP*-Fusion in den Stamm CFI2 erfolgte in den resultierenden

Transformanten C2S5F1A/B (Abb. 49, Spuren 7 und 8) in Allel *SAP5-1*, jedoch blieb trotz Auftretens der neuen Bande ein hybridisierendes Fragment der Ausgangsgröße erhalten. Offensichtlich erfolgte eine Verdoppelung dieses Allels bereits im Ausgangsstamm JKC18, da hier wie in Stamm CFI2 die *SAP5-1*-spezifische 2.0 kb-Bande leicht verstärkt hybridisierte (Abb. 49, Spur 5).

#### 4.4.3 *In vitro*-Überprüfung des IVET-Systems in den regulatorischen Mutanten

Die Stämme C2S2F1A/B, C3S2F1D/E und C4S2F1B/C wurden zur Überprüfung des Reportersystems in *SAP2*-reprimierendem Minimalmedium vorkultiviert und 1:100 in induzierendes YCB-BSA-Medium überführt. Nach Vorkultur sowie nach 24 h Wachstum in Induktionsmedium wurden jeweils Aliquots der Kulturen auf Indikatorplatten ausplattiert, um nach Auszählen großer und kleiner Kolonien den Anteil der Zellen zu bestimmen, in denen eine *SAP2P*-induzierte, FLP-vermittelte Marker-Deletion zu einem MPA-sensitiven Phänotyp führte.



**Abb. 50** *SAP2*-Induktion in Zellen der *C. albicans*-Stämme, die Mutationen in den regulatorischen Genen *CPH1* (C2S2F1A/B), *EFG1* (C3S2F1D/E) oder *CPH1* und *EFG1* (C4S2F1B/C) enthalten. Die *SAP2*-Aktivierung wurde nach Ausplattieren von Aliquots der Vorkulturen in Minimalmedium sowie der YCB-BSA über Nacht-Kulturen auf MPA-haltigen Indikatorplatten bestimmt. Als Kontrolle diente der Stamm S2FI5B.

Durch den Induktionsversuch konnte die Funktionalität des Reportersystems in den regulatorischen *C. albicans*-Mutanten bestätigt werden, da in sämtlichen Transformanten mit *SAP2P-ecaFLP*-Fusionen eine *SAP2P*-induzierte *MPA<sup>R</sup>*-Deletion zu beobachten war. Nach 24 h Wachstum unter *SAP2*-induzierenden Bedingungen waren alle Zellen der verschiedenen *SAP2*-Reporterstämme MPA-sensitiv (Abb. 50). Jedoch fiel auf, dass bereits nach Vorkultur

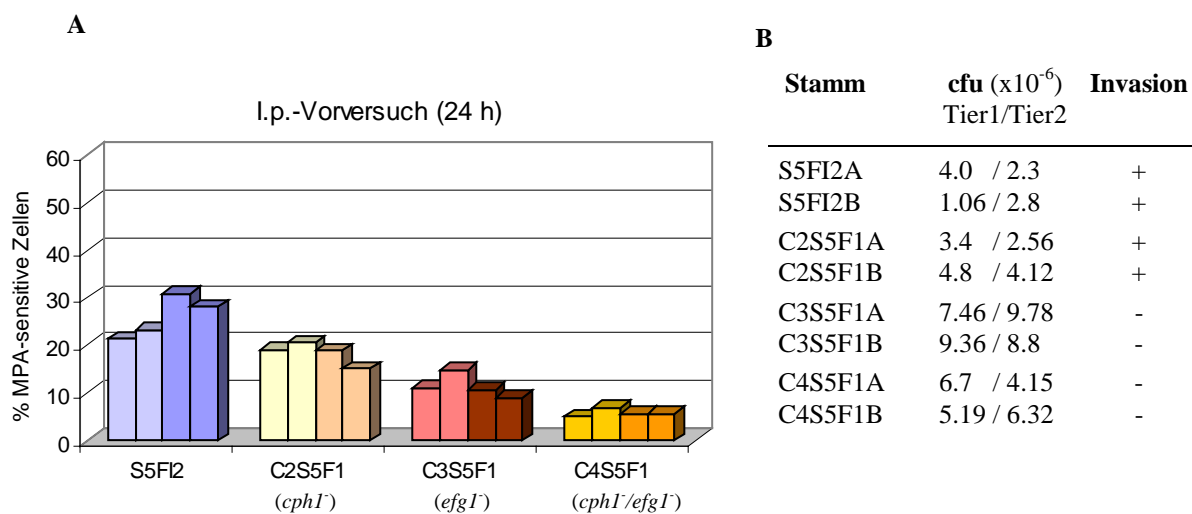
in Minimalmedium über 10% der Zellen der Stämme C3S2F1D/E signifikant *SAP2* aktiviert hatten und Zellen der Stämme C4S2F1B/C nach Wachstum unter diesen *SAP2*-reprimierenden Bedingungen zu einem großen Anteil MPA-sensitiv waren, d.h. während der Vorkultur *SAP2* aktivierten bzw. vorab während der Propagation auf Minimalagarplatten bereits aufgrund der *SAP2*-Induktion den Marker verloren hatten (Abb. 50). Offensichtlich wurde in den entsprechenden *efg1*-Mutanten bzw. *cph1 efg1*-Doppelmutanten das *SAP2*-Gen nicht mehr gleichermaßen reguliert wie im Ausgangsstamm CAI4 bzw. der *cph1*-Mutante. Diese höchst interessante Beobachtung wurde jedoch an dieser Stelle nicht weiterverfolgt, da hier der Einfluß der Mutationen in den Signaltransduktionswegen auf die *in vivo*-Expression des *SAP5*-Gens im Stamm CAI4 im Vordergrund stand.

#### 4.4.4 Einfluß der Transkriptionsregulatoren CPH1 und EFG1 auf die *in vivo*-*SAP5*-Aktivierung

Als Modell für die Überprüfung des Einflusses der Einzel- bzw. Doppelmutationen in den Genen *CPH1* bzw. *EFG1* auf die Expression des Proteasegens *SAP5* im Stamm CAI4 während der systemischen Infektion, diente das bereits mehrfach untersuchte i.p.-Maus-Infektionsmodell. Dies schien sinnvoll, da in vorhergehenden Versuchen bereits gezeigt werden konnte, dass im Stamm CAI4 das *SAP5*-Gen in diesem Modell schon sehr früh nach Infektion in den Pilzzellen signifikant induziert wurde, als noch keine Keimschläuche mikroskopisch nachweisbar waren. Darüberhinaus wurde in den Erregern *SAP5* auch im weiteren Infektionsverlauf nach i.p.-Infektion deutlich aktiviert.

In einem Vorversuch wurden jeweils zwei Tiere pro Stamm mit je  $1 \times 10^8$  Blastosporen einer Vorkultur intraperitoneal infiziert. Bei der Überprüfung der Stämme C2S5F1A/B, C3S5F1A/B und C4S5F1A/B dienten als Kontrollen die bereits analysierten Transformanten S5FI2A/B sowie auch der Wildtyp-Stamm SC5314. 24 h nach Infektion wurden die Pilzzellen jeweils reisoliert und für die Bestimmung der *SAP5*-Aktivierung auf den Indikatorplatten ausplattiert (Abb. 51A). Gleichzeitig wurde jeweils die Zahl koloniebildungsfähiger Einheiten bestimmt (Abb. 51B). Durch mikroskopische Betrachtung wurde auch Hyphenbildung und Invasionsfähigkeit der Pilze in entsprechende Wirtsgewebe überprüft (Abb. 51B). Während der Tierexperimente konnte der bereits gezeigte Einfluß der hier untersuchten regulatorischen Gene auf die Virulenz von *C. albicans* beobachtet werden (Lo *et al.*, 1997). Die *cph1*-Mutanten C2S5F1A/B verhielten sich genauso invasiv wie die Kontrollstämme S5FI2A/B und

SC5314 und bildeten intraperitoneal lange Hyphen aus. Dagegen fanden sich nach Infektion mit den *efg1*-Mutanten C3S5F1A/B sowie den *cph1 efg1*-Doppelmutanten C4S5F1A/B nur rundliche bis längs-ovale Blastosporen, jedoch keine Hyphen, ohne zu invadieren zwischen den parenchymatösen Organen. Dies erklärte auch die für diese Stämme beobachteten hohen cfu-Werte, da die Anzahl koloniebildungsfähiger Einheiten nach Reisolierung und Ausplattieren von ausschließlich Blastosporen höher ist als von Zellen, die myzelartig wachsen (Abb. 51B).



**Abb. 51** (A) Überprüfung der *SAP5*-Aktivierung in *C. albicans*-Stämmen mit Mutationen in den Genen *CPH1* (C2S5F1A/B), *EFG1* (C3S5F1A/B) bzw. *CPH1* und *EFG1* (C4S5F1A/B) während des disseminierenden Krankheitsverlaufs nach intraperitonealer Infektion. Für jeden Reporterstamm (verschiedene Farbtöne) wurden jeweils zwei Mäuse infiziert, um nach 24 h die Induktion des *SAP5*-Gens durch Reisolierung der Pilzzellen und Ausplattieren auf den Indikatorplatten zu bestimmen. (B) zeigt die zugehörigen cfu-Werte, und ob eine Invasion der Pilzzellen in parenchymatöse Organe beobachtet werden konnte.

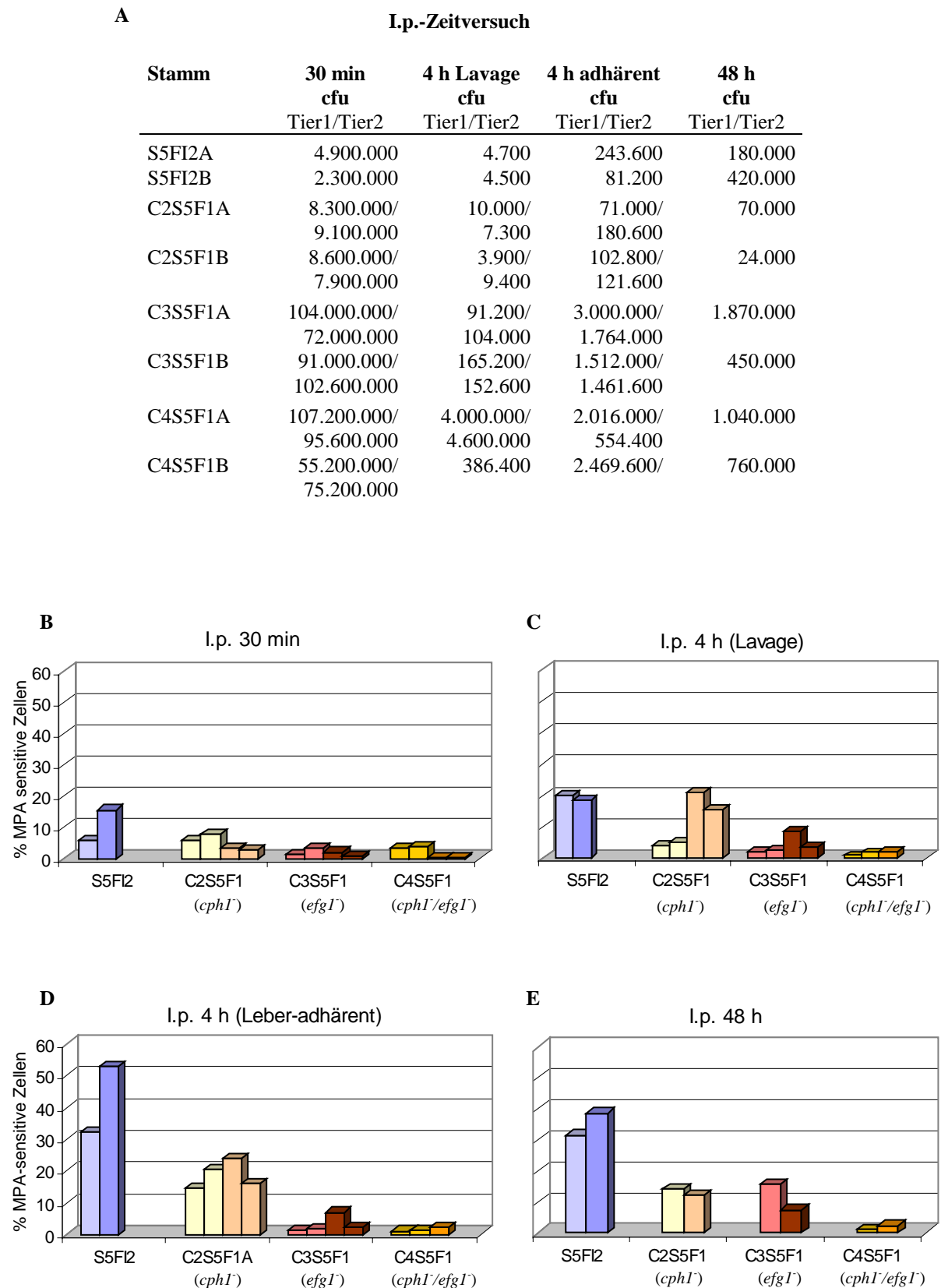
Durch den i.p.-Vorversuch wurde bereits auf einen Zusammenhang zwischen den Transkriptionsfaktoren *CPH1* bzw. *EFG1* und der Expression des *SAP5*-Gens im *C. albicans*-Stamm CAI4 hingewiesen. Im Vergleich zu den Kontrollstämmen S5FI2A/B (21-31% MPA-sensitive Zellen) wurde in Zellen der Reporterstämmen mit entsprechenden Mutationen eine insgesamt geringere Aktivierung dieses Proteasegens nachgewiesen (Abb. 51A). Besonders auffällig schien insbesondere die verminderte *SAP5*-Expression in den Stämmen C4S5F1A/B, in denen sowohl das *CPH1*- als auch das *EFG1*-Gen inaktiv sind. Nur 5-7% der reisolierten Zellen dieser Stämme hatten innerhalb 24 h nach i.p.-Infektion das *SAP5*-Gen signifikant aktiviert. Dagegen wurde in Zellen der *cph1*-Stämme C2S5F1A/B mit 15-21% MPA-



sensitiver Zellen eine vergleichsweise deutliche *SAP5*-Induktion ermittelt. In Zellen der Stämme C3S5F1A/B mit inaktiviertem *EFG1*-Gen wurden weniger MPA-sensitive Zellen (9-15%) reisoliert als in den Zellen mit einer Einzelmutationen im *CPHI*-Gen, dennoch hat auch hier offensichtlich eine deutliche *SAP5*-Aktivierung stattgefunden (Abb. 51A).

Wie bereits zuvor für den Stamm CAI4 gezeigt, sollte als zusätzlicher Kontrollversuch auch in den regulatorischen Mutanten die Aktivierung des *SAP5*-Gens im zeitlichen Verlauf der Infektion analysiert werden. Zu diesem Zweck wurde die *SAP5*-Expression 30 min, 4 h und 48 h nach intraperitonealer Infektion analysiert, wobei nach 4 h Zellen, die an der Leber adhärten, sowie nicht adhärente Zellen getrennt auf eine *SAP5*-Aktivierung analysiert wurden (Abb. 52). Für die Kontrollstämme S5FI2A/B wurde zu den angegebenen Zeitpunkten je ein Tier untersucht, für die anderen Reporterstämme mit Ausnahme des 48 h-Wertes je zwei. Aufgrund ausbleibender Hyphenbildung und Invasionsfähigkeit konnten die ermittelten Keimzahlen nach Infektion mit den Stämmen C3S5F1A/B und C4S5F1A/B nicht mit denen der anderen Stämme verglichen werden und gaben daher keinen Anhaltspunkt über den Grad der Infektion an.

In den Kontrollstämmen S5FI2A/B konnte auch in diesem Versuch eine frühzeitige Aktivierung des *SAP5*-Gens beobachtet werden (Abb. 52B-D). Dagegen war die *SAP5*-Induktion in den *cph1*- bzw. *efg1*-Einzelmutanten prozentual in insgesamt weniger Zellen nachweisbar. In den Reporterstämmen C4S5F1A/B, in denen sowohl das *CPHI*- als auch das *EFG1*-Gen inaktiviert sind, konnte wiederum nahezu keine *SAP5*-Aktivierung detektiert werden (Abb. 52B-E). Diese Beobachtung ließ vermuten, dass in diesem Infektionsmodell eine starke *SAP5*-Induktion unabhängig von den beiden untersuchten Transkriptionsfaktoren offensichtlich nicht stattfindet. Dennoch konnte nicht gezeigt werden, dass die *SAP5*-Expression von nur einem der beiden Regulatoren abhängig ist. Zwar wurde sowohl in den Stämmen C2S5F1A/B mit einer Einzelmutation im *CPHI*-Gen als auch C3S5F1A/B mit inaktiviertem *EFG1*-Gen die *SAP5*-Induktion im Gegensatz zu den Kontrollstämmen S5FI2A/B reduziert, konnte aber dennoch in einem bemerkenswerten Anteil der Zellen nachgewiesen werden (Abb. 52C-E). Dies wurde besonders 48 h nach Infektion deutlich, da hier in den *cph1*-Mutanten durchschnittlich 13%, in den *efg1*-Mutanten 12%, in den Doppelmutanten aber nur 2% der reisolierten Zellen den *MPA<sup>R</sup>*-Marker während der Infektion verloren hatten (Abb. 52E). Auffällig erschien auch die signifikante *SAP5*-Induktion bereits 4 h nach Infektion in Zellen mit einer *cph1*-Mutation, zu einem Zeitpunkt, als eine Hyphenbildung der Pilze einsetzte (Abb. 52C und D).



**Abb. 52** Aktivierung des *SAP5*-Gens in *C. albicans*-Stämmen mit Mutationen in regulatorischen Genen während der Infektion. In (A) sind die zu den verschiedenen Zeitpunkten nach intraperitonealer Infektion ermittelten cfu-Werte der Reporterstämme angegeben, während in (B)-(D) die jeweils ermittelte *SAP5*-Aktivierung dargestellt ist. Die Stämme sind durch verschiedene Farbtöne gekennzeichnet. Für die Kontrollstämme generell sowie für den 48 h-Wert wurde je ein Tier infiziert, ansonsten je zwei Tiere mit Ausnahme für Stamm C2S5F1B nach 4 h.

Faßt man die Ergebnisse zur Analyse der *SAP5*-Expression in den regulatorischen *C. albicans*-Mutanten zusammen, trugen unter den hier studierten *in vivo*-Bedingungen vermutlich beide Regulatoren, *CPH1* und *EFG1* zur *SAP5*-Expression im Stamm CAI4 bei. Vergleicht man die beobachtete *SAP5*-Aktivität in den Zellen der Stämme mit *cph1*- bzw. *efg1*-Mutation mit dem morphologischen Erscheinungsbild der jeweiligen Mutanten während der Infektion, korrelierte die *SAP5*-Induktion letztlich aber nicht mit der Hyphenbildung. Während die *cph1*-Mutanten phänotypisch nicht von den Kontrollstämmen zu unterscheiden waren, wurden nach i.p.-Infektion der Mäuse mit den Zellen der *efg1*-Mutanten nur Blastosporen identifiziert. Dieses Erscheinungsbild zeigten auch die Zellen mit *cph1 efg1*-Doppelmutation, in denen keine signifikante *SAP5*-Aktivierung nachgewiesen werden konnte. Demnach scheint die Expression des *SAP5*-Gens zwar von den hier untersuchten morphogenetisch relevanten Signaltransduktionswegen beeinflußt zu sein, aber nicht notwendigerweise von der Ausbildung von Hyphen abhängig zu sein. Das könnte bedeuten, dass *SAP5*-Expression und Hyphenbildung von ähnlichen Wirtsfaktoren induziert werden und daher gleichzeitig zu beobachten, aber nicht voneinander abhängig sind.

## 5 Diskussion

Als opportunistischer Erreger einer *Candida*-Mykose des Menschen stellt *C. albicans* aufgrund der großen Anzahl abwehrgeschwächter Patienten eine klinisch ernstzunehmende Gefahr dar (Fridkin and Jarvis, 1996). In Abhängigkeit des Immundefektes sind verschiedene Verlaufsformen dieser Pilzkrankung zu beobachten und reichen von oberflächlichen Schleimhautbelägen bis hin zu lebensbedrohlichen tiefen Organmykosen. Da jedoch neben der Wirtsdisposition offensichtlich auch Eigenschaften des Erregers maßgeblich für die Infektion entscheidend sind, wurden in den letzten Jahrzehnten auch Virulenzfaktoren von *C. albicans* diskutiert und aufgrund zahlreicher Tierversuche auf ihre pathogenetische Bedeutung hingewiesen (Odds, 1988; Navarro-Garcia *et al.*, 2001). Als vielfach untersuchtes Merkmal wurde in diesem Zusammenhang auch die Fähigkeit von *C. albicans* zur extrazellulären proteolytischen Aktivität mit der Virulenz des Erregers verbunden (Staib, 1965). Den sekretorischen Aspartylproteasen (SAPs) von *C. albicans* werden neben ihrer Aufgabe in der Bereitstellung niedermolekularer Stickstoffquellen durch den proteolytisch bedingten Eiweißabbau auch andere wichtige Funktionen während der Infektion zugeschrieben. Hierzu gehören eine mögliche Beteiligung an der Adhärenz der Pilzzellen an Wirtsoberflächen (Ray and Payne, 1988; Watts *et al.*, 1998), der Zerstörung von Wirtsbarrieren während der Invasion von Geweben (Colina *et al.*, 1996; Morschhäuser *et al.*, 1997) und der Evasion des Immunsystems durch Abbau von Immunglobulinen und Komplementproteinen (Rüchel, 1986; Kaminishi *et al.*, 1995). Nachdem durch genetische Analyse eine ganze Familie homologer Proteasegene in *C. albicans* identifiziert wurde, stellte sich die Frage nach Funktion und pathogenetischer Bedeutung der individuellen Isoenzyme. Durch die Analyse von spezifisch hergestellten SAP-Mutanten in Infektionsmodellen konnte den SAP-Isogenen ein allgemeiner Einfluß auf die Virulenz von *C. albicans* zugesprochen werden, jedoch keine definierte Bedeutung für das Infektionsgeschehen (Hube *et al.*, 1997; Sanglard *et al.*, 1997). Aufgrund der Beobachtung, dass die individuellen Proteasegene *in vitro* differentiell aktiviert werden (Hube *et al.*, 1994, White and Agabian, 1995; Monod *et al.*, 1998) wurden ähnliche Aktivierungsunterschiede auch *in vivo* für möglich gehalten. Diese Vermutung wird auch dadurch unterstützt, dass trotz breiter Substratspezifität der verschiedenen SAP-Enzyme durchaus *in vitro*-Unterschiede bezüglich Spezifität und optimaler Aktivitätsbedingungen der einzelnen Proteasen bestehen (Koelsch *et al.*, 2000). Das könnte bedeuten, dass die jeweiligen Enzyme während des Infektionsgeschehens spezifische Aufgaben erfüllen und sie daher

stadienspezifisch vom Erreger während der Infektion eingesetzt werden. Da jedoch die komplexen Erreger-Wirts-Auseinandersetzungen während einer Infektion kaum *in vitro* zu simulieren sind, sollte die Analyse der *in vivo*-SAP-Genexpression zum Verständnis ihrer Bedeutung als Virulenzfaktor von *C. albicans* beitragen. Nachdem herkömmliche Methoden für einen entsprechenden Nachweis aber nur schwer in der experimentellen Infektion einsetzbar sind, wurde in der vorliegenden Arbeit ein genetisches Reportersystem für *C. albicans* entwickelt, das als IVET-Strategie eine *in vivo*-Expressionsanalyse spezifisch wirtsinduzierter Gene ermöglichen sollte. Dadurch steht eine für diesen Organismus neuartige Strategie der Pathogenitätsanalyse zur Verfügung, die zur *in vivo*-Untersuchung von putativen Virulenzgenen alternativ und ergänzend neben der Virulenzbestimmung von spezifischen *C. albicans*-Mutanten eingesetzt werden kann.

## **5.1 Etablierung einer *in vivo*-Expressionstechnologie für *C. albicans***

### **Funktionsweise des Reportersystems**

Das an den Codon-Gebrauch von *C. albicans* angepaßte Gen der site-spezifischen Rekombinase FLP aus *Saccharomyces cerevisiae* wird durch den Promotor des Gens kontrolliert, dessen Expression untersucht werden soll. Eine Aktivierung des Promotors führt zur Bildung der Rekombinase, die ihrerseits ein von ihren spezifischen Erkennungssequenzen flankiertes Resistenzgen ( $MPA^R$ -Marker [Köhler *et al.*, 1997]) irreversibel aus dem Genom der entsprechenden *C. albicans*-Zelle deletiert. Zellen, die den Marker verloren haben, bilden nach Ausplattieren auf Mycophenolsäure (MPA)-haltigen Indikatoragarplatten deutlich kleinere Kolonien als solche Zellen, die das Resistenzgen besitzen. Durch Bestimmung des Prozentsatzes kleiner Kolonien an der Gesamtkoloniezahl kann letztlich ermittelt werden, wieviele Zellen einer untersuchten Population das entsprechende Gen zuvor aktiviert hatten. Aufgrund der einfachen phänotypischen Unterscheidung MPA-positiver und -negativer Zellen anhand der Koloniegröße, kann selbst bei einer großen Anzahl von Klonen eine zuvor erfolgte Genaktivierung leicht festgestellt werden. Da jede Kolonie aus einer Zelle hervorgegangen ist, ist auch eine Analyse auf Einzelzellebene möglich.

Eine wichtige Voraussetzung für die *in vivo*-Expressionsanalyse eines Gens mit der hier entwickelten IVET-Strategie besteht darin, dass eine nachweisbare Induktion des Zielgens

unter *in vitro*-Bedingungen nicht stattfinden darf, da andernfalls die Zellen entsprechender Reporterstämme bereits vor der experimentellen Infektion den Marker verlieren würden. Da unter nicht-induzierenden *in vitro*-Bedingungen ein Markerverlust in Zellen der hier analysierten Reporterstämme nicht zu beobachten war (mit Ausnahme spezifischer regulatorischer Mutanten), führte offensichtlich eine mögliche geringe Expression der *SAP*-Gene nicht zur Bildung einer ausreichenden Menge an Rekombinase. Eine Marker-Exzision wurde demnach erst dann vermittelt, nachdem der Zielpromotor über einen bestimmten Schwellenwert aktiviert wurde. Das bedeutet gleichzeitig, dass mit diesem Reportersystem keine Aussage über die tatsächliche Stärke der Induktion eines Gens möglich ist. Vielmehr kann nur im Sinne einer „ja/nein“-Antwort nachgewiesen werden, ob bzw. in wieviel Prozent einer analysierten Zellpopulation das Zielgen signifikant aktiviert wurde. Möglicherweise sind Gene des Erregers, die *in vitro* nicht nachweisbar sind, während der Infektion aber stark aktiviert werden, pathogenetisch wichtig. Entsprechend könnte ein hoher Anteil von reisolierten *C. albicans*-Zellen eines Reporterstammes, in dem während des Krankheitsverlaufs eine nachweisbare Induktion des untersuchten Gens stattgefunden hatte, auf eine Bedeutung dieses Gens am Infektionsgeschehen hinweisen. Dabei ist die Gesamtzahl reisolierter Zellen für die Bestimmung des prozentualen Anteils MPA-sensitiver Klone unerheblich, so dass bereits die Wiedergewinnung relativ weniger Zellen aus den infizierten Tieren für eine Analyse ausreichend ist. Als Vorteil ist auch zu bewerten, dass die irreversible Deletion des Markers aus dem Genom einer Zelle auf deren Nachkommen weitervererbt wird und daher durch Analyse der Nachkommenklone auch eine nur vorübergehend erfolgte Geninduktion detektiert werden kann. Dies scheint insbesondere bei einer Genexpressionsanalyse während der Infektion wichtig, da bestimmte Gene des Erregers möglicherweise stadienspezifisch bzw. in Abhängigkeit von Mikroumgebungen in definierten Wirtsnischen nur kurzzeitig induziert werden. Ein irreversibler Markerverlust bedeutet jedoch auch, dass ein Abschalten bzw. wiederholtes Anschalten eines Gens mit diesem Reportersystem nicht nachvollzogen werden kann. Aus diesem Grund wurde während der Tierexperimente eine Überprüfung der Genexpression in den Zellen der Reporterstämme auch zu verschiedenen Zeitpunkten einer Infektion, bzw. unter Umgehung bestimmter Infektionsstadien vorgenommen, um dadurch einen Hinweis auf die Bedeutung der untersuchten Faktoren im Krankheitsverlauf erhalten zu können.

### Überprüfung der Funktionalität des Reportersystems *in vitro*

Da Bedingungen zur Induktion und Repression des *SAP2*-Gens in *C. albicans* bekannt sind, wurde zunächst ein *C. albicans*-Stamm mit einer *SAP2P-caFLP*-Fusion hergestellt. Bei der Überprüfung der Funktionalität des Reportersystems erwies sich die FLP-Rekombinase als zuverlässiger Reporter einer Genexpression, da durch entsprechende Induktionsversuche das für *C. albicans* bekannte *SAP2*-Expressionsmuster bestätigt werden konnte. Nach Kultivierung der Zellen des *SAP2P-caFLP*-Reporterstammes S2FI1A unter nicht-induzierenden Bedingungen (z.B. Voll- oder Minimalmedium) konnte keine FLP-Aktivität beobachtet werden. Nach Anzucht in einem Medium, in dem ein Protein wie Rinderserumalbumin (BSA) die alleinige Stickstoffquelle darstellt, hatte dagegen ein Großteil der Zellen den Marker aufgrund *SAP2P*-induzierter FLP-Aktivität verloren. Durch Southern-Hybridisierung konnte dabei bestätigt werden, dass Genotyp und Phänotyp der MPA-resistenten bzw. sensitiven Kolonien der Indikatorplatten jeweils übereinstimmten. Gleiches wurde auch für den MPA-positiven Kontrollstamm S2UI1 bzw. das MPA-sensitive Derivat S2FI1<sup>S</sup> des Reporterstammes S2FI1A gezeigt. Mit dem Stamm S2UI1, der wie der Reporterstamm S2FI1A den deletierbaren Marker, anstelle der *SAP2P-caFLP*-Fusion jedoch nur das *URA3*-Gen im *SAP2*-Lokus enthält, konnte zudem überprüft werden, dass ein Markerverlust während des Wachstums der Zellen in Abwesenheit der FLP-Rekombinase nicht stattfindet. Die *in vitro*-Induktionsversuche mit dem Reporterstamm S2FI1A bestätigten, dass eine basale *SAP2*-Promotoraktivität für eine nachweisbare *caFLP*-Expression offensichtlich zu gering war, und erst eine signifikante Induktion des Zielgens in einem Rekombinationsereignis resultierte. Dabei korrelierte unter *SAP2*-induzierenden Bedingungen die FLP-Aktivität mit der durch Northern-Analyse ermittelten Transkription des *SAP2*-Gens. Eine Verzögerungszeit von 2-4 h, die nach Überführung von Zellen des Reporterstammes S2FI1A von Vollmedium in Induktionsmedium zwischen Auftreten der *SAP2*-mRNA und dem Entstehen MPA-sensitiver Klone beobachtet wurde, sollte die *in vivo*-Verwendbarkeit des Reporters nicht beeinträchtigen. Wie später jedoch festgestellt wurde, ist ein Vergleich der *SAP2P*-vermittelten FLP-Aktivität mit dem Auftreten der *SAP2*-mRNA nur bedingt aussagekräftig, da die beiden *SAP2*-Allele des *C. albicans*-Stammes CAI4 nicht gleichermaßen reguliert werden. Insgesamt stellte die Diploidie von *C. albicans* für die Etablierung des Reportersystems aber einen großen Vorteil dar, da trotz Insertion einer Reporterengenfusion in ein zu analysierendes Zielgen eines der wildtypischen Allele unversehrt blieb.

Da nach Überführen der Zellen des Stammes S2FI1A in *SAP2*-induzierendes YCB-BSA-Medium der Prozentsatz *MPA*-sensitiver Klone zeitabhängig anstieg, hatten offenbar nicht alle *C. albicans*-Zellen dieser Kultur das *SAP2*-Gen während des Wachstums gleichzeitig induziert. Demnach erfolgte hier eine signifikante Proteasegenexpression in einigen Zellen sehr früh, in anderen dagegen erst viel später, vermutlich in Abhängigkeit ihrer jeweiligen Stickstoffversorgung. Da bei Anzucht des Reporterstammes S2FI1A in YCB-BSA-Medium in keinem dieser Versuche alle Zellen den *MPA<sup>R</sup>*-Marker verloren hatten, wurde zunächst vermutet, dass einige Zellen unter diesen Bedingungen das *SAP2*-Gen überhaupt nicht aktivierten. Nach Entwicklung eines sensitiveren *FLP-FRT*-Reportersystems, sowie durch Verwendung des GFP als Reporter einer Genexpression, konnte hier jedoch eine *SAP2*-Aktivierung in allen Zellen einer entsprechenden Kultur nachgewiesen werden. Demnach war bei Verwendung des *caFLP*-Gens als Reporter die *SAP2P*-induzierte FLP-Aktivität nicht in allen Zellen ausreichend, um in einer nachweisbaren Marker-Exzision zu resultieren. Eine erhöhte Sensitivität des IVET-Systems wurde durch Austausch von vier weiteren Aminosäuren in dem bereits an *C. albicans* angepassten FLP-Enzym erzielt. Die erhöhte Empfindlichkeit dieses verbesserten Reportersystems wurde *in vitro* durch die *SAP2*-Reporterstämme S2FI5B bzw. S2FI7A mit *SAP2P-ecaFLP*-Fusionen bestätigt. Dabei wurde auch beachtet, dass trotz erhöhter Reporter-Aktivität eine Marker-Deletion während des Wachstums der Zellen unter *SAP2*-reprimierenden Bedingungen nicht stattfindet. Letztlich stehen für *C. albicans* nun zwei Reportersysteme mit unterschiedlicher Sensitivität zur Verfügung, die je nach *in vitro*-Basalaktivität des zu untersuchenden Zielgens für eine *in vivo*-Genexpressionsanalyse eingesetzt werden können.

### **Infektionsmodelle und *SAP2*-Expression**

Die Maus-Infektionsmodelle, die für die Überprüfung der *SAP*-Expression Verwendung fanden, können sicherlich nur begrenzt dazu dienen, eine *Candida*-Mykose des Menschen zu simulieren. Sie sollten aber dennoch dazu beitragen, das Verhalten des Erregers in einem komplexen Wirtssystem während der symptomatischen Infektion besser verstehen zu können. In Anlehnung an die vielfältigen Krankheitsbilder einer *Candida*-Mykose bei unterschiedlichem Verlauf wurden in den Tierversuchen verschiedene Infektionsrouten gewählt. Dabei sollte in einem Schleimhautmodell die lokale Erreger-Wirts-Auseinandersetzung nach oraler Infektion untersucht werden, bei der trotz Invasion des Ösophagusepithels keine Dissemination der Erreger zu beobachten war. Demgegenüber



dienten zwei weitere Infektionsmodelle zur Untersuchung der Proteasegenexpression während der systemischen Infektion. Dabei wurde zwischen intraperitonealer und intravenöser Infektion unterschieden. Die i.v.-Infektion sollte auch dazu beitragen, eine Genaktivierung in den Pilzzellen feststellen zu können, die erst im Anschluß an die frühen Infektionsschritte der i.p.-Infektion erfolgte, d.h. nachdem die Erreger die Blutbahn erreichten und disseminierten.

Die ersten *in vivo*-Experimente dienten zur Überprüfung der Verwendbarkeit des Reportersystems im Tierversuch. Durch die Kontrollstämme S2UI1 (MPA-positiv) und S2FI1<sup>S</sup> (MPA-negativ) konnte die Neutralität des *MPA<sup>R</sup>*-Markers bestätigt werden, d.h. dass sich *C. albicans*-Zellen mit bzw. ohne das Resistenzgen nicht nur während der *in vitro*-Kultivierung, sondern auch während der Infektion gleichermaßen verhielten. Nur durch Erfüllung dieser Grundvoraussetzung war es möglich, durch Analyse von Nachkommenklonen Rückschlüsse auf eine zuvor erfolgte Genaktivierung in den *C. albicans*-Zellen des Reporterstammes zu treffen. Mit den Kontrollstämmen konnte auch demonstriert werden, dass MPA-positive bzw. -negative Zellen nach Reisolierung aus befallenem Untersuchungsgewebe auf den Indikatorplatten den erwarteten Kolonie-Phänotyp aufwiesen. Wie bereits *in vitro* beobachtet, bildeten nur in seltenen Fällen auch MPA-positive Zellen des Kontrollstammes S2UI1 kleine Kolonien, die aber nach Überimpfen auf Agarplatten mit hoher MPA-Konzentration eindeutig MPA-resistent waren. Dieser Prozentsatz falsch-positiver Klone einer analysierten Zellpopulation (max. 2.5%) schien aber angesichts des einfachen Detektionssystems vernachlässigbar.

Durch Analyse der organspezifischen *SAP2*-Expression in den *C. albicans*-Zellen im zeitlichen Verlauf einer systemischen Infektion konnte gezeigt werden, dass eine starke Aktivierung dieses Gens erst im Spätstadium der Infektion einsetzte, einhergehend mit einer Zustandsverschlechterung der Tiere und einer massiven Vermehrung der Erreger. Dabei ist aber schwer zu beurteilen, ob die *SAP2*-Expression in Pilzzellen der befallenen Organe aus pathogenetischer Sicht eher Ursache oder Folge der Gewebszerstörung darstellte. Da innerhalb der ersten Infektionsschritte keine signifikante *SAP2*-Aktivierung in den Zellen des Reporterstammes nachweisbar war, konnte gefolgert werden, dass die *SAP2*-Protease offenbar keinen relevanten Beitrag zur initialen Besiedlung und Invasion von Wirtsgeweben bzw. -organen in diesen Versuchen lieferte. Diese Annahme wurde auch dadurch unterstützt, dass während der zehntägigen Infektion des Ösophagusepithels nach oraler Inokulation der Zellen eine *SAP2*-Aktivierung nicht festzustellen war. Demnach sollten bei der Infektion der Ösophagusschleimhaut und während der frühen Phasen des Infektionsverlaufs nach i.p.-

Infektion entsprechend andere Isoenzyme der Proteasefamilie von Bedeutung sein. Da nur eine Genaktivierung über einen entsprechenden Schwellenwert in einer nachweisbaren FLP-Aktivität in den Zellen des Reporterstammes resultierte, konnte eine geringe *SAP2*-Expression während dieser Infektionsschritte jedoch nicht ausgeschlossen werden. Ebenso ist auch entgegen dem hier verwendeten Oralmodell eine signifikante *SAP2*-Expression in anderen Schleimhautmodellen durchaus möglich, da *C. albicans* in unterschiedlichen Wirtsnischen lokal begrenzte Schleimhautinfektionen hervorrufen kann. Beispielsweise konnten in einem Vaginitis-Rattenmodell nach Reisolierung einer ausreichend großen Anzahl *C. albicans*-Keime aus der Vaginalflüssigkeit infizierter Versuchstiere *SAP1* und *SAP2* als vorwiegend exprimierte *SAP*-Gene durch mRNA-Bestimmung mittels Northern-Analyse nachgewiesen werden (De Bernardis *et al.*, 1995). Jedoch muß auch berücksichtigt werden, dass Wechselbeziehungen zwischen Wirt und Erreger in unterschiedlichen Wirtsnischen nicht miteinander vergleichbar sind, und dass auch die jeweils vorherrschenden Milieubedingungen wie z.B. der pH-Wert die *SAP*-Expression beeinflussen können. Da *SAP2* während der systemischen Infektion der Maus offensichtlich insgesamt an der Pathogenese beteiligt war, stellte sich die interessante Frage, welche regulatorischen Mechanismen bzw. genetischen Strukturen diese wirtsabhängige Genexpression innerhalb der *C. albicans*-Zellen beeinflussen.

## **5.2 Regulation des *C. albicans* *SAP2*-Gens: *in vitro* und *in vivo***

Bei der Analyse der *in vitro*- bzw. *in vivo*-Regulation des *C. albicans*-*SAP2*-Gens konnte gezeigt werden, dass für eine *SAP2*-Aktivierbarkeit bestimmte DNA-Elemente innerhalb der Promotorregion dieses Gens von entscheidender Bedeutung sind. Darüberhinaus wurde festgestellt, dass die beiden wildtypischen Allele des *SAP2*-Gens in dem hier untersuchten *C. albicans*-Stamm differentiell reguliert werden.

### **Einfluß von DNA-Repeats auf die Aktivierbarkeit des *SAP2*-Promotors**

Während der *in vivo*-Experimente wurden zwei genetisch gleichermaßen konstruierte *C. albicans*-*SAP2*-Reporterstämme auf ihre FLP-Aktivität während der systemischen Infektion überprüft. Anders als unter Laborbedingungen wurde dabei überraschenderweise beobachtet, dass in Zellen des Stammes S2FI1D im Gegensatz zu S2FI1A keine signifikante Induktion des Reporters stattgefunden hatte. Es wurde vermutet, dass sich die beiden Stämme innerhalb der *SAP2*-Promotorregion unterschieden, die für die Expression des *caFLP*-Gens, in

beiden Stämmen in Allel *SAP2-1* integriert, verantwortlich ist. Für die Konstruktion der *SAP2P-caFLP*-Reportergekassette des Plasmids pSFL26 wurde aus praktischen Gründen das *SAP2P*-Fragment einer bereits hergestellten *SAP2P-GFP*-Fusion verwendet (Morschhäuser *et al.*, 1998). Da diese Fusion jedoch den *SAP2*-Promotor eines anderen *C. albicans*-Stammes (1161) enthielt, waren durchaus DNA-Sequenzunterschiede gegenüber dem in dieser Arbeit verwendeten *C. albicans*-Stamm SC5314 bzw. seiner Derivate denkbar. Durch Sequenzierung wurde beobachtet, dass der *C. albicans-SAP2*-Promotor zwei auffällige Regionen mit pentameren Wiederholungssequenzen, sogenannten Repeats enthielt (R1 bzw. R2). Bemerkenswerterweise unterschied sich die Kombination der Repeat-Kopienzahl im Stamm CAI4 auf Allelebene, da Allel *SAP2-1* vier R1 und sechs R2 Repeats aufwies, Allel *SAP2-2* hingegen fünf R1 und fünf R2 Repeats. Die gleiche Repeatkombination wie in Allel *SAP2-2* des Stammes CAI4 wurde auch im *SAP2P*-Fragment des Stammes 1161 vorgefunden. Da die *SAP2P-caFLP*-Fusion aus Plasmid pSFL26 mit Repeatstruktur (5/5) in den Stämmen S2FI1A und S2FI1D in Allel *SAP2-1* (4/6) integrierte, konnten während der homologen Rekombination verschiedene Repeatkombinationen erzeugt werden. Während in dem Reporterstamm S2FI1A der ursprüngliche Promotor des Allels *SAP2-1* (4/6) erhalten blieb, kontrollierte in Stamm S2FI1D ein künstlicher Hybrid-*SAP2*-Promotor mit der Repeatstruktur (4/5) die Expression des *caFLP*-Gens. Demnach erfolgte das crossing-over während der Insertion der DNA-Kassette in Stamm S2FI1D offensichtlich in einem Bereich zwischen den beiden Repeatregionen des *SAP2*-Promotors in Allel *SAP2-1*, was in einer unnatürlichen Repeatverteilung resultierte. Es wurde vermutet, dass die *SAP2*-Promotormutation in Stamm S2FI1D, d.h. der Verlust einer Kopie von R2 für die verminderte *in vivo*-FLP-Aktivität verantwortlich war, möglicherweise durch Einfluß auf Regulatoren, die für diese Aktivierung erforderlich sind. Dabei wurde vermutet, dass nicht die Repeats selbst Bindungsstellen für mutmaßliche Transkriptionsfaktoren darstellten, sondern dass die Deletion einer Wiederholungssequenz durch Veränderung der DNA-Struktur einen regulatorisch wichtigen Abstand stromaufwärts bzw. -abwärts positionierter Regulatorbindungsstellen veränderte. Auswirkungen auf die Aktivierbarkeit des *SAP2*-Promotors durch Veränderung der Repeatkopienzahl wurden daher experimentell durch *C. albicans*-Reporterstämme untersucht, in denen verschiedene *SAP2*-Promotorvarianten das *caFLP*-Gen kontrollierten. Dadurch konnte der Einfluß der Repeatstruktur auf die Aktivierbarkeit des *SAP2*-Promotors unter Laborbedingungen und während der Infektion analysiert werden. Unter *in vitro*-Bedingungen wurden die verschiedenen *SAP2*-Promotorvarianten ähnlich gut induziert. Dagegen zeigte

sich, dass die wildtypischen Promotoren beider *SAP2*-Allele, d.h.  $P_{SAP2-1}$  mit (4/6)- und  $P_{SAP2-2}$  mit (5/5)-Repeatkombination, während der systemischen Infektion gut induzierbar waren, im Gegensatz zu den *SAP2*-Promotoren mit den Kombinationen (4/5) bzw. (5/6). Der *SAP2*-Promotor mit (4/4)-Repeatstruktur wurde während der Infektion mittelmäßig induziert. Unterschiede in der Pathogenese nach Infektion mit den verschiedenen Reporterstämmen, die gleichzeitig heterozygote *SAP2*-Mutanten darstellten, konnten dabei nicht beobachtet werden. Ein Ausbleiben der wirtsspezifischen Aktivierbarkeit wurde demnach nur bei *SAP2*-Promotoren mit ungerader Repeatzahl beobachtet. Die beiden wildtypischen *SAP2*-Promotoren unterschieden sich zwar ebenfalls in der Kombination der R1 und R2 Repeats, nicht aber in ihrer Gesamtkopienzahl. In beiden Fällen wären Abstand und symmetrische Ausrichtung möglicherweise ober- und unterhalb der Repeatregionen bindender Aktivatoren unverändert. In den *SAP2P-caFLP*-Fusionen der Stämme S2FI1D und S2FI4A/B mit ungerader Repeatkopienzahl könnten dagegen Abstand und räumliche Ausrichtung möglicher Bindungspartner verändert sein, da sowohl Deletion als auch Hinzufügen eines Repeats entsprechende Bindungssequenzen um fünf Basenpaare, d.h. um ca. eine halbe Helix-Umdrehung innerhalb des Promotor-DNA-Stranges verschieben würden. Durch den Stamm S2FI2, in dem gegenüber S2FI1D noch ein weiteres R2 Repeat deletiert wurde, sollte überprüft werden, ob allein durch Wiederherstellen der ursprünglichen räumlichen Ausrichtung stromaufwärts bzw. -abwärts der Repeatregionen platzierter putativer Regulatorbindungsstellen eine *in vivo*-Aktivierung des *SAP2*-Promotors möglich ist. Obwohl die lineare DNA-Sequenz in diesem Promotor gegenüber den wildtypischen um zehn Basenpaare verringert wurde, konnte eine signifikante Aktivierung dieses Promotors während der Infektion beobachtet werden; zwar in vergleichsweise weniger Zellen als bei wildtypischer Repeatkombination, aber dennoch in einem größeren Anteil als nach Infektion mit Zellen, die Promotoren ungerader Gesamtrepeatzahl enthielten.

Nach einem mehrfach untersuchten Modell könnten bei der Transkription spezifischer Gene Aktivator-Proteine, die in einer Distanz von mehreren hundert Basenpaaren oberhalb des Transkriptions-Startpunktes gebunden haben, durch eine Schleifenbildung des dazwischenliegenden DNA-Bereiches einen direkten Kontakt mit ihren Zielstrukturen des Promotor-Kernelementes einschließlich der TATA-Box herstellen (Rippe *et al.*, 1995; Ptashne and Gann, 1997). Dabei könnten einerseits Abstand und räumliche Ausrichtung der jeweiligen Aktivator-Bindungsstellen innerhalb der DNA-Helix, andererseits aber auch die Biegefähigkeit des DNA-Stranges von Bedeutung sein. Ähnliche Überlegungen zum

Einfluß entsprechend intrinsischer Eigenschaften des DNA-Stranges in Promotorsegmenten auf die Transkription von Genen wurden bereits untersucht, doch ergaben verschiedene experimentelle Promotoraktivitätsanalysen kontroverse Ergebnisse (Ross *et al.*, 2000). Bei der Regulation des Arabinoseoperons in *Escherichia coli* konnten beispielsweise entsprechende Einflüsse beobachtet werden (Lee and Schleif, 1989). Für die Blockierung der Transkription der Strukturgene *araBAD* dieses Operons aufgrund einer DNA-Schleife ist die Bindung des Regulators AraC an zwei durch einen Abstand von 211 Basenpaaren getrennte Operatorstellen (*araI* und *araO<sub>2</sub>*) entscheidend. Für die präzise Ausrichtung der Schleife erscheint wichtig, dass sich die beiden AraC-Bindungsstellen räumlich auf der korrekten Seite der DNA-Doppelhelix befinden. Eine Vergrößerung ihres Abstandes durch Insertion von 5 Basenpaaren beeinflusste die Reprimierbarkeit des Promotors der *BAD*-Gene dramatisch. Durch experimentelle Veränderung des linearen Abstands der beiden Bindungsstellen konnte darüberhinaus demonstriert werden, dass die Aktivität dieses Promotors mit einer Periodizität oszillierte, die der Länge einer helikalen Windung der DNA entspricht (Lee and Schleif, 1989). Auch die Aktivität eines menschlichen T-Zell-Rezeptorgen-enhancers erforderte eine präzise, von der DNA-Helix abhängige Ausrichtung individueller Bindungsstellen für entsprechende Transkriptionsfaktoren (Giese *et al.*, 1995). Ähnliche Wechselwirkungen wurden auch bei der Transkriptions-Initiation früher Gene des SV40 (simian virus)-Virus beobachtet (Takahashi *et al.*, 1986). In Versuchen mit dem Aktivator-Protein GAL4, der in *Saccharomyces cerevisiae* die Transkription von Genen des Galaktosestoffwechsels anregt, konnte dagegen der Ausrichtung von entsprechenden Bindungsstellen innerhalb eines Promotors keine genregulatorische Bedeutung zugeschrieben werden. Nachdem eine GAL4-Bindungsstelle künstlich an verschiedenen Stellen oberhalb der TATA-Box des *GAL1* (Galaktokinase)-Gens inseriert wurde, konnte keine veränderte Genexpression beobachtet werden (Ruden *et al.*, 1988). Bei der Positionierung der Aktivator-Bindungsstellen in den mutierten Promotoren wurde sogar beachtet, dass bezogen auf den Transkriptionsstartpunkt GAL4 in den unterschiedlichen Konstrukten theoretisch an räumlich gegenüberliegenden Seiten der DNA-Helix bindet. Dagegen wurde die Transkription durch einfache Verkürzung des linearen Abstandes zwischen Aktivatorbindungsstellen und Transskriptionsstartpunkt stimuliert (Ross *et al.*, 2000). Eine einfache Vorhersage regulatorischer Einflüsse auf die Transkription von Genen, bedingt durch physikalische Eigenschaften eines DNA-Moleküls, scheint demnach nicht generell möglich zu sein, in definierten Genen jedoch eine besondere Rolle zu spielen. Eine Beteiligung von Repeatsequenzen an solchen Regulationsmechanismen

ist durchaus denkbar. Repeatsequenzen unterschiedlichster Größe sind in vielen Organismen bekannt und treten innerhalb eines definierten Genoms einzeln verteilt oder in Wiederholungen auf. In diesem Zusammenhang wurde von Beispielen berichtet, die den jeweils untersuchten Wiederholungssequenzen genregulatorische Funktionen zuschreiben konnten. Bei humanpathogenen Bakterien wie z.B. *Neisseria meningitidis*, *N. gonorrhoeae*, *Haemophilus influenzae* u.a. sind beispielsweise Mechanismen der Phasen- und Antigenvariation bekannt, bei denen die An- bzw. Abwesenheit bestimmter Oberflächenstrukturen durch eine Insertion oder Deletion von Repeatsequenzen in entsprechenden Genen verursacht wird (Van Belkum *et al.*, 1998). Repetitive DNA wurde auch in Eukaryonten nachgewiesen, darunter in fakultativ humanpathogenen Pilzen wie z.B. *Aspergillus* spp., *Cryptococcus* spp. und *Candida* spp. (Van Belkum *et al.*, 1998). Ein genregulatorischer Einfluß von DNA-Repeats wie er bei Bakterien beobachtet wurde, konnte hier jedoch nicht gezeigt werden. Unklar ist auch, ob in einem diploiden Mikroorganismus wie *C. albicans* ähnlich wie in haploiden Organismen entsprechende „switch“-Effekte selektiv begünstigt werden würden. Dennoch könnten Repeatveränderungen mit Einfluß auf die Expression bestimmter Gene möglicherweise die Anpassungsfähigkeit der Pilzzellen an ihren Wirt in gewissem Maße verändern. Da *in vitro*- und wirtsspezifische *SAP2*-Aktivierung in *C. albicans* unterschiedlich reguliert werden könnten, besteht die Möglichkeit, dass unter diesen grundlegend verschiedenen Bedingungen auch jeweils andere Transkriptionsfaktoren an der Expression dieses Gens beteiligt sind. Dies könnte erklären, dass sich die Veränderungen im Repeatbereich im *SAP2*-Promotor nur *in vivo* auf dessen Aktivierbarkeit auswirkten.

Bislang sind keine Transkriptionsfaktoren von *C. albicans* bekannt, die an der Regulation der sekretorischen Aspartylproteasen direkt beteiligt sind. Durch Sequenzanalyse konnten unterschiedlichste putative Regulator-Bindungsstellen im *C. albicans*-*SAP2*-Promotor identifiziert werden. Beispielsweise finden sich mehrere theoretische Erkennungssequenzen für sogenannte GATA-Faktoren, DNA-bindende Zinkfingerproteine, die in Pilzen, Tieren und Pflanzen an vielen verschiedenen Regulationsmechanismen beteiligt sind (Scazzocchio, 2000). Als globale Regulatoren spielen z.B. die GATA-Faktoren AREA bzw. NIT2 in den Fadenpilzen *Aspergillus nidulans* bzw. *Neurospora crassa* eine wichtige Rolle zur Kontrolle von Enzymen, die am Stickstoffmetabolismus beteiligt sind (Marzluf, 1997). Interessant erscheinen im *SAP2*-Promotor von *C. albicans* auch putative Bindungsstellen für den Transkriptionsfaktor GCN4, der in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* neben der Expression

von Genen des Aminosäurestoffwechsels offensichtlich auch zahlreiche andere Gene regulatorisch beeinflusst (Natarajan *et al.*, 2001). Eine Bedeutung solcher theoretischen Regulator-Bindungsstellen innerhalb des *SAP2*-Promotors für die Expression dieses Proteasegens kann allerdings nur aufgrund ihres Vorkommens nicht angenommen werden. Dennoch wäre eine Untersuchung ihres möglichen Einflusses auf die *SAP2*-Regulation im Zusammenhang mit den identifizierten Repeatsequenzen des *SAP2*-Promotors interessant.

### **Differentielle Regulation der beiden *SAP2*-Allele**

Bei der Herstellung der *C. albicans*-*SAP2*-Reporterstämme fielen Transformanten auf, die nach Insertion eines Reportergens in den *SAP2*-Lokus während der Kultivierung im *SAP2*-induzierenden YCB-BSA-Medium nur sehr schwach wuchsen. Bemerkenswerterweise konnte dabei ein Zusammenhang zwischen Wachstumsdefekt dieser heterozygoten *SAP2*-Mutanten und einer allelspezifischen Insertion des Reportergens festgestellt werden. Transformanten des Stammes CAI4 bzw. CFI1 mit Integration, d.h. gleichzeitig auch Inaktivierung von Allel *SAP2-1*, z.B. S2FI1A und S2FI1D, konnten während der Kultivierung in YCB-BSA-Medium im Wachstum nicht vom Ausgangsstamm SC5314 unterschieden werden. Dagegen wuchsen Stämme mit inaktiviertem Allel *SAP2-2*, z.B. S2FI3B und S2FI4A in diesem Medium über Nacht nur sehr schwach. Durch Überprüfung des Überstandes entsprechender YCB-BSA-Kulturen im Proteingel wurde beobachtet, dass ein Abbau des Proteins in Kulturen der Stämme mit deletiertem *SAP2-2*-Allel nicht stattgefunden hat. Bei gleichzeitig starkem Wachstum wurde dagegen das BSA in den Kulturen heterozygoter Mutanten mit inaktiviertem Allel *SAP2-1* vollständig abgebaut. Wie bei dem Ausgangsstamm SC5314 konnte hier im Proteingel auch eine Bande von der typischen Größe der sekretorischen *SAP2*-Protease identifiziert werden (Hube *et al.*, 1994; White and Agabian, 1995). Der beobachtete Unterschied in der Proteolyseaktivität der verschiedenen heterozygoten *SAP2*-Mutanten während der Kultivierung in YCB-BSA konnte nur dadurch erklärt werden, dass Allel *SAP2-1* allein entweder nicht ausreichend aktiviert wurde, oder aber für kein proteolytisch aktives, sekretiertes Enzym codierte. Auf eine prinzipiell mögliche Aktivierbarkeit des Allels *SAP2-1* wurde bereits durch den *SAP2P-caFLP*-Reporterstamm S2FI1A hingewiesen, da  $P_{SAP2-1}$  während des Wachstums dieses Stammes in YCB-BSA deutlich induziert wurde. Jedoch enthält dieser Stamm neben der Fusion in Allel *SAP2-1* ein intaktes Allel *SAP2-2*. Daher bestand die Möglichkeit, dass eine Induktion des Allels *SAP2-1* nur bei gleichzeitig intaktem Allel *SAP2-2* erfolgte. Demnach konnte Allel *SAP2-1* möglicherweise von *SAP2-2*

regulatorisch abhängig sein, aber nicht umgekehrt, da die Anwesenheit von Allel *SAP2-2* allein für ein starkes Wachstum der Stämme mit inaktiviertem *SAP2-1*-Allel in YCB-BSA bei hoher proteolytischer Aktivität ausreichend war. Bevor diese Hypothese näher untersucht wurde, sollte zunächst geprüft werden, ob die Gene beider *SAP2*-Allele des Stammes CAI4 für aktive, sekretorische Proteasen codieren. Zu diesem Zweck wurden die jeweils codierenden Regionen beider Allele unter Kontrolle des konstitutiven *C. albicans*-Aktin-Promotors im Aktin-Lokus einer homozygoten *SAP2*-Mutante exprimiert. Mit den resultierenden Stämmen SAP2K1 bzw. SAP2K2 konnte nachgewiesen werden, dass die Expression beider *SAP2*-Allele zur Bildung sekretierter und funktioneller Proteasen führte. Somit konnte die differentielle Allelregulation durch eine unterschiedliche Aktivierbarkeit der beiden *SAP2*-Allele bedingt sein. Ob eine Induktion von Allel *SAP2-1* tatsächlich nur in Anwesenheit eines intakten *SAP2-2*-Allels möglich ist, wurde durch den Reporterstamm S2FI6A überprüft. Diese homozygote *SAP2*-Mutante enthält in Allel *SAP2-1* die *SAP2P-caFLP*-Fusion, besitzt jedoch kein intaktes *SAP2-2*-Allel. Induktionsversuche demonstrierten, dass eine signifikante *SAP2P*-Aktivierung in Allel *SAP2-1* des Stammes S2FI6A innerhalb 66 h Wachstum in YCB-BSA nicht stattfand, und auch nach 90 h Wachstum nur ca. 10% der Zellen MPA-sensitiv waren. Eine signifikante Induktion des Allels *SAP2-1* in Stamm CAI4 war demnach unter diesen Bedingungen ohne intakt erhaltenes Allel *SAP2-2* nicht möglich. Diese Abhängigkeit wurde auch während der systemischen Infektion deutlich, da durchschnittlich nur 7% der Zellen des Stammes S2FI6A den Marker zu einem Zeitpunkt verloren hatten, als bereits 33% der Zellen des Stammes S2FI1A mit intaktem Allel *SAP2-2* MPA-sensitiv waren. Jedoch muß berücksichtigt werden, dass die Zellen des Stammes S2FI6A während der Infektion möglicherweise Wirtsnischen, in denen normalerweise *SAP2* spezifisch aktiviert wird, aufgrund der *SAP2*-Mutation nicht erreichen konnten. Dieser Stamm rief zwar wie die übrigen Reporterstämme eine systemische Infektion der Maus mit starkem Nierenbefall hervor, jedoch wurden hier in keinem der Versuche ähnlich hohe Keimzahlen nachgewiesen wie nach Infektion mit dem Wildtyp oder den heterozygoten *SAP2*-Mutanten. Im Zusammenhang mit der differentiellen Allelregulation wurde vermutet, dass der wildtypische Promotor aus Allel *SAP2-2* leichter aktivierbar ist als der in Allel *SAP2-1*. Diese Annahme wurde *in vitro* insbesondere durch die Verwendung des GFP als Reporter einer Genexpression bestätigt. Dazu dienten Reporterstämme, in denen bei inaktiviertem Allel *SAP2-1* jeweils  $P_{SAP2-1}$  bzw.  $P_{SAP2-2}$  die Expression des *GFP*-Gens in Allel *SAP2-2* kontrollierte. Da unter gleichen Bedingungen in Zellen des Stammes CAG551D1 mit  $P_{SAP2-1}$ -



*GFP*-Fusion eine geringere Fluoreszenz nachgewiesen wurde als in Zellen des Stammes CAG551D4 mit einer  $P_{SAP2-2}$ -*GFP*-Fusion, war möglicherweise  $P_{SAP2-1}$  an der schlechteren Aktivierbarkeit des Allels *SAP2-1* beteiligt. Es kann vermutet werden, dass die jeweilige Repeatstruktur, (4/6) in  $P_{SAP2-1}$  gegenüber (5/5) in  $P_{SAP2-2}$  einen Einfluß auf die unterschiedliche Aktivierbarkeit der beiden Promotoren ausübt. Demnach wären zwar die *SAP2*-Promotoren des Stammes CAI4 beider Repeatstrukturen prinzipiell gut aktivierbar, jedoch würde eine (5/5)-Repeatkombination im *SAP2*-Promotorbereich eine leichtere Induktion dieses Gens ermöglichen. Durch diese Erkenntnisse konnte für die *in vitro*-*SAP2*-Regulation im *C. albicans*-Stamm CAI4 insgesamt gefolgert werden, dass in Zellen, in denen nur Allel *SAP2-2* intakt ist, offensichtlich eine ausreichende Basalaktivität des *SAP2-2*-Promotors für einen initialen BSA-Abbau während des Wachstums in YCB-BSA-Medium verantwortlich war. In einer Art Rückkopplung konnten dann BSA-Abbauprodukte zusammen mit der sekretierten Protease deren Expression signifikant stimulieren. Da eine ausreichend starke basale Expression des Allels *SAP2-1* des Stammes CAI4 scheinbar nicht vorlag, wuchsen heterozygote *SAP2*-Mutanten mit intaktem *SAP2-1*-Allel in YCB-BSA über Nacht nur schwach. Dies korreliert auch mit der Beobachtung, dass eine Induktion von  $P_{SAP2-2}$  in Allel *SAP2-2* des Stammes S2FI3B in diesem Medium nur zeitlich stark verzögert erfolgte. Eine Aktivierung konnte hier jedoch durch Zusatz von Hefeextrakt oder Proteolysefiltrat im Medium beschleunigt werden. Dieses Ergebnis stimmt mit Beobachtungen anderer Autoren überein, die zeigen konnten, dass zwar intakte Proteine als alleinige Stickstoffquelle im Nährsubstrat eine Proteaseinduktion in *C. albicans* hervorrufen können, dass aber eine volle Aktivierung von der Anwesenheit von Protein-Abbauprodukten in Form von Peptiden abhängig ist (Lerner and Goldman, 1993). Aktivierung des *SAP2*-Gens durch einen Mechanismus einer positiven Rückkopplung wurde bereits von Hube *et al.* (1994) postuliert. Aufgrund von Experimenten mit einem spezifischen Protease-Inhibitor (Pepstatin A) wurde die Bedeutung einer basalen Proteasegenexpression für die *SAP2*-Aktivierung herausgestellt, da der Kulturüberstand einer proteolytisch aktiven *C. albicans*-Kultur nach Pepstatin A-Behandlung nicht mehr eine *SAP2*-Induktion in *SAP2*-reprimierten *C. albicans*-Zellen auslösen konnte. Demnach war für eine *SAP2*-Aktivierung offensichtlich nicht nur die Anwesenheit von Peptiden, sondern auch die einer aktiven Protease notwendig. Die Beobachtung in der vorliegenden Arbeit, dass eine starke *SAP2*-Aktivierung in Zellen von Reporterstämmen ohne intaktes *SAP2*-Gen nur in YCB-BSA-Medium erfolgte, das mit

proteolytisch aktivem Kulturüberstand supplementiert wurde, verdeutlicht die Bedeutung aktiver Protease für die Induktion des *SAP2*-Gens unter *in vitro*-Bedingungen.

Die beobachtete differentielle *in vitro*-Expression der beiden *SAP2*-Allele im *C. albicans*-Stamm CAI4 ließ auch eine unterschiedliche wirtsabhängige Regulation dieser beiden Allele vermuten, d.h. dass Allel *SAP2-2* während der experimentellen Infektion möglicherweise früher und auch in einem größeren Anteil der Zellen aktiviert wird als Allel *SAP2-1*. Diese Annahme wurde mit Hilfe von Reporterstämmen bestätigt, die Fusionen der jeweiligen *SAP2*-Promotoren und dem *ecaFLP*-Gen enthielten. Es wurde deutlich, dass in Zellen des Stammes S2FI7A Allel *SAP2-2* im Verlauf einer systemischen Infektion vergleichsweise eher aktiviert wurde als Allel *SAP2-1* in Zellen des Stammes S2FI5B. Auch wurde zu allen Untersuchungszeitpunkten in einem jeweils größeren Anteil der reisolierten Zellen eine Aktivierung des Allels *SAP2-2* nachgewiesen als von Allel *SAP2-1*. Demnach wurde auch während der Infektion Allel *SAP2-2* offensichtlich leichter aktiviert als Allel *SAP2-1*. Dabei fiel auch auf, dass die Induktion von Allel *SAP2-2* im Gegensatz zu *SAP2-1* nicht mit einer hohen Keimzahl bzw. massiven Schädigung von Wirtsgewebe korrelierte. Ein Zusammenhang zwischen differentieller Allelregulation und *SAP2*-Promotor wurde auch hier beobachtet, da das *ecaFLP*-Gen in Zellen des Reporterstammes S2FI5G, das in Allel *SAP2-2* von  $P_{SAP2-1}$  kontrolliert wird, im Infektionsverlauf vergleichsweise wie in Zellen des Stammes S2FI5B induziert wurde. Trotz erhöhter Sensitivität des *ecaFLP*-Enzyms wurden mit dem Stamm S2FI5B während der Infektion ähnliche FLP-Aktivitäten ermittelt wie mit Stamm S2FI1A, der das *caFLP*-Gen enthält. Diese Beobachtung bestätigt, dass nicht die geringere Sensitivität des Reporters in Zellen des Stammes S2FI1A Ursache für einen ausbleibenden Nachweis einer *SAP2-1*-Aktivierung in den frühen Infektionsstadien der systemischen Infektion darstellte. Die Beobachtung, dass nur ein Teil der analysierten Zellpopulation das untersuchte Zielgen in bestimmten Infektionsstadien deutlich induziert hatte, scheint generell durchaus möglich. Die Stärke der Expression eines bestimmten Gens könnte innerhalb der Population heterogen und daher nur in einem gewissen Anteil nachweisbar sein. Auch könnte ein Genexpressionsmuster im Zusammenhang mit der jeweiligen Wachstumsphase der Zelle stehen, d.h. z.B. Zellen unterschiedlicher Morphologieform könnten entsprechend auch unterschiedliche Gene exprimiert haben. Zuletzt muß berücksichtigt werden, dass sich bei der Organentnahme zur Reisolierung der Pilze möglicherweise die Erreger in sehr verschiedenen Mikronischen aufhielten und dementsprechend auch spezifische Virulenzgene exprimiert hatten.

Insgesamt zeigt dieses Beispiel, dass die Allele eines definierten Virulenzgens von *C. albicans* möglicherweise generell differentiell während der Infektion reguliert werden könnten und darüberhinaus auch miteinander kommunizieren. Unklar bleibt, ob die beobachtete schlechtere Induzierbarkeit des Allels *SAP2-1* des *C. albicans*-Stammes CAI4 eine Fehlfunktion darstellt, die nur aufgrund der Diploidie des Genoms den Erreger in seiner Virulenz nicht benachteiligt und daher weitervererbt wurde, oder aber während der Erreger-Wirtsbeziehung einen selektiven Vorteil für diesen *C. albicans*-Stamm bedeuten kann. Demzufolge könnte die differentielle Allelregulation zu einer regulatorischen Flexibilität des Erregers beitragen und dadurch die Variabilität der vielfältigen Anpassungsmechanismen dieses Mikroorganismus an seinen Wirt zusätzlich erhöhen. Das Vorkommen von Allelunterschieden in *C. albicans* ist bereits dadurch aufgefallen, dass sich unabhängig spezifisch hergestellte heterozygote Mutanten unterschiedlich virulent verhielten (Rieg *et al.*, 1999). Dabei schien unklar, ob mögliche Gendosiseffekte auf differentieller Expression der jeweiligen Allele oder der Funktionalität ihrer Produkte beruhte (Navarro-Garcia *et al.*, 2001). Alleldiversität wurde auch bei der gezielten Inaktivierung eines Gens durch homologe Rekombination beobachtet und war hier möglicherweise Ursache dafür, dass eine genspezifische Mutagenesekassette ein bestimmtes Allel bei der Integration bevorzugt. Wie am Beispiel des *PHR1*-Gens von *C. albicans* gezeigt, sind dafür auch DNA-Sequenzunterschiede zwischen den Allelen verantwortlich, die oft nur 1-2% betragen, sich aber auf die flankierenden Regionen eines Gens konzentrieren (Yesland and Fonzi, 2000). Dabei stellt sich auch die interessante Frage, ob die beobachtete allelspezifische homologe Integration in *C. albicans* darauf hinweist, dass auch natürlicherweise eine interchromosomale Rekombination ungleicher Allele hier nur selten eintritt. Dies würde bedeuten, dass sich Mutationen ansammeln könnten und dadurch zur Genomdiversität beitragen würden.

### **5.3 Regulation der Gene *SAP1-SAP6* während der Infektion**

Unter Verwendung der etablierten Maus-Infektionsmodelle konnte durch die IVET-Strategie eine differentielle Expression individueller Mitglieder der Proteasegenfamilie während der systemischen Infektion und auch der lokal begrenzten Infektion des Ösophagusepithels nachgewiesen werden. Dadurch wurde bestätigt, dass die einzelnen *C. albicans*-Proteasegene während der Infektion in der Tat unterschiedlich reguliert wurden und ihre Produkte möglicherweise individuelle pathogenetisch wichtige Beiträge zum Infektionsgeschehen

leisteten. Für eine Analyse der Expression der Proteasegene *SAP1-SAP6* wurden wie zuvor zur Untersuchung des *SAP2*-Gens *C. albicans*-Reporterstämme hergestellt, die jeweils in einem der beiden zugehörigen *SAP*-Allele eine Fusion aus *SAP*-Promotor und dem *ecaFLP*-Gen enthielten. Dabei schien die spezifische Analyse der Expression der äußerst homologen Isogene *SAP4*, *SAP5* bzw. *SAP6* besonders interessant, da diese Untergruppe von Proteasegenen allgemein als hyphenspezifisch bezeichnet wird, und myzelartiges Wachstum von *C. albicans* pathogenetisch von großer Bedeutung zu sein scheint.

Aufgrund der Erkenntnisse über die *in vivo*-*SAP2*-Expression wurde vermutet, dass *SAP2* für die Schleimhautinfektion und auch für die ersten Infektionsschritte im Krankheitsverlauf einer systemischen Infektion während Besiedlung und Gewebeinvasion offensichtlich keine essentielle Bedeutung hatte. Dagegen war diese sekretorische Protease aber insbesondere im Spätstadium der systemischen Infektion für die Vermehrung der Pilzzellen in den infizierten Organen wichtig. Daher wurde angenommen, dass während der Schleimhautinfektion sowie der initialen Schritte der systemisch verlaufenden Mykose entsprechend andere *SAPs* dieser Enzymfamilie zur Pathogenese beitragen. Diese Annahme bestätigend konnte gezeigt werden, dass die Proteasegene *SAP5* und *SAP6* während der Schleimhautinvasion nach oraler Infektion in einem Großteil der Pilzzellen signifikant induziert wurden und daher vermutlich für eine Infektion dieser Wirtsnische von großer Bedeutung sind. Während der frühen Infektionsschritte nach Infektion der Bauchhöhle, einer Wirtsnische, die sich von der Ösophagusschleimhaut unterscheidet, wurde *SAP5*, aber nicht *SAP6* in den *C. albicans*-Zellen deutlich induziert, und zwar bereits 30 min nach Infektion. Zu diesem Zeitpunkt wurden nur Blastokonidien, aber keine Keimschläuche im Untersuchungsmaterial mikroskopisch identifiziert. Myzelartiges Wachstum wurde in diesem Modell 4 h nach Infektion beobachtet, als die Pilzzellen an der Leber adhärirten und zu einem Großteil *SAP5* exprimiert hatten. Demgegenüber wurde eine Aktivierung des *SAP6*-Gens nur dann nachgewiesen, als auch *C. albicans*-Hyphen beobachtet werden konnten. Eine Induktion des *SAP4*-Gens wurde ebenfalls nachgewiesen, jedoch verglichen mit der Aktivierung der Gene *SAP5* und *SAP6* in einem weitaus geringeren Anteil der jeweils reisolierten Zellen.

Bei der Analyse der Proteasegenaktivierung nach intravenöser Infektion fiel ein bemerkenswerter Zusammenhang zwischen Infektionsdosis, -verlauf und *SAP*-Genexpression auf, der auch Hinweise auf eine mögliche Bedeutung der verschiedenen Isoenzyme am Infektionsgeschehen lieferte. Ein Inokulum von  $4 \times 10^5$  Zellen resultierte nach hämatogener Aussaat der Zellen in einer starken Vermehrung der Erreger bei massivem Befall der Nieren

(cfu-Werte zwischen  $10^6$ - $10^7$ ). Verhältnismäßig viele der reisolierten Zellen hatten hier nach 4-tägigem Krankheitsverlauf neben *SAP4*, *SAP5* und *SAP6* insbesondere *SAP2* ( $P_{SAP2-1}$ ) deutlich aktiviert. Demgegenüber änderten sich Krankheitsverlauf und Genexpressionsmuster bei einer Verringerung der Infektionsdosis von zuvor  $4 \times 10^5$  auf nun  $2 \times 10^5$  Zellen. Die ermittelten Keimzahlen der Nieren betrug nur  $10^4$ - $10^5$ , und auch eine starke Organschädigung konnte nicht beobachtet werden. Bei Vergleich der *SAP*-Aktivierung wurde deutlich, dass bei niedrigerer Infektionsdosis *SAP2* ( $P_{SAP2-1}$ ) in den aus den Nieren reisolierten Pilzzellen nicht signifikant induziert wurde, dagegen aber *SAP5* und *SAP6* in einem auffallend größeren Anteil als bei dem höherem Inokulum. Dabei wurden für diese beiden Isogene in einigen Versuchsreihen Werte von nahezu 100% MPA-sensitiver Kolonien, d.h. zuvor induzierter Zellen ermittelt. Dieses Ergebnis läßt vermuten, dass bei vergleichsweise höherer Infektionsdosis aufgrund der hohen Zellzahl eine Aktivierung der Protease *SAP5* während der frühen Infektionsschritte in vielen Zellen zur Ausbreitung im Wirt nicht notwendig erschien, während *SAP2* bei dieser massiven Infektion und starken Organschädigung möglicherweise zur Substratverwertung von vielen Pilzzellen zur Vermehrung benötigt wurde. Umgekehrt wären bei entsprechend geringerem Inokulum die Erreger in den einleitenden Infektionsschritten und zur Aufrechterhaltung des Krankheitsverlaufs zu einer Induktion von *SAP5* und *SAP6* gezwungen gewesen. Da eine massive Organschädigung bei gleichzeitiger Vermehrung der Pilze hier nicht beobachtet wurde, blieb eine Induktion des *SAP2*-Gens entsprechend aus.

Die Gene *SAP1* und *SAP3* wurden während der lokal begrenzten Schleimhautinfektion wie auch während des systemischen Krankheitsverlaufs in einigen Zellen signifikant aktiviert, insgesamt jedoch nur in einem geringen Anteil der jeweils untersuchten Population von Zellen. Den entsprechenden Proteasen konnte in den hier studierten Infektionsmodellen demnach keine besondere Bedeutung für die Pathogenität von *C. albicans* zugewiesen werden. Jedoch muß auch berücksichtigt werden, dass eine Genregulation möglicherweise nicht nur durch Promotor-induzierte Transkription, sondern auch durch andere Mechanismen wie z.B. veränderte Transkriptstabilität oder Translationseffizienz beeinflusst werden könnte. Dementsprechend würde eine pathogenetisch bedeutsame Aktivierung dieser *SAP*-Gene durch FLP-Reporteraktivität nicht angezeigt werden. Unter Verwendung einer Methode, die auf einer RT (reverse Transkription)-PCR beruht, wiesen Naglik *et al.* (1999) auf eine besondere *in vivo*-Aktivierung der *C. albicans*-Gene *SAP1* und *SAP3* bei Patienten mit oraler Candidiasis hin. Im Speichel der von den Autoren untersuchten Personen wurden bei zwei

von zehn klinisch auffälligen Patienten Transkripte von *SAP1* bzw. in sechs von zehn Fällen *SAP3* nachgewiesen, nicht jedoch bei symptomatisch unauffälligen *Candida*-Trägern. Demgegenüber wurde die Transkription der Gene *SAP2*, sowie auch *SAP4-SAP6* bei allen symptomatisch Auffälligen, aber auch bei nahezu allen asymptomatischen Trägern nachgewiesen. Die in dieser Studie gewählte Strategie zur Überprüfung einer Virulenzgenexpression bietet prinzipiell den Vorteil, dass auch eine Untersuchung von *C. albicans*-Wildstämmen in menschlichem Untersuchungsmaterial möglich ist. Aufgrund der hohen Nachweis-Empfindlichkeit scheint jedoch schwer zu beurteilen, ob ein entsprechender Transkriptnachweis auch gleichzeitig mit einer pathogenetisch relevanten Genaktivierung in den Pilzzellen korrelierte. In Kontrollexperimenten konnten die Autoren zeigen, dass bereits 10-100 *SAP2*-exprimierende *C. albicans*-Zellen pro ml Speichel für einen mRNA-Nachweis ausreichen. Für die Detektion der *SAP*-Transkripte wurden pro Patientenprobe durchschnittlich mehrere tausend Zellen eingesetzt. Da die Bestimmung der Genexpression nicht auf Einzelzellebene erfolgte, konnte daher theoretisch ein geringer Anteil *SAP*-exprimierender Zellen innerhalb der analysierten Population ausreichen, um letztlich ein Signal nach der RT-PCR zu erhalten. Auch unter Verwendung der in der vorliegenden Arbeit etablierten IVET-Strategie konnte stets in einem geringen Anteil von *C. albicans*-Zellen eine signifikante Aktivierung von *SAP1* bzw. *SAP3* während der Infektion nachgewiesen werden. Entsprechend wäre hier vermutlich eine ausreichende Transkriptmenge für einen RT-PCR-Nachweis vorhanden gewesen, dessen pathogenetische Bedeutung aber angesichts des geringen Anteils induzierter Zellen an der Gesamtpopulation fraglich gewesen wäre. Während von Naglik *et al.* für die Isogene *SAP1*, *SAP2* bzw. *SAP3* jeweils individuelle Primerpaare für die Amplifizierung der jeweiligen mRNAs gewählt wurden, war ein spezifischer Transkriptnachweis der Isogene *SAP4-SAP6* jedoch nicht möglich. Insofern sind die Werte für die verschiedenen *SAP*-Gene nur schwer miteinander vergleichbar. Entsprechend können dabei auch *SAP*-spezifische Unterschiede in Primer-Bindung und template-Amplifizierung während der PCR-Reaktionen in den verschiedenen Speichelproben sicherlich nicht ausgeschlossen werden und möglicherweise zu unterschiedlichen Signalstärken führen. Insgesamt muß aber auch berücksichtigt werden, inwieweit die Erreger-Wirts-Auseinandersetzung in den jeweils untersuchten Wirtsnischen vergleichbar sind, d.h. Besiedlung und klinisch relevante Infektion der Mundschleimhaut bzw. Infektion des Ösophagusepithels. Unterschiedliche *SAP*-Expressionsmuster bezüglich *SAP1* und *SAP3* innerhalb der von Naglik *et al.* durchgeführten Studie, aber auch im Vergleich mit den in

dieser Arbeit erzielten Ergebnissen, könnten letztlich auch durch die Analyse von jeweils verschiedenen *C. albicans*-Stämmen beeinflusst worden sein. Bei dem mRNA-Nachweis durch Northern-Analyse verschiedener *C. albicans*-Stämme wurde z.B. deutlich, dass die *in vitro*-Expression der *SAP*-Gene, insbesondere *SAP1*, *SAP3* sowie *SAP4-SAP6* offensichtlich stammspezifisch reguliert wird (Hube *et al.*, 1994). Beispielsweise werden die Gene *SAP1* und *SAP3* in dem *C. albicans*-Stamm WO-1 unter *in vitro*-Bedingungen phasenspezifisch in der opaque-Phase, nicht aber in der white-Phase aktiviert (White and Agabian, 1995). Diese Form des phänotypischen switching wurde für den *C. albicans*-Modellstamm SC5314, Ausgangsstamm für die Reporterstämme dieser Arbeit, nicht beschrieben. Dennoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass auch in diesem Stamm eine ähnliche Phasenvariation für die *SAP*-Genexpression während der Infektion von Bedeutung ist.

Die Gene *SAP4-SAP6*, deren Ähnlichkeit in der abgeleiteten Aminosäuresequenz 75-89% beträgt, werden allgemein als hyphenspezifisch diskutiert, da ihre Expression unter *in vitro*-Bedingungen nur während eines gleichzeitigen Auftretens von *C. albicans*-Keimschläuchen beobachtet werden konnte. Jedoch ist aufgrund der großen Ähnlichkeit der Isogene *SAP4-SAP6* ein spezifischer *SAP4*-, *SAP5*- bzw. *SAP6*-Transkriptnachweises durch Northern-Analyse nur schwer möglich (Hube *et al.*, 1994). Da eine *SAP4-SAP6*-Expression in *C. albicans* nicht nur in Serum-supplementiertem Medium, sondern auch in serumfreien hypheninduzierenden Medien *in vitro* möglich war, wurde vermutet, dass die Aktivierung dieser drei Isogene allein durch pH-Wert und Hyphenbildung in den *C. albicans*-Zellen ausgelöst wird (White and Agabian, 1995). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wiesen jedoch auf eine offensichtlich viel kompliziertere Situation während der Infektion hin. Dabei wurde auch deutlich, dass die Gene *SAP4-SAP6* *in vivo* nicht gleichermaßen, sondern durchaus individuell reguliert wurden. Eine generelle Bedeutung dieser drei *SAP*-Gene für die Pathogenität von *C. albicans* bei der systemischen Infektion ist aber bereits bekannt und wurde auch experimentell durch den Einsatz von spezifischen Mutanten gezeigt (Sanglard *et al.*, 1997; Kretschmar *et al.*, 1999). In Tierexperimenten überlebten Meerschweinchen bzw. Mäuse nach intravenöser Infektion mit einer *C. albicans-sap4-sap6*-dreifach-Mutante deutlich länger als Tiere, die mit dem entsprechenden Ausgangsstamm SC5314 infiziert wurden. Jedoch war eine Auswirkung der eingeführten Mutationen in diesem Stamm auf die *in vivo*-Expression anderer *SAP*-Gene, z.B. *SAP2* nicht auszuschließen. Dies wurde vermutet, da die *SAP4-SAP6*-Mutante in *SAP2*-induzierendem YCB-BSA-Medium im Vergleich zum Ausgangsstamm einen auffälligen Wachstumsdefekt aufwies, der auch mit der fehlenden

proteolytischen Aktivität des entsprechenden Kulturüberstandes korrelierte (Sanglard *et al.*, 1997). Unter Verwendung desgleichen *C. albicans*-Stammes wurde in einem *in vitro*-Vergleich der Überlebensrate von *C. albicans*-Zellen nach Phagozytose durch Maus-Peritonealmakrophagen demonstriert, dass Zellen der *SAP4-SAP6*-Mutante um mehr als 50% effektiver abgetötet wurden als wildtypische Zellen (Borg-von Zepelin *et al.*, 1998). Parallel konnte unter Verwendung von *SAP4-SAP6*-spezifischen Antisera durch immunfluoreszenzmikroskopischen Nachweis in diesen Wirtsabwehrzellen auch die Expression der Gene *SAP4-SAP6* in den wildtypischen Pilzzellen nachgewiesen werden. Interessanterweise wurde in diesen Experimenten darauf hingewiesen, dass sowohl auf der Oberfläche von phagozytierten *C. albicans*-Blastokonidien als auch von myzelartig wachsenden Zellen *SAP4-SAP6*-Antigene identifiziert wurden. Dieser Hinweis korreliert mit Beobachtungen in der vorliegenden Arbeit, da in einigen *C. albicans*-Zellen 30 min nach i.p.-Infektion *SAP5* bereits signifikant zu einem Zeitpunkt induziert wurde, als mikroskopisch noch keine Keimschlauchinduktion der Zellen festzustellen war. Diese Beobachtung ließ vermuten, dass *SAP5* durch Wirtsfaktoren aktiviert wird, die auch zu einer Ausbildung von Hyphen führen, und dass sowohl *SAP5*-Expression als auch Filamentierung der Pilzzellen zur Pathogenität der Erreger beitragen. Entsprechend schien die Aktivierung von *SAP5* nicht notwendigerweise von der Keimschlauchbildung der Zellen abhängig zu sein.

### **Einfluß von Signaltransduktionswegen auf die *SAP*-Genexpression**

Um herausfinden zu können, ob während der Infektion mit *C. albicans* die Expression des *SAP5*-Gens von der Morphologie der Pilzzellen abhängig ist, wurde geprüft, inwieweit dieses Gen von Signaltransduktionswegen in *C. albicans* beeinflusst wird, deren Beteiligung an der Ausbildung von Hyphen bekannt ist (Brown and Gow, 1999). Dazu wurde die IVET-Strategie in bereits existierende *C. albicans*-Stämme eingeführt, in denen die Gene *CPH1*, *EFG1* bzw. *CPH1* und *EFG1* inaktiviert wurden (Liu *et al.*, 1994; Lo *et al.*, 1997). Da es sich bei den jeweiligen regulatorischen Mutanten um Derivate des *C. albicans*-Stammes CAI4 handelt, konnten die Ergebnisse der *SAP5*-Expressionsanalyse in diesen Stämmen mit den bereits erzielten Erkenntnissen zur *in vivo*-*SAP*-Regulation im Stamm CAI4 verglichen werden. Nach Insertion des von *FRT*-sites flankierten *MPA<sup>R</sup>*-Markers ins Genom der drei regulatorischen Mutanten wurden *SAP2P*- bzw. *SAP5P-ecaFLP*-Fusionen am jeweils zugehörigen Genlokus eingeführt. Bei der Überprüfung ihrer korrekten Integration fiel auf, dass der Stamm CFI3 und entsprechend seine Derivate offensichtlich für eines der beiden *SAP2*-Allele homozygot



waren, und dass Stamm JKC18 und dessen Abkömmlinge ein zusätzliches *SAP5*-Allel aufwiesen. Diese Beobachtung zeigt, dass verschiedene Derivate eines Ausgangsstammes (hier Stamm CAI4), durchaus weitere unbekannte genetische Unterschiede aufweisen können, ausgelöst möglicherweise durch genetische Manipulation oder natürliche genomische Variabilität (Pla *et al.*, 1996). Diese Tatsache zwingt zu einer generell kritischen Beurteilung von Ergebnissen, die mit einem definierten *C. albicans*-Isolat nach längerer Propagation bzw. durch Vergleich vermeintlich isogener Stämme erzielt wurden.

Die *SAP5*-Aktivierung in den *C. albicans*-Zellen der verschiedenen regulatorischen Mutanten wurde im Tiermodell einer systemisch verlaufenden Infektion nach intraperitonealer Infektion untersucht. Als Kontrollen dienten die bereits verwendeten *C. albicans*-*SAP5*-Reporterstämme S5FI2A und S5FI2B, in denen die entsprechenden Gene intakt sind. Die i.p.-Infektion wurde gewählt, da hier bereits sehr früh nach Infektion eine deutliche *SAP5*-Aktivierung in diesen Kontrollstämmen beobachtet werden konnte. Bei dem Vergleich der Ergebnisse aus Versuchen mit den verschiedenen regulatorischen Mutanten muß berücksichtigt werden, dass sich diese Stämme nicht nur im morphologischen Erscheinungsbild, sondern auch in ihrer Virulenz grundsätzlich unterscheiden. Da *efg1*-Einzelmutanten und *cph1 efg1*-Doppelmutanten bei fehlender Hyphenbildung nicht invadierten und sich avirulent verhielten (Lo *et al.*, 1997), konnten die entsprechenden Ergebnisse zur *SAP5*-Expression nicht bezüglich des Verlaufs der Infektion interpretiert werden. Dabei gaben die ermittelten Keimzahlen für diese Mutanten auch keinen Anhaltspunkt über deren Virulenz an, da nach Reisolieren und Ausplattieren von ausschließlich Blastosporen deutlich höhere cfu-Werte ermittelt wurden als nach Ausplattieren myzelartig wachsender Zellen. Die Ergebnisse der *in vivo*-Experimente wiesen dennoch darauf hin, dass die Expression des *SAP5*-Gens im *C. albicans*-Stamm CAI4 zumindest in diesem Infektionsmodell von den Regulatoren *CPH1* und *EFG1* maßgeblich beeinflusst wurde. Zwar konnten zu den verschiedenen Zeitpunkten nach i.p.-Infektion der Maus Zellen der *cph1 efg1*-Doppelmutanten reisoliert werden, in denen *SAP5* signifikant induziert worden war, jedoch schien dieser Anteil verglichen mit der Gesamtzahl der analysierten Zellen sehr gering zu sein. Gegenüber den Kontrollstämmen wurde auch für die jeweiligen *cph1*- bzw. *efg1*-Einzelmutanten eine verminderte *SAP5*-Expression nachgewiesen, so dass offenbar beide Regulatoren an der Aktivierung dieses Gens beteiligt waren, und die beiden Signalwege sich regulatorisch nicht kompensierten. Dennoch fiel auf, dass sowohl nach Infektion mit *cph1*- als auch *efg1*-Mutanten in einem bemerkenswerten Anteil der

reisolierten Zellen eine signifikante *SAP5*-Induktion nachgewiesen werden konnte. Interessanterweise hat die Expression dieses Gens demnach nicht mit der Fähigkeit zur Hyphenbildung der *C. albicans*-Zellen korreliert, da *efg1*-Mutanten im Gegensatz zu den *cph1*-Mutanten während der Infektion keine Hyphen ausbildeten. Dass die Fähigkeit zur Hyphenbildung allein nicht zur uneingeschränkten *SAP5*-Induktion ausreichte, wurde umgekehrt dadurch unterstützt, dass die *SAP5*-Expression in Zellen der *cph1*-Mutanten trotz normaler Filamentierung gegenüber den Kontrollstämmen vermindert war. Entsprechend konnte vermutet werden, dass im *C. albicans*-Stamm *CAI4* während der Infektion *SAP5*-Aktivierung und Hyphenbildung nicht konsequenterweise voneinander abhängig sind, sondern vielmehr durch ähnliche Umwelt- bzw. Wirtssignale in den Pilzzellen ausgelöst werden und so zur Pathogenität des Erregers beitragen. Darüberhinaus unterstützen die Ergebnisse die Vermutung, dass die hier untersuchten Signalwege nicht nur an morphologischen Differenzierungsprozessen beteiligt sind, sondern auch auf die Regulation anderer putativer Virulenzgene während der Infektion Einfluß nehmen (Whiteway, 2000). Vor diesem Hintergrund schien interessant, dass überraschenderweise ein regulatorischer Einfluß der hier untersuchten Signalwege auch auf die Expression des *SAP2*-Gens festgestellt wurde. Ein hoher Anteil MPA-sensitiver Zellen nach Anzucht der entsprechenden *SAP2*-Reporterstämme mit *efg1*-Mutation, aber insbesondere mit *cph1 efg1*-Doppelmutation unter *SAP2*-reprimierenden Bedingungen ließ auf eine offensichtlich dereprimierte Expression dieses Proteasegens schließen. Diese Beobachtung verdeutlicht, dass die entsprechenden Regulatoren nicht nur einen positiven, sondern möglicherweise auch einen negativen Einfluß auf die Expression von Genen ausüben. Auch scheint ihre genregulatorische Bedeutung nicht nur ausschließlich auf die Hyphenphase der *C. albicans*-Zellen beschränkt zu sein.

Auf einen Zusammenhang zwischen Expression der Gene *SAP4-SAP6* und der Hypheninduktion wurde aufgrund von *in vitro*-Beobachtungen bereits mehrfach hingewiesen (Hube, 1994). Jedoch muß auch berücksichtigt werden, dass diese Proteasegene unter Laborbedingungen möglicherweise anders reguliert werden könnten als während der Infektion. Von Schröppel *et al.* (2000) wurde *in vitro* durch Northern-Analyse gezeigt, dass im Gegensatz zum Wildstamm in Zellen der *efg1*-Einzelmutanten bei ausbleibender Keimschlauchinduktion unter hypheninduzierenden Bedingungen kein *SAP4-SAP6*-spezifisches Transkript nachweisbar war. Eine spezifische Detektion der *SAP5*-mRNA wurde hier aufgrund der hohen Homologie dieser drei *SAP*-Gene jedoch nicht gezeigt. Das bedeutet, dass entweder *SAP5 in vitro* auch im Wildstamm nicht nachweisbar exprimiert wurde, oder

aber die Expression dieses Gens unter Laborbedingungen strikt von *EFG1* abhängig ist. In Bezug auf die Beobachtungen in der vorliegenden Arbeit unterstreichen beide Möglichkeiten die Vermutung, dass die wirtsinduzierte Aktivierung des *SAP5*-Gens in Zellen des *C. albicans*-Stammes CAI4 auf zellulärer Ebene anders reguliert werden könnte als unter hypheninduzierenden *in vitro*-Bedingungen und vermutlich auch nicht nur von *EFG1* abhängig ist. Dass Hypheninduktion während der Infektion möglicherweise anders abläuft als z.B. die Serum-induzierte Keimschlauchinduktion bei neutralem pH-Wert und einer Temperatur von 37°C, zeigten kürzlich auch Untersuchungen des in *C. albicans* identifizierten Transkriptionsfaktors caTEC1 (Schweizer *et al.*, 2000). *catec1*-Mutanten des *C. albicans*- Stammes CAI4 wiesen im Gegensatz zum Ausgangsstamm eine verminderte Serum-induzierte Keimschlauchbildung auf. Dieser Defekt wurde jedoch nach intravenöser Infektion der Maus nicht beobachtet, der Stamm verhielt sich aber trotzdem avirulent. Diese Beobachtung weist auch darauf hin, dass Hyphenbildung und Virulenz durchaus getrennt zu beurteilen sind. Ein möglicher Zusammenhang zwischen Hyphenbildung und *SAP4-SAP6*-Expression wurde von den Autoren erwogen, da innerhalb der Promotoren der Gene *SAP4-SAP6* putative Bindungsstellen von caTEC1 identifiziert werden konnten (Schweizer *et al.*, 2000). Darüberhinaus wurde ein *SAP4-SAP6*-spezifisches Transkript in *catec1*-Mutanten unter hypheninduzierenden Bedingungen nicht nachgewiesen. Dabei bleibt aber unklar, ob ein entsprechender Einfluß auch während der Infektion zu beobachten ist, und ob generell ein Zusammenhang zwischen putativen caTEC1-Bindungsstellen und *SAP4-SAP6*-Aktivierung besteht. Interessanterweise befinden sich diese Bindungsstellen innerhalb auffälliger Wiederholungen von 25mer-Repeats, die in den Promotoren der Isogene *SAP4*, *SAP5* bzw. *SAP6* in unterschiedlicher Anzahl vorkommen. Im Rahmen einer Diplomarbeit konnte von Binder (2001) mit Hilfe der in der vorliegenden Arbeit entwickelten IVET-Strategie gezeigt werden, dass die unterschiedliche Anzahl dieser Repeats nicht für die differentielle Expression dieser drei *SAP*-Gene während der Infektion verantwortlich ist. Es könnte nun die Frage geklärt werden, ob eine wirtsabhängige *SAP4-SAP6*-Aktivierung in der *catec1*-Mutante noch stattfindet, oder ob der Virulenzdefekt dieses *C. albicans*-Stammes bei gleichzeitig normaler Hyphenbildung möglicherweise auch durch eine gestörte *SAP4-SAP6*-Aktivierung beeinflusst wurde. In einer jüngsten Veröffentlichung konnten Leng *et al.* (2001) zeigen, dass der Regulator *EFG1* als DNA-bindendes Helix-Loop-Helix-Protein mit der DNA-Konsensussequenz (5'-CANNTG-3') im Promotor des *C. albicans*-Gens *ALS8* in Wechselwirkung tritt. Bemerkenswerterweise ist die Expression dieses Gens, das für ein

hyphenspezifisches Zellwandprotein codiert, *in vitro* von EFG1 abhängig. Jedoch wurde eine Beteiligung dieses DNA-Bindungsmotivs auf die EFG1-abhängige Regulation von *ALS8* nicht gezeigt. Da putative Bindungsstellen für EFG1 auch in den Promotoren der in der vorliegenden Arbeit untersuchten *SAP*-Gene identifiziert werden konnten, ist eine Beteiligung dieser Motive auf den regulatorischen Einfluß von EFG1 auf diese Gene nicht auszuschließen. Jedoch besteht auch die Möglichkeit, dass dieser Regulator indirekt über andere Faktoren an der Regulation von Proteasegenen teilnimmt.

Aufgrund des beobachteten Einflusses definierter Signaltransduktionswege auf die Expression des *SAP5*-Gens in *C. albicans* während der Infektion wurde insgesamt verdeutlicht, dass morphogenetisch relevante Regulatoren auch die Regulation von Virulenzgenen beeinflussen, die selbst nicht an der Ausprägung der Morphologie der Zellen beteiligt sind. Demnach scheinen Virulenzdefekte von regulatorischen Mutanten mit gestörter Hyphenbildung nicht notwendigerweise nur durch eine veränderte Morphologie bedingt zu sein, sondern möglicherweise auch durch Fehlregulation anderer pathogenetisch wichtiger Gene. Eine Untersuchung regulatorischer Netzwerke, die die Expression putativer Virulenzfaktoren insbesondere während der Infektion beeinflussen, scheint daher wichtig. Erst dadurch kann verstanden werden, wie je nach Umweltbedingung bzw. Wirtsnische durch zelluläre Regulationsmechanismen verschiedene virulenz-assoziierte Eigenschaften der Zelle in koordinierter Weise zur Pathogenität von *C. albicans* während der Infektion beitragen.

## 5.4 Abschließende Wertung und Ausblick

In den letzten Jahren trug die Entwicklung von molekularbiologischen Methoden maßgeblich zur Erforschung des opportunistisch humanpathogenen Pilzes *Candida albicans* bei (De Backer *et al.*, 2000). Bereits diskutierte Virulenzfaktoren von *C. albicans* konnten durch ihren Einsatz näher untersucht und noch unbekanntes entsprechend entdeckt werden. Dennoch bleibt die Auseinandersetzung von *C. albicans* mit ihrem Wirt während der Infektion noch weitgehend unverstanden (Whiteway, 2000). Dabei ist auch unklar, wie pathogenetisch wichtige Eigenschaften dieses Keimes in Anpassung an die verschiedensten Wirtsnischen regulatorisch koordiniert in den einzelnen Pilzzellen eingesetzt werden und so für die Aufrechterhaltung der Infektion mitverantwortlich sind. Einen Beitrag zur Klärung dieser Fragen sollte die in der vorliegenden Arbeit für *C. albicans* entwickelte *in vivo*-Expressionstechnologie liefern. Mit dieser Methode kann nachgewiesen werden, ob bzw. in

welchen Stadien einer Infektion ausgewählte Virulenzgene dieses Erregers im Gegensatz zu *in vitro*-Kultivierungsbedingungen aktiviert werden. Dadurch können Hinweise auf eine mögliche Beteiligung und Bedeutung entsprechender Faktoren am Infektionsgeschehen gewonnen werden. Am Beispiel der sekretorischen Aspartylproteasen, einer für die Virulenz von *C. albicans* vielfach diskutierten Familie homologer Isoenzyme, konnte durch Einsatz dieser Technik eine differentielle und stadienspezifische Aktivierung der zugrunde liegenden Gene in den Pilzzellen während der Infektion nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass die einzelnen Mitglieder dieser Familie sekretorischer Proteasen vermutlich jeweils spezifische Aufgaben während der Infektion erfüllen und dadurch in Abhängigkeit der verschiedenen Wirtsnischen immer eine bestmögliche Anpassung des Erregers unterstützen. Daneben konnten auch Einblicke in wichtige genetische Strukturen für die Aktivierung einzelner Proteasegene sowie in regulatorische Beziehungen dieser Gene zur Hyphenbildung der Zellen erhalten werden. Da *C. albicans* vermutlich durch den koordinierten Einsatz vieler verschiedener Merkmale zum Krankheitserreger wird (Odds, 1994), bietet sich nun auch eine Analyse der *in vivo*-Expression anderer putativer Virulenzgene mit dieser Strategie an. Besonders Experimente mit weiteren *C. albicans*-Stämmen, die in definierten regulatorischen Genen defekt sind, sollten das Verständnis darüber verbessern, durch welche zellulären Signalwege verschiedene Pathogenitätsmechanismen während der Infektion miteinander kommunizieren. Dabei könnte das Reportersystem auch durch Expressionsanalyse individueller Allele zur Erforschung dieser noch weitgehend unbekanntem Flexibilität des Genoms beitragen. Doch neben der Untersuchung bereits diskutierter Virulenzmerkmale kann die IVET-Strategie auch als Werkzeug zum Aufspüren noch unbekannter pathogenetisch wichtiger Gene des Erregers eingesetzt werden, beispielsweise für eine Identifizierung spezifisch wirtsabhängig induzierter Promotoren im *C. albicans*-Genom. Aufgrund einer verstärkten molekularen Erforschung anderer *Candida*-Arten neben *C. albicans*, können neue Erkenntnisse über das Verständnis virulenzbestimmender Eigenschaften dieses Haupterregers pilzbedingter Infektionen des Menschen in Zukunft auch durch den Vergleich mit anderen, nahe verwandten Spezies erzielt werden. Nicht zuletzt sollte aber auch verstärkt untersucht werden, welche Wirtssignale letztlich an einer Aktivierung definierter Virulenzmerkmale dieses Mikroorganismus beteiligt sind und in diesem Sinne dazu beitragen, dass *C. albicans* vom symptomatisch unauffälligen Besiedler zum gefährlichen Krankheitserreger des Menschen werden kann.

## 6 Literaturverzeichnis

1. **Ausubel, F., Brent, R., Kingston, R., Moore, D., Seidman, J., Smith, J., Struhl, K. (1989)** Current protocols in molecular biology. Wiley, New York
2. **Banerjee, A., Ganesan, K., Datta, A. (1991)** Induction of secretory acid proteinase in *Candida albicans*. J Gen Microbiol 137: 2455-2461
3. **Belkum, A. van, Scherer, S., Van Alphen, L., Verbrugh, H. (1998)** Short-sequence repeats in procaryotic genomes. Microbiol Mol Biol Rev 62: 275-293
4. **Binder, A. (2001)** Analyse von Promotorelementen *in vivo* induzierter *Candida albicans* Virulenzgene. Diplomarbeit Universität Würzburg
5. **Birnboim, H. C., Doly, J. (1979)** Rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid-DNA. Nucleic Acids Res 7:1513-1523
6. **Borg-von Zepelin, M., Beggah, S., Boggian, K., Sanglard, D. Monod, M. (1998)** The expression of the secreted aspartyl proteinases Sap4 to Sap6 from *Candida albicans* in murine macrophages. Mol Microbiol 28: 543-554
7. **Braun, B. R., Johnson, A. D. (1997)** Control of filament formation in *Candida albicans* by the transcriptional repressor TUP1. Science 277: 105-109
8. **Braun, B. R., Head, W. S., Wang, M. X., Johnson, A. D. (2000)** Identification and characterization of TUP1-regulated genes in *Candida albicans*. Genetics 156: 31-44
9. **Broach, J. R. (1981)** The yeast plasmid 2  $\mu$ m circle. In : Strathern, J. N., Jones, E. W., Broach, J.R. (eds) The molecular biology of the yeast *Saccharomyces*: Life cycle and inheritance. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, pp 455-470
10. **Brown, A. J. P., Gow, N. A. R. (1999)** Regulatory networks controlling *Candida albicans* morphogenesis. Trends Microbiol 7: 333-338
11. **Buchholz, F., Ringrose, L., Angrand, P.-O., Rossi, F., Stewart, A. F. (1996)** Different thermostabilities of FLP and Cre recombinases: implications for applied site-specific recombination. Nucleic Acids Res 24:4256-4262
12. **Buchholz, F., Angrand, P.-O., Stewart, A. F. (1998)** Improved properties of FLP recombinase evolved by cycling mutagenesis. Nat. Biotechnol. 16:657-662
13. **Buffo, J., Herman, M. A., Soll, D. R. (1984)** A characterization of pH-regulated dimorphism in *Candida albicans*. Mycopathologia 85: 21-30
14. **Camilli, A., Beattie, D. T., Mekalanos, J. J. (1994)** Use of genetic recombination as a reporter of gene expression. Proc Natl Acad Sci USA 91:2634-2638
15. **Cannon, R. D., Jenkinson, H. F., Shepherd, M. G. (1992)** Cloning and expression of *Candida albicans* ADE2 and proteinase genes on a replicative plasmid in *C. albicans* and *Saccharomyces cerevisiae*. Mol Gen Genet 235:453-457
16. **Chalfie, M. C., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W. W., Stuhl, K. (1994)** Green fluorescent protein as a marker for gene expression. Science 263:802-805
17. **Chiang, S. L., Mekalanos, J. J., Holden, D. W. (1999)** *In vivo* genetic analysis of bacterial virulence. Annu Rev Microbiol 53: 129-154

18. **Colina, A.-R., Aumont, F., Deslauriers, N., Belhumeur, P., DeRepentigny, L. (1996)** Evidence for degradation of gastrointestinal mucin by *Candida albicans* secretory aspartyl proteinase. *Infect Immun* 64:4514-4519
19. **Cutler, J. E. (1991)** Putative virulence factors of *Candida albicans*. *Annu Rev Microbiol* 45:187-218
20. **Davis, D. R. (1990)** The structure and function of aspartic proteinases. *Ann Rev Biophysics Chem* 19:189-215
21. **De Backer, M. D., Magee, P. T., Pla, J. (2000)** Recent developments in molecular genetics of *Candida albicans*. *Annu Rev Microbiol* 54: 463-498
22. **De Bernardis, F., Cassone, A., Sturtevant, J., Calderone, R. (1995)** Expression of *Candida albicans* *SAP1* and *SAP2* in experimental vaginitis. *Infect Immun* 63:1887-1892
23. **De Bernardis, F., Mondello, F., Scaravelli, G., Pachi, A., Girolamo, A., Agatensi, L., Cassone, A. (1999)** High aspartyl proteinase production and vaginitis in human immunodeficiency virus-infected women. *J Clin Microbiol* 37:1376-1380
24. **Einsele, H., Heesemann, J., Roggenkamp, A., Hengel, H., Koszinowski, U. (2000)** Infektionen bei Immunsuppression. In: *Klinische Infektiologie* (Hrsg.: Marre, R., Mertens, T., Trautmann, M., Vanek, E.), Urban & Fischer Verlag, München Jena: 811-835
25. **El Barkani, A., Kurzai, O., Fonzi, W. A., Ramon, A., Porta, A., Frosch, M., Mühlischlegel, F. A. (2000)** Dominant active alleles of RIM101 (PRR2) bypass the pH restriction on filamentation of *Candida albicans*. *Mol Cell Biol* 20: 4635-4647
26. **Engelmann, E. (1999)** Sproßpilze. In: *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie* (Hrsg.: Hahn, H., Falke, D., Kaufmann, S.H.E., Ullmann, U.), Springer Verlag Berlin Heidelberg New York: 701-710
27. **Ernst, J. F. (2000)** Transcription factors in *Candida albicans* – environmental control of morphogenesis. *Microbiology* 146: 1763-1774
28. **Fonzi, W. A., Irwin, M. Y. (1993)** Isogenic strain construction and gene mapping in *Candida albicans*. *Genetics* 134:717-728
29. **Fonzi, W. A. (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
30. **Fridkin, S. K., Jarvis, W. R. (1996)** Epidemiology of nosocomial fungal infections. *Clin Microbiol Rev* 9:499-511
31. **Futcher, A. B. (1986)** Copy number amplification of the 2 micron circle plasmid of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Theor Biol* 119: 197-204
32. **Gale, C. A., Bendel, C. M., McClellan, M., Hauser, M., Becker, J. M., Berman, J., Hostetter, M. K. (1998)** Linkage of adhesion, filamentous growth, and virulence in *Candida albicans* to a single gene, *INT1*. *Science* 279: 1355-1358
33. **Georgopapadakou, N. H. (1998)** Antifungals: mechanisms of action and resistance, established and novel drugs. *Curr Opin Microbiol* 1: 547-557
34. **Ghannoum, M., Abu Elteen, K. (1986)** Correlative relationship between proteinase production, adherence and pathogenicity of various strains of *Candida albicans*. *J Med Vet Mycol* 24: 407-413
35. **Giese, K., Kingsley, C., Kirshner, J. R., Grosschedl, R. (1995)** Assembly and function of a TCR $\alpha$  enhancer complex is dependent on LEF-1-induced DNA bending and multiple protein-protein interactions. *Genes Dev* 9: 995-1008

36. **Gillum, A. M., Tsay, E. Y. H., Kirsch, D.R. (1984)** Isolation of the *Candida albicans* gene for orotidine-5'phosphate decarboxylase by complementation of *S. cerevisiae* *ura3* and *E. coli* *pyrF* mutations. *Mol Gen Genet* 198: 179-182
37. **Hacker (2000)** *Candida albicans*. In: Molekulare Infektionsbiologie (Hrsg.: Hacker, J., Heesemann, J.), Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg Berlin:240-244
38. **Hostetter, M. K. (1999)** Integrin-like proteins in *Candida* spp. and other microorganisms. *Fungal Genet Biol* 28:135-145
39. **Hoyer, L. L. (2001)** The ALS gene family of *Candida albicans*. *Trends Microbiol* 9: 176-180
40. **Hube, B., Turver, C. J., Odds, F. C., Eiffert, H., Boulnois, G. J., Kochel, H., Rüchel, R. (1991)** Sequence of the *Candida albicans* gene encoding the secretory aspartate proteinase. *J Med Vet Mycol* 29: 129-131
41. **Hube, B., Monod, M., Schofield, D. A., Brown, A. J. P., Gow, N. A. R. (1994)** Expression of seven members of the gene family encoding secretory aspartyl proteinases in *Candida albicans*. *Mol Microbiol* 14:87-99
42. **Hube, B. (1996)** *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases. *Curr Top Med Mycol* 7:55-69
43. **Hube, B., Sanglard, D., Odds, F., C., Hess, D., Monod, M., Schäfer, W., Brown, A., J., P., Gow, N., A., R. (1997)** Disruption of each of the secreted aspartyl proteinase genes *SAP1*, *SAP2*, and *SAP3* of *Candida albicans* attenuates virulence. *Infect Immun* 65:3529-3538
44. **Kaminishi, H., Miyaguchi, H., Tamaki, T., Suenaga, N., Hisamatsu, M., Mihashi, I., Matsumoto, H., Maeda, H., Hagihara, Y. (1995)** Degratation of humoral host defense by *Candida albicans* proteinase. *Infect Immun* 63: 984-988
45. **Kilby, N. J., Snaith, M. R. and Murray, J. A. (1993)** Site-specific recombinases: tools for genome engineering. *Trends Genet* 9:413-421
46. **Kimura, L. H., Pearsall, N. N. (1980)** Relationship between germination of *Candida albicans* and increased adherence to human buccal epithelial cells. *Infect Immun* 28: 464-468
47. **Köhler, G. A., White, T. C., Agabian, N. (1997)** Overexpression of a cloned IMP dehydrogenase gene of *Candida albicans* confers resistance to the specific inhibitor mycophenolic acid. *J Bacteriol* 179: 2331-2338
48. **Koelsch, G., Tang, J., Loy, J. A., Monod, M., Jackson, K., Foundling, S. I., Lin, X. (2000)** Enzymic characteristics of secreted aspartic proteases of *Candida albicans*. *Biochim Biophys Acta* 1480: 117-131
49. **Kretschmar, M., Hube, B., Bertsch, T., Sanglard, D., Merker, R., Schröder, M., Hof, H., Nichterlein, T. (1999)** Germ tubes and proteinase activity contribute to virulence of *Candida albicans* in murine peritonitis. *Infect Immun* 67: 6637-6642
50. **Kwon-Chung, K. J., Lehman, D., Good, C., Magee, P. T. (1985)** Genetic evidence for role of extracellular proteinase in virulence of *Candida albicans*. *Infect Immun* 49:571-575
51. **Lee, D. H., Schleif, R. F. (1989)** *In vivo* DNA loops in *araCBAD*: size limits and helical repeat. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 476-480
52. **Leng, P., Lee, P. R., Wu, H., Brown, A. J. (2001)** Efg1, a morphogenetic regulator in *Candida albicans*, is a sequence-specific DNA binding Protein. *J Bacteriol* 183: 4090-4093
53. **Lerner, C. G., Goldman, R. C. (1993)** Stimuli that induce production of *Candida albicans* extracellular aspartyl proteinase. *J Gen Microbiol* 139: 1643-1651
54. **Leuker, C. E., Hahn, A.-M., Ernst, J. F. (1992)**  $\beta$ -Galactosidase of *Kluyveromyces lactis* (Lac4p) as reporter of gene expression in *Candida albicans* and *Candida tropicalis*. *Mol Gen Genet* 235:235-241



55. **Liu, H., Köhler, J., Fink, G. R. (1994)** Suppression of hyphal formation in *Candida albicans* by mutation of a *STE12* homolog. *Science* 266: 1723-1726
56. **Lo, H. J., Köhler, J. R., DiDomenico, B., Loebenberg, D., Cacciapuoti, A., Fink, G. R. (1997)** Nonfilamentous *C. albicans* mutants are avirulent. *Cell* 90: 939-949
57. **Louie, A., Dixon, D. M., El-Maghrabi, E. A., Burnett, J. W., Baltch, A. L., Smith, R. P. (1994)** Relationship between *Candida albicans* epidermolytic proteinase activity and virulence in mice. *J Med Vet Mycol* 32: 59-64
58. **Louria, D. B., Brayton, R. G. (1964)** Behavior of *candida* cells within leukocytes. *Proc Soc Exp Biol Med* 115:93
59. **Magee, B. B., Hube, B., Wright, R. J., Sullivan, P. A., Magee, P. T. (1993)** The genes encoding the secreted aspartyl proteinases of *Candida albicans* constitute a family with at least three members. *Infect Immun* 61:3240-3243
60. **MacDonald, F., Odds, F. C. (1980)** Inducible proteinase of *Candida albicans* in diagnostic serology and in the pathogenesis of systemic candidosis. *J Med Microbiol* 13:423-435
61. **MacDonald, F., Odds, F. C. (1983)** Virulence for mice of a proteinase-secreting strain of *Candida albicans* and a proteinase-deficient mutant. *J Gen Microbiol* 129:431-438
62. **Mahan, M. J., Slauch, J. M., Mekalanos, J. J. (1993)** Selection of bacterial virulence genes that are specifically induced in host tissues. *Science* 259:686-688
63. **Mahan, M. J., Tobias, J. W., Slauch, J. M., Hanna, P. C., Collier, R. J., Mekalanos, J. J. (1995)** Antibiotic-based selection for bacterial genes that are specifically induced during infection of a host. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:669-673
64. **Maniatis, T., Fritsch, E. F., Sambrook, J. (1982)** *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor (Cold Spring Harbor Laboratory)
65. **Marzluf, G. A. (1997)** Genetic regulation of nitrogen metabolism in the fungi. *Microbiol Mol Biol Rev* 61: 17-32
66. **Monod, M., Togni, G., Hube, B., Sanglard, D. (1994)** Multiplicity of genes encoding secreted aspartic proteinases in *Candida* species. *Mol Microbiol* 13: 357-368
67. **Monod, M., Hube, B., Hess, D., Sanglard, D. (1998)** Differential regulation of SAP8 and SAP9, which encode two new members of the secreted aspartic proteinase family in *Candida albicans*. *Microbiology* 144:2731-2737
68. **Morschhäuser, J., Virkola, R., Korhonen, T. K., Hacker, J. (1997)** Degradation of human subendothelial extracellular matrix by proteinase-secreting *Candida albicans*. *FEMS Microbiol Lett* 153:349-355
69. **Morschhäuser, J., Michel, S., Hacker, J. (1998)** Expression of a chromosomally integrated, single-copy *GFP* gene in *Candida albicans*, and its use as a reporter of gene regulation. *Mol Gen Genet* 257: 412-420
70. **Morschhäuser, J., Michel, S., Staib, P. (1999)** Sequential gene disruption in *Candida albicans* by FLP-mediated site-specific recombination. *Mol Microbiol* 32: 547-556
71. **Naglik, J. R., Newport, G., White, T. C., Lynette, Fernandes-Naglik, L. L., Greenspan, J. S., Greenspan, D., Sweet, S. P., Challacombe, Agabian, N. (1999)** *In vivo* analysis of secreted aspartyl proteinase expression in human oral candidiasis. *Infect Immun* 67: 2482-2490
72. **Natarajan, K., Meyer, M. R., Jackson, B. M., Slade, D., Roberts, C., Hinnebusch, A. G., Marton, M. J. (2001)** Transcriptional profiling shows that Gcn4p is a master regulator of gene expression during amino acid starvation in yeast. *Mol Cell Biol* 21: 4347-4368

73. **Navarro-Garcia, F., Sanchez, M., Nombela, C. Pla, J. (2001)** Virulence genes in the pathogenic yeast *Candida albicans*. FEMS Microbiol Rev 25: 245-268
74. **Odds, F. C. (1988)** *Candida* and Candidosis. Baillière Tindall, London, England
75. **Odds, F. C. (1994)** *Candida* species and virulence. ASM News 60: 313-318
76. **Osbourn, A. E., Barber, C. E., Daniels, M. J. (1987)** Identification of plant-induced genes of the bacterial pathogen *Xanthomonas campestris* pathovar *campestris* using a promoter-probe plasmid. EMBO J 6: 23-28
77. **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
78. **Ptashne, K., Gann, A. (1997)** Transcriptional activation by recruitment. Nature 386: 569-577
79. **Ramesh, N. V., Kolattukudy, P. E. (1996)** Disruption of the serin proteinase gene (*sep*) in *Aspergillus flavus* leads to a compensatory increase in the expression of a metalloproteinase gene (*mep20*). J Bacteriol 178: 3899-3907
80. **Ray, T. L., Payne, C. D. (1988)** Scanning electron microscopy of epidermal adherence and cavitation in murine candidiasis: a role for *Candida* acid proteinase. Infect Immun 56:1942-1949
81. **Ray, T. L., Payne, C. D. (1990)** Comparative production and rapid purification of *Candida* acid proteinase from protein-supplemented cultures. Infect Immun 58 :508-514
82. **Ray, T. L., Payne, C. D., Morrow, B. J. (1991)** *Candida albicans* acid proteinase: characterization and role in candidiasis. Adv Exp Med Biol 306: 173-183
83. **Remold, H., Fasold, H., Staib, F. (1968)** Purification and characterization of a proteolytic enzyme from *Candida albicans*. Biochim Biophys Acta 167: 399-406
84. **Rieg, G., Fu, Y., Ibrahim, A. S., Zhou, X., Filler, S. G., Edwards Jr., J. E. (1999)** Unanticipated heterogeneity in growth rate and virulence among *Candida albicans* *AAF1* null mutants. Infect Immun 67: 3193-3198
85. **Riggle, P. J., Andrutis, K. A., Chen, X., Tzipori, S. R., Kumamoto, C. A. (1999)** Invasive lesions containing filamentous forms produced by a *Candida albicans* mutant that is defective in filamentous growth in culture. Infect Immun 67: 3649-3652
86. **Rinaldi, M. G. (1993)** In: Candidiasis: Pathogenesis, Diagnosis, and Treatment (ed.: Bodey, G. P.) Raven Press New York: 1-20
87. **Rippe, K., von Hippel, P. H., Langowski, J. (1995)** Action at a distance: DNA-looping and initiation of transcription. Trends Biol Sci 20:500-506
88. **Rippon, J. W. (1988)** Medical Mycology. Saunders Philadelphia
89. **Ross, E. D., Keating, A. M., Maher, L. J. (2000)** DNA constraints on transcription activation *in vitro*. J Mol Biol 297: 321-334
90. **Ruden, D. M., Ma, J., Ptashne, M. (1988)** No strict alignment is required between a transcriptional activator binding site and the "TATA box" of a yeast gene. Proc Natl Acad Sci USA 85: 4262-4266
91. **Rüchel, R., Uhlemann, K., Böning, B. (1983)** Secretion of acid proteinases by different species of the genus *Candida*. Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg 255: 537-548
92. **Rüchel, R. (1986)** Cleavage of immunoglobulins by pathogenic yeasts of the genus *Candida*. Microbiol Sci 3:316-319

93. **Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., Erlich, H. A. (1988)** Primer directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA-Polymerase. *Science* 239:487-491
94. **Sanglard, D., Hube, B., Monod, M., Odds, F. C., Gow, N. A. R. (1997)** A triple deletion of the secreted aspartyl proteinase genes *SAP4*, *SAP5*, and *SAP6* of *Candida albicans* causes attenuated virulence. *Infect Immun* 65: 3539-3546
95. **Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1989)** Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY
96. **Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A. R. (1977)** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74:5463-5467
97. **Santos, M. A., Keith, G., Tuite, M. F. (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
98. **Scazzocchio, C. (2000)** The fungal GATA factors. *Curr Opin Microbiol* 3: 126-131
99. **Schaller, M., Korting, H. C., Schäfer, W., Bastert, J., Chen, W, Hube, B. (1999a)** Secreted aspartic proteinase (Sap) activity contributes to tissue damage in a model of human oral candidosis. *Mol Microbiol* 34: 169-180
100. **Schaller, M., Hube, B., Ollert, M. W., Schäfer, W., Borg-von Zepelin, M., Thoma-Greber, E., Korting, H. C. (1999b)** *In vivo* expression and localization of *Candida albicans* secreted aspartyl proteinase during oral Candidiasis in HIV-infected patients. *J Invest Dermatol* 112: 383-386
101. **Schröppel, K., Sprößer, K., Whiteway, M., Thomas, D. Y., Röllinghoff, M., Csank, C. (2000)** Repression of hyphal proteinase expression by the mitogen-activated protein (MAP) kinase phosphatase Cpp1p of *Candida albicans* is independent of the MAP kinase Cek1p. *Infect Immun* 68: 7159-7161
102. **Schweizer, A., Rupp, S., Taylor, B. N., Röllinghoff, M., Schröppel, K. (2000)** The TEA/ATTS transcription factor CaTec1p regulates hyphal development and virulence in *Candida albicans*. *Mol Microbiol* 38: 435-445
103. **Southern, E. M. (1975)** Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 98: 503-517
104. **Srikantha, T., Chandrasekhar, A., Soll, D. R. (1995)** Functional analysis of the promotor of the phase-specific *WH11* gene of *Candida albicans*. *Mol Cell Biol* 15:1797-1805
105. **Srikantha, T., Klapach, A., Lorenz, W. W., Tsai, L. K., Laughlin, L. A., Gorman, J. A., Soll, D. R. (1996)** The sea pansy *Renilla reniformis* luciferase serves as a sensitive bioluminescent reporter for differential gene expression in *Candida albicans*. *J Bacteriol* 178:121-129
106. **Staab, J. F., Bradway, S. D., Fidel, P. L., Sundstrom, P. (1999)** Adhesive and mammalian transglutaminase substrate properties of *Candida albicans* Hwp1. *Science* 283: 1535-1538
107. **Staib, P. (1997)** Verwendung der site-spezifischen Rekombinase FLP als Reporter der Genexpression in *Candida albicans*. Diplomarbeit Universität Würzburg
108. **Staib, P., Morschhäuser, J. (1999)** Chlamyospore formation on Staib agar as a species-specific characteristic of *Candida dubliniensis*. *Mycoses* 42: 521-524
109. **Staib, P., Kretschmar, M., Nichterlein, T., Köhler, G., Michel, S., Hof, H., Hacker, J., Morschhäuser, J. (1999)** Host-induced, stage-specific virulence gene activation in *Candida albicans* during infection. *Mol Microbiol* 32: 533-546
110. **Staib, P., Morschhäuser, J., Hacker, J. (2000)** Pilze: Erreger-Wirtsbeziehung, Allgemeine Pathogenese. In: Klinische Infektiologie (Hrsg.: Marre, R., Mertens, T., Trautmann, M., Vanek, E.), Urban & Fischer Verlag, München Jena: 28-33

111. **Staub, F. (1965)** Serum-proteins as nitrogen source for yeast-like fungi. *Sabouraudia* 4:187-193
112. **Staub, F. (1969)** Proteolysis and pathogenicity of *Candida albicans* strains. *Mycopathol Mycol Appl* 37:345-348
113. **Stark, W. M., Boocock, M. R., Sherratt, D. J. (1992)** Catalysis by site-specific recombinases. *Trends Genet* 8: 432-439
114. **Stoldt, V. R., Sonneborn, A., Leuker, E., Ernst, J. F. (1997)** Efg1p, an essential regulator of morphogenesis of the human pathogen *Candida albicans*, is a member of a conserved class of bHLH proteins regulating morphogenetic processes in fungi. *EMBO J* 16: 1982-1991
115. **Strauß, A., Michel, S., Morschhäuser, J. (2001)** Analysis of phase-specific gene expression at the single-cell level in white-opaque switching system of *Candida albicans*. *J Bacteriol* 183: 3761-3769
116. **Sugita, T., Nakase, T. (1999)** Non-universal usage of the leucine CUG codon and the molecular phylogeny of the genus *Candida*. *System Appl Microbiol* 22: 79-86
117. **Sullivan, D. J., Westerneng, T. J., Haynes, K. A., Bennett, D. E., Coleman, D. C. (1995)** *Candida dubliniensis* sp. nov. phenotypic and molecular characterization of a novel species associated with oral candidosis in HIV-infected individuals. *Microbiology* 141:1507-1521
118. **Sundstrom, P. (1999)** Adhesins in *Candida albicans*. *Curr Opin Microbiol* 2: 353-357
119. **Takahashi, K., Vigneron, M., Matthes, H., Wildeman, A., Zenke, M., Chambon, P. (1986)** Requirement of stereospecific alignments for initiation from the simian virus 40 early promoter. *Nature* 319: 121-126
120. **Valdivia, R. H., Falkow, S. (1997)** Fluorescence-based isolation of bacterial genes expressed within host cells. *Science* 277:2007-2011
121. **Wang, J., Mushegian, A., Lory, S., Jin, S. (1996)** Large-scale isolation of candidate virulence genes of *Pseudomonas aeruginosa* by *in vivo* selection. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:10434-10439
122. **Watts, H. J., Chea, F. S., Hube, B., Sanglard, D., Gow, N. A. (1998)** Altered adherence in strains of *Candida albicans* harbouring null mutations in secreted aspartic proteinase genes. *FEMS Microbiol Lett* 159: 129-135
123. **Whiteway, M. (2000)** Transcriptional control of cell type and morphogenesis in *Candida albicans*. *Curr Opin Microbiol* 3: 582-588
124. **White, T. C., 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
125. **Wirsching, S., Michel, S., Köhler, G., Morschhäuser, J. (2000a)** Activation of the multiple drug resistance gene *MDR1* in fluconazole-resistant, clinical *Candida albicans* strains is caused by mutations in a *trans*-regulatory factor. *J Bacteriol* 182: 400-404
126. **Wirsching, S., Michel, S., Morschhäuser, J. (2000b)** Targeted gene disruption in *Candida albicans* wild-type strains: the role of the *MDR1* gene in fluconazole resistance of clinical *Candida albicans* isolates. *Mol Microbiol* 36: 856-865
127. **Yesland, K., Fonzi, W. A. (2000)** Allele-specific gene targeting in *Candida albicans* results from heterology between alleles. *Microbiology* 146: 2097-2104
128. **Young, G. M., Miller, V. L. (1997)** Identification of novel chromosomal loci affecting *Yersinia enterocolitica* pathogenesis. *Mol Microbiol* 25:319-328

## **A ANHANG**

### **A.1 ERKLÄRUNGEN**

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

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

Würzburg im Juli 2001

Peter Staib

## A.2 PUBLIKATIONEN

### Originalarbeiten

**Staub, P., Kretschmar, M., Nichterlein, T., Köhler, G., Michel, S., Hof, H., Hacker, J., Morschhäuser, J. (1999)** Host-induced, stage-specific virulence gene activation in *Candida albicans* during infection. *Mol Microbiol* 32: 533-546

**Staub, P., Morschhäuser, J. (1999)** Chlamyospore formation on Staub agar as a species-specific characteristic of *Candida dubliniensis*. *Mycoses* 42: 521-524

**Morschhäuser, J., Michel, S., Staub, P. (1999)** Sequential gene disruption in *Candida albicans* by FLP-mediated site-specific recombination. *Mol Microbiol* 32: 547-556

**Staub, P., Michel, S., Köhler, G., Morschhäuser, J. (2000)** A molecular genetic system for the pathogenic yeast *Candida dubliniensis*. *Gene* 242: 393-398

**Staub, 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

**Staub, P., Moran, G. P., Sullivan, D. J., Coleman, D. C., Morschhäuser, J. (2001)** Isogenic strain construction and gene targeting in *Candida dubliniensis*. *J Bacteriol* 183: 2859-2865

**Staub, P., Kretschmar, M., Nichterlein, T., Hof, H., Morschhäuser, J. (2001)** The transcriptional regulators CPH1 and EFG1 mediate the activation of the *Candida albicans* virulence gene *SAP5* during infection. eingereicht bei *Infect Immun*

### Übersichtsarbeiten

**Staub, P., Morschhäuser, J., Hacker, J. (2000)** Pilze: Erreger-Wirtsbeziehung, Allgemeine Pathogenese. In: *Klinische Infektiologie* (Hrsg.: Marre, R., Mertens, T., Trautmann, M., Vanek, E.), Urban & Fischer Verlag, München Jena: 28-33

**Staub, P., Kretschmar, M., Nichterlein, T., Köhler, G., Morschhäuser, J. (2000)** Expression of virulence genes in *Candida albicans*. *Adv Exp Med Biol* 485: 167-176

**Staub, P., Wirsching, S., Strauß, A., Morschhäuser, J. (2001)** Gene regulation and host adaptation mechanisms in *Candida albicans*. *Int J Med Microbiol* 291: 183-188

### A.3 LEBENSLAUF

Name: Peter, Andreas, Markus Staib

Wohnort: 97286 Sommerhausen, Kirchplatz 15

Geburtstag: 21.08.1971

Geburtsort: Würzburg

Eltern: Prof. Dr. med. Dr. med. vet. Friedrich Staib  
Johanna Staib, geb. Riedl

Geschwister: Friedrich Staib, geb. 27.08.1968  
Jörg Staib, geb. 04.09.1970

Schulbildung: 1977-1983 Grundschule am Breitenbachplatz, später umbenannt in  
Dunant-Grundschule, Berlin-Steglitz;  
1983-1990 Paulsen-Oberschule (Gymnasium) Berlin-Steglitz,  
Abitur Juni 1990

Bundeswehr: Grundwehrdienst vom 1.7.1990-30.6.1991  
(im März 1995 nachträglich den Kriegsdienst an der Waffe aus  
Gewissensgründen verweigert)

Studium: Biologie (Diplom) von Nov. 1991-Nov.1997 an der Universität  
Würzburg; Diplomprüfung in den Fächern Mikrobiologie, Biochemie  
und Zoologie (mit Schwerpunkt Zell- und Entwicklungsbiologie);  
experimentelle Diplomarbeit im Fach Mikrobiologie bei Prof. Hacker  
in der Gruppe von Dr. Morschhäuser

Wissenschaftliche  
Anstellungen: Jan. 1998-Juni 1998 Institut für molekulare Infektionsbiologie bzw.  
Zentrum für Infektionsforschung der Universität Würzburg bei Prof.  
Hacker in der Gruppe von Dr. Morschhäuser;  
Juli 1998-Juni 2001 Zentrum für Infektionsforschung der Universität  
Würzburg bei PD Dr. Morschhäuser, in dieser Zeit Promotions-  
stipendiat der Studienstiftung des deutschen Volkes