

**Funktionelle Analyse des  
„Multidrug-Resistance“-Regulators *MRR1*  
im humanpathogenen Hefepilz *Candida albicans***

**Functional analysis of the  
multidrug resistance regulator *MRR1*  
in the pathogenic yeast *Candida albicans***



Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades  
der Graduate School of Life Sciences (GSLS)

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

Klasse Infection and Immunity

vorgelegt von

**Sabrina Schubert**  
aus Hannover

Institut für Molekulare Infektionsbiologie  
Würzburg 2011







Funktionelle Analyse des  
„Multidrug-Resistance“-Regulators *MRR1*  
im pathogenen Hefepilz *Candida albicans*

Functional analysis of the  
multidrug resistance regulator *MRR1*  
in the pathogenic yeast *Candida albicans*

Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades  
der Graduate School of Life Sciences (GSLs)  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg  
Klasse Infection and Immunity

vorgelegt von  
Sabrina Schubert  
aus Hannover

Würzburg 2011

Eingereicht am:

Mitglieder des Promotionskomitees:

Vorsitzender: Prof. Dr. T. Dandekar

1. Betreuer: Prof. Dr. J. Morschhäuser

2. Betreuer: Prof. Dr. K. Brehm

3. Betreuer: PD Dr. K. Ohlsen

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunden ausgehändigt am:

# Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung</b>	<b>1</b>
<b>Summary</b>	<b>5</b>
<b>1. Einleitung</b>	<b>7</b>
1.1. Allgemeine Einführung . . . . .	7
1.1.1. Pilzinfektionen . . . . .	7
1.1.2. <i>Candida albicans</i> . . . . .	9
1.1.3. Vergleich zwischen <i>C. albicans</i> und <i>C. dubliniensis</i> . . . . .	15
1.1.4. Antimykotika . . . . .	16
1.2. Resistenzmechanismen . . . . .	18
1.2.1. Allgemeine Resistenzmechanismen . . . . .	18
1.2.2. Effluxpumpen . . . . .	19
1.3. Regulation der Effluxpumpen und Zinc-Cluster-Transkriptionsfaktoren . . . . .	20
1.3.1. <i>Cis</i> -regulatorische Elemente . . . . .	20
1.3.2. Zinc-Cluster-Proteine . . . . .	22
1.3.3. Zinc-Cluster-Proteine in <i>C. albicans</i> . . . . .	23
1.3.4. Zinc-Cluster-Proteine in anderen <i>Candida</i> -Spezies . . . . .	25
1.3.5. Aktivierung der Zinc-Cluster-Transkriptionsfaktoren . . . . .	25
1.4. weitere Transkriptionsfaktoren . . . . .	26
1.5. Zielsetzung der Arbeit . . . . .	27
<b>2. Ergebnisse</b>	<b>29</b>
2.1. Gain-of-function Mutationen in <i>MRR1</i> aus <i>Candida dubliniensis</i> . . . . .	29
2.1.1. Identifikation eines <i>CaMRR1</i> -Orthologs in <i>C. dubliniensis</i> . . . . .	29
2.1.2. Sequenzanalyse der <i>CdMRR1</i> -Allele . . . . .	31
2.1.3. Einfluss der Mutationen in <i>CdMRR1</i> auf die <i>MDR1</i> -Expression und die Resistenz . . . . .	32

2.2.	Funktionelle Analyse des Transkriptionsfaktors <i>MRR1</i> mittels Deletionsstudien	36
2.2.1.	Analyse von Mrr1-Proteinen mit C-terminalen und internen Deletionen	36
2.2.2.	Transkriptionelle Aktivität von TetR-Mrr1 Fusionsproteinen	39
2.2.3.	Eingrenzung der DNA-Bindedomäne	42
2.3.	Interaktion von Mrr1 mit Cap1 und Upc2	45
2.3.1.	Herstellung der <i>cap1</i> Δ Mutante	45
2.3.2.	Die Rolle von Cap1 in der <i>MDR1</i> -Expression und der Mdr1-vermittelten Resistenz	48
2.3.3.	Kooperation zwischen Mrr1 und Cap1 in der <i>MDR1</i> -Expression	53
2.3.4.	Die Rolle von Upc2 in der <i>MDR1</i> -Expression und der Mdr1-vermittelten Resistenz	54
2.3.5.	Induzierbarkeit des <i>MDR1</i> -Promotors in <i>mrr1</i> Δ, <i>cap1</i> Δ und <i>upc2</i> Δ Mutanten	57
2.3.6.	Anteil der Mdr1 Effluxpumpe an Mrr1-, Cap1- und Upc2- vermittelter Resistenz	58
2.4.	Identifizierung direkter Zielgene von Mrr1	60
2.4.1.	ChIP-on-chip: Vorversuche	60
2.4.2.	ChIP-on-chip: Durchführung und Ergebnisse	64
2.4.3.	Mrr1-Transkriptionsprofil	66
2.4.4.	Vergleich der von aktiviertem Mrr1 gebundenen Gene mit den von Mrr1 regulierten Genen	67
2.4.5.	Identifikation eines potentiellen Mrr1-Bindemotivs	69
<b>3.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>71</b>
3.1.	Gain-of-function Mutationen in Cd <i>MRR1</i>	71
3.2.	Identifikation funktioneller Mrr1-Domänen	73
3.3.	Interaktion von Mrr1 mit Cap1 und Upc2	76
3.4.	Identifikation eines Mrr1-Bindemotivs	79
3.5.	Abschließende Worte und Ausblick	80
<b>4.</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>83</b>
4.1.	Verwendete Bakterienstämme und Plasmide	83
4.1.1.	<i>Escherichia coli</i> K12 Stamm	83
4.1.2.	Plasmide	83
4.2.	Verwendete <i>C. albicans</i> -Stämme	87
4.3.	Verwendete <i>C. dubliniensis</i> -Stämme	100

4.4.	Oligonukleotide . . . . .	101
4.5.	Geräte und Chemikalien . . . . .	103
4.5.1.	Geräte . . . . .	103
4.5.2.	Chemikalien . . . . .	104
4.5.3.	Lösungen . . . . .	105
4.6.	Mikrobiologische Methoden . . . . .	106
4.6.1.	Anzucht von <i>Escherichia coli</i> . . . . .	106
4.6.2.	Anzucht von <i>Candida</i> -Stämmen . . . . .	106
4.7.	Molekularbiologische Methoden . . . . .	107
4.7.1.	Plasmidisolierung aus <i>E. coli</i> . . . . .	107
4.7.2.	Polymerasekettenreaktion (PCR) . . . . .	108
4.7.3.	Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen . . . . .	108
4.7.4.	Aufreinigung von DNA mittels Agarose-Gelelektrophorese . . . . .	109
4.7.5.	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> Zellen . . . . .	109
4.7.6.	Ligation von DNA-Fragmenten und Transformation kompetenter <i>E. coli</i> Zellen . . . . .	110
4.7.7.	DNA-Sequenzierung . . . . .	110
4.7.8.	Transformation von <i>C. albicans</i> durch Elektroporation . . . . .	110
4.7.9.	Isolierung chromosomaler DNA aus <i>C. albicans</i> . . . . .	111
4.7.10.	Southern Hybridisierung . . . . .	112
4.7.11.	Proteinisolierung aus <i>C. albicans</i> . . . . .	113
4.7.12.	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese . . . . .	113
4.7.13.	Nachweis von Proteinen mittels Coomassie-Färbung und Western Blot .	114
4.7.14.	Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration von antimykotischen Substanzen (MHK-Test) . . . . .	114
4.7.15.	Nachweis der <i>GFP</i> -Expression mittels Durchflusszytometrie (FACS) . .	115
4.7.16.	ChIP-on-chip . . . . .	115
<b>A.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>117</b>
<b>B.</b>	<b>Anhang</b>	<b>131</b>
	Eidesstattliche Erklärung . . . . .	131
	Danksagung . . . . .	133
	Publikationsliste . . . . .	135
	Lebenslauf . . . . .	137





# Zusammenfassung

Der Hefepilz *Candida albicans* gehört zu den fakultativ pathogenen Infektionserregern und ist Teil der natürlichen Mikroflora der Schleimhäute des Verdauungs- und Urogenitaltraktes der meisten gesunden Menschen. Ist das Gleichgewicht der Flora gestört, kann es zu oberflächlichen Mykosen kommen, wie z.B. der oropharyngealen Candidiasis (Mundsoor), die in der Regel durch die Gabe eines Antimykotikums in wenigen Tagen zu behandeln sind. In seltenen Fällen kann es auch zu schwerwiegenden Infektionsverläufen bis hin zu lebensbedrohlichen systemischen Mykosen kommen. Hauptsächlich immunsupprimierte Patienten, wie z.B. AIDS-Patienten oder Personen, die kürzlich einer Organ- oder Knochenmarkstransplantation unterzogen wurden, leiden häufig an oberflächlichen *C. albicans*-Infektionen. Insbesondere bei wiederkehrenden Infektionen ist der Pilz in der Lage, gegen das häufig verabreichte Medikament Fluconazol eine Resistenz zu entwickeln. Ein wichtiger Mechanismus dieser Resistenzentwicklung ist die Überexpression von Effluxpumpen, die das Medikament aus der Zelle heraustransportieren. Zwei Arten von Effluxpumpen, die eine Rolle in der Resistenzentwicklung in *C. albicans* spielen, konnten bisher identifiziert werden, die ABC (ATP binding cassette)-Transporter Cdr1 und Cdr2 sowie der MFS (major facilitator superfamily)-Transporter Mdr1. Der Zinc-Cluster-Transkriptionsfaktor Mrr1 spielt eine wichtige Rolle in der Regulation der *MDR1*-Effluxpumpe. Er kontrolliert die *MDR1*-Expression in Anwesenheit induzierender Substanzen und sogenannte „gain-of-function“ Mutationen in *MRR1* konnten als die Ursache der konstitutiven *MDR1*-Hochregulierung und der „Multidrug-Resistance“ in *C. albicans* identifiziert werden [28, 82].

In dieser Arbeit konnte ein Ortholog zu *MRR1* aus *C. albicans* in *Candida dubliniensis*, einer zu *C. albicans* nahe verwandten Hefe, identifiziert werden. Es wurde gezeigt, dass in den untersuchten klinischen und *in vitro* generierten Fluconazol-resistenten *C. dubliniensis*-Stämmen ebenfalls gain-of-function Mutationen in *MRR1* die *MDR1*-Überexpression und eine Resistenz bewirken. Die Ergebnisse demonstrieren, dass der Transkriptionsfaktor Mrr1 eine wichtige Rolle in der Entwicklung der Resistenz in diesen humanpathogenen Pilzen spielt.

Bisher ist nicht bekannt, wie der Zinc-Cluster-Transkriptionsfaktor *MRR1* durch induzierende Substanzen oder gain-of-function Mutationen aktiviert wird. Um zu verstehen, wie die Mrr1-Aktivität reguliert wird, wurden in dieser Arbeit durch Deletionsstudien funktionelle Domänen des Transkriptionsfaktors identifiziert. Durch C-terminale und interne Deletionen konnte eine

Aktivierungsdomäne (AD1) im C-Terminus von *MRR1* aufgefunden werden, die notwendig war für die Benomyl-induzierte *MDR1*-Expression. Die Deletion einer inhibitorischen Domäne (ID1), ebenfalls im C-terminalen *MRR1*-Bereich, bewirkte eine konstitutive Aktivität des Proteins. Diese ID1 ist also notwendig, die Aktivität des Transkriptionsfaktors unter nicht-induzierenden Bedingungen zu reprimieren. Dass die zusätzliche Deletion der AD1 zwar die konstitutive Aktivität des Proteins aufhob, es aber immer noch in Lage war, den *MDR1*-Promotor in Anwesenheit von Benomyl zu aktivieren, spricht für das Vorhandensein von mindestens einer weiteren aktivierenden Region, die in dieser Arbeit jedoch nicht genau lokalisiert werden konnte. Ein Fusionsprotein aus den 106 N-terminalen Aminosäuren von Mrr1 und der Gal4-Aktivierungsdomäne aus *Saccharomyces cerevisiae* induzierte konstitutiv die *MDR1*-Expression, was zeigte, dass die DNA-Bindedomäne ausreicht, den Transkriptionsfaktor an den *MDR1*-Promotor zu binden.

Auch von anderen Transkriptionsfaktoren ist bekannt, dass sie in die Regulation der *MDR1*-Expression involviert sind, da sie an den *MDR1*-Promotor binden. Um einen besseren Einblick in die Regulation der *MDR1*-vermittelten Resistenz in *C. albicans* zu bekommen, wurde in dieser Arbeit die gegenseitige Abhängigkeit von Mrr1 und Cap1 bzw. Upc2 in Bezug auf die *MDR1*-Expression untersucht. Es wurde gezeigt, dass ein hyperaktives Mrr1 unabhängig von Cap1 und Upc2 den *MDR1*-Promotor aktivierte und eine Resistenz vermittelte. Aktiviertes Upc2 hingegen war in Abwesenheit von Mrr1 nicht in der Lage, den *MDR1*-Promotor zu aktivieren, und die Anwesenheit von Mrr1 bewirkte nur eine geringe Upc2-abhängige *MDR1*-Expression. Ein C-terminal verkürztes, hyperaktives Cap1-Protein induzierte zwar unabhängig von Mrr1 die *MDR1*-Expression und eine Resistenz, die Anwesenheit von Mrr1 erhöhte jedoch dessen Aktivität. Die durch Benomyl und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induzierte *MDR1*-Expression war abhängig von Mrr1 und teilweise abhängig von Cap1, Upc2 hingegen war nicht notwendig.

Durch ChIP-on-chip Analysen und Transkriptionsprofile mit aktiviertem Mrr1 konnte gezeigt werden, dass Mrr1 die meisten seiner Zielgene unabhängig von Cap1 bindet und hochreguliert. Mrr1 und Cap1 kooperieren zwar unter bestimmten Bedingungen bei der Induktion der *MDR1*-Expression im *C. albicans*-Wildtyp, gain-of-function Mutationen in einem der beiden Transkriptionsfaktoren aber bewirken, dass sie unabhängig voneinander eine Überexpression der Mdr1-Effluxpumpe und eine Resistenz verursachen können. Eine Analyse der von Mrr1 gebundenen Sequenzen ergab ein mögliches Mrr1-Bindemotiv. Dessen häufiges Vorkommen im *MDR1*-Promotor spricht dafür, dass, wie schon von Hiller *et al.* beschrieben [44], keine einzelne Promotorregion für die konstitutive *MDR1*-Expression in Stämmen mit hyperaktivem Mrr1 absolut notwendig ist.

Mit der vorliegenden Arbeit wurde ein wichtiger Beitrag zum Verständnis der Entwicklung der

Multidrug-Resistenz in *C. albicans* geleistet. Effluxpumpen und deren Regulatoren stellen in der Bekämpfung von *C. albicans*-Infektionen ein interessantes Angriffsziel für die Entwicklung neuer Medikamente und die Weiterentwicklung bereits vorhandener Antimykotika dar.



# Summary

The yeast *Candida albicans* is a human fungal pathogen and is part of the microflora of mucosal surfaces of the gastrointestinal and urogenital tract in most healthy people. If the balance of the flora is disturbed *C. albicans* can cause superficial mycoses, e.g. oropharyngeal Candidiasis, also known as „thrush“, which are usually easy to cure within a few days by treatment with antimycotic drugs. Infections with the yeast can also result in serious as well as life-threatening systemic mycoses. However, immunocompromised patients, e.g. AIDS patients, often suffer from superficial *C. albicans* infections and especially in recurrent infections the yeast can develop resistance to the commonly used antifungal drug fluconazole. An important mechanism of drug resistance is the overexpression of efflux pumps, which mediate the transport of toxic compounds out of the cell. Two types of efflux pumps, which play a role in the development of resistance in *C. albicans*, have been described so far, the ABC (ATP binding cassette) transporters Cdr1 and Cdr2, and the MFS (major facilitator superfamily) transporter Mdr1. The zinc cluster transcription factor Mrr1 plays an important role in the regulation of the *MDR1* gene. It controls the *MDR1* expression in response to inducing chemicals and gain-of-function mutations in *MRR1* are responsible for the constitutive upregulation of *MDR1* and fluconazole resistance [28, 82].

In this work a Ca*MRR1* ortholog was found in *Candida dubliniensis*, a yeast closely related to *C. albicans*. It could be shown that gain-of-function mutations in Cd*MRR1* were the cause of *MDR1* overexpression and drug resistance in all investigated clinical and *in vitro* generated strains. The results showed that Mrr1 plays an important role in the development of drug resistance in these human fungal pathogens.

Currently it is not understood how these zinc cluster transcription factors are activated under inducing conditions or by gain-of-function mutations. To better understand the regulation of Mrr1 activation, in this work deletion studies were performed to identify functional domains of the transcription factor. By C-terminal and internal deletions an activation domain (AD1), which was necessary for the benomyl-induced *MDR1* expression, was detected at the C-terminus of the protein. The deletion of an inhibitory domain (ID1) located near the distal AD1 resulted in constitutive activity of Mrr1. Therefore ID1 is necessary to repress Mrr1 activity under non-inducing conditions. The additional deletion of AD1 abolished the constitutive

activity of the protein but it was still able to activate the *MDR1* promoter in the presence of benomyl. These results indicate that there is at least one other activating region in Mrr1, but it could not exactly be localized in this work. A fusion protein consisting of the 106 N-terminal amino acids of Mrr1 and the transcriptional activation domain of Gal4 from *Saccharomyces cerevisiae* could confer constitutive *MDR1* expression, demonstrating that the DNA binding domain is sufficient to target Mrr1 to the *MDR1* promoter.

Other transcription factors are also implicated in the regulation of *MDR1* expression because they bind to the *MDR1* promoter. To gain better insight into the regulation of *MDR1*-mediated drug resistance in *C. albicans*, the interdependence of Mrr1 and two other *MDR1* regulators, Cap1 and Upc2, was studied in this work. It could be shown that hyperactive Mrr1 could activate the *MDR1* promoter and confer drug resistance independently from Cap1 and Upc2. However, activated Upc2 was not able to activate the *MDR1* promoter in the absence of Mrr1. In the presence of Mrr1 Upc2 could only slightly activate *MDR1* expression. A C-terminally truncated, hyperactive Cap1 protein induced *MDR1* expression and drug resistance independently from Mrr1, but the presence of Mrr1 enhanced its activity. The benomyl- and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced *MDR1* expression was dependent on Mrr1 and partially dependent on Cap1. Upc2 was dispensable for the *MDR1* induction by both inducers.

ChIP-on-chip analyses and transcriptional profiles with activated Mrr1 revealed that Mrr1 binds and upregulates most of its targets independently from Cap1. Mrr1 and Cap1 cooperate under certain conditions to induce *MDR1* expression in wild-type *C. albicans*, but gain-of-function mutations in one of the two transcription factors result in independently mediated *MDR1* overexpression and drug resistance. Analysis of the Mrr1-bound sequences revealed a putative Mrr1 binding motif. Its frequent occurrence in the *MDR1* promoter is in line with the finding from a previous study, that not only a single promoter region is absolutely necessary for the constitutive *MDR1* upregulation in strains carrying gain-of-function mutations in Mrr1.

This thesis contributes to the understanding of the development of multidrug resistance in *C. albicans*. Efflux pumps and their transcriptional regulators provide an interesting target for the development of new antifungal drugs or the further development of available drugs against *C. albicans* infections.

# 1. Einleitung

## 1.1. Allgemeine Einführung

### 1.1.1. Pilzinfektionen

Der Anteil der Infektionen, die durch Pilze verursacht werden, spielen im Vergleich zu Infektionen bakteriellen oder viralen Ursprungs zwar nur eine untergeordnete Rolle, jedoch haben sie paradoxerweise aufgrund des medizinischen Fortschritts in den letzten Jahrzehnten immer mehr an Bedeutung gewonnen. Die Verwendung von Antibiotika, der Einsatz von Immunsuppressiva nach Organtransplantationen und die Anwendung der Chemotherapie führten zwar zu einer höheren Überlebensrate von Patienten mit lebensbedrohlichen Krankheiten, trugen aber auch zu einem enormen Anstieg an immunsupprimierten Personen, wie z.B. HIV-, Diabetes- oder Krebspatienten, bei, was in einer Zunahme an Infektionen mit opportunistischen pathogenen Pilzen resultierte [52, 103]. Die Erkenntnis, dass ein geschwächtes Immunsystem die Empfänglichkeit der Patienten für eine Vielzahl von Pilzkrankungen erhöht, führte zu intensiverer Grundlagenforschung auf diesem Gebiet.

Pilze sind Eukaryoten und bilden neben Pflanzen, Tieren und Prokaryoten ein eigenes Reich. Von den bis heute ca. 100000 bekannten Pilzarten sind ca. 180 Arten für den Menschen klinisch relevant. In der Medizin unterscheidet man die Erreger der Mykosen anhand ihres Erscheinungsbildes in Fadenpilze, Sprosspilze und dimorphe Pilze. Fadenpilze weisen als Grundelement fadenartige Ausläufer (Hyphen) auf und bilden ein Hyphengeflecht (Myzel). Sie lassen sich weiter unterteilen in Dermatophyten (z.B. *Trichophyton rubrum*) und Schimmelpilze (z.B. *Aspergillus fumigatus*). Sprosspilze (z.B. *Candida albicans*), vermehren sich typischerweise asexuell durch Zellsprossung und dimorphe Pilze (z.B. *Histoplasma capsulatum*) können abhängig von den Umweltbedingungen in Faden- oder Sprossform vorkommen. Eine taxonomische Einteilung der Pilze nach einem System, das auf der Art der Fortpflanzung basiert, erwies sich als schwierig, da es z.B. Pilze gibt, denen das (perfekte) sexuelle Stadium fehlt oder in denen es noch nicht nachgewiesen wurde. Zu diesem Form-Taxon der *Fungi imperfecti* zählen Vertreter der Gattungen *Aspergillus*, *Penicillium* und *Candida*, die sich asexuell durch Sporen, Knospen oder rein vegetativ vermehren, aufgrund von Genhomologien aber zu dem Phylum der Asco-

mycota (Schlauchpilze) gehören [50]. Mit dem Projekt „Assembling the Fungal Tree of Life“ (<http://aftol.org/>) hat es sich eine große Gruppe von Wissenschaftlern zum Ziel gemacht, die bislang konfuse Taxonomie der Pilze in der wissenschaftlichen Literatur zu bereinigen, eine Konsistenz der verschiedenen Datenbanken zu erreichen und somit zu einem besseren Verständnis der Evolution des Pilzreiches beizutragen. Aus diesem Projekt entstammte im Frühjahr 2007 eine umfassende Studie zur Klassifikation aller Pilzgruppen, an der 67 Wissenschaftler aus 13 Ländern beteiligt waren [42].

Die häufigste Dermatophyrose beim Menschen ist der Fußpilz, meist verursacht durch Vertreter der Gattung *Trichophyton*. Dermatophyten befallen Keratinanteile in der Hornschicht der Oberhaut, der Haare und der Nägel. Häufig werden bei Pilzinfektionen jedoch Pathogene der Gattungen *Candida*, *Cryptococcus* und *Aspergillus* diagnostiziert [104]. Erreger der meisten Infektionen mit Schimmelpilzen ist *Aspergillus fumigatus*. Neben allergischen Reaktionen ist *A. fumigatus* Verursacher von Aspergillomen, Überwucherungen des Pilzes („fungus ball“) auf der Oberfläche bereits bestehender Lungenläsionen, die durch Tuberkulose oder andere Lungenkrankheiten entstanden sind [92]. Die Infektionen immungeschwächter Personen mit *A. fumigatus* haben meistens eine invasive Aspergillose zur Folge, bei der die Pilzhyphen in das Lungengewebe eindringen, dieses zerstören und nicht selten sich über den Blutkreislauf im Körper ausbreiten [92]. Da spezifische Diagnoseverfahren und therapeutische Maßnahmen begrenzt sind, ist die Mortalitätsrate mit 30-90 % sehr hoch [10]. Nach *Aspergillus* ist *Cryptococcus* der am häufigsten aus der Lunge isolierte, ambulant erworbene Pilz [131]. *Cryptococcus neoformans* gehört zu den wichtigsten Vertretern der klinisch relevanten Basidiomyceten (Ständerpilzen) und wird vor allem durch Vogelkot und Kompost verbreitet. Er verursacht unterschiedliche klinische Erscheinungsbilder einschließlich asymptomatischer Infektionen der Lunge und anderer Organe bis hin zu lebensbedrohlichen Infektionen des Zentralnervensystems [56]. Trotz verfügbarer Behandlungsmethoden liegt die Mortalitätsrate der Kryptokokkenmeningitis bzw. -meningoenzephalitis bei AIDS-Patienten bei 10-25 % [64].

Die meisten Pilzinfektionen beim Menschen werden jedoch von *C. albicans* und anderen *Candida*-Spezies verursacht [62]. Unter den ca. 200 bisher bekannten *Candida*-Arten gelten nur wenige als für den Menschen opportunistisch pathogen. Dazu gehören neben *C. albicans* *C. dubliniensis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. lusitaniae*, *C. parapsilosis* und *C. tropicalis* [90], die unterschiedliche Krankheitsverläufe hervorrufen können. Der gesunde Mensch verfügt über natürliche Barrieren wie die Haut und Schleimhäute mit einer gesunden Mikroflora und ein intaktes Immunsystem. Der fakultativ pathogene Erreger *C. albicans* ist Teil der natürlichen Mikroflora der Schleimhäute des Verdauungs- und Urogenitaltraktes der meisten gesunden Menschen. Ist das Gleichgewicht der Flora gestört, kann es zu oberflächlichen Mykosen kommen, wie z.B.



der oropharyngealen Candidiasis (Mundsoor), die auch häufig bei Neugeborenen beobachtet wird. Ca. 75 % der gesunden Frauen leiden mindestens einmal in ihrem Leben an einer Vaginalmykose, schätzungsweise 5 % davon sogar an wiederkehrenden Infektionen mit fünf oder mehr Infektionen pro Jahr [125, 126]. In der Regel ist ein oberflächlicher Befall durch die Gabe eines Antimykotikums in wenigen Tagen behandelt. Insbesondere immunsupprimierte Patienten, wie z.B. AIDS-Patienten, Organ- oder Knochenmarksempfänger oder Krebspatienten, die sich einer Chemotherapie unterziehen, leiden häufig an oberflächlichen Mykosen und wiederkehrenden Infektionen, die auch schwerwiegende Infektionsverläufe bis hin zu lebensbedrohlichen systemischen Mykosen nach sich ziehen können. Auch unter extrem untergewichtigen Neugeborenen sind systemische *Candida*-Infektionen mit hoher Mortalitätsrate ein immer häufiger auftretendes Problem [18]. *Candida* ist das vierthäufigste Pathogen, das für Infektionen der Blutbahn verantwortlich ist [45]. Europäischen Umfragen zufolge ist *C. albicans* die Ursache für mehr als die Hälfte der Fälle von invasiver Candidiasis, aber die Anzahl der Fälle, die durch andere *Candida*-Arten ausgelöst wird, scheint anzusteigen [62]. Es herrschen große regionale und sogar institutionelle Unterschiede in der Zusammensetzung der *Candida*-Spezies, die ernsthafte Erkrankungen auslösen [111]. Die am häufigsten vorkommenden nicht-*albicans*-Arten sind *C. parapsilosis* (20-40 %), *C. tropicalis* (10-30 %), *C. krusei* (10-35 %) und *C. glabrata* (5-40 %) [58]. Die Sterblichkeitsrate liegt ähnlich wie bei *C. albicans* bei 15-35 %, wobei *C. glabrata* mit 40-70 % die höchste Mortalität aufweist [58]. Die *Candida*-Spezies unterscheiden sich auch in Hinblick auf ihre Sensitivität gegenüber Antimykotika, was unterschiedliche Behandlungsmethoden erfordert (siehe Abschnitt 1.1.4).

### 1.1.2. *Candida albicans*

Symptome der Candidiasis (Soor) wurden schon um 400 v. Chr. von Hippokrates erwähnt, aber erst 1846 konnten die oralen Läsionen, die durch den Soor hervorgerufen werden, mit einem Pilz in Verbindung gebracht werden [6]. Aufgrund der unterschiedlichen morphologischen Erscheinungsformen des Pilzes war man sich lange Zeit nicht einig über dessen taxonomische Klassifikation. Im Jahre 1923 präsentierte Berkhout ein Klassifikationsschema, in dem sie den Pilz *Candida albicans* benannte [7]. *Candida* leitet sich ab von *toga candida*, dem lateinischen Wort für die weiße Robe, die im alten Rom von den Bewerbern um Staatsämter getragen wurde. *Albicans*, ebenfalls aus dem Lateinischen, bedeutet „weiß“ und beschreibt die weißen wachstypischen Kolonien, die der Pilz auf Nährmedium formt.

### 1.1.2.1. Virulenzfaktoren

#### Dimorphismus

Der Wechsel von der Hefe zur Hyphenform ist für die Virulenz von *C. albicans* von großer Bedeutung. Als pleiomorpher Organismus kann *C. albicans* neben der normalen Hefeform in weiteren unterschiedlichen Wachstumsformen vorkommen, sowohl in länglichen, ellipsoiden Pseudohyphen, als auch in kontinuierlich länger werdenden Hyphen. In der Hefeform erfolgt die Proliferation durch Knospung und anschließende Teilung der Zellen. Pseudohyphen entstehen durch unipolares Wachstum, wobei Zellen, die jeweils aus der vorherigen Zelle durch Sprossung entstehen, ein Filament bilden. Die Zellen der Pseudohyphen bleiben an den Septen miteinander verbunden und wachsen verzweigt, vermutlich um die Suche nach Nährstoffen zu vereinfachen [8]. Hyphen entstehen durch kontinuierliches apikales Wachstum einzelner Zellen, sind stark polarisiert und weisen im Gegensatz zu den Pseudohyphen keine Einschnürungen an den Septen auf. An der Spitze der wachsenden Hyphe befindet sich Aktin und zwischen der Mutterzelle und dem Keimschlauch formt sich ein Septin-Ring. Die Ausbildung von Hyphen steht in direktem Zusammenhang mit der Virulenz des Pilzes, da er mit ihnen das Wirtsgewebe penetriert [59]. *C. albicans* kann mit den Hyphen sowohl zwischen als auch in die Epithelzellen eindringen und diese schädigen, was zumindest zum Teil auf die Abgabe hydrolytischer Enzyme zurückzuführen ist [150].

Das filamentöse Wachstum erfolgt in Reaktion auf äußere Bedingungen [31]. Beispielsweise können hohe Temperaturen (37 °C), die Anwesenheit von Serum, ein hoher pH-Wert, verschiedene Kohlenstoffquellen oder Stickstoffmangel ein Hyphenwachstum induzieren [8, 31]. Außerdem sind Signaltransduktionswege in die Regulation der Hefe-Hyphen-Transformation involviert. Zu den wichtigsten und am besten erforschten Signalwegen gehören die Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK)-Kaskade, der cAMP-abhängige Signalweg, der Zweikomponenten-Histidinkinase- und der pH-Signalweg [144].

#### Weitere Virulenzfaktoren

Die Pathogenese von *C. albicans*-Infektionen ist ein komplexer Prozess, der die Stadien Adhäsion an Wirtszellen, Penetration des Wirtsgewebes und Verbreitung im Wirt umfasst. Zusätzlich zur Hefe-Hyphen-Transformation sind mehrere Virulenzfaktoren an der Pathogenität des Pilzes beteiligt. Während Adhäsine (z.B. ALS-Gene), die es der Hefe ermöglichen, unterschiedliche Gewebe und somit unterschiedliche Nischen im Wirt zu besiedeln, über den Erfolg der initialen Kolonisierung der Epithelzellen der Schleimhaut entscheiden [48, 91, 134], erlaubt die metabolische Flexibilität des Pilzes, die Nährstoffe, die dort zur Verfügung stehen, zu nutzen [12].

Als Reaktion auf die Anheftung an eine Oberfläche kann *C. albicans* sowohl auf Wirtsgewebe als auch auf medizinischen Geräten wie Kathetern, prothetischen Herzklappen oder Hormonspiralen einen Biofilm bilden, eine dreidimensionale Struktur aus Zellen umgeben von einer exopolymeren Matrix [4]. Während der Entstehung des Biofilms entwickeln die Zellen eine Resistenz gegen antimykotische Substanzen (z.B. Fluconazol). Im Gegensatz zu planktonischen Zellen, in denen eine Azol-Resistenz hauptsächlich durch die Überexpression von Effluxpumpen verursacht wird (siehe Abschnitt 1.2.2), scheint in reifen Biofilmen zumindest zum Teil das Binden der antimykotischen Moleküle an  $\beta$ -1,3-Glucane in der extrazellulären Matrix für eine Resistenz verantwortlich zu sein [86, 140]. Der Einschluss der antimykotischen Substanzen in der extrazellulären Matrix hindert diese daran, zu den Biofilm-Zellen zu gelangen, was die geringe transkriptionelle Antwort der Zellen auf die Antimykotika erklärt [140].

Auch die extrazelluläre proteolytische Aktivität von *C. albicans* ist für die Virulenz von Bedeutung. Die sekretorischen Aspartat-Proteasen (SAPs) werden von der Hefe in die Umgebung abgegeben und spalten dort Proteine. Auf diesem Weg werden Wirtsgewebe abgebaut, Proteine der Wirtsabwehr, wie z.B. Immunglobuline, zerstört und der Zelle Nährstoffe zur Verfügung gestellt [84].

#### 1.1.2.2. Genetik von *C. albicans*

##### ***C. albicans* als Modellorganismus**

Bestimmte genetische Veränderungen des *C. albicans*-Genoms wie Insertionen oder Deletionen sind relativ einfach zu erzeugen. Die Hefe lässt sich leicht transformieren und die Integration fremder DNA erfolgt häufig über homologe Rekombination [8, 23]. Aus diesen Gründen und besonders wegen der Fähigkeit, zwischen Hefe- und Hyphenform zu wechseln, wird *C. albicans* auch als Modellorganismus für pathogene Pilze verwendet. Trotzdem ist die molekulare genetische Manipulation der Hefe bzw. die funktionale Genomanalyse mit einigen Einschränkungen verbunden [23]. Die Diploidität, das Fehlen eines sexuellen Zyklus und der unkonventionelle Gebrauch des CTG-Codons (codiert für Serin statt Leucin) unterscheiden *C. albicans* von der nicht pathogenen Hefe *S. cerevisiae*, dem bevorzugten eukaryotischen Modellorganismus für genetische Untersuchungen [23]. Molekulare und genetische Ansätze, die Funktion von Genen aufzuklären, wie z.B. die Expression von Genen in anderen Organismen, werden durch diese Eigenschaften erschwert. So müssen z.B. heterolog exprimierte Gene vor der Integration ins *C. albicans*-Genom erst durch den Austausch der CTG-Codons durch für Leucin codierende Triplets, z.B. TTG, ersetzt werden.

### Identifikation neuer Gene in *C. albicans*

Um die oben genannten Schwierigkeiten bei genetischen Studien direkt in *C. albicans* zu umgehen, wurden viele *C. albicans*-Gene in *S. cerevisiae* identifiziert und analysiert. Trotz des ungewöhnlichen CTG-Codon-Gebrauchs sind *C. albicans*-Gene, wenn sie in *S. cerevisiae* exprimiert werden, häufig zumindest teilweise funktionell, was deren Identifikation mittels Komplementationsstudien erleichtert [8]. Seit die komplette Genomsequenz von *C. albicans* verfügbar ist, ist es einfacher, Gene zu identifizieren und funktionell zu analysieren. Der *Candida* Genome Database (<http://www.candidagenome.org/>) zufolge umfasst das *C. albicans*-Genom 6202 Open Reading Frames (ORFs), von denen bereits 1415 verifiziert sind. Häufig findet man in den Annotationen, z.B. auf Grund von Homologien zu bereits bekannten Genen, Hinweise auf die Funktion des zu untersuchenden Gens. Mittels Sequenzvergleich können viele *C. albicans*-Gene, die zu Genen aus *S. cerevisiae* homolog sind, identifiziert werden. Zu einigen *C. albicans*-Genen sind keine *S. cerevisiae*-Homologe bekannt und da *S. cerevisiae* menschliches Gewebe weder besiedelt noch penetriert, spielen diese Gene möglicherweise eine Rolle in der Interaktion mit dem Wirt. Durch Deletion, Überexpression oder Mutation können die Gene auf ihre Funktion untersucht werden. Auch die Anwendung von Transkriptionsprofilen kann bei der Analyse der Genfunktion wichtige Hinweise geben.

### Gendeletionen

Trotz der oben genannten Schwierigkeiten werden Methoden für genetische Untersuchungen in *C. albicans* ständig weiterentwickelt und verbessert. Standardmethode für die Konstruktion von Knockout-Mutanten in *C. albicans* war lange Zeit die „*URA*-blaster“-Strategie. Die Methode basiert auf dem Ersetzen beider zu deletierender Allele durch den *URA3*-Marker im Uridin auxotrophen Stamm CA14, in dem beide Kopien des *URA3*-Gens zerstört sind. Dabei wird eine recycelbare Kasette, die den *URA3*-Marker mit flankierenden Kopien des bakteriellen *hisG*-Gens und Sequenzen, die homolog zur 5'- und 3'-Region des zu deletierenden Gens sind, enthält, über homologe Rekombination in eins der Allele eingebracht. Die Uridin-prototrophen Transformanten können so von *ura3*-negativen Ausgangsstämmen selektiert werden. Durch spontane intrachromosomale Rekombination zwischen den flankierenden *hisG*-Sequenzen wird der *URA3*-Marker ausgeschnitten, wobei das zu deletierende Gen zerstört bleibt. Die so erhaltenen *ura3*-negativen Transformanten werden auf 5-Fluororotsäure selektiert und können einer zweiten Runde der Mutagenese mit derselben Kasette unterzogen werden [34].

Wegen einiger Nachteile eines auxotrophen Markers (zusammengefasst in Reuß *et al.* (2004) [102]) wurden Methoden entwickelt, die es erlauben, unter der Verwendung von dominanten Selektionsmarkern Knockout-Mutanten direkt von einem wildtypischen Ausgangsstamm herzustellen. Als erster dominanter Selektionsmarker wurde von Wirsching *et al.* (2000) [145] der

*MPA<sup>R</sup>*-Marker, der Resistenz gegen Mycophenolsäure verleiht, verwendet. Die Deletionskassette, der *MPA<sup>R</sup>*-Flipper, bestand ähnlich zum „*URA*-Blaster“ aus einem dominanten Selektionsmarker mit einem *C. albicans*-angepassten *FLP*-Gen (*caFLP*), das für eine site-spezifische Rekombinase (*FLP*) codiert, unter der Kontrolle des induzierbaren *SAP2*-Promotors. Ist die Kassette in eins der Zielallele integriert, wird die *FLP*-Expression durch die Induktion des *SAP2*-Promotors induziert, was zur Exzision der Kassette führt [146]. Die *MPA<sup>R</sup>*-flipping Methode wurde unter anderem erfolgreich verwendet, um die Rolle von Effluxpumpen in *C. albicans* und *C. dubliniensis* zu untersuchen [77, 128, 146, 147]. Nachteile dieser Methode sind der zeitliche Aufwand, positive *MPA*-resistente Transformanten zu identifizieren, und die Tatsache, dass der *MPA<sup>R</sup>*-Marker aus der Sequenz eines Zielenzym der Mycophenolsäure abgeleitet ist und an dessen Stelle ins Genom integriert anstatt in den Locus des Zielgens [145].

Mittlerweile ist für die gezielte Gendeletion in *C. albicans* der *SAT1*-Flipper eine beliebte Methode. In 2004 optimierten Reuß *et al.* das *FLP*-vermittelte Markerrecycling mit einem neuen Selektionsmarker, dem *caSAT1*-Marker, der für eine Streptothricin-Acetyltransferase codiert und Resistenz gegen Nourseothricin verleiht [102]. Vom Aufbau und der Verwendung gleicht die *SAT1*-Flipper-Kassette dem *MPA<sup>R</sup>*-Flipper, enthält nur anstelle des *MPA<sup>R</sup>*-Markers den *caSAT1*-Marker und *caFLP* befindet sich anstelle des *SAP2*- unter der Kontrolle des *MAL2*-Promotors. Da der *MAL2*-Promotor „leaky“ ist, d.h. unter nicht-induzierenden Bedingungen nicht vollständig abgeschaltet ist, ist eine Induktion mit Maltose nicht nötig. Der *SAT1*-Flipper wird ohne Selektionsdruck bei Inkubation in YPD-Medium ausgeschnitten, zurück bleibt eine Kopie der *FRT*-site. Die Herstellung einer homozygoten Knockout-Mutante, die sich nachher nur durch das Fehlen der Zielgene von dem wildtypischen Ausgangsstamm unterscheidet, erfordert zwei Runden der Integration und Exzision der *SAT1*-Flipper-Kassette. Vorteil des *SAT1*-Flippers gegenüber dem *MPA<sup>R</sup>*-Flipper ist der weniger hohe zeitliche Aufwand, positive Transformanten zu selektieren, und die höhere Spezifität der Integration der Kassette in den Ziellocus. Die Verwendung des *SAT1*-Flippers erlaubt die funktionelle Analyse spezifischer Gene durch Deletion und Komplementation direkt im wildtypischen Stamm und umgeht somit die Probleme, die mit der Benutzung von auxotrophen Markern und auxotrophen Stämmen einhergehen [102].

### Genexpressions-Systeme

Zwar ist die Deletion von Genen für die Analyse von deren Funktionen unverzichtbar, jedoch ist sie selbsterklärend für essentielle Gene nicht anwendbar. Um die Funktion dieser essentiellen Gene zu untersuchen, ist die Modifikation der Genexpression eine wichtige Methode. Jedoch ist die Anzahl der Expressionssysteme in *C. albicans* limitiert. Verschiedene konstitutiv aktive, induzierbare und reprimierbare Promotoren, die die Genexpression regulieren, stehen zur Ver-

fügung [23]. So wurde in dieser Arbeit zum Beispiel für die konstitutive Expression von Genen der *ADH1*-Promotor verwendet.

Nakayama *et al.* entwickelten im Jahr 2000 ein Tet-Off-System für den Gebrauch in *C. albicans* [85]. Das System basiert auf der in *E. coli* charakterisierten Expression der Tetracyclin-Resistenzgene auf dem *Tn10*-Transposon [148]. Das zu untersuchende *C. albicans* Gen steht dabei unter der Kontrolle eines Minimalpromotors, in welchem alle aktivierenden Sequenzen durch die Tetracyclin-Operatorsequenz *tetO* ersetzt wurden. Ein Tetracyclin-kontrollierter Transaktivator (tTA), bestehend aus dem Tetracyclin-Repressor (TetR) aus *E. coli* und der Aktivierungsdomäne eines Transkriptionsaktivators, bindet in Abwesenheit von Doxycyclin (Dox) an *tetO* und ermöglicht so die Transkription des zu untersuchenden Gens. Bei der Zugabe von Dox bindet dieses mit hoher Affinität an den Aktivator, der daraufhin vom *tetO* dissoziiert, was zu einer Repression der Genexpression führt [85]. Mit diesem Tet-Off-System können durch die Verminderung der Expression Informationen über die Funktion von essentiellen Genen gewonnen werden.

Ebenso wichtig für das Untersuchen von Genfunktionen ist die Induktion der Genexpression. Park *et al.* entwickelten 2005 ein Tet-induzierbares Expressionssystem, bei dem ein reverser TetR (rtetR), der nur in Anwesenheit von Dox an *tetO* bindet, verwendet wurde [93]. Ein *C. albicans*-angepasster rtTA (rtetR in Fusion mit der Gal4-Aktivierungsdomäne) wird unter der Kontrolle des konstitutiv aktiven *ADH1*-Promotors exprimiert. Unter der Kontrolle des Promotors  $P_{tet}$  mit der Operatorsequenz *tetO* befindet sich ein *C. albicans*-adaptiertes *GFP*-Reporter gen, durch dessen Expression die Tet-induzierte Genexpression quantifiziert werden kann [93]. In der vorliegenden Arbeit wurde dieses Tet-On-System in einer abgewandelten Form verwendet (siehe 2.2.2).

### Genomweite Expressionsanalysen

Ein weiterer Vorteil der Verfügbarkeit der kompletten *C. albicans*-Genomsequenz ist die wesentlich vereinfachtere Herstellung von DNA-Microarrays für Genexpressionsanalysen. Die Erstellung von Expressionsprofilen erlaubt es, die relative Häufigkeit von tausenden mRNAs zum selben Zeitpunkt unter bestimmten Bedingungen zu ermitteln. So kann man sich auf Gene konzentrieren, die dann am stärksten exprimiert werden, wenn der Organismus auf ein bestimmtes Signal reagiert, z.B. einem Medikament ausgesetzt ist. Es gibt eine relativ große Auswahl an Arrayformaten, die sich bezüglich des Array-Substrates und der Größe und der Synthese der gespotteten DNA unterscheiden (zusammengefasst in Lorenz (2007) [67]). Cowen *et al.* veröffentlichten als erstes Studien mit Microarrays, die das gesamte *C. albicans*-Genom umfassen [22]. Durch die Erstellung von Genexpressionsprofilen haben sie Gene identifiziert, die eine Rolle in der Resistenzentwicklung gegen Fluconazol spielen. Schnelle Veränderungen in der

Genexpression als Antwort auf äußere Bedingungen verleihen *C. albicans* eine außergewöhnliche Anpassungsfähigkeit. Mit genomweiten Expressionsanalysen lassen sich solche Veränderungen sehr gut beobachten. Welche Gene als Antwort auf antimykotische Substanzen reguliert werden und in die Entwicklung von Resistenzen involviert sind, welche Faktoren eine Rolle bei der Infektion spielen und in den Wechsel von der Hefe- in die Hyphenform oder in die Biofilmentwicklung involviert sind, sind zum Beispiel Fragestellungen, bei denen genomweite Expressionsprofile Anwendung gefunden haben. Durch den Vergleich sequenzierter Genome mittels Microarray können auch Spezies-spezifische Gene identifiziert werden.

Microarrays, die das gesamte *C. albicans*-Genom umfassen, werden auch für eine Methode namens ChIP-on-chip verwendet (siehe auch Material und Methoden Abschnitt 4.7.16), die Chromatin-Immunopräzipitation mit der Hybridisierung auf Microarrays vereint. Mit dieser Methode lassen sich *in vivo*-Bindestellen eines bestimmten Proteins identifizieren. In dieser Arbeit wurde die ChIP-on-chip Analyse angewendet, ein *in vivo*-Bindeprofil des Zinc-Cluster-Transkriptionsfaktors Mrr1 im gesamten *C. albicans*-Genom zu erstellen.

### 1.1.3. Vergleich zwischen *C. albicans* und *C. dubliniensis*

*C. dubliniensis* wurde erstmals 1995 als eigene Spezies beschrieben und weist trotz eindeutiger Unterschiede im Karyotyp und im genetischen Fingerabdruck eine sehr hohe Homologie zu *C. albicans* auf [133]. Ein Vergleich der Genomsequenzen von *C. albicans* und *C. dubliniensis* ergab, dass von den 5569 orthologen Genpaaren 44,4% (2470) in der Nukleotidsequenz zu mehr als 90% und 96,3% (5362) zu mehr als 80% identisch waren [49].

Aufgrund der phänotypischen Ähnlichkeit, einschließlich der Ausbildung von Keimschläuchen und der Produktion von Chlamydosporen, wird die Hefe in der Diagnostik häufig mit *C. albicans* verwechselt [39]. Während *C. albicans* jedoch nur eine terminale Chlamydospore an den Enden längerer Hyphen und Pseudohyphen bildet, produziert *C. dubliniensis* am Ende kurzer stark verzweigter Pseudohyphen stetig massenweise Chlamydosporen, die häufig in Dupletts oder Tripletts angeordnet zu beobachten sind [133]. Die Chlamydosporenbildung kann angewendet werden, die beiden Spezies voneinander zu unterscheiden. Auf Staibagar wächst *C. dubliniensis* filamentös und bildet Chlamydosporen, während *C. albicans* glatte Kolonien aus Hefezellen formt [129].

Weitere phänotypische Unterschiede zwischen *C. dubliniensis* und *C. albicans* zeigen sich z.B. in der Kohlenstoffassimilation oder in der Farbe der Kolonien auf bestimmten Medien. Außerdem weist *C. dubliniensis* eine geringere Toleranz gegenüber erhöhten Temperaturen, osmotischem Druck und oxidativem Stress auf [119, 132]. Folglich gibt es für die Unterscheidung der beiden nahe verwandten Spezies in der Diagnostik eine Reihe phänotypischer Tests. Jedoch sind nur

wenige dieser Tests zu 100 % verlässlich, sodass immer mehr als eine Methode angewendet werden sollte [132]. Eine sehr verlässliche Methode ist die PCR, die auf der Amplifikation spezies-spezifischer Sequenzen basiert [60]. Genetische Verfahren wie RFLPs und Sequenzanalysen liefern zwar genaue Ergebnisse, sind aber als Routineverfahren in der Diagnostik zu aufwendig, sodass wahrscheinlich noch einige *C. dubliniensis* Isolate missidentifiziert werden. *C. dubliniensis* wird meist aus HIV-infizierten Patienten mit oropharyngealer Candidiasis isoliert. Im Gegensatz dazu ist sie aber für nur ca. 2 % der systemischen *Candida*-Infektionen verantwortlich, während *C. albicans* mit ca. 65 % den größten Anteil zu verantworten hat [99]. Dieser Unterschied in der Fähigkeit der beiden Spezies Infektionen zu verursachen spiegelt sich auch in vergleichenden Studien mit Infektionsmodellen wieder. Diese zeigten, dass *C. albicans* deutlich pathogener war als *C. dubliniensis* [130, 143]. Trotz genotypischer und phänotypischer Gemeinsamkeiten scheint *C. albicans* gegenüber *C. dubliniensis* einen Wettbewerbsvorteil in der Besiedlung und Infektion des Menschen zu haben. Worin dieser besteht, ist bisher nicht geklärt worden. Obwohl die Genomsequenzen der beiden Spezies sehr homolog sind, konnten 168 *C. albicans*-spezifische Gene identifiziert werden, die in *C. dubliniensis* nicht vorkommen. Sie codieren unter anderem für Hyphen-spezifische Virulenzfaktoren, wie z.B. für die Mitglieder der *SAP*-Genfamilie Sap5 und Sap6 und die Oberflächenproteine Als3 und Hyr1 [49]. Möglicherweise trägt das Fehlen dieser Gene in *C. dubliniensis* zur geringeren Virulenz bei, die Gründe für die Unterschiede in der Virulenz sind jedoch komplexer und nicht auf einen einfachen Defekt in *C. dubliniensis* zurückzuführen.

#### 1.1.4. Antimykotika

Homologe Gene, die in allen Pilzen vorkommen, besonders diejenigen, die für das Wachstum des Pilzes essentiell sind, stellen ein ideales Angriffsziel für Breitspektrum-Antimykotika dar. Insbesondere Gene, zu denen es kein Homolog im Menschen gibt, werden wegen der geringen Nebenwirkungen gern als Target für die Entwicklung antimykotischer Medikamente genutzt. Für die Behandlung von Pilzinfektionen stehen sieben unterschiedliche Medikamentenklassen zur Verfügung, die sich in Bezug auf Wirkungsweise und Wirkziel unterscheiden.

##### **Polyene**

Polyene binden an Ergosterol, das Hauptsterol in der Pilzmembran, und formen Poren, was die Permeabilität der Membran erhöht und zum Verlust von Zellbestandteilen und somit zum Tod der Zelle führt [73]. Die wichtigsten Vertreter der Polyene sind Amphotericin B und Nystatin. Amphotericin B war lange Zeit das am häufigsten verwendete Medikament bei systemischen Pilzinfektionen. Zwar ist die Resistenzentwicklung in Pilzen gegen Amphotericin B gering, auf-



grund der starken Nebenwirkungen, z.B. besonders hohe Nephrotoxizität, wird es heute meist nur noch als Reserveantimykotikum eingesetzt. In den letzten Jahren wurden jedoch besser verträgliche Präparate entwickelt, in denen Amphotericin B mit Fettmolekülen kombiniert vorliegt [75].

### 5-Flucytosin

Das Basenanalogen 5-Flucytosin (5-FC) wird durch eine Cytosin-Permease in die Pilzzelle aufgenommen und sofort von der Cytosin-Deaminase zu 5-Fluor-Uracil deaminiert. Durch die UMP-Pyrophosphorylase wird das 5-Fluor-Uracil zu 5-Fluoro-Uridinmonophosphat umgewandelt und dann weiter zu 5-Fluoro-Uridintriphosphat phosphoryliert. Der Einbau von 5-Fluoro-UTP in die RNA bewirkt eine fehlerhafte RNA-Synthese [98]. Die zusätzliche Umwandlung von 5-Fluor-Uracil zu 5-Fluor-dUMP resultiert in einer Inhibierung der Thymidylat-Synthase, was eine Inibierung der DNA-Synthese und der Zellteilung zur Folge hat [98]. Da die Pilze häufig eine Resistenz gegen 5-FC entwickeln, wird es meist in Kombination mit anderen Antimykotika verabreicht. 5-FC wirkt nur gering gegen filamentöse Pilze und Dermatophyten, was an der fehlenden Cytosin-Deaminase liegen könnte [30, 113]. Auch Säugerzellen fehlt dieses Enzym, was die geringe Toxizität von 5-FC für den Menschen erklärt [47].

### Azole

Häufig werden Medikamente eingesetzt, die die Biosynthese von Ergosterol hemmen, einem essentiellen Bestandteil der Pilzzellmembran. Da Ergosterol im Säugerorganismus nicht vorkommt, bietet dessen Biosynthese an verschiedenen Schritten ein ideales Ziel zur Behandlung von Pilzinfektionen. Azole z.B. inhibieren die Sterol 14 $\alpha$ -Demethylase (Erg11), was zu einem Mangel an Ergosterol und einer Ansammlung toxischer methylierter Sterole in der Zelle führt [113]. Bei den Azolen unterscheidet man die Imidazole (z.B. Ketokonazol, Miconazol, Clotrimazol), die oberflächlich bei Infektionen der Haut oder Schleimhaut verwendet werden, von den Triazolen (z.B. Fluconazol, Voriconazol, Itraconazol), die bei Infektionen der Schleimhaut und auch bei systemischen Mykosen verabreicht werden.

### Allylamine, Thiocarbamate und Morpholine

Allylamine (z.B. Terbinafin) und Thiocarbamate (z.B. Tolnaftat) hemmen die Ergosterol Biosynthese an einem frühen Schritt durch die Inhibierung der Squalenepoxidase (Erg1) und Morpholine (z.B. Fenpropimorph) hemmen die Enzyme  $\Delta^{14}$ -Reduktase (Erg2) und  $\Delta^8$ - $\Delta^7$ -Isomerase (Erg24). Allylamine, Thiocarbamate und Morpholine haben zwar ein breites Wirkungsspektrum, werden aber hauptsächlich oberflächlich bei Infektionen mit Dermatophyten angewendet [87].

## Echinocandine

Vertreter der Klasse der Echinocandine, z.B. Caspofungin oder Miconazole, wirken negativ auf die Zellwandsynthese, indem sie die  $\beta$ -1,3-D-Glucansynthase hemmen. Sie werden gegen invasive *Candida*- und *Aspergillus*-Infektionen verabreicht, zeigen jedoch keine Wirkung gegen *Cryptococcus* und die meisten Schimmelpilze [95].

## 1.2. Resistenzmechanismen

### 1.2.1. Allgemeine Resistenzmechanismen

Pilze können gegen alle unter 1.1.4 genannten Medikamente spezifische Resistenzmechanismen entwickeln. Obwohl eine Resistenz gegen Amphotericin B nur selten vorkommt, kann ein Mangel an Ergosterol in der Pilzmembran zu geringerer Anfälligkeit gegenüber Polyenen führen [89]. Eine Resistenz gegen 5-FC kann durch Mutationen in Proteinen, die die Pyrimidin-Wiederverwertung (salvage pathway) regulieren, auftreten [47] oder eine Resistenz gegen Echinocandine kann die Folge von Mutationen in Untereinheiten des  $\beta$ -1,3-D-Glukansynthase-Komplexes sein [95].

Resistenzen gegen Azole treten insbesondere in HIV-Patienten mit wiederkehrenden oropharyngealen oder ösophagealen *C. albicans*-Infektionen auf [25]. Ein häufiger Mechanismus klinischer Azol-Resistenz sind Veränderungen im Sterolbiosyntheseweg. Die Inhibierung von Erg11 führt nicht nur zu einem Mangel an Ergosterol sondern auch zu einer Ansammlung eines methylierten Sterols, welches das Wachstum hemmt. Änderungen im Sterolbiosyntheseweg, die die Akkumulation dieses toxischen Sterols verhindern, können eine Resistenz bewirken. Die Inaktivierung des *ERG3*-Gens z.B., das für die Sterol- $\Delta^{5,6}$ -Desaturase codiert, führt zu einer Akkumulation von 14 $\alpha$ -Methylfecosterol, unter dessen Anwesenheit Wachstum möglich ist [53]. Genetische Mutationen im Zielenzym Erg11, die eine geringere Affinität des Enzyms zum Azol bewirken, können zu einer Azol-Resistenz führen [54, 55, 61]. Auch eine Überexpression von Erg11, sodass die Konzentration des Antimykotikums nicht ausreicht, Erg11 und somit die Ergosterol-Biosynthese zu inhibieren, kann die Ursache einer Resistenz gegen Azole sein [27]. Aktivierende Mutationen im Transkriptionsfaktor Upc2 (Uptake control) konnten als Ursache für die *ERG11*-Überexpression identifiziert werden [28]. Da Upc2 nicht nur *ERG11* sondern auch andere *ERG*-Gene reguliert, die in die Ergosterol-Biosynthese involviert sind, kann es zu Kreuzresistenzen kommen. Zum Beispiel kann zusätzlich zur Azol-Resistenz eine Resistenz gegen Terbinafin auftreten, wenn auch das Terbinafin-Target Erg1 überexprimiert wird (siehe 1.1.4).

### 1.2.2. Effluxpumpen

Pilze können auch Resistenzen gegen multiple strukturell unterschiedliche Antimykotika mit verschiedenen Wirkmechanismen entwickeln, indem sie Effluxpumpen überexprimieren. Diese sind in der Cytoplasmamembran lokalisiert und pumpen Medikamente sowie andere toxische Substanzen (Xenobiotika) und endogene Metabolite aus der Zelle heraus. Bisher konnten zwei unterschiedliche Typen von Effluxpumpen identifiziert werden. Man unterscheidet die ABC (ATP binding cassette)-Transporter, die die Energie für den Transport aus ATP ziehen, von den Major Facilitator Superfamily (MFS)-Transportern, die den Protonengradienten entlang der Cytoplasmamembran als Energiequelle nutzen [26].

*C. albicans* exprimiert zwei hoch homologe (84 %) ABC-Transporter, *Candida drug resistance 1* (Cdr1) und Cdr2, die in die Resistenz gegen Azole und andere toxische Substanzen involviert sind. *CDR1* ist homolog zu *PDR5* (pleiotropic drug resistance) aus *S. cerevisiae* und wurde entdeckt, da es die Cycloheximid-Empfindlichkeit der *S. cerevisiae pdr5Δ* Mutante komplementierte [100]. Dass die Expression von *CDR1* in dieser Mutante zusätzlich die Resistenzen gegen einige andere Medikamente erhöhte [100] und dass die Deletion von *CDR1* in *C. albicans* zur Überempfindlichkeit gegen alle getesteten Azole und andere Inhibitoren führte [116], wie auch die Tatsache dass die *CDR1* Überexpression in erhöhter Resistenz resultierte [88], ließ vermuten, dass *CDR1* ein Multidrug-Resistenz-Gen ist. *CDR2* wurde ebenfalls aufgrund seiner Fähigkeit, die Fluconazol-Hypersensitivität der *S. cerevisiae pdr5Δ* Mutante zu komplementieren, entdeckt [117]. Weitere ABC-Transporter aus *C. albicans*, wie z.B. Cdr3 und Cdr4, scheinen nicht in die Azol-Resistenz involviert zu sein [5, 35].

Zwei Effluxpumpen der Major Facilitator Superfamily, die antimykotische Stoffe transportieren, wurden bisher in *C. albicans* beschrieben. *FLU1* (fluconazole resistance) komplementierte in *S. cerevisiae pdr5Δ* Mutanten die Fluconazol-Sensitivität und verlieh Resistenz gegen weitere toxische Substanzen, nicht aber gegen Itraconazol und Ketokonazol [14]. Die Deletion von *FLU1* in *C. albicans* resultierte hingegen in höherer Sensitivität gegen Mycophenolsäure und nur leichter Resistenz gegen alle drei Azole, nicht aber gegen andere toxische Substanzen. Die Tatsache, dass in *flu1Δ* Mutanten keine Fluconazol-Akkumulation beobachtet werden konnte, zeigte, dass die leichte Azol-Sensitivität nicht auf *FLU1*-vermittelten Efflux zurückzuführen war. In Fluconazol-resistenten Isolaten war eine erhöhte *FLU1*-Expression nicht zu beobachten, was bedeutet, dass dieser Transporter wahrscheinlich keine Rolle in der Resistenz in klinischen Isolaten spielt [14].

Der erste in pathogenen Pilzen überhaupt charakterisierte MFS-Transporter und im Zusammenhang mit der Resistenz in *C. albicans* bedeutendste Transporter ist die *MDR1* (multidrug resistance)-Effluxpumpe. Da *MDR1* in *S. cerevisiae* in der Lage war, Resistenz gegen Benomyl

und Methotrexat zu verleihen, bekam es die Bezeichnung *BEN<sup>r</sup>* [33]. Erst als gefunden wurde, dass die Inaktivierung des Gens in *C. albicans* in erhöhter Empfindlichkeit der Zellen gegenüber verschiedenen antimykotischen Substanzen, nicht aber gegenüber Benomyl, resultierte, wurde es umbenannt in *CaMDR1* [38]. *MDR1* wird unter Standardbedingungen in sensitiven *C. albicans*-Isolaten nur minimal exprimiert, weshalb die Inaktivierung des Gens in einem solchen Stamm keine Fluconazol-Hypersensitivität zur Folge hatte [83]. Die Deletion von *MDR1* in Fluconazol-resistenten *MDR1*-überexprimierenden klinischen Isolaten resultierte hingegen in einem partiellen Verlust der Fluconazol-Resistenz [146]. Auch die Überexpression von *MDR1* in *C. albicans* zog eine erhöhte Resistenz gegen Fluconazol, Cerulenin, Brefeldin A und 4-NQO nach sich, was belegte, dass *MDR1* Multidrug-Resistenz in *C. albicans* verleihen kann [43].

Die Transporter Cdr1, Cdr2 und Mdr1 sind demnach die wichtigsten Effluxpumpen, die in *C. albicans* in die Resistenz gegen Azole involviert sind. Mdr1 scheint ein begrenztes Substratspektrum zu haben, transportiert z.B. Fluconazol und Voriconazol, nicht aber Itraconazol und Miconazol, während Cdr1 und Cdr2 generell ein breiteres Substratspektrum aufweisen (zusammengefasst in Cannon *et al.* [15]).

Auch in anderen *Candida*-Spezies wurden *CDR1*-, *CDR2*- und *MDR1*-Homologe entdeckt, die mit einer Resistenz in Zusammenhang stehen. In *C. glabrata* zum Beispiel existieren die Effluxpumpen *CgCDR1*, *CgCDR2* (auch *CgPDH1*) und *CgSNQ2*, von denen in Azol-resistenten klinischen Isolaten mindestens eine hochreguliert ist [74, 115, 137, 142]. Die Resistenz in klinischen *C. dubliniensis*-Isolaten hingegen ist meist die Folge einer *MDR1*-Überexpression [94] und die Inaktivierung von *MDR1* in solchen Stämmen resultierte in einer Abnahme der Resistenz [147]. *CDR1*- und *CDR2*-vermittelte Resistenz scheint in *C. dubliniensis* eine eher geringe Rolle zu spielen, da *CDR1* in vielen *C. dubliniensis*-Stämmen eine Nonsense-Mutation trägt und *CDR2* nur in geringen Mengen exprimiert wird [97]. In Azol-resistenten Stämmen mit einem funktionellen *CDR1*-Gen konnte jedoch ebenfalls eine *CDR1*- bzw. *CDR2*-Überexpression beobachtet werden [97].

## 1.3. Regulation der Effluxpumpen und Zinc-Cluster-Transkriptionsfaktoren

### 1.3.1. *Cis*-regulatorische Elemente

Es konnte gezeigt werden, dass nicht Mutationen im Promotor für die Überexpression von Effluxpumpen in *C. albicans* verantwortlich sind sondern Mutationen in *trans*-regulatorischen Faktoren, die allerdings in diesen Studien nicht identifiziert wurden [24, 145]. De Micheli

*et al.* beschrieben ein drug-responsive element (DRE) in der Promotorregion von *CDR1* und *CDR2*, welches essentiell für die Hochregulierung der Effluxpumpen durch Östradiol und andere induzierende Substanzen ist [24]. Die Deletion des DRE in resistenten klinischen *C. albicans*-Isolaten resultierte in einer Abnahme bzw. einer Aufhebung der Aktivität der Promotoren, was nahelegt, dass *trans*-regulatorische Faktoren, die an dieses Element binden, für die Expression der Effluxpumpen verantwortlich sind [24].

Im *MDR1*-Promotor wurden in mehreren Studien unabhängig voneinander drei solcher *cis*-regulatorischen Elemente identifiziert. Der Bereich zwischen den Nukleotiden -399 und -299 in Bezug auf das Startcodon ist essentiell für die Benomyl-induzierte Expression von *MDR1* [40, 44]. Harry *et al.* und Rognon *et al.* identifizierten die Nukleotide von Position -601 bis -500 als notwendig für die *MDR1*-Induktion durch  $H_2O_2$  und andere oxidierende Substanzen, weswegen dieser Bereich als HRE ( $H_2O_2$  response element) bezeichnet wurde [40, 106]. Zudem beinhaltet die Region eine Bindestelle für Cap1, ein bZIP-Transkriptionsfaktor, der die Reaktion auf oxidativen Stress in *C. albicans* reguliert. Sie konnten keine Relevanz des Bereiches für die Benomyl-induzierte und die konstitutive *MDR1*-Expression feststellen. Hiller *et al.* hingegen stellten fest, dass dieser Bereich für die *MDR1*-Induktion durch Benomyl notwendig ist [44]. Sie identifizierten zusätzlich einen dritten aktivierenden Bereich von Position -287 bis -209, der für die konstitutive Hochregulierung von *MDR1* in einem Fluconazol-resistenten Stamm notwendig war, allerdings nur, wenn eine der beiden anderen Regionen fehlte.

Riggle und Kumamoto haben gezeigt, dass das aktivierende Element zwischen -295 und -261 (MDRE) notwendig für die *MDR1*-Überexpression in *in vitro* generierten Fluconazol-resistenten Stämmen war [105]. Zwar führte die Fusion dieses Elements mit einem nicht-funktionellen *CDR2*-Promotorfragment zur Aktivierung des Promotors in einem *MDR1*-überexprimierenden Stamm, nicht aber in einem *CDR2*-überexprimierendem oder einem Fluconazol-sensitiven Stamm. Die Inaktivierung des Elements im *MDR1*-Promotor mit gesamter Länge hatte jedoch keine Auswirkungen auf dessen Aktivität, was dafür spricht, dass weitere Upstream-Regionen eine konstitutive Hochregulierung von *MDR1* in diesen Stämmen vermitteln können [105]. Rognon *et al.* identifizierten denselben Bereich (-296 bis -260) als essentiell für die konstitutive Hochregulierung von *MDR1* in Fluconazol-resistenten Stämmen und die Benomyl-induzierte *MDR1*-Expression in Fluconazol-sensitiven Stämmen und nannten ihn daher BRE (benomyl response element) [106].

Verschiedene *cis*-aktivierende Regionen im *MDR1*-Promotor scheinen also eine Benomyl-induzierte *MDR1*-Expression vermitteln zu können, die abhängig ist von den experimentellen Induktionsbedingungen.

### 1.3.2. Zinc-Cluster-Proteine

Verschiedene Studien zeigten, dass Zinc-Cluster-Transkriptionsfaktoren Gene regulieren, die in die Azol-Resistenz involviert sind [21, 82, 124].

Zinc-Cluster-Proteine gehören zur Klasse der Zinc-Finger-Proteine, existieren ausschließlich in Pilzen und haben das hochkonservierte  $CysX_2CysX_6CysX_{5-12}CysX_2CysX_{6-8}Cys$ -Motiv gemeinsam. Sechs Cysteinreste binden an zwei Zinkatome und vermitteln die Faltung der DNA-Bindedomäne, die bis auf wenige Ausnahmen in der N-terminalen Region des Transkriptionsfaktors lokalisiert ist. Zinc-Cluster-Proteine können mit der DNA als Monomer, als Homodimer oder als Teil eines heterodimeren Komplexes interagieren [136]. Viele Studien haben gezeigt, dass Zinc-Cluster-Transkriptionsfaktoren als Homodimer an CGG-Triplets binden, wobei die Orientierung (evertiert, invertiert, direct repeats) und der Abstand der Triplets für die Bindung entscheidend sind [71]. Gal4 aus *S. cerevisiae* zum Beispiel, das die Transkription von Genen aktiviert, die in den Glucosekatabolismus involviert sind, ist das erste beschriebene und am intensivsten untersuchte Zinc-Cluster-Protein und bindet als Homodimer an invertierte CGG-Repeats mit einem Abstand von 11 Basenpaaren [72]. Tac1 (Transcriptional activator of *Candida* drug resistance genes) aus *C. albicans* hingegen bindet in vielen Promotoren seiner Zielgene das DRE-like Motiv  $CGGN_4CGG$  [66]. Neben dem Zinc-Finger gehören zur DNA-Bindedomäne ein Linker, dessen Struktur innerhalb der Zinc-Cluster-Proteine stark variiert, und eine Dimerisierungsregion aus Heptaden-Repeats, welche eine hochkonservierte coiled-coiled Struktur formen, die sehr wahrscheinlich für die Dimerisierung und für Protein-Protein-Interaktionen verantwortlich ist [71].

Zwischen der N-terminalen DNA-Bindedomäne und der C-terminalen sauren Region, die häufig als aktivierende Domäne agiert, befindet sich die „middle homology region“ (MHR) [71]. Diese ca. 80 Aminosäuren lange Pilz-spezifische Transkriptionsfaktordomäne ist innerhalb der Proteinklasse weniger homolog. Dass Deletionen in der MHR häufig eine konstitutive Aktivität des Proteins bewirken, lässt vermuten, dass die MHR eine Rolle in der Regulation dieser Transkriptionsfaktoren spielt [71].

Die C-terminale Region unterscheidet sich innerhalb der Zinc-Cluster-Transkriptionsfaktoren sowohl in Funktion als auch in der Struktur. Zum Beispiel wurden gain-of-function Mutationen in diesem Bereich beschrieben, die für die konstitutive Aktivität des Transkriptionsfaktors verantwortlich waren [19, 20, 28, 29, 152]. Silver *et al.* fanden in der Aktivierungsdomäne von Upc2 Motive einer Transmembrandomäne, was sie vermuten ließ, dass der Transkriptionsfaktor in der Cytoplasmamembran verankert ist, bevor er abgespalten und in den Nukleus transportiert wird [124]. Dagegen sprechen jedoch die Ergebnisse von Znaidi *et al.*, dass ein C-terminales HA-Epitop Upc2 konstitutive Aktivität verleiht [153].

### 1.3.3. Zinc-Cluster-Proteine in *C. albicans*

Durch Sequenzvergleiche mit der hochkonservierten DNA-Bindedomäne aus *S. cerevisiae* wurden im gesamten *C. albicans*-Genom 77 putative ORFs ermittelt, die für Zinc-Cluster-Proteine codieren [11]. Nur wenigen dieser ORFs konnte bisher eine spezifische Funktion zugeordnet werden, wie z.B. die Regulation von Genen, die in die Resistenz oder die Ergosterol-Biosynthese involviert sind.

Zwei Zinc-Cluster-Transkriptionsfaktoren spielen eine wichtige Rolle bei der Entwicklung der Azol-Resistenz in *C. albicans*, indem sie die Expression der Effluxpumpen kontrollieren. Tac1 reguliert die Expression der ABC-Transporter *CDR1* und *CDR2* [21] und Mrr1 (Multidrug resistance regulator) die Expression des MFS-Transporters *MDR1* [82]. Als Reaktion auf induzierende Substanzen vermitteln diese Transkriptionsfaktoren die Hochregulierung der oben genannten Zielgene.

#### Tac1

Die Tatsache, dass das DRE in den Promotoren von *CDR1* und *CDR2* verantwortlich für die induzierte Hochregulierung dieser beiden Transporter ist und CGG-Triplets in direct repeats aufweist, ließ vermuten, dass es sich bei dem DRE um eine Bindestelle für Zinc-Cluster-Transkriptionsfaktoren handelt [24, 71]. Dass einige Azol-resistente *C. albicans*-Stämme homozygot für den mating type locus (*MTL*) auf Chromosom 5 waren, führte zu der Vermutung, dass Gene, die in der Nähe des *MTL* liegen, eventuell in die Azol-Resistenz involviert sind und dass der Verlust der Heterozygotie einen Anstieg in der Resistenz bewirkt [108]. Coste *et al.* suchten im gesamten *C. albicans*-Genom nach Genen mit putativem Zinc-Cluster, die sich in den Regionen um den *MTL*-Locus befinden. Die Deletion eines dieser Gene resultierte in einem Verlust der Fluphenazin-induzierten *CDR1*- und *CDR2*-Hochregulierung und wurde daher Tac1 (Transcriptional activator of *CDR1* genes) genannt [21]. Tatsächlich war ein GST-Tac1-Fusionsprotein in der Lage, an das DRE zu binden. Die Expression eines *TAC1*-Alleles mit einer aktivierenden Mutation in einem Azol-sensitiven Stamm war verantwortlich für die konstitutive Hochregulierung von *CDR1* und *CDR2*. Das und die Tatsache, dass die Deletion eines der beiden *TAC1*-Gene in einem Verlust der *CDR1*- und *CDR2*-Hochregulierung resultierte, belegte, dass Tac1 ein wichtiger Regulator der Multidrug-Resistenz ist [21]. Mittels Transkriptions- und Expressionsprofilen sowie ChIP-on-chip Experimenten wurden neben *CDR1* und *CDR2* noch weitere Tac1-Targets identifiziert, z.B. *PDR16*, ein Phosphatidylinositol-Transporter, und *TAC1* selbst, in deren Promotorregionen ein DRE-like Element zu finden war [21, 65, 152]. Es konnte gezeigt werden, dass *CDR1/2*-überexprimierende Stämme gain-of-function Mutationen in *TAC1* aufweisen, was zu einer konstitutiven Aktivität des Transkriptionsfaktors führte

[19, 20, 152]. Die Expression mutierter Allele in Azol-sensitiven Stämmen bewirkte eine konstitutive Überexpression von *CDR1* und *CDR2* und eine Multidrug-Resistenz und die Deletion von *TAC1* in Azol-resistenten Isolaten zog einen Verlust der *CDR1/2*-Überexpression und der Resistenz nach sich [20, 152]. Diese Resultate identifizierten Tac1 als zentralen Regulator der *CDR1/2*-vermittelten Multidrug-Resistenz.

### Mrr1

Der Zinc-Cluster-Transkriptionsfaktor *MRR1* wurde bei einer genomweiten Expressionsanalyse identifiziert, da er in unterschiedlichen Fluconazol-resistenten klinischen *C. albicans*-Isolaten zusammen mit *MDR1* hochreguliert war [82]. Die Deletion von *MRR1* in resistenten Isolaten resultierte in einer Aufhebung der *MDR1*-Expression und einer Resistenz [82]. Außerdem konnten durch Sequenzvergleiche der resistenten mit den zugehörigen sensitiven *MRR1*-Allelen gezeigt werden, dass die resistenten Isolate homozygot für *MRR1*-Allele mit einem einzelnen Basenaustausch geworden sind. Die Expression dieser mutierten Allele in einem sensitiven Stamm resultierte in einer *MDR1*-Überexpression und einer Resistenz [82]. Durch den Vergleich von Transkriptionsprofilen wurden noch weitere Gene identifiziert, die von Mrr1 kontrolliert werden und eventuell eine Rolle in der Resistenz gegen antimykotische Substanzen spielen [82]. Der Fakt, dass die Deletion von *MRR1*-Allelen, die eine gain-of-function Mutation tragen, die Sensitivität gegenüber Fluconazol mehr erhöhte als die Deletion des *MDR1*-Gens selbst, spricht für eine Beteiligung weiterer Mrr1-regulierter Gene, die in die Resistenz involviert sind [82]. Alle bisher untersuchten *MDR1*-überexprimierenden Fluconazol-resistenten *C. albicans*-Stämme, sowohl klinische Isolate als auch *in vitro* generierte Stämme, wiesen gain-of-function Mutationen in *MRR1* auf, was eine konstitutive Aktivität des Transkriptionsfaktors bewirkte [29, 82].

### Upc2

Wie schon erwähnt sind Veränderungen in der Ergosterol-Biosynthese, die die biochemische Umwandlung von Acetyl-CoA in Squalen und die anschließende Transformation von Squalen in Ergosterol umfasst, ein weiterer Resistenzmechanismus in *C. albicans*, in den Zinc-Cluster-Transkriptionsfaktoren involviert sind. Ergosterol ist zu Cholesterin in Säugerzellen analog und somit ein wichtiger Bestandteil der Pilzzellmembran, der zur Fluidität und Integrität der Membran sowie zur korrekten Funktion von Membran-gebundenen Enzymen beiträgt [69]. Die Überexpression von Upc2, ein Ortholog zu Upc2 und Ecm22 aus *S. cerevisiae*, die die Expression der *ERG*-Gene regulieren [70, 124], machte die Zellen resistent gegenüber Azolen [70]. Zellen hingegen, in denen *UPC2* deletiert wurde, waren sensitiv gegenüber verschiedenen antimykotischen Substanzen, wie z.B. Azolen [70, 124]. Aktivierende Mutationen in Upc2



können eine konstitutive Aktivität des Transkriptionsfaktors und somit eine Überexpression von *ERG11* und eine Resistenz gegen Fluconazol zur Folge haben [29, 41, 46]. Auch ein Anstieg des *MDR1*-mRNA-Level konnte beobachtet werden [29]. Andere *ERG*-Gene (z.B. *ERG2*, *ERG10*), die bei Behandlung mit Azolen hochreguliert waren [65], wurden ebenfalls von Upc2 gebunden [153]. Interessanterweise agiert Upc2 nicht nur als transkriptioneller Aktivator sondern auch als Repressor, was von der Art des aktivierenden Signals abhängt. Unter Sauerstoffmangel fungierte er z.B. als Aktivator von *MDR1* und bei Behandlung mit Lovastatin als Repressor von *MDR1* und *CDR1* [153]. Upc2 scheint sich selbst ebenfalls zu regulieren, da es an seinen eigenen Promotor bindet [153].

#### 1.3.4. Zinc-Cluster-Proteine in anderen *Candida*-Spezies

In *C. glabrata* wurde ein Zinc-Cluster-Transkriptionsfaktor mit Homologie zum den aus *S. cerevisiae* bekannten Transkriptionsfaktoren *PDR1* und *PDR3* identifiziert. Die Inaktivierung von *CgPDR1* resultierte in reduzierter *CDR1*-, *CDR2*- und *SNQ2*-Expression und erhöhter Anfälligkeit gegenüber Azolen und anderen Medikamenten [138, 141]. Dessen künstliche Überexpression hatte eine starke Hochregulierung der Effluxpumpen und einen Anstieg der Resistenz zur Folge [137, 138, 141]. Es konnte gezeigt werden, dass auch in *CgPDR1* gain-of-function Mutationen für die Überexpression von *CDR1*, *CDR2* und *SNQ2* verantwortlich sind und somit Resistenz gegen antimykotische Substanzen vermitteln [32, 138, 141].

#### 1.3.5. Aktivierung der Zinc-Cluster-Transkriptionsfaktoren

Bisher ist nicht geklärt, wie diese Zinc-Cluster-Transkriptionsfaktoren durch induzierende Substanzen oder gain-of-function Mutationen tatsächlich aktiviert werden.

Die Aktivität vieler Zinc-Cluster-Proteine wird durch die Bindung induzierender Moleküle reguliert [71]. Zum Beispiel sind xenobiotische Substanzen für die Aktivierung der paralogen Transkriptionsfaktoren Pdr1 und Pdr3 in *S. cerevisiae* bzw. Pdr1 in *C. glabrata* verantwortlich. Pdr1 und Pdr3 kontrollieren die Expression mehrerer Effluxpumpen (z.B. *PDR5*, *SNQ2*) und gleichen somit funktionell Tac1 und Mrr1 aus *C. albicans*. Es konnte gezeigt werden, dass Medikamente und andere toxische Substanzen an die xenobiotische Bindedomäne (XBD) in Pdr1/Pdr3 binden und somit eine Konformationsänderung hervorrufen, dass die C-terminale Aktivierungsdomäne mit der Gal11-Untereinheit des Mediatorkomplexes interagieren kann, was zu einer Rekrutierung der RNA-Polymerase II zu den Promotoren der Zielgene von Pdr1/Pdr3 führt [135]. Mutationen oder Deletionen innerhalb dieser negativ regulierenden Domäne bewirken eine konstitutive Aktivität der Transkriptionsfaktoren, was darauf hinweist, dass diese inhi-

bitorische Domäne den Transkriptionsfaktor in Abwesenheit von induzierenden Substanzen in einem aktiven Zustand hält [71]. Gain-of-function Mutationen in der XBD in CgPdr1 bewirken durch Nachahmen einer Bindung xenobiotischer Substanzen eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors. Andere Mutationen in der Region, die mit Gal11 interagiert, sind eventuell für die Interaktion des Transkriptionsfaktors mit dem Mediator Komplex unter nicht-induzierenden Bedingungen verantwortlich [32]. Ob Mrr1 und Tac1 eventuell auf eine ähnliche Weise aktiviert werden, ist bisher nicht bekannt. Tac1 wird vermutlich erst aktiviert, nachdem es an die Promotoren der Zielgene gebunden hat, da es im Nucleus lokalisiert ist und auch in Abwesenheit induzierender Substanzen oder aktivierender Mutationen an die Zielgene bindet [21, 66].

Es ist zwar bekannt, dass in *C. albicans* Tac1 in Anwesenheit von Fluphenazin und Östradiol *CDR1* und *CDR2* hochreguliert [24] und Benomyl und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> die Mrr1-abhängige *MDR1*-Expression induzieren [82, 106], jedoch ist bisher nicht geklärt, ob diese induzierenden Substanzen direkt an die Zinc-Cluster-Transkriptionsfaktoren binden oder auf indirektem Weg deren Aktivierung verursachen.

Für Tac1 konnte bereits die Funktionalität der N-terminalen DNA-Bindedomäne experimentell bestätigt werden, da ein Tac1-GST Fusionsprotein, das die DNA-Bindedomäne enthält, in der Lage war, an das DRE zu binden [21]. Auch wenn man aufgrund des Zn<sub>2</sub>Cys<sub>6</sub>-Motivs eine N-terminale DNA-Bindedomäne vorhersagen kann, wurden funktionelle Domänen in *MRR1* bisher nicht experimentell bestimmt. Gain-of-function Mutationen, die eine konstitutive Aktivität von Mrr1 bewirken, sind in unterschiedlichen Regionen des Transkriptionsfaktors zu finden, jedoch nicht in vorhergesagten Domänen wie der DNA-Bindedomäne und der MHR [28]. Vermutlich beeinflussen sie Aminosäuren, die in Abwesenheit von induzierenden Substanzen den Transkriptionsfaktor in einer inaktiven Form halten [81].

## 1.4. weitere Transkriptionsfaktoren

### Cap1

Cap1 (*C. albicans* AP-1), ein bZIP-Protein, ist der erste Transkriptionsfaktor, der mit Multidrug-Resistenz in *C. albicans* in Verbindung gebracht wurde [2]. Cap1 ist hoch homolog zu Yap1 aus *S. cerevisiae* und wurde isoliert, da es bei Überexpression in *S. cerevisiae* den Zellen Resistenz gegen Fluconazol verlieh [1]. Cap1 ist essentiell für die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Toleranz in *C. albicans* und ein C-terminal verkürztes, hyperaktives *CAP1* (*CAP1-TR*) resultierte in einer Resistenz gegenüber Fluconazol und einer Überexpression von *MDR1*, nicht aber von *CDR1* [2]. Es konnte gezeigt werden, dass Cap1 notwendig ist für die die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierte *MDR1*-Expression in Fluconazol-resistenten Stämmen und zur Benomyl-induzierten *MDR1*-Expression beiträgt

[106, 151]. Benomyl verursacht ebenfalls oxidativen Stress und aktiviert in *S. cerevisiae* das Cap1 Homolog Yap1 [68]. Cap1 bindet *in vivo* an den *MDR1*-Promotor [151]. Bei Aktivierung akkumuliert Cap1 im Nukleus, bindet dort an den *MDR1*-Promotor und induziert die *MDR1*-Expression [151].

### Mcm1

Mcm1 ist ein MADS-Box-Transkriptionsfaktor, der sowohl reprimierend als auch aktivierend in viele zelluläre Prozesse involviert ist, meist indem er co-regulatorische Proteine zu den jeweiligen Promotoren rekrutiert [139]. Im BRE bzw. dem MDRE im *MDR1*-Promotor befindet sich eine Mcm1-Bindestelle [106]. Mutationen in diesem Bereich, die dazu führten, dass Mcm1 nicht mehr binden konnte, resultierten in einer Aufhebung der *MDR1*-Expression. Das und die Tatsache, dass auch eine Verringerung der Mcm1-Expression einen Verlust der *MDR1*-Aktivierung zu Folge hatte, demonstrierte, dass Mcm1 in die Regulation der *MDR1*-Expression durch das MDRE involviert ist [105].

## 1.5. Zielsetzung der Arbeit

Um eine positive Wirkung der derzeit gegen *C. albicans* verwendeten Antimykotika zu erhalten, ist es ein wichtiges Forschungsziel, die Resistenzmechanismen in diesem Hefepilz zu bekämpfen. Ein vielversprechendes Target, auch für die Entwicklung neuer antimykotischer Substanzen, bieten dabei die Effluxpumpen und deren transkriptionelle Regulatoren.

Zinc-Cluster-Transkriptionsfaktoren spielen eine wichtige Rolle in der Regulation von Genen, die in die Resistenzentwicklung in *C. albicans* involviert sind. Bisher ist nicht bekannt, wie Zinc-Cluster-Transkriptionsfaktoren durch induzierende Substanzen oder gain-of-function Mutationen in einen aktivierten Zustand gelangen. Ein Hauptziel der vorliegenden Arbeit war es, funktionelle Bereiche in Mrr1, der die Expression der *MDR1*-Effluxpumpe reguliert, zu identifizieren.

Durch Deletionsstudien sollte herausgefunden werden, welche Domänen für die Aktivierung des Transkriptionsfaktors bei Zugabe der induzierenden Substanz Benomyl verantwortlich sind und welche Domänen unter nicht induzierenden Bedingungen für die Repression der Mrr1-Aktivität benötigt werden. Außerdem sollte untersucht werden, welche Regionen im N-Terminus notwendig sind, den Transkriptionsfaktor an den Promotor des *MDR1*-Gens zu dirigieren.

Auch von anderen Transkriptionsfaktoren, wie z.B. Cap1 und Upc2, weiß man, dass sie in die *MDR1*-Regulation verwickelt sind, da sie an den *MDR1*-Promotor binden [151, 153]. Das lässt vermuten, dass Cap1 und Upc2 ebenfalls eine wichtige Rolle in der Regulation der *MDR1*-

Expression spielen und dass eventuell aktivierende Mutationen auch in diesen Transkriptionsfaktoren die Ursache für *MDR1*-abhängige Resistenz sein könnten. Auch die Tatsache, dass Mrr1 und Cap1 zum Teil dieselben Targets zu kontrollieren scheinen [82, 151], lässt vermuten, dass die beiden Transkriptionsfaktoren miteinander kooperieren. Um einen ersten Einblick in das regulatorische Netzwerk der *MDR1*-Expression und die Resistenz in *C. albicans* zu bekommen, sollte in dieser Arbeit untersucht werden, inwiefern die Aktivität von Mrr1 von Cap1 und Upc2 abhängt und ob wiederum Cap1 und Upc2 unabhängig von Mrr1 eine *MDR1*-Hochregulierung und eine Resistenz verursachen können.

Da neben der *MDR1*-Effluxpumpe noch weitere Mrr1-regulierte Gene zur Fluconazol-Resistenz in *C. albicans* beizutragen scheinen [82], sollten durch ChIP-on-chip Experimente und Transkriptionsprofile Gene identifiziert werden, die *in vivo* von Mrr1 gebunden und auch hochreguliert werden. Ob die Abwesenheit von Cap1 dabei eine Rolle spielt, sollte in diesem Zusammenhang ebenfalls untersucht werden. Die Analyse der ChIP-on-chip Daten, d.h. der von Mrr1 gebundenen Sequenzen, sollte Aufschluss über ein mögliches Mrr1-Bindemotiv geben.

Zusammenfassend war es Ziel der vorliegenden Arbeit, mit der funktionellen Analyse des Zinc-Cluster-Transkriptionsfaktors *MRR1* einen erheblichen Beitrag zum Verständnis der Entwicklung der Multidrug-Resistenz in *C. albicans* zu leisten. Wie Mrr1 in Anwesenheit von induzierenden Substanzen aktiviert wird, wie gain-of-function Mutationen den Transkriptionsfaktor konstitutiv aktivieren und inwiefern Mrr1 mit weiteren *MDR1*-Regulatoren, insbesondere Cap1, die Expression seiner Zielgene induziert, sollte im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden.

## 2. Ergebnisse

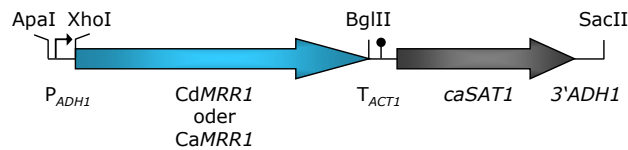
### 2.1. Gain-of-function Mutationen in *MRR1* aus *Candida dubliniensis*

Die konstitutive Überexpression der Effluxpumpen *CDR1*, *CDR2* und *MDR1* ist die Hauptursache für eine Resistenz gegen Fluconazol und andere toxische Substanzen in *C. albicans* [80, 94, 113]. In *C. dubliniensis* konnten zwar Homologe zu diesen Genen identifiziert werden [78], da aber *CDR1* in den meisten *C. dubliniensis*-Stämmen durch eine Punktmutation inaktiv ist und *CDR2* nur gering exprimiert wird, ist hauptsächlich die *MDR1*-Überexpression für die Fluconazol-Resistenz in *C. dubliniensis* verantwortlich [77, 94, 147]. In *C. albicans* reguliert der Transkriptionsfaktor Mrr1 die Expression der *MDR1*-Effluxpumpe und vermittelt eine Resistenz gegen unterschiedliche antimykotische Substanzen [82]. In allen bisher untersuchten klinischen und *in vitro* generierten *MDR1*-überexprimierenden Fluconazol-resistenten Isolaten bewirken gain-of-function Mutationen in *MRR1* eine konstitutive Aktivität des Transkriptionsfaktors [28]. Eine Fluconazol-Resistenz in *C. dubliniensis*-Stämmen ist leicht *in vitro* in Anwesenheit des Antimykotiums zu induzieren [79]. Daher stellte sich die Frage, ob *C. dubliniensis* über zusätzliche Mechanismen verfügt, schnell eine *MDR1*-Überexpression zu induzieren oder die Hefe ein Ortholog des Transkriptionsfaktors Ca*MRR1* exprimiert und wenn ja, ob ebenfalls Mutationen in diesem Faktor für die *MDR1*-Überexpression verantwortlich sind.

#### 2.1.1. Identifikation eines Ca*MRR1*-Orthologs in *C. dubliniensis*

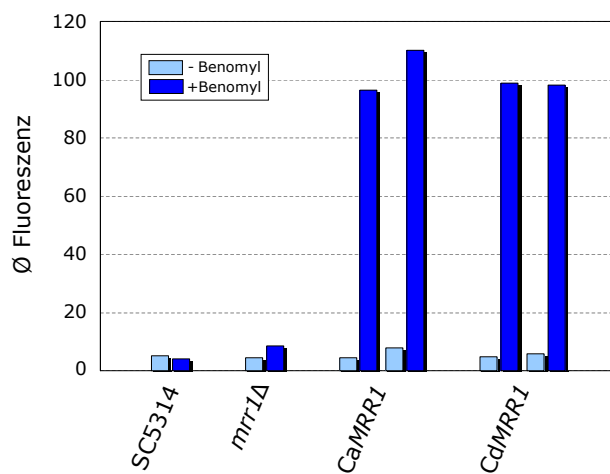
Die BLAST-Suche in der Genomsequenz von *C. dubliniensis* (<http://www.sanger.ac.uk/sequencing/Candida/dubliniensis/>) identifizierte einen ORF (Cd36\_85850), dessen 1100 Aminosäuren lange Sequenz zu 91 % mit der 1108 Aminosäuren langen Mrr1-Sequenz aus *C. albicans* übereinstimmte. Um zunächst zu untersuchen, ob es sich bei diesem Cd*MRR1*-Gen um ein Ortholog zu Ca*MRR1* handelt, wurde die entsprechende codierende Region aus dem Fluconazolsensitiven *C. dubliniensis*-Stammes CM1 mit den spezifischen Primern CdMRR1-1 und CdMRR1-2 amplifiziert und über die Schnittstellen XhoI und BglII in das Plasmid pADH1E1 kloniert

(Abb. 2.1). Die Sequenz des PCR-Produktes stimmte mit der Sequenz des *CdMRR1* aus der Genomdatenbank überein.



**Abbildung 2.1.: Konstrukt für die Expression der *CdMRR1*- und *CaMRR1*-Allele.** Die Expressionskassette enthält *MRR1*, was über die Schnittstellen *XhoI* und *BglII* eingefügt wurde, unter der Kontrolle des *ADH1*-Promotors sowie die Transkriptionsterminations-Sequenz des *ACT1*-Gens  $T_{ACT1}$ . Das *ApaI*-*SacII* Fragment wurde über homologe Rekombination der flankierenden *ADH*-Sequenzen, der Promotorregion  $P_{ADH1}$  und der  $3'ADH1$ -Region, in den *C. albicans ADH1*-Locus integriert. Die Selektion positiver Kolonien erfolgte über den Resistenzmarker *caSAT1*.

Über homologe Rekombination wurde das *ApaI*-*SacII* Fragment aus dem *pADH1E1*-Derivat in den *ADH1*-Locus der *C. albicans mrr1Δ* Mutante CAG48ZCF36M4B, die eine  $P_{MDR1}$ -*GFP*-Reporterfusion enthält, integriert. Die Identifikation positiver Transformanten erfolgte über die Selektion auf Nourseothricin-haltigen Agarplatten. Die erfolgreiche Integration der Expressionskassette wurde mit einem Southern Blot überprüft (nicht gezeigt). Nach der Restriktionsspaltung der genomischen DNA mit *NsiI*, konnte ein spezifisches Bandenmuster mit der  $5'ADH1$ - bzw. der  $3'ADH1$ -Sonde detektiert werden (siehe Abbildung 2.3).



**Abbildung 2.2.: *CdMRR1* komplementiert *C. albicans mrr1Δ* Mutante.**

Fluoreszenz von jeweils zwei unabhängigen *C. albicans mrr1Δ* Mutanten, die eine  $P_{MDR1}$ -*GFP*-Reporterfusion enthalten und *CaMRR1* bzw. *CdMRR1* unter der Kontrolle des *ADH1*-Promotors exprimieren. Der Ausgangsstamm CAG48MRR1M4B (*mrr1Δ*) und der Wildtypstamm SC5314 ohne ein *GFP*-Reporter gen als Kontrolle für die Hintergrundfluoreszenz dienten als Referenz. Die Stämme wuchsen in An- und Abwesenheit von Benomyl und die Fluoreszenz der Zellen wurde mittels FACS-Analyse bestimmt.

Ob das *CdMRR1*-Allel, das unter der Kontrolle des *ADH1*-Promotors exprimiert wurde, in der Lage war, die Mutante zu komplementieren und den *MDR1*-Promotor zu aktivieren, wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Wie in Abbildung 2.2 zu sehen ist, konnte *CdMRR1* mit der selben Effizienz wie *CaMRR1* die Benomyl-induzierte *MDR1* Expression in der *C. albicans mrr1Δ* Mutante aktivieren. Somit konnte gezeigt werden, dass *CdMRR1* ebenfalls die Expression der *MDR1*-Effluxpumpe reguliert und es sich daher um ein Ortholog zu *MRR1* aus *C. albicans* handelt.

### 2.1.2. Sequenzanalyse der Cd*MRR1*-Allele

In Fluconazol-resistenten *C. albicans*-Stämmen sind Mutationen in *MRR1* für die Überexpression der *MDR1*-Effluxpumpe verantwortlich [28]. Um zu untersuchen, ob ebenfalls Mutationen in Cd*MRR1* die *MDR1*-Überexpression in Fluconazol-resistenten *C. dubliniensis*-Stämmen verursachen, wurden *MRR1*-Allele aus *MDR1*-überexprimierenden Fluconazol-resistenten Isolaten kloniert und sequenziert. Zur Verfügung standen ein Fluconazol-resistentes klinisches Isolat (CM2), welches aus dem selben Patienten isoliert wurde wie der parentale Fluconazol-sensitiver Stamm CM1, und vier Stämme (CD57A und CD57B, CD51-IIA und CD51-IIB), die *in vitro* aus zwei Fluconazol-sensitiven klinischen Stämmen (CD57 bzw. CD51-II) durch serielle Kultivierung auf YPD-Agar mit ansteigenden Fluconazolkonzentrationen generiert wurden (siehe Tabelle 4.3) [78, 79].

Die Cd*MRR1*-Allele wurden, wie bereits unter 2.1.1 beschrieben, mit den Primern Cd*MRR1*-1 und Cd*MRR1*-2 amplifiziert, in das Plasmid pADH1E1 (Abb. 2.1) kloniert und sequenziert. Wie schon erwähnt entsprach die *MRR1* Sequenz des Fluconazol-sensitiven Stammes CM1 der des *MRR1*-Allels aus der *C. dubliniensis*-Genomsequenz. Das *MRR1*-Allel aus dem Fluconazol-resistenten Stamm CM2 war bis auf einen G-A Austausch an Position 2597, was einen Aminosäureaustausch von Cystein zu Tyrosin an Position 866 im Mrr1-Protein zur Folge hatte, mit dem *MRR1* aus dem verwandten Stamm CM1 identisch.

Die *MRR1*-Sequenz des Fluconazol-sensitiven Isolates CD57 wies einige Unterschiede zum *MRR1*-Allel aus der *C. dubliniensis*-Genomsequenz auf: drei stille Mutationen (G933A, G1419A, A2721G) und zwei Mutationen (G223A, T2503A), die in einem Aminosäureaustausch im Mrr1-Protein (G75R, S835T) resultieren. In den aus CD57 *in vitro* generierten Fluconazol-resistenten Isolaten CD57A und CD57B konnte dasselbe *MRR1*-Allel nachgewiesen werden. Jedoch wies *MRR1* aus CD57A zusätzlich eine C1784A- und *MRR1* aus CD57B eine C1121T-Substitution auf, die im Protein einen S595Y- bzw. einen T374I-Aminosäureaustausch zur Folge hatten.

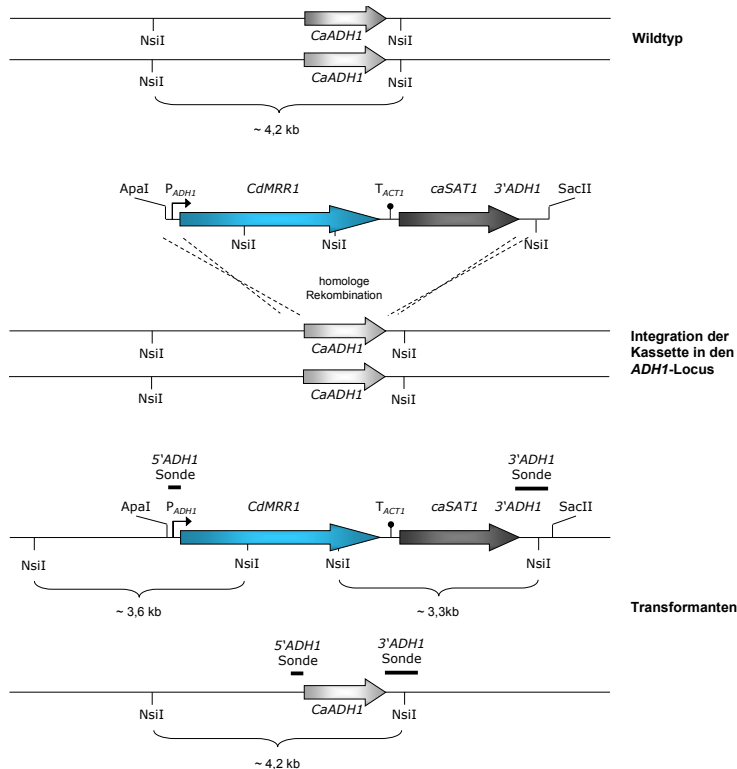
Das *MRR1*-Allel aus dem Fluconazol-sensitiven Isolat CD51-II war identisch mit *MRR1* aus CM1. Dasselbe Allel konnte auch aus den aus CD51-II *in vitro* generierten resistenten Stämmen CD51-IIA und CD51-IIB isoliert werden, jedoch wiesen diese zusätzlich noch kleine In-frame-Deletionen auf. Im *MRR1*-Allel aus CD51-IIA fehlten die 36 Nukleotide von Position 2959 bis 2994, die für die Aminosäuren D987 bis I998 codieren, und im *MRR1*-Allel aus CD51-IIB waren die drei Nukleotide von Position 2952 bis 2954 deletiert, was im Fehlen der Aminosäure T985 in Mrr1 resultierte.

Durch direktes Sequenzieren der PCR-Produkte konnte festgestellt werden, dass die resistenten Stämme alle homozygot für die beschriebenen Mutationen waren und diese Mutationen in den

sensitiven parentalen Stämmen nicht vorkamen. Es wurde gezeigt, dass in allen untersuchten Fluconazol-resistenten *C. dubliniensis*-Stämmen, die *MDR1* überexprimieren, Mutationen in *MRR1* vorhanden waren.

### 2.1.3. Einfluss der Mutationen in *CdMRR1* auf die *MDR1*-Expression und die Resistenz

Das Auftreten der unter 2.1.2 beschriebenen *MRR1*-Mutationen in Fluconazol-resistenten *MDR1*-überexprimierenden *C. dubliniensis*-Isolaten, ließ vermuten, dass diese Mutationen eine konstitutive Aktivität des Transkriptionsfaktors bewirken. Um das zu bestätigen, wurden die oben genannten *CdMRR1*-Allele wie in Abschnitt 2.1.1 beschrieben unter der Kontrolle des *ADH1*-Promotors in einer *C. albicans* *mrr1*Δ Mutante, die eine  $P_{MDR1}$ -*GFP*-Reporterfusion enthält, exprimiert und die positiven Transformanten selektiert.



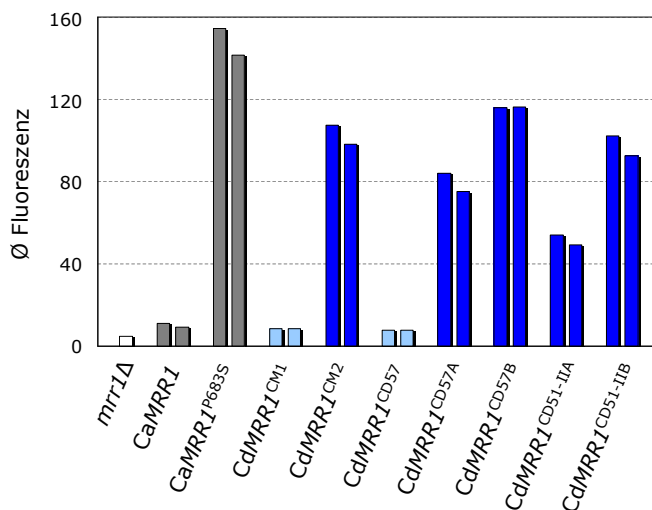
**Abbildung 2.3.: Integration der *CdMRR1*-Allele in den *C. albicans* *ADH1*-Locus.** Im *ADH1*-Locus befinden sich an den Positionen -2591 bzw. bei +1601 in Bezug auf das Startcodon *NsiI*-Schnittstellen. Nach dem Restriktionsverdau lässt sich sowohl mit der 5'- als auch mit der 3'*ADH1*-Sonde eine Bande bei ca. 4,2 kb detektieren. Die *ApaI*-*SacII* geschnittenen Expressionskassetten aus den *pADH1E1* Derivaten, die ein *CdMRR1*-Allel mit zwei weiteren *NsiI*-Schnittstellen und den *caSAT1*-Selektionsmarker enthalten, wurden über homologe Rekombination in den *C. albicans* *ADH1*-Locus integriert. Mit der 5'*ADH1*-Sonde konnte dann ein zusätzliches Fragment von ca. 3,6 kb und mit der 3'*ADH1*-Sonde ein Fragment von ca. 3,3 kb detektiert werden.

Die Transformation wurde mit einem Southern Blot überprüft (nicht gezeigt). Wie in Abbildung 2.3 zu sehen ist, weist *CdMRR1* im Gegensatz zu *CaMRR1* zwei *NsiI*-Schnittstellen auf. Das hatte zur Folge, dass durch den *NsiI*-Verdau der genomischen DNA der Transformanten, die das *CdMRR1*-Allel enthalten, mit der 3'*ADH1*-Sonde zusätzlich zum wildtypischen 4,2 kb



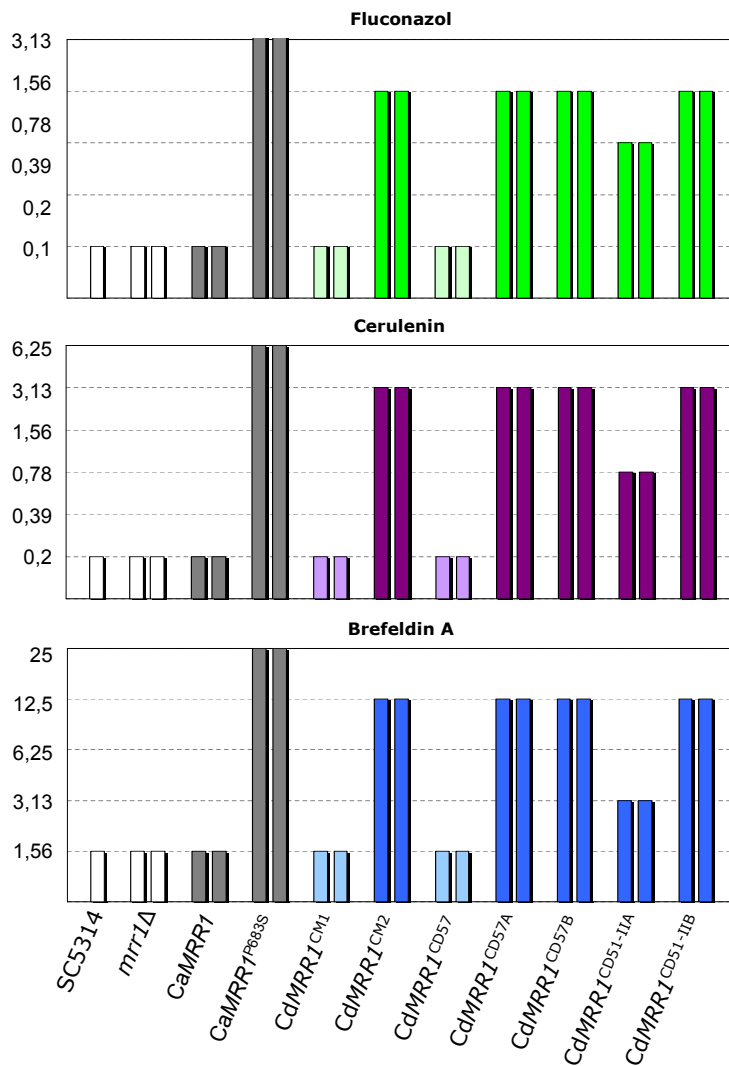
Fragment ein Fragment von ca. 3,3 kb und für Transformanten mit dem *CaMRR1*-Allel ein zusätzliches Fragment von ca. 8,6 kb detektiert werden konnte.

Die *CdMRR1*-Allele wurden auf ihre Fähigkeit, den *MDR1*-Promotor zu aktivieren, mittels FACS-Analyse untersucht. Da sich die *MRR1*-Allele aus den Fluconazol-sensitiven Stämmen CM1 und CD51-II in der Sequenz nicht unterschieden, wurde *CdMRR1* aus CM1 auch als Kontrolle für die Allele aus den Stämmen CD51-IIA und CD51-IIB verwendet. Außerdem wurden zum Vergleich das wildtypische *MRR1*-Allel und das konstitutiv aktive *MRR1*-Allel mit einer P683S-Mutation aus *C. albicans* [82] exprimiert und ein Stamm, in dem *MRR1* deletiert war als Kontrolle hinzugezogen. Wie Abbildung 2.4 zeigt, waren alle mutierten *CdMRR1*-Allele (*CdMRR1*<sup>CM2</sup>, *CdMRR1*<sup>CD57A</sup>, *CdMRR1*<sup>CD57B</sup>, *CdMRR1*<sup>CD51-IIA</sup>, *CdMRR1*<sup>CD51-IIB</sup>) in der Lage, den *MDR1*-Promotor konstitutiv zu aktivieren. Die nicht mutierten Allele aus den parental Stämmen (*CdMRR1*<sup>CM1</sup>, *CdMRR1*<sup>CD57</sup>) induzierten die *MDR1*-Expression nicht. Dieser Versuch belegte, dass es sich bei den Mutationen in den *CdMRR1*-Allelen aus Fluconazol-resistenten *MDR1*-überexprimierenden Isolaten um gain-of-function Mutationen handelte, die die konstitutive Aktivität des Transkriptionsfaktors bewirkten.



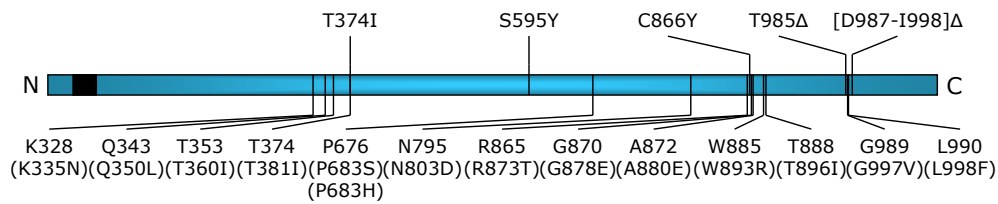
**Abbildung 2.4.: Mutationen in *CdMRR1* bewirken konstitutive Aktivität des *MDR1*-Promotors.** Die gezeigten *CaMRR1*- und *CdMRR1*-Allele wurden in einer *C. albicans* *mrr1Δ* Mutante, die *GFP* unter der Kontrolle des *MDR1*-Promotors enthält, exprimiert. Die Fluoreszenz wurde jeweils in zwei unabhängigen Transformanten mittels Durchflusszytometrie gemessen.

Um zu untersuchen, ob die Mutationen in den *CdMRR1*-Allelen nicht nur für die konstitutive Aktivierung des *MDR1*-Promotors sondern auch für die Resistenz verantwortlich sind, wurden die oben beschriebenen Allele in eine *C. albicans* *mrr1Δ* Mutante des Wildtypstammes SC5314 eingebracht. Die positiven Transformanten wurden wie oben beschrieben im Southern Blot identifiziert. Die Sensitivität der Transformanten gegenüber Fluconazol, Cerulenin und Brefeldin A wurde in einem MHK-Test bestimmt.



**Abbildung 2.5.: Mutationen in CdMRR1 verursachen Multidrug-Resistenz.** MHK (in µg/ml) von Fluconazol, Cerulenin und Brefeldin A für den Wildtypstamm SC5314, zwei unabhängige homozygote *mrr1Δ* Mutanten und jeweils zwei unabhängige Transformanten, die die angegebenen *MRR1*-Allele unter der Kontrolle des *ADH1*-Promotors exprimieren.

Wie Abbildung 2.5 zeigt, resultierte die Expression der mutierten Allele in einem 4- bis 8-fachen Anstieg der Resistenz gegen Fluconazol, einem 4- bis 16-fachen Anstieg der Resistenz gegen Cerulenin und in einem 2- bis 8-fachen Anstieg der Resistenz gegen Brefeldin A. Die entsprechenden nicht-mutierten Allele der parentalen Stämme hatten keinen Einfluss auf die Empfindlichkeit gegenüber den untersuchten Medikamenten. Dieser MHK-Test zeigte, dass mutierte *CdMRR1*-Allele, wenn sie in *C. albicans* exprimiert werden, eine Resistenz verursachen, was dafür spricht, dass diese Allele ebenso für die Resistenz in den *MDR1*-überexprimierenden *C. dubliniensis*-Stämmen verantwortlich sind. Mutationen in *MRR1* konnten als die Hauptursache der *MDR1*-Überexpression in *C. dubliniensis* identifiziert werden, was bestätigte, dass der Transkriptionsfaktor Mrr1 in *C. dubliniensis*, wie bereits in *C. albicans* gezeigt werden konnte [28, 82], eine zentrale Rolle in der Entwicklung der Resistenz spielt.



**Abbildung 2.6.: Positionen der gain-of-function Mutationen in CdMrr1.** Das Mrr1-Protein wird durch einen linearen Balken dargestellt. Der schwarze Bereich repräsentiert die N-terminale DNA-Bindedomäne. Die Mutationen, die während dieser Arbeit in den *MRR1*-Allelen Fluconazol-resistenter *C. dubliniensis*-Isolate identifiziert wurden, sind überhalb des Balkens zu finden. Gain-of-function Mutationen, die bereits aus *MRR1*-Allelen Fluconazol-resistenter *C. albicans*-Stämme bekannt sind, sind unterhalb des Balkens angezeigt. Die entsprechenden Positionen im *C. albicans* Mrr1 stehen in Klammern darunter.

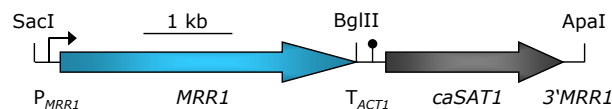
Abbildung 2.6 zeigt die in dieser Arbeit identifizierten gain-of-function Mutationen in CdMrr1, die in Fluconazol-resistenten *C. dubliniensis*-Stämmen eine *MDR1*-Überexpression bewirken, und die bisher bekannten aktivierenden Mutationen aus *MRR1* aus *C. albicans*. Es fällt auf, dass die Mutationen in einigen Bereichen, den sogenannten Hotspots, häufiger auftreten als in anderen. Um zu untersuchen, welche Rolle diese Regionen für die Funktionalität von Mrr1 spielen, wurde in dieser Arbeit CaMrr1 funktionell analysiert.

## 2.2. Funktionelle Analyse des Transkriptionsfaktors *MRR1* mittels Deletionsstudien

Ein Hauptziel dieser Arbeit war, funktionelle Domänen des Transkriptionsfaktors Mrr1 zu identifizieren, um Einblicke zu bekommen, wie dessen Aktivität reguliert wird. Dazu wurden in unterschiedlichen Versuchen C- und N-terminale Bereiche von *MRR1* deletiert sowie interne Deletionen eingefügt und die transkriptionelle Aktivität des verkürzten Transkriptionsfaktors bestimmt.

### 2.2.1. Analyse von Mrr1-Proteinen mit C-terminalen und internen Deletionen

Um Regionen zu identifizieren, die notwendig für die Aktivität des Transkriptionsfaktors Mrr1 sind, wurden Mrr1-Proteine mit seriellen C-terminalen Verkürzungen bzw. kleinen internen Deletionen in Bereichen, in denen aktivierende Mutationen häufig auftreten (Hotspots), auf ihre Fähigkeit untersucht, den *MDR1*-Promotor zu aktivieren.

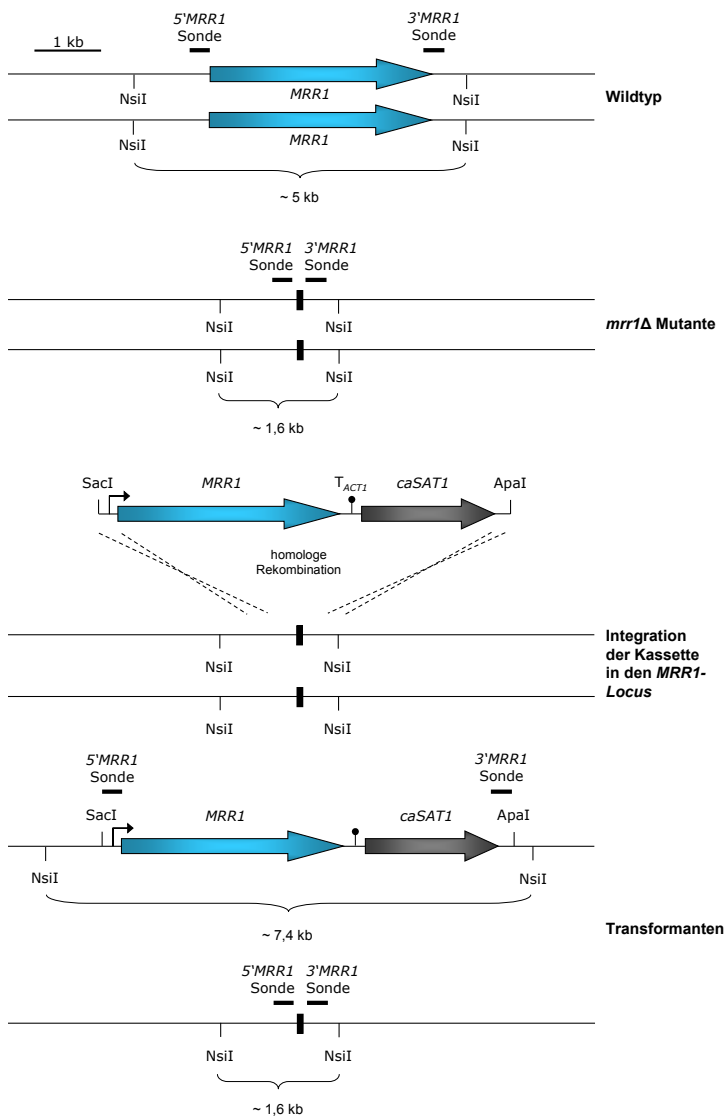


**Abbildung 2.7.: Aufbau des Inserts aus dem Plasmid pZCF36K2.** Das Plasmid pZCF36K2 enthält das wildtypische *MRR1*-Allel und diente sowohl als Template als auch als Expressionsvektor für *MRR1*-Allele mit C-terminalen bzw. internen Deletionen. Das Konstrukt enthält ausserdem den Transkriptionsterminator  $T_{ACT1}$  und den Selektionsmarker *caSAT1*. Über homologe Rekombination der *MRR1*-Promotorregion ( $P_{MRR1}$ ) und der 3'*MRR1*-Region wurde das *SacI*-*ApaI* Fragment in den *MRR1*-Locus eingebacht.

Die *MRR1*-Allelfragmente wurden mit spezifischen Primern und dem wildtypischen *MRR1* aus dem Plasmid pZCF36K2 als Template amplifiziert, mit dem entsprechend gespaltene pZCF36K2 ligiert und in *E. coli* exprimiert. Über die Schnittstellen *SacI* und *ApaI* wurden die Expressionskassetten aus den Plasmiden herausgeschnitten und über homologe Rekombination in den *MRR1*-Locus der *C. albicans mrr1*Δ Mutante integriert.

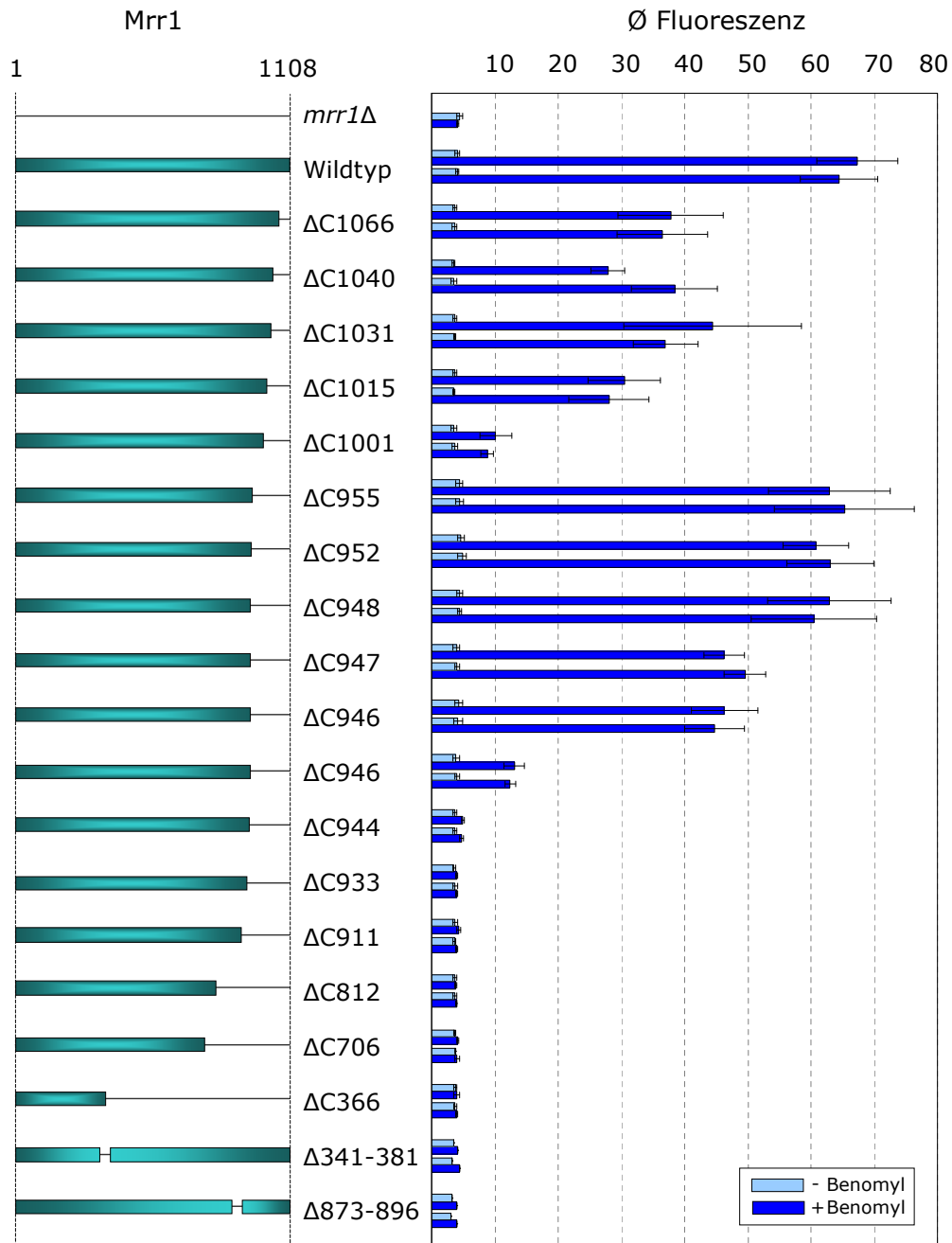
Die positiven Transformanten wurden mittels Southern Blot identifiziert (nicht gezeigt). Bei erfolgreicher Integration des *SacI*-*ApaI* Fragmentes in den *MRR1*-Locus, konnte nach dem Restriktionsverdau der genomischen DNA mit *NsiI* mit der 3'*MRR1*- bzw. der 5'*MRR1*-Sonde Fragmente von bestimmter Größe detektiert werden (siehe Integrationsschema 2.8).

Die Fähigkeit der modifizierten Allele, die  $P_{MDR1}$ -*caGFP*-Reporterfusion in Anwesenheit von Benomyl zu aktivieren, wurde mittels FACS-Analyse bestimmt (siehe Abb. 2.9). Keine der



**Abbildung 2.8.: Integration der verkürzten *MRR1*-Allele in den *MRR1*-Locus.** Im *MRR1*-Locus befinden sich NsiI-Schnittstellen an den Positionen -1132 und +3842 in Bezug auf das Startcodon, so dass sich nach einem Restriktionsverdau ein Fragment von ca. 5 kb, sowohl mit der 5'- als auch mit der 3'*MRR1*-Sonde, detektieren lässt. In der *mrr1Δ* Mutante hat das NsiI-Fragment eine Größe von ca. 1,6 kb. Bei erfolgreicher Integration der Expressionskassette (hier als Beispiel mit dem vollständigen *MRR1*-Allel) kommt es zu einem Shift und eine im Vergleich zum Wildtypsignal größere Fragment erscheint auf dem Southern Blot. Da die Expressionskassette nur in eines der beiden *MRR1*-Allele integriert, ist bei den Transformanten zusätzlich das *mrr1Δ* Fragment detektierbar.

Deletionsmutanten wies eine konstitutive Aktivität auf, da der *MDR1*-Promotor nur in Anwesenheit von Benomyl induziert wurde. Das Entfernen der letzten 42 ( $\Delta C1066$ ) bis 93 ( $\Delta C1015$ ) Aminosäuren resultierte in einer geringeren Mrr1-Aktivität, die verkürzten Proteine waren aber dennoch gut mit Benomyl induzierbar. Als kaum noch induzierbar erwies sich das Mrr1-Protein, dessen 107 C-terminale Aminosäuren deletiert wurden ( $\Delta C1001$ ), wohingegen Mrr1, dem zusätzlich noch 46 C-terminale Aminosäuren mehr fehlten ( $\Delta C955$ ), die Aktivität eines wildtypischen Mrr1 aufwies. Das *MRR1* <sup>$\Delta C946$</sup> -Allel verlieh ebenfalls fast noch vollständige Promotoraktivität, wohingegen das Entfernen von zwei weiteren Aminosäuren die *MDR1*-Induktion vollständig aufhob ( $\Delta C944$ ). Alle kürzeren Mrr1-Derivate, die in diesem Versuch getestet wurden, waren nicht mehr induzierbar. Kleine interne Deletionen der Hotspots ( $\Delta 342-381$  und  $\Delta 873-896$ ) resultierten in einem inaktiven Protein.

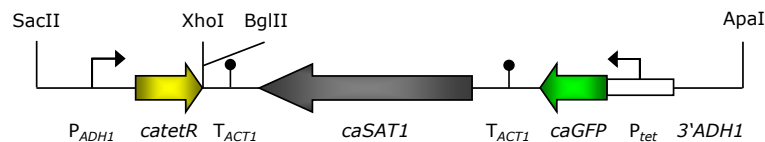


**Abbildung 2.9.: MDR1-Promotoraktivität in Abhängigkeit verkürzter Mrr1-Proteine.** Die dargestellten Mrr1-Proteine mit seriellen C-terminalen Verkürzungen bzw. kleinen internen Deletionen wurden im Reporterstamm CAG48MRR1M4B exprimiert und die MDR1-Promotoraktivität in zwei unabhängigen Transformanten (B1, B2) in An- und Abwesenheit von Benomyl (50 µg/ml) mittels Durchflusszytometrie quantifiziert. Die parentale *mrr1Δ* Mutante diente als Kontrolle. Die durchschnittliche Fluoreszenz und die Standardabweichung für die Stämme mit C-terminal verkürztem MRR1 wurde aus den Ergebnissen von drei unabhängigen Experimenten ermittelt. Stämme, die MRR1 mit internen Deletionen exprimieren, wurden nur einmal gemessen und weisen daher keine Standardabweichung auf.

Interessanterweise waren also Mrr1-Derivate, die noch einen großen Teil des C-Terminus aufwiesen ( $\Delta C1001$  bis  $\Delta C1066$ ), weniger aktiv als einige wesentlich kürzere Proteine ( $\Delta C946$  bis  $\Delta C955$ ). Das deutete darauf hin, dass der Bereich zwischen Aminosäure 956 und 1001 einen inhibitorischen Effekt auf die Mrr1-Aktivität hat. Die Ergebnisse ließen vermuten, dass die C-terminalen 107 Aminosäuren von Mrr1 eine Aktivierungsdomäne beinhalten, die notwendig für die effiziente Induktion durch Benomyl ist. Diese Region scheint jedoch verzichtbar zu sein, wenn die Aminosäuren 955 bis 1001 fehlen. Da die ersten 948 Aminosäuren für eine vollständige Aktivität des Transkriptionsfaktors ausreichen, müssen sie zusätzliche aktivierende und regulatorische Domänen umfassen.

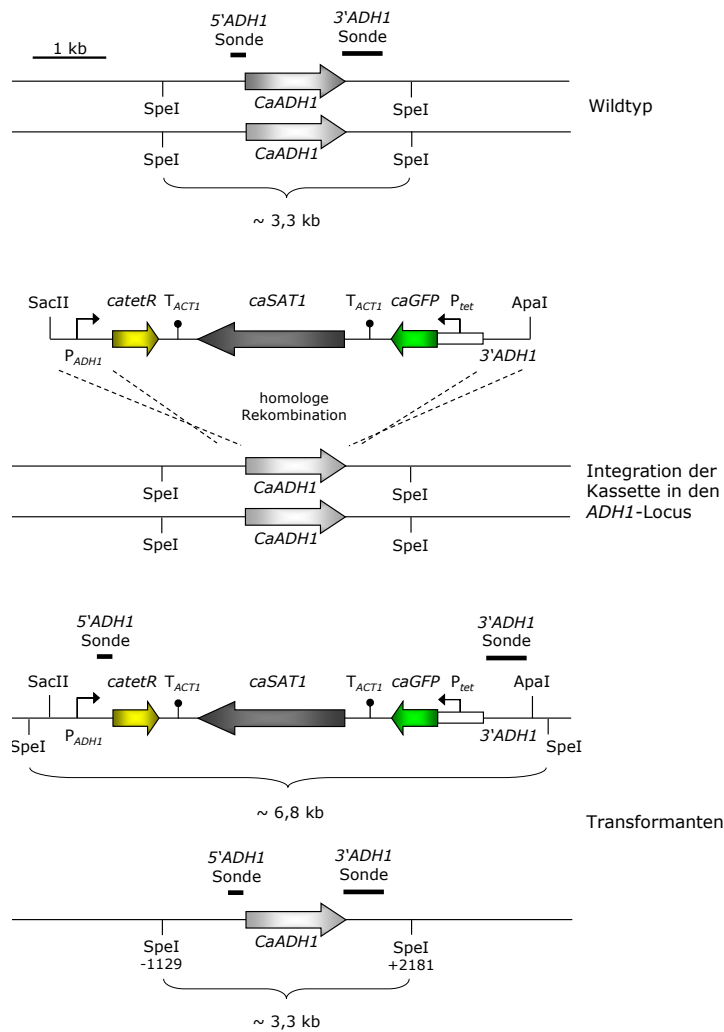
### 2.2.2. Transkriptionelle Aktivität von TetR-Mrr1 Fusionsproteinen

Um die minimale Länge des Transkriptionsfaktors weiterhin einzugrenzen, die für die Mrr1-Aktivität notwendig ist, wurden zusätzlich zu den Proteinen mit C-terminalen und internen Deletionen (Kapitel 2.2.1) auch N-terminal verkürzte und interne Mrr1-Fragmente auf die Fähigkeit, die Transkription zu aktivieren, untersucht. Das in der Einleitung beschriebene Tet-On-System wurde für diesen Versuch in einer abgewandelten Form verwendet. Um zu untersuchen, ob Mrr1 in der Lage ist, einem heterolog exprimierten DNA-Bindeprotein transkriptionelle Aktivität zu verleihen, wurden Mrr1-Fragmente ohne DNA-Bindedomäne mit einem *Candida*-adaptierten *tetR*-Gen (*catetR*) fusioniert und unter der Kontrolle des *ADH1*-Promotors exprimiert. Die Aktivität des Fusionsproteins wurde durch die Expression von *caGFP* unter der Kontrolle eines TetR-abhängigen Promotors ( $P_{tet}$ ) quantifiziert.



**Abbildung 2.10.: Aufbau des Inserts aus dem Plasmid pTET52.** Das Plasmid pTET52 enthält das *catetR*-Gen unter der Kontrolle des *ADH1*-Promotors und das *caGFP*-Reportergen unter der Kontrolle des TetR-abhängigen Promotors ( $P_{tet}$ ). Fusionen mit *catetR* wurden konstruiert, indem interne und N-terminal verkürzte *MRR1*-Fragmente bzw. die *GAL4AD* über die Schnittstellen XhoI und BglII in pTET52 integriert wurden. Über homologe Rekombination der flankierenden *ADH1*-Sequenzen konnten die SacII-ApaI Fragmente in den *ADH1*-Locus integrieren.

Die SacII-ApaI Fragmente aus den pTET52-Derivaten wurden in den *ADH1*-Locus des *C. albicans* Wildtypstamm SC5314 integriert. Die Identifikation der positiven Transformanten erfolgte mittels Southern Blot (siehe Schema 2.11). Nach dem Verdau der genomischen DNA mit SpeI konnte sowohl mit der 3'*ADH1*-Sonde als auch mit der 5'*ADH1*-Sonde bei den Transformanten



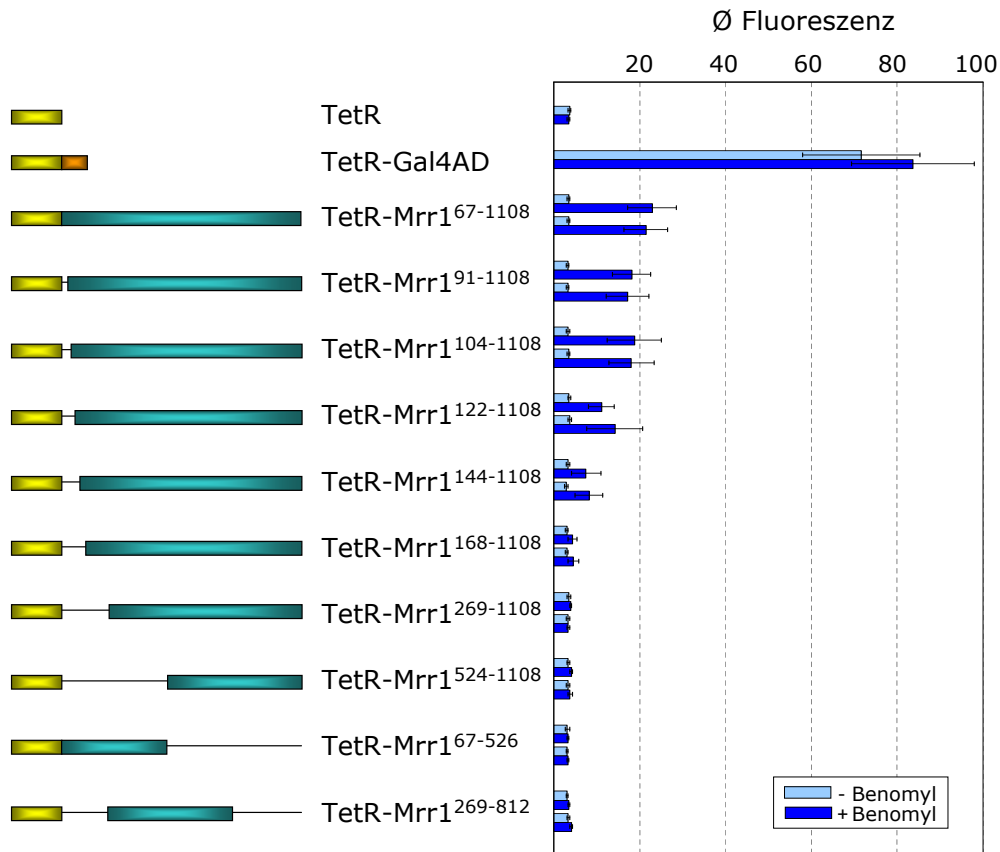
**Abbildung 2.11.: Integration der SacII-ApaI Fragmente aus den pTET52-Derivaten in den *C. albicans* *ADH1*-Locus.** Im *ADH1*-Locus befinden sich SpeI-Schnittstellen an den Positionen -1129 und +2181 in Bezug auf das Startcodon, sodass bei einem Restriktionsverdau ein ca. 3,3 kb großes Fragment entsteht, das sich sowohl mit der 5'- als auch mit der 3'*ADH1*-Sonde detektieren lässt. Bei erfolgreicher Integration der Expressionskassette (hier als Beispiel mit dem *catetR* als Insert) entsteht ein größeres Fragment von ca. 6,8 kb. Da die Expressionskassette nur in eines der beiden *MRR1*-Allele integriert, ist bei den Transformanten zusätzlich die wildtypische *ADH1*-Fragment vorhanden.

eine zusätzliches Fragment detektiert werden, das größer als das Wildtyp-Fragment mit einer Größe von ca. 3,3 kb war.

Die FACS-Daten zeigen, dass das Fusionsprotein, was bis auf die DNA-Bindedomäne das gesamte Mrr1-Protein enthielt (67-1108), im Wildtypstamm SC5314 den TetR-abhängigen Promotor aktivieren konnte (Abb. 2.12), was belegt, dass Mrr1, wenn die eigene DNA-Bindedomäne durch TetR ersetzt wird, seine Aktivität behält und immer noch mit Benomyl induziert werden kann. Ein Stamm, der nur TetR exprimierte, diente als Negativkontrolle und war demnach nicht in der Lage, die *caGFP*-Expression zu aktivieren. Ein weiterer Stamm, der ein Fusionsprotein mit der Gal4-Aktivierungsdomäne exprimierte, wurde als Positivkontrolle verwendet. Die TetR-Gal4AD Fusion war konstitutiv aktiv, induzierte also die Tet-Promotoraktivität in An- und Abwesenheit von Benomyl.

Mit der Idee, die für die Aktivität des Transkriptionsfaktors relevanten Bereiche vorerst grob einzugrenzen, wurden drei überlappende Mrr1-Fragmente (Aminosäuren 67-526, 269-812 und 524-





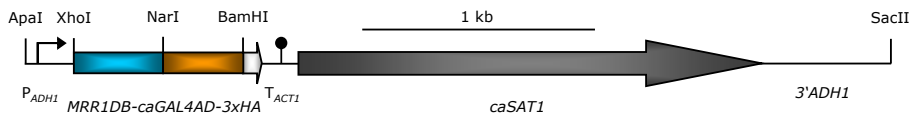
**Abbildung 2.12.: *MDR1*-Promotoraktivität in Abhängigkeit von TetR-Mrr1 Fusionsproteinen.** Die angegebenen TetR-Mrr1 Fusionsproteine, die interne und N-terminal verkürzte Mrr1-Fragmente beinhalten, wurden zusammen mit *caGFP*, das unter der Kontrolle eines TetR-abhängigen Promotors steht, im *C. albicans* Stamm SC5314 exprimiert. Die *MDR1*-Promotoraktivität wurde in zwei unabhängigen Transformanten (A, B) in An- und Abwesenheit von Benomyl (50 µg/ml) mittels Durchflusszytometrie quantifiziert. Stämme, die ein TetR-Gal4AD Fusionsprotein bzw. unfusioniertes TetR exprimieren, dienen als Positiv- bzw. Negativkontrolle. Die durchschnittliche Fluoreszenz und die Standardabweichung für die Stämme, die die Fusionsproteine exprimieren, wurden aus den Ergebnissen von drei unabhängigen Experimenten ermittelt.

1108) exprimiert und die resultierenden Fusionsproteine auf ihre Fähigkeit, die Transkription zu induzieren, untersucht. Es war jedoch keines dieser Derivate in der Lage, den Tet-Promotor in Anwesenheit von Benomyl zu aktivieren. Daher wurden weitere TetR-Mrr1 Fusionsproteine konstruiert, deren Mrr1-Fragmente sequenziell N-terminal verkürzt wurden.

Nur Fusionsproteine, die fast das komplette Mrr1-Protein beinhalteten, konnten in Anwesenheit von Benomyl die Transkription induzieren. Die Deletion der ersten 143 Aminosäuren des N-Terminus von Mrr1 resultierte in einer deutlich geringeren Aktivierung des Tet-Promotors und für Hybridproteine, in dessen Mrr1-Teil die ersten 167 Aminosäuren fehlten, war kaum noch Aktivität zu beobachten. Fusionsproteine, denen die ersten 268 Mrr1 Aminosäuren fehlten, waren komplett inaktiv (Abb. 2.12).

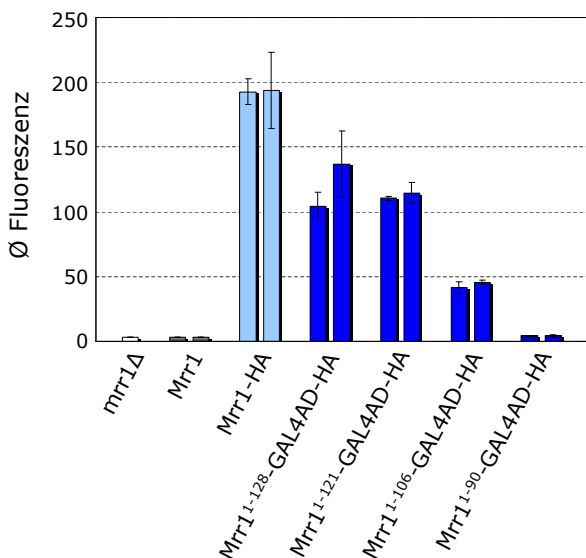
### 2.2.3. Eingrenzung der DNA-Bindedomäne

Wie die meisten anderen Zinc-Cluster-Proteine weist Mrr1 in der N-terminalen Region eine vorhergesagte DNA-Bindedomäne auf, die die Aminosäuren 31 bis 59 umfasst. Ob die DNA-Bindedomäne ausreicht, den Transkriptionsfaktor an den *MDR1*-Promotor zu führen oder ob weitere Mrr1-Regionen dafür notwendig sind, wurde in diesem Experiment untersucht.



**Abbildung 2.13.: Aufbau des Inserts aus dem Plasmid pZCF36DBH2.** Die DNA-Bindedomäne aus *MRR1* (*MRR1DB*) wurde mit der 3xHA-markieren *GAL4AD* fusioniert. Die für Ligation der Fragmente und die Exzision der Kasette relevanten Restriktionsschnittstellen sind im oberen Bereich der Grafik angegeben. Das Insert umfasst außerdem den Transkriptionsterminator  $T_{ACT1}$  und den Selektionsmarker *caSAT1*. Die flankierenden *ADH1*-Sequenzen, der *ADH1*-Promotor ( $P_{ADH1}$ ) und die 3'*ADH1*-Region, dienen zur Integration der ApaI-SacII Kasette in den *ADH1*-Locus.

Zuerst wurden die 128 N-terminalen Aminosäuren aus Mrr1 mit der Gal4-Aktivierungsdomäne aus *S. cerevisiae* fusioniert und unter der Kontrolle des *ADH1*-Promotors in dem Reporterstamm CAG48MRR1M4B exprimiert. Durch homologe Rekombination wurde das ApaI-SacII Fragment aus dem Plasmid pZCF26DBH2 (Abb. 2.13) in den *ADH1*-Locus der *mrr1* $\Delta$  Mutante integriert. Die positiven Transformanten wurden auf Nourseothricin-Platten selektiert und wie unter 2.2.2 beschrieben im Southern Blot überprüft.

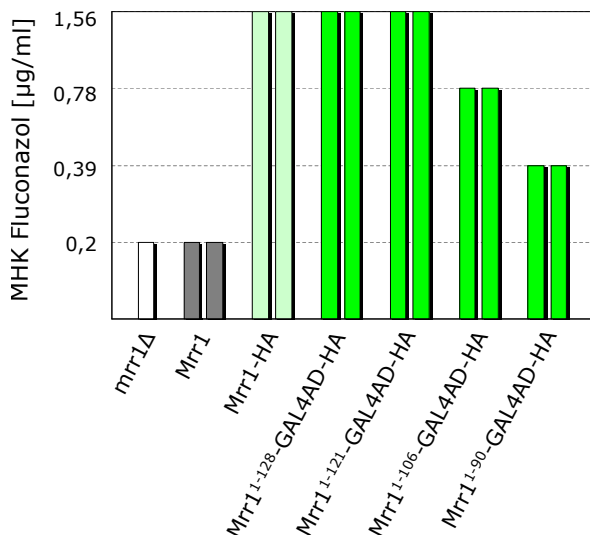


**Abbildung 2.14.: Aktivierung des *MDR1*-Promotors durch Mrr1DB-Gal4AD Fusionsproteine.** Die Promotoraktivität in *mrr1* $\Delta$  Reporterstämmen, die die angezeigten Mrr1DB-Gal4AD Fusionen exprimieren, wurde mittels Durchflusszytometrie quantifiziert. Als Kontrolle dienten die *mrr1* $\Delta$  Mutante und Stämme, die das wildtypische Mrr1 bzw. hyperaktives HA-gekoppeltes Mrr1 enthielten. Die durchschnittliche Fluoreszenz und die Standardabweichung wurden für jeweils zwei unabhängige Transformanten (B1, B2) in drei Versuchsdurchführungen bestimmt.

Die Fähigkeit des Fusionsproteins, die  $P_{MDR1}$ -GFP-Reporterfusion zu aktivieren, wurde per FACS-Analyse untersucht. Die *mrr1* $\Delta$  Mutante und die Reporterstämmen, die Mrr1 in gesamter

Länge bzw. HA-fusioniertes, hyperaktives Mrr1 exprimieren, wurden zum Vergleich hinzugezogen. Aus eigenen Experimenten (siehe Kapitel 2.4) und anderen Veröffentlichungen [153] ist bekannt, dass ein HA-Tag am C-Terminus des Transkriptionsfaktors diesem einen gain-of-function Effekt verleiht. Da das gleiche Fusionsprotein ohne HA-Epitop ebenfalls den *MDR1*-Promotor aktivierte (nicht gezeigt), ist in diesem Versuch das HA-Tag nicht für die konstitutive Aktivität des Proteins verantwortlich. Wie in Abbildung 2.14 zu sehen ist, war das wildtypische Mrr1 nicht in der Lage, in Abwesenheit induzierender Substanzen den *MDR1*-Promotor zu aktivieren, während das hyperaktive HA-markierte Mrr1 den *MDR1*-Promotor konstitutiv aktivierte. Auch das Fusionsprotein Mrr1DB-Gal4AD konnte den *MDR1*-Promotor induzieren, was zeigt, dass die ersten 128 N-terminalen Aminosäuren von Mrr1, die die DNA-Bindedomäne beinhalten, ausreichen, den Transkriptionsfaktor zum *MDR1*-Promotor zu dirigieren.

Um die DNA-Bindedomäne, die für die Erkennung des *MDR1*-Promotors notwendig ist, weiter einzugrenzen, wurde der N-terminale Bereich von Mrr1 weiter sequenziell am C-Terminus verkürzt und die Apal-SacII Fragmente aus den pZCF36DBH2-Derivaten wie oben beschrieben ins Genom der *mrr1* $\Delta$  Mutante integriert und exprimiert. Es wurde getestet, ob diese kürzeren Mrr1-Fragmente ebenfalls ausreichen, das Mrr1DB-Gal4AD Fusionsprotein zum *MDR1*-Promotor zu dirigieren. Das Hybridprotein mit den ersten 121 N-terminalen Mrr1-Aminosäuren aktivierte den *MDR1*-Promotor mit annähernd derselben Effizienz wie die Mrr1<sup>1-128</sup>-Gal4AD Fusion, während die ersten 106 N-terminalen Aminosäuren den *MDR1*-Promotor mit einer deutlich geringeren Intensität aktivierten. Die ersten 90 Aminosäuren von Mrr1 reichten nicht mehr aus, die *MDR1*-Expression signifikant zu induzieren.



**Abbildung 2.15.:** MHK von Fluconazol für jeweils zwei unabhängige Transformanten (A, B) der *mrr1* $\Delta$  Stämme, die die angezeigten Mrr1BD-Gal4AD Fusionen exprimierten. Als Kontrolle dienten die *mrr1* $\Delta$  Mutanten und die Stämme, die das wildtypische Mrr1 bzw. hyperaktives HA-gekoppeltes Mrr1 enthielten.

Die gleichen Fusionsproteine wurden zusätzlich in der *mrr1* $\Delta$  Mutante (SCMRR1M4A und -B) exprimiert und deren Fähigkeit, den Zellen Resistenz gegen Fluconazol zu verleihen, in

einem MHK-Test bestimmt. Die Ergebnisse des MHK-Tests korrelierten weitestgehend mit den Daten aus der FACS-Analyse. Allerdings wiesen die Zellen, die das kürzeste Fusionsprotein (Mrr1<sup>1-90</sup>-Gal4AD) exprimierten, eine leicht erhöhte Resistenz gegen Fluconazol auf. Die ersten 90 N-terminalen Aminosäuren aus Mrr1 scheinen also auszureichen, Mrr1 Targets zu aktivieren, die zur Fluconazol-Resistenz beitragen.

Als Fazit dieses Versuchs lässt sich sagen, dass die ersten 106 Aminosäuren des N-Terminus von Mrr1 ausreichen, den Transkriptionsfaktor zum *MDR1*-Promotor zu dirigieren.

## 2.3. Interaktion von Mrr1 mit Cap1 und Upc2

Verschiedene Studien beschreiben weitere Transkriptionsfaktoren, die in die *MDR1*-Regulation involviert sind. So bindet beispielsweise Cap1, der bZIP-Transkriptionsfaktor, der in *C. albicans* die Antwort auf oxidativen Stress reguliert [2, 149], *in vivo* an den *MDR1*-Promotor [151]. Zwar führte die Deletion von *CAP1* in *MDR1*-überexprimierenden Stämmen nicht zu einer Abnahme der *MDR1*-Expression, die Expression eines C-terminal verkürzten, hyperaktiven *CAP1*-Allels jedoch resultierte in einer *MDR1*-Überexpression und in einer Resistenz [2].

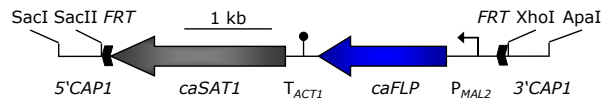
Der Zinc-Cluster-Transkriptionsfaktor Upc2, der die Expression der *ERG*-Gene reguliert und bei Ergosterolmangel deren Expression induziert [70, 124], bindet ebenfalls an den *MDR1*-Promotor [153]. Je nach Wachstumsbedingungen agiert er dort als Aktivator oder Repressor [153] und gain-of-function Mutationen in Upc2 (z.B. ein Aminosäureaustausch an Position 648 von Glycin zu Asparaginsäure) bewirken eine konstitutive Hochregulierung der *ERG*-Gene und ein erhöhtes *MDR1*-mRNA-Level [29, 153].

Es stellte sich die Frage, ob Cap1 und Upc2 neben Mrr1 ebenfalls wichtige Regulatoren der *MDR1*-Expression sind und ob aktivierende Mutationen in diesen Transkriptionsfaktoren möglicherweise auch ein Grund für die *MDR1*-vermittelte Resistenz in klinischen *C. albicans*-Isolaten sein könnten. In dieser Arbeit wurde untersucht, ob diese Transkriptionsfaktoren eventuell bei der Expression der *MDR1*-Effluxpumpe und der Resistenzentwicklung miteinander interagieren. In unterschiedlichen Versuchen wurde ermittelt, ob Mrr1 nur unter Anwesenheit von Cap1 bzw. Upc2 in der Lage ist, die *MDR1*-Expression zu aktivieren, und ob Cap1 und Upc2 auch in Abwesenheit von Mrr1 eine *MDR1*-Hochregulierung und eine Resistenz bewirken können.

### 2.3.1. Herstellung der *cap1*Δ Mutante

#### 2.3.1.1. Herstellung der *SAT1*-Flipperkassette für die Deletion von *CAP1*

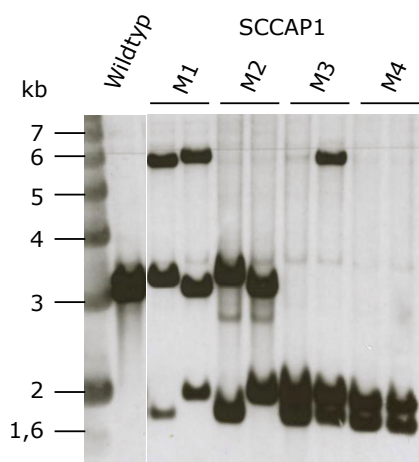
Die Upstream-Region des *CAP1*-Gens (-427 bis +62) wurde mit den Primern CAP1-5 und CAP1-6 amplifiziert und über die Restriktionsschnittstellen *SacI* und *SacII* in das Plasmid pSFS4 kloniert. Das entstandene Plasmid pCAP1M1 enthält neben der 5'*CAP1*-Region das *caSAT1*-Resistenzgen, die *FLP*-Rekombinase *caFLP* mit der Terminationssequenz des *ACT1*-Gens unter der Kontrolle des Maltose-induzierbaren Promotors  $P_{MAL2}$  sowie die flankierenden *FRT*-sites. Für die Konstruktion des Plasmids pCAP1M2 wurde die Downstream-Region des *CAP1*-Gens (+1460 bis +1910) mit den Primer CAP1-7 und CAP1-8 amplifiziert, mit *XhoI* und *Apal* verdaut und in das *XhoI*/*Apal* gespaltene Plasmid pCAP1M1 kloniert (siehe Abb. ??).



**Abbildung 2.16.: Kasette aus pCAP1M2 für die Deletion von CAP1.** Die Flipperkasette aus dem Plasmid CAP1M2 enthält den *caSAT1*-Resistenzmarker, die *FLP*-Rekombinase *caFLP* mit der Terminationssequenz  $T_{ACT1}$  unter der Kontrolle eines Maltose-induzierbaren Promotors  $P_{MAL2}$ . Über homologe Rekombination flankierenden Sequenzen ( $5'CAP1$  und  $3'CAP1$ ) wurde das *SacI*-*ApaI* Fragment in den *C. albicans* *CAP1*-Locus integriert. Die für die Konstruktion des Plasmids relevanten Schnittstellen sind angegeben.

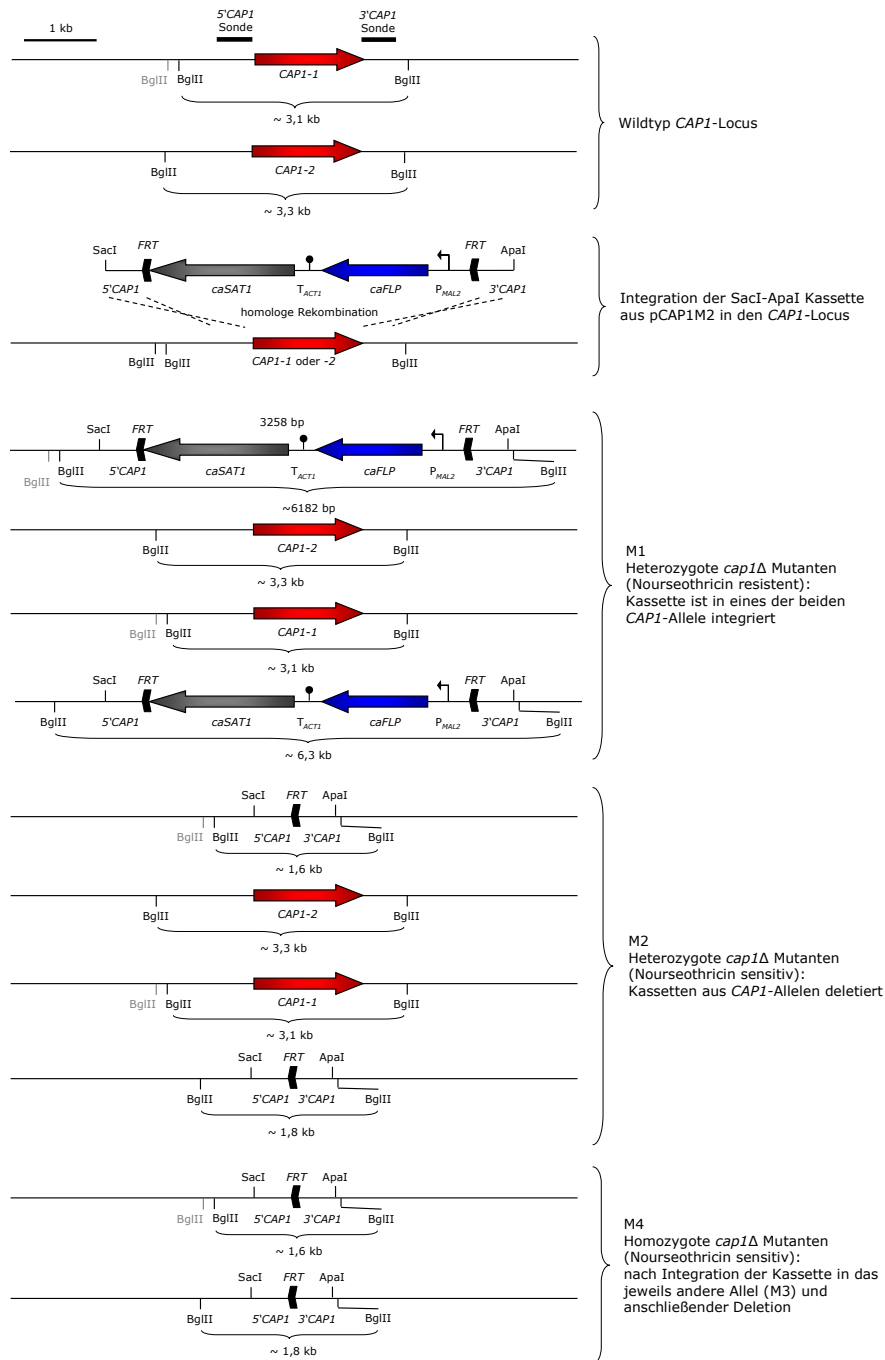
### 2.3.1.2. Deletion der *CAP1*-Allele im Wildtypstamm SC5314

Für die Herstellung der *cap1* $\Delta$  Mutante wurde die in der Einleitung beschriebene *SAT1*-Flipper-Methode angewendet. Die codierende Region eines der beiden *CAP1*-Allele im Stamm SC5314 wurde durch die *SacI*-*ApaI* Deletionskasette aus dem Plasmid pCAP1M2 ersetzt. Durch die Maltose-induzierte *FLP*-vermittelte Deletion der Kasette wurden die heterozygoten *CAP1* Mutanten erhalten und nach einer weiteren Runde der Integration und Exzision die homozygoten *CAP1* Mutanten. Die Abbildung 2.18 beschreibt die Schritte der *CAP1*-Deletion mit der *SAT1*-Flipper-Methode.



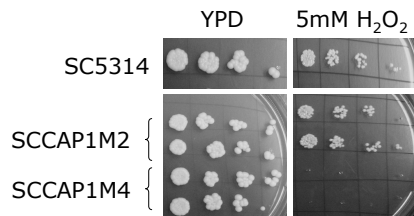
**Abbildung 2.17.: Überprüfung der *cap1* $\Delta$  Tranformanten.** Die genomische DNA von jeweils zwei unabhängigen hetero- und homozygoten *cap1* $\Delta$  Mutanten des Wildstammes SC5314 (M1-M4) sowie des Ausgangsstammes wurde mit *Bgl*III gespalten und die Banden mit der  $5'CAP1$ -Sonde detektiert. Allel *CAP1-1* weist upstream der codierenden Region einen *Bgl*III-Polymorphismus auf, weswegen im Wildtypstamm eine Doppelbande zu sehen ist. Die erste Integration der Deletionskasette (M1) erfolgte in einer Transformante in das Allel *CAP1-1*, in der der zweiten Transformante in das Allel *CAP1-2*. Da der Maltose-abhängige Promotor in Abwesenheit von Maltose nicht komplett reprimiert ist, wurde die Kasette in den Mutanten M1 und M3 bei der Inkubation der Stämme zur Isolierung der genomischen DNA zum Teil aus dem Genom herausgeschnitten. Das erklärt die zusätzlichen Banden bei ca. 2 kb bzw. 1,7 kb, die normalerweise erst bei den Mutanten M2 und M4 nach der Exzision der Kasette erscheinen, und das Verschwinden der ca. 6 kb großen Bande bei M3. Nicht relevante Spuren wurden aus dem Bild herausgeschnitten.

Die Transformanten wurden nach jedem Integrations- und Exzisionsschritt im Southern Blot überprüft. Der Blot in Abbildung 2.17 zeigt die Spaltung aller Transformanten bis zum Erhalten der *cap1* $\Delta$  Mutanten. Nach der Spaltung mit *Bgl*III konnte mit der  $3'$ - bzw. der  $5'CAP1$ -Sonde ein spezifisches Bandenmuster detektiert werden.



**Abbildung 2.18.: Herstellung der *cap1Δ* Mutante mit der SAT1-Flipper-Methode.** Die codierende *CAP1*-Region des *C. albicans*-Stammes SC5314 wurde durch homologe Rekombination mit der *Sac*I-*Apa*I Deletionskassette aus pCAP1M2 ersetzt. Das Allel *CAP1-1* weist upstream der codierenden Region einen *Bgl*III-Polymorphismus auf. Durch Ausschneiden und eine weitere Runde der Integration und Exzision wurden die homozygoten *cap1Δ* Mutanten erhalten. Die für die Identifikation der positiven Transformanten relevanten *Bgl*III-Schnittstellen sowie die Größen der mit der 3'- und der 5'*CAP1*-Sonde detektierbaren Fragmente sind angegeben.

Da eines der beiden *CAP1*-Allele (hier Allel 1 genannt) upstream der codierenden *CAP1*-Region einen BglII-Polymorphismus aufweist, wurde bei der Erstellung zweier unabhängiger heterozygoter Transformanten darauf geachtet, dass die Deletionskassette in einer Transformante in Allel 1 und der anderen Transformante in Allel 2 integriert.

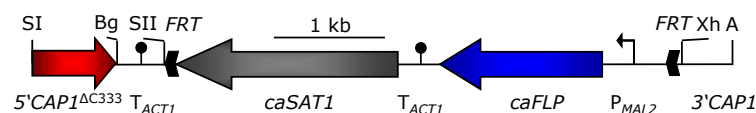


**Abbildung 2.19.: Wachstum der *cap1*Δ Mutanten auf H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.** Spotttest von jeweils zwei unabhängigen hetero- (M2) bzw. homozygoten (M4) *cap1*Δ Mutanten und deren Ausgangsstamm SC5314. Bei der homozygoten *cap1*Δ Mutante SCCAP1M4 ist kein Wachstum mehr auf YPD-Medium mit 5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zu beobachten.

Ein Spotttest zeigte, dass die heterozygote *cap1*Δ Mutante ebenso gut wie der Ausgangsstamm auf 5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> wachsen konnte, die homozygote Mutante war jedoch komplett sensitiv gegenüber H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Die *upc2*Δ Mutante wurde nicht im Rahmen dieser Arbeit hergestellt, sondern von Clemens Heilmann während seiner Diplomarbeit angefertigt [41].

### 2.3.2. Die Rolle von Cap1 in der *MDR1*-Expression und der Mdr1-vermittelten Resistenz

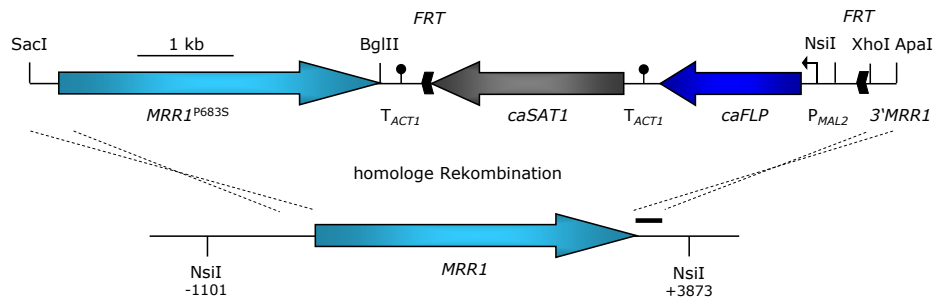
Wie schon erwähnt ist neben *MRR1* auch ein hyperaktives, C-terminal verkürztes *CAP1*-Allel in der Lage, den *MDR1*-Promotor konstitutiv zu aktivieren und in eine Resistenz hervorzurufen [2]. Daher war es Ziel dieser Arbeit zu untersuchen, ob ein hyperaktives *CAP1*-Allel für seine Aktivität die Anwesenheit von Mrr1 benötigt bzw. hyperaktives *MRR1* von der Anwesenheit von Cap1 abhängig ist. Dafür wurden eins bzw. beide *CAP1*-Allele im Wildtypstamm SC5314 sowie einer *mrr1*Δ Mutante durch C-terminal verkürzte, hyperaktive *CAP1*-Allele (*CAP1*<sup>ΔC333</sup>) ersetzt. Ebenso wurde hyperaktives *MRR1* im Wildtypstamm und der *cap1*Δ Mutante exprimiert.



**Abbildung 2.20.: Aufbau der Deletionskassette für das Ersetzen des *CAP1*-Allels durch *CAP1*<sup>ΔC333</sup>.** Die Abbildung zeigt den *SAT1*-Flipper aus Plasmid pCAP1R1. Zur homologen Rekombination in den *CAP1*-Locus dienen die flankierenden Sequenzen, im 5'-Bereich der C-terminale Teil des verkürzten *CAP1*-Allels (*CAP1*<sup>ΔC333</sup>) und die 3'*CAP1*-Region. Die für die Konstruktion des Plasmids wichtigen Schnittstellen sind angegeben: SacI (SI), SacII (SII), XhoI (Xh) und Apal (A). Die BglII-Schnittstelle (Bg) ist relevant für die Identifikation positiver Transformanten im Southern Blot.



Die Herstellung der Mutanten, in denen eins oder beide endogene *CAP1*-Allele durch das hyperaktive *CAP1*<sup>ΔC333</sup>-Allel ersetzt wurden, erfolgte nach demselben Schema, wie es bereits in Abbildung 2.18 beschrieben wurde. Durch zweimalige Integration und Exzision der Kasette aus pCAP1R1 (Abb. 2.20) in den *CAP1*-Locus wurden die homozygoten *CAP1*<sup>ΔC333</sup> Mutanten erhalten, entweder im Wildtyp-Hintergrund (SCCAP1R11 bis -R14) oder im *mrr1*Δ-Hintergrund (Δ*mrr1*CAP1R1 bis -R14). Das integrierte SacI-ApaI Fragment aus dem Plasmid pCAP1R1 ähnelt dem Fragment aus pCAP1M2 (Abb. 2.16), weist aber anstelle der 5'*CAP1*-Region den C-Terminus des verkürzten *CAP1*-Allels mit einem Aktinterminator auf. Die zusätzliche eingefügte BglII-site, über die das 5'*CAP1*<sup>ΔC333</sup>-Fragment mit dem Aktinterminator ligiert wurde, resultierte allerdings in einem anderen Bandenmuster. Anstelle der 5'*CAP1*-Sonde wurde für die Hybridisierung die spezifische 5'*CAP1R1*-Sonde verwendet, die aus dem SacI-BglII Fragment aus pCAP1R1 besteht.

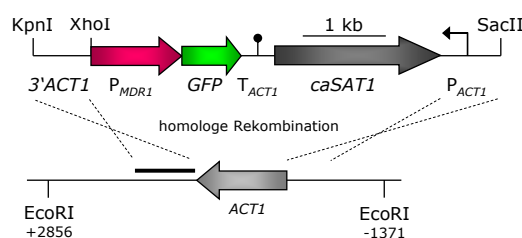


**Abbildung 2.21.: Aufbau der Deletionskassette aus pMRR1R3.** Die Abbildung zeigt den *SAT1*-Flipper aus dem Plasmid pMRR1R3 mit dem *caSAT1*-Resistenzmarker sowie der *FLP*-Rekombinase *caFLP* unter der Kontrolle des Maltose-induzierbaren Promotors *P<sub>MAL</sub>* und der Transkriptionsterminationssequenz *T<sub>ACT1</sub>*. Zur homologen Rekombination des SacI-ApaI Fragmentes in den wildtypischen *MRR1*-Locus (unten) dienen die flankierenden Sequenzen, im 5'-Bereich das mutierte *MRR1*-Allel (*MRR1*<sup>P683S</sup>) und die 3'*MRR1*-Region. Zusätzliche für die Konstruktion des Plasmids relevante Schnittstellen (BglII und XhoI) sind angegeben. Die NsiI-Schnittstellen bei -1101 bp und +3873 bp in Bezug auf das *MRR1*-Startcodon sowie im *P<sub>MAL</sub>* sind relevant für die Identifikation positiver Transformanten im Southern Blot. Der kurze schwarze Balken markiert die Bindestelle der 3'*MRR1*-Sonde.

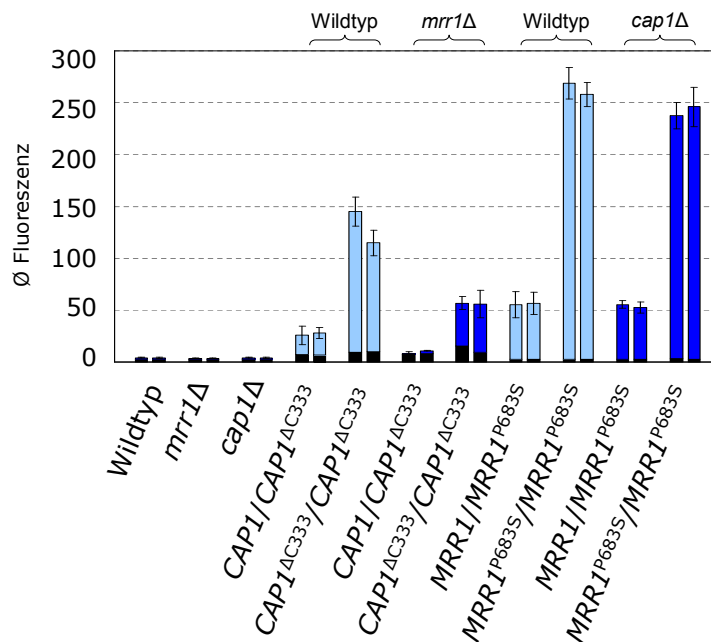
Die Stämme SCMR1R32 und -R34, in denen eines bzw. beide endogenen *MRR1*-Allele durch hyperaktives *MRR1* (*MRR1*<sup>P683S</sup>) ersetzt wurden, wurden von Franziska Dierolf im Rahmen ihrer Diplomarbeit konstruiert. Die Integration der hyperaktiven *MRR1*-Allele in die *cap1*Δ Mutante SCCAP1M4 erfolgte in dieser Arbeit ebenfalls wie oben beschrieben mit der *SAT1*-Flipper-Methode. Durch wiederholte Integration und Exzision des SacI-ApaI Fragments aus pMRR1R3 (Abb. 2.21, von F. Dierolf), was als flankierende Sequenzen für die homologe Rekombination das mutierte *MRR1*-Allel (*MRR1*<sup>P683S</sup>) und die 3'*MRR1*-Region enthielt, wurden

die homozygoten  $MRR1^{P683S}$  Transformanten hergestellt ( $\Delta cap1MRR1R31$  bis  $-R34$ ). Die Identifikation der positiven Transformanten erfolgte durch die Spaltung der genomischen DNA mit *NsiI* und anschließender Detektion der Fragmente im Southern Blot mit der 3'*MRR1*-Sonde (nicht gezeigt). In der *MRR1*-Region befindet sich eine *NsiI*-site bei ca. -1100 bp und eine bei ca. +3880 in Bezug auf das Startcodon (siehe Abb. 2.21). Das wildtypische *NsiI*-Fragment weist daher eine Größe von ca. 5 kb auf. Bei Integration der Deletionskassette aus p*MRR1R3* konnte aufgrund einer *NsiI*-site im  $P_{MAL}$  ein zusätzliches Fragment von ca. 700 bp detektiert werden. Das Ausschneiden des *SAT1*-Flippers an den *FRT*-sites bewirkte einen Shift der  $\sim 0,7$  kb Bande auf ca. 5,5 kb, was dem wildtypischen Fragment plus Aktinterminator und *FRT*-sites entsprach. Das Ersetzen des zweiten *MRR1*-Allels durch die hyperaktive Form erfolgte auf dieselbe Weise. Die Mutanten und deren Kontrollstämme wurden in einem MHK-Test auf ihre Empfindlichkeit gegenüber Fluconazol und Cerulenin getestet (Abb. 2.24).

In den Wildtyp SC5314 und die *mrr1* $\Delta$  bzw. *cap1* $\Delta$  Mutanten, die hyperaktive *CAP1*- bzw. *MRR1*-Allele exprimieren, sowie deren Kontrollstämme wurde über homologe Rekombination in den *ACT1*-Locus eine Reporterfusion eingebracht. Das *KpnI*-*SacII* Fragment aus dem Plasmid pMPG2S enthält *GFP* unter der Kontrolle des *MDR1*-Promotors (Abb. 2.22). Die positiven Transformanten wurden nach Spaltung der genomischen DNA mit *EcoRI* im Southern Blot überprüft. Bei erfolgreicher Integration der Fragmente war mit einer *ACT1*-spezifischen Sonde, die aus dem *KpnI*-*XhoI* Fragment aus dem Plasmid pMPG2S besteht (siehe Abb. 2.22), zusätzlich zum wildtypischen  $\sim 4,2$  kb Fragment ein weiteres Fragment von  $\sim 8,4$  kb detektierbar. Per Durchflusszytometrie wurde die Fähigkeit der hyperaktiven Transkriptionsfaktoren *Mrr1* und *Cap1*, in An- und Abwesenheit des jeweils anderen Transkriptionsfaktors den *MDR1*-Promotor zu aktivieren, quantifiziert.



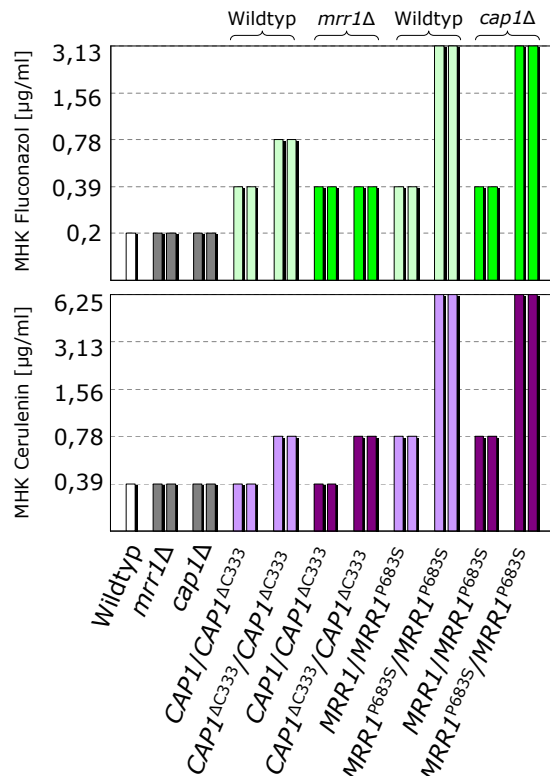
**Abbildung 2.22.: Konstrukt aus dem Plasmid pMPG2S.** Das *KpnI*-*SacII* Fragment aus pMPG2S wurde verwendet, um die  $P_{MDR1}$ -*GFP*-Reporterfusion über homologe Rekombination der *ACT1*-Promotorregion und der 3'*ACT1*-Region in den *C. albicans* *ACT1*-Locus zu integrieren. Die Kassette enthält außerdem den *caSAT1*-Selektionsmarker und die Terminationssequenz des *ACT1*-Gens. Zur Überprüfung der Transformanten wurde die genomische DNA an den *EcoRI*-Schnittstellen, die sich an den Positionen -1371 und +2856 in Bezug auf das *ACT1*-Startcodon befinden, gespalten und die Fragmente mit der *ACT1*-spezifischen Sonde (*KpnI*-*XhoI* Fragment, schwarzer Balken) detektiert. Bei erfolgreicher Integration der Fragmente entstand durch den *EcoRI*-Verdau neben dem wildtypischen  $\sim 4,2$  kb großen Fragment ein weiteres von ca. 8,4 kb.



**Abbildung 2.23.: Aktivierung des *MDR1*-Promotors durch hyperaktive *CAP1*- und *MRR1*-Allele.** In *C. albicans*-Stämmen, die eine  $P_{MDR1}$ -GFP-Reporterfusion tragen, wurde die Fluoreszenz und die Standardabweichung aus drei Experimenten von je zwei unabhängigen Transformanten (B1, B2) folgender Stämme bestimmt: SCMPG2 (Wildtyp), SCMRR1M4MPG2 (*mrr1Δ*), SCCAP1M4MPG2 (*cap1Δ*), SCCAP1R2MPG2 und SCCAP1R4MPG2 (hetero- und homozygote  $CAP1^{\Delta C333}$  Mutante),  $\Delta mrr1$ CAP1R2MPG2 und  $\Delta mrr1$ CAP1R4MPG2 (hetero- und homozygote  $CAP1^{\Delta C333}$  Mutante im *mrr1Δ*-Hintergrund), SCMRR1R32MPG2 und SCMRR1M34MPG2 (hetero- und homozygote  $MRR1^{P683S}$  Mutante),  $\Delta cap1$ MRR1R32MPG2 und  $\Delta cap1$ MRR1M34MPG2 (hetero- und homozygote  $MRR1^{P683S}$  Mutante im  $CAP1^{\Delta C333}$ -Hintergrund). Die Hintergrundfluoreszenzen der Ausgangsstämme, die keine Reporterfusion enthalten, sind als schwarzer Balken am Fuß jedes Balkens dargestellt (eine Messung).

Wie in Abbildung 2.23 zu sehen ist, wird *MDR1* unter normalen Wachstumsbedingungen kaum nachweisbar exprimiert. Auch die *mrr1Δ* und die *cap1Δ* Mutante weisen nur Hintergrundfluoreszenz auf. Das Ersetzen der beiden wildtypischen *CAP1*-Allele durch die hyperaktive, C-terminal verkürzte Form führte zu einer Aktivierung des *MDR1*-Promotors, während in der heterozygoten  $CAP1^{\Delta C333}$  Mutante nur wenig Expression zu beobachten war. Auch in den *mrr1Δ* Mutanten waren die  $CAP1^{\Delta C333}$ -Allele in der Lage, *MDR1* zu aktivieren, allerdings mit geringerer Effizienz als im Wildtyp-Hintergrund. Die FACS-Daten zeigen, dass die Induktion des *MDR1*-Promotors durch hyperaktive  $CAP1^{\Delta C333}$ -Allele nur teilweise Abhängig ist von Mrr1. Zwei hyperaktive *MRR1*-Allele ( $MRR1^{P683S}$ ) aktivierten den *MDR1*-Promotor stärker als die verkürzten *CAP1*-Allele, während ein  $MRR1^{P683S}$  eine im Vergleich geringe *MDR1*-Expression bewirkte. Die hyperaktiven  $MRR1^{P683S}$ -Allele aktivierten die *MDR1*-Expression in der *cap1Δ* Mutante mit ähnlicher Effizienz wie im Wildtypstamm SC5314, was beweist, dass die Mrr1-vermittelte *MDR1*-Expression nicht von der Anwesenheit von Cap1 abhängt.

Der Effekt hyperaktiver *MRR1*- und *CAP1*-Allele auf die Resistenz im Wildtyp und der *cap1Δ*



**Abbildung 2.24.:** MHK von Fluconazol und Cerulenin für den Wildtypstamm SC5314 sowie die *cap1*Δ (SCCAP1M4) und die *mrr1*Δ Mutante (SCMRR1M4) und deren Derivate, in denen eins oder beide *CAP1*- und *MRR1*-Allele durch hyperaktive *CAP1*<sup>ΔC333</sup>- bzw. *MRR1*<sup>P683S</sup>-Allele ersetzt wurden. Die MHK wurde für jeweils zwei unabhängige Transformanten (A, B) bestimmt.

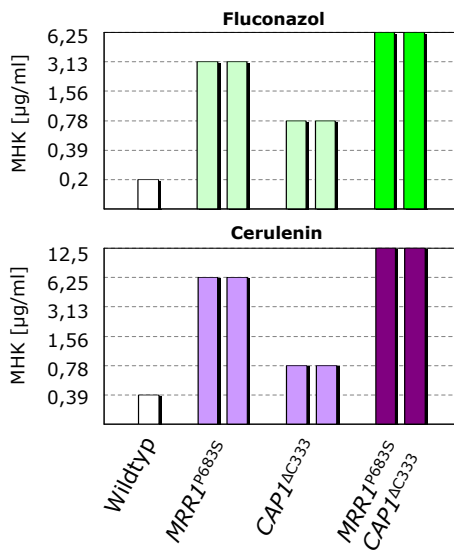
bzw. der *mrr1*Δ Mutanten wurde in einem MHK-Test bestimmt (siehe Abb. 2.24). Das Ersetzen eines der endogenen *CAP1*-Allele durch das hyperaktive *CAP1*<sup>ΔC333</sup>-Allel resultierte in einem leichten Anstieg der Resistenz gegen Fluconazol, während zwei hyperaktive *CAP1*<sup>ΔC333</sup>-Allele die Fluconazol-Resistenz noch erhöhten. In der *mrr1*Δ Mutante hingegen resultierte das Ersetzen eines endogenen *CAP1*-Allels durch das *CAP1*<sup>ΔC333</sup>-Allel nicht in einem Anstieg der *MDR1*-Expression und die Integration zweier *CAP1*<sup>ΔC333</sup>-Allele bewirkte eine geringere Aktivierung des *MDR1*-Promotors als im Wildtyp-Hintergrund. Das belegt, dass *CAP1*<sup>ΔC333</sup> für die Vermittlung der Fluconazol-Resistenz zumindest teilweise die Anwesenheit von *Mrr1* benötigt. Im Gegensatz dazu war eine Resistenz gegen Cerulenin erst in der homozygoten *CAP1*<sup>ΔC333</sup> Mutante zu beobachten und dieselben Ergebnisse wurden in der *mrr1*Δ Mutante abgelesen. Die Fähigkeit der hyperaktiven *CAP1*-Allele, Resistenz gegen das *Mdr1*-Substrat Cerulenin zu verleihen, ist demnach nicht von einem funktionellen *MRR1*-Gen abhängig. Ein hyperaktives *MRR1*<sup>P683S</sup>-Allel war in der Lage, eine leichte Resistenz gegen Fluconazol und Cerulenin zu verursachen, während in der homozygoten *MRR1*<sup>P683S</sup> Mutante ein Anstieg der Resistenz um das 16-fache zu beobachten war. Die selben Werte wurden in der *cap1*Δ Mutante erreicht, was belegt, dass hyperaktives *MRR1* die Anwesenheit eines intakten *CAP1*-Genes nicht benötigt, um Resistenz gegen Fluconazol und Cerulenin zu vermitteln.

Insgesamt zeigten diese FACS-Analyse und der MHK-Test, dass hyperaktive *CAP1*- und *MRR1*-

Allele unabhängig voneinander Resistenz vermitteln können.

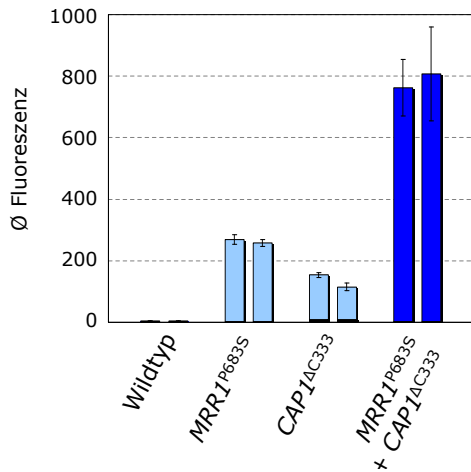
### 2.3.3. Kooperation zwischen Mrr1 und Cap1 in der *MDR1*-Expression

Da sowohl hyperaktive *MRR1*-Allele als auch hyperaktive *CAP1*-Allele den *MDR1*-Promotor aktivieren, wurde untersucht, ob die gemeinsame Expression der hyperaktiven Formen der Transkriptionsfaktoren eventuell einen additiven oder sogar synergistischen Effekt auf die *MDR1*-Promotoraktivität und die Resistenz hat. Dazu wurden zuerst die beiden endogenen *CAP1*-Allele in einem Stamm, der bereits zwei hyperaktive *MRR1*<sup>P683S</sup>-Allele enthielt, durch die hyperaktiven *CAP1*<sup>ΔC333</sup>-Allele ersetzt. Das SacI-ApaI Fragment aus dem Plasmid pCAP1R1 (Abb. 2.20) wurde über homologe Rekombination in den *CAP1*-Locus der homozygoten *MRR1*<sup>P683S</sup> Mutante integriert (siehe Integrationsschema 2.18). Nach der Spaltung der genomischen DNA mit BglII wurde das spezifische Bandenmuster mit der 3'*CAP1*-Sonde im Southern Blot visualisiert. Die Empfindlichkeit der Doppelmutanten gegenüber Fluconazol und Cerulenin wurde in einem MHK-Test ermittelt (Abb. 2.25).



**Abbildung 2.25.: Effekt hyperaktiver *MRR1*- und *CAP1*-Allele auf die Resistenz.** Gezeigt sind die MHK von Fluconazol und Cerulenin für den Wildtypstamm SC5314 sowie die Mutanten, in denen die wildtypischen *MRR1*- und/oder *CAP1*-Allele durch die jeweiligen hyperaktiven *MRR1*<sup>P683S</sup>- und *CAP1*<sup>ΔC333</sup>-Allele ersetzt wurden. Die MHK wurde für jeweils zwei unabhängige Transformanten (A, B) der Stämme SC*MRR1*R34, SC*CAP1*R14 und SC*MRR1*R34*CAP1*R14 ermittelt.

Um in den gleichen Stämmen die Auswirkungen der gleichzeitigen Expression hyperaktiver *CAP1*- und *MRR1*-Allele auf die Aktivität des *MDR1*-Promotors zu bestimmen, wurde das KpnI-SacII Fragment mit der P<sub>*MDR1*</sub>-*GFP*-Reporterfusion aus dem Plasmid pMPG2S (siehe Abb. 2.22) in deren Genom integriert. Die Aktivität des *MDR1*-Promotors in den *CAP1*<sup>ΔC333</sup> *MRR1*<sup>P683S</sup> Doppelmutanten wurde mittels Durchflusszytometrie gemessen und mit der Aktivität des *MDR1*-Promotors in Stämmen, die nur *CAP1*<sup>ΔC333</sup>- bzw. *MRR1*<sup>P683S</sup>-Allele exprimieren, verglichen (Abb. 2.26).



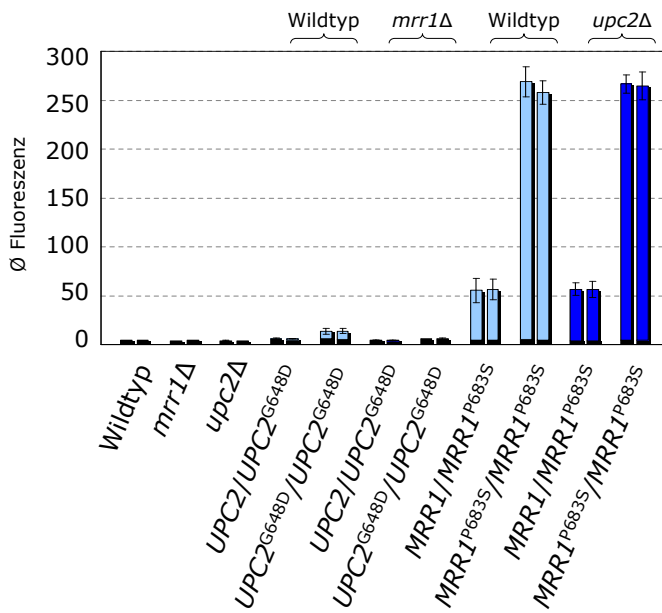
**Abbildung 2.26.: Effekt hyperaktiver *MRR1*- und *CAP1*-Allele auf die *MDR1*-Promotoraktivität.** Die Aktivierung der  $P_{MDR1}$ -*GFP*-Reporterfusion in Stämmen, die hyperaktive *MRR1*<sup>P683S</sup>- und/oder *CAP1*<sup>ΔC333</sup>-Allele exprimieren, wurde mittels Durchflusszytometrie quantifiziert. Die durchschnittliche Fluoreszenz und die Standardabweichung wurden aus drei Experimenten für jeweils zwei unabhängige Transformanten (A,B) der Stämme SCMPG2, SCMRR1R34MPG2, SCCAP1R14MPG2 und SCMRR1R34CAP1R14MPG2 ermittelt. Die Hintergrundfluoreszenz der Ausgangsstämme ohne *GFP* ist als schwarzer Bereich am Fuß der Balken angegeben (ein Messwert).

Wie in Abbildung 2.25 zu sehen ist, stieg die Resistenz gegen Fluconazol und Cerulenin in den Stämmen, die beide hyperaktiven Formen der Transkriptionsfaktoren, *MRR1*<sup>P683S</sup> und *CAP1*<sup>ΔC333</sup>, exprimieren, gegenüber Stämmen, die nur einen konstitutiv aktiven Transkriptionsfaktor exprimieren, weiter an. Auch die *MDR1*-Expression war erhöht, wenn beide Transkriptionsfaktoren in konstitutiv aktiver Form vorlagen (Abb. 2.26). Diese Ergebnisse zeigen, dass aktivierende Mutationen in *Mrr1* und *Cap1* einen additiven Effekt auf die *MDR1*-Expression und die Resistenz haben.

### 2.3.4. Die Rolle von *Upc2* in der *MDR1*-Expression und der *Mdr1*-vermittelten Resistenz

Dass die Aktivität eines hyperaktiven *CAP1*-Allels teilweise abhängig von der Anwesenheit eines intakten *MRR1*-Allels ist, konnte in Abschnitt 2.3.2 demonstriert werden. Auf dieselbe Weise wurde in dieser Arbeit auch die gegenseitige Abhängigkeit von *Mrr1* und *Upc2* bei der *MDR1*-Expression und der Vermittlung der Resistenz untersucht. Die *upc2*Δ Mutante wurde von Nico Dunkel hergestellt [29]. Die wildtypischen Stämme, die integrierte *UPC2*-Allele tragen, wurden von Clemens Heilmann und Sabrina Schneider angefertigt [41]. Die *mrr1*Δ Mutanten mit integrierten *UPC2*-Allelen wurden für diese Arbeit von Sabrina Schneider konstruiert.

In diesem Versuch wurde untersucht, ob hyperaktives *Upc2* in der Lage ist, die *MDR1*-Expression zu induzieren und ob dessen Aktivität abhängig von der Anwesenheit von *Mrr1* ist. In die SC5314- und *mrr1*Δ-Derivate, in denen eins oder beide endogene *UPC2*-Allele durch das konstitutiv aktive *UPC2*<sup>G684D</sup>-Allel ersetzt wurden, wurde eine  $P_{MDR1}$ -*GFP*-Reporterfusion integriert und die Fähigkeit der Allele, den *MDR1*-Promotor zu aktivieren, in einer FACS-Analyse ermittelt.

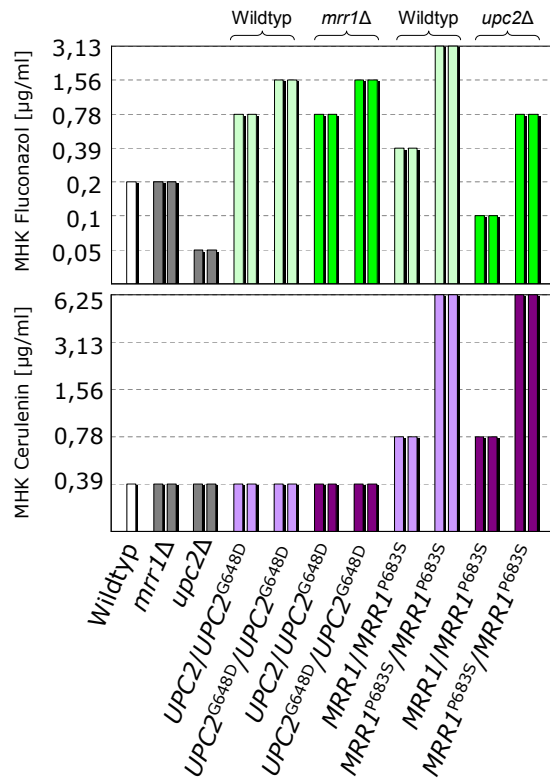


**Abbildung 2.27.: Aktivierung des *MDR1*-Promotors durch hyperaktive *UPC2*- und *MRR1*-Allele.** Angezeigt sind nur die relevanten Genotypen der jeweiligen Stämme, die Stammnamen sind der Tabelle 4.2 zu entnehmen. Die Stämme tragen eine  $P_{MDR1}$ -*GFP*-Reporterfusion, die durchschnittliche Fluoreszenz und die Standardabweichung wurden aus drei Experimenten von je zwei unabhängigen Transformanten (B1, B2) in den angezeigten Hintergründen bestimmt. Die Hintergrundfluoreszenzen der Ausgangsstämme, die keine Reporterfusion enthalten, sind als schwarzer Bereich am Fuß jedes Balkens dargestellt (eine Messung).

Wie die Abbildung 2.27 zeigt, wies die heterozygote  $UPC2^{G684D}$  Mutante nur Hintergrundfluoreszenz auf. In der homozygoten  $UPC2^{G684D}$  Mutante konnte ein ca. 2,5-facher Anstieg der Fluoreszenz über dem Hintergrund beobachtet werden, was belegt, dass hyperaktives *UPC2* die *MDR1*-Expression aktivieren kann. Diese *Upc2*-Aktivität scheint abhängig von der Anwesenheit eines intakten *MRR1* zu sein, denn in der  $mrr1\Delta$  Mutante konnte keine  $UPC2^{G684D}$ -vermittelte *MDR1*-Expression detektiert werden.

Die *Upc2*-vermittelte *MDR1*-Expression ist jedoch im Vergleich zur *MDR1*-Expression, die durch hyperaktives *MRR1* induziert wird, fast vernachlässigbar. Stämme, die ein konstitutiv aktives  $MRR1^{P683S}$ -Allel exprimieren, besonders aber die homozygoten  $MRR1^{P683S}$  Transformanten, wiesen eine starke  $P_{MDR1}$ -*GFP*-Aktivierung auf. Das Fehlen der funktionellen *UPC2*-Allele hatte keinen Einfluss auf die *MDR1*-Expression in diesen Mutanten, was belegt, dass *Upc2* für die  $MRR1^{P683S}$ -vermittelte *MDR1*-Expression nicht notwendig ist. Die FACS-Daten zeigen, dass *Upc2* bei der Regulation der *Mdr1*-Effluxpumpe nur eine untergeordnete Rolle spielt, *Mrr1* hingegen ein wichtiger Regulator der *MDR1*-Expression ist.

Es wurde bereits gezeigt, dass die Resistenz gegen Fluconazol in Stämmen mit einer G684D-Mutation in einem *UPC2*-Allel gegenüber dem wildtypischen Ausgangsstamm um das 4-fache erhöht ist, in homozygoten  $UPC2^{G684D}$  Stämmen sogar um das 8-fache [41]. Im MHK-Test der vorliegenden Arbeit mit den selben Stämmen wurden die selben Werte nicht nur im Wildtyp-Hintergrund sondern auch im  $mrr1\Delta$ -Hintergrund abgelesen (siehe 2.28). Hyperaktives *Upc2* erhöhte demnach die Fluconazol-Resistenz in An- und Abwesenheit von *Mrr1* gleichermaßen. Das und die Tatsache, dass es im Gegensatz zu hyperaktivem *Mrr1* die *MDR1*-Expression



**Abbildung 2.28.:** MHK von Fluconazol und Cerulenin für den Wildtypstamm SC5314 sowie die *upc2Δ* (SCUPC2M4) und die *mrr1Δ* (SCMRR1M4) und deren Derivate, in denen eins oder beide *UPC2*- und *MRR1*-Allele durch hyperaktive *UPC2*<sup>G468D</sup>- bzw. *MRR1*<sup>P683S</sup>-Allele ersetzt wurden. Angezeigt sind nur die relevanten Genotypen der jeweiligen Stämme, die Stammnamen sind der Tabelle 4.2 zu entnehmen. Die MHK wurde für jeweils zwei unabhängige Transformanten (A, B) bestimmt.

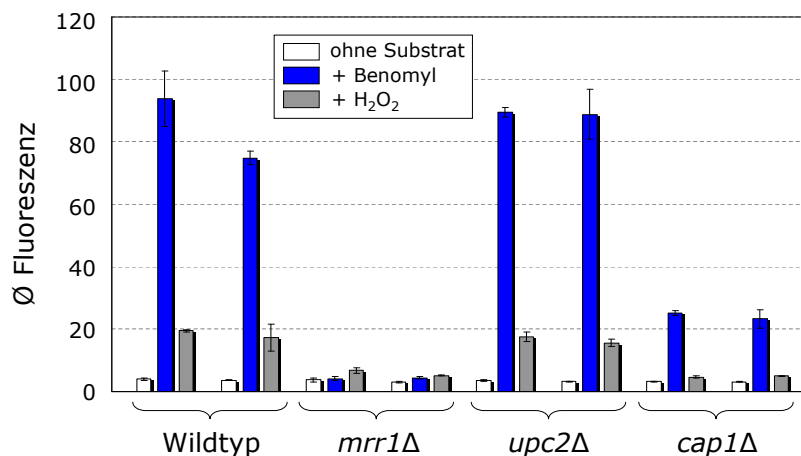
nur minimal aktivierte (siehe Abb. 2.27), zeigt, dass die Fluconazol-Resistenz in *UPC2*<sup>G684D</sup>-exprimierenden Stämmen auf die Überexpression von *ERG11* und anderen Upc2-Targets zurückzuführen ist und nicht auf eine erhöhte *MDR1*-Expression. Die Empfindlichkeit gegenüber Cerulenin, welches ein Substrat der Mdr1-Effluxpumpe ist, wurde weder im Wildtyp-Hintergrund noch im *mrr1Δ*-Hintergrund von der Anwesenheit eines oder zweier *UPC2*<sup>G684D</sup>-Allele beeinflusst.

In *C. albicans*-Stämmen, die ein hyperaktives *MRR1*<sup>P683S</sup>-Allel exprimieren, wurde ein 2-facher Anstieg der Cerulenin-Resistenz beobachtet und in homozygoten *MRR1*<sup>P683S</sup>-Stämmen sogar ein 16-facher Anstieg (Abb. 2.28). Wie schon bei der Aktivierung des *MDR1*-Promotors beobachtet werden konnte (Abb. 2.27), hatte auch in Hinsicht auf die Cerulenin-Resistenz die Abwesenheit von *UPC2* keinen Einfluss auf die *MRR1*<sup>P683S</sup>-Aktivität. Obwohl *upc2Δ* Mutanten hypersensitiv gegenüber Fluconazol waren [29], konnte hier gezeigt werden, dass *MRR1*<sup>P683S</sup> in der *upc2Δ* Mutante in gleichem Maße Resistenz gegen Fluconazol verursacht wie im Wildtyp-Hintergrund. In Stämmen, in denen beide *MRR1*-Allele durch die hyperaktive Form ersetzt wurden, stieg die Fluconazol-Resistenz um das 16-fache. Mit den MHK-Tests konnte belegt werden, dass hyperaktives Mrr1 unabhängig von Upc2 in der Lage ist, eine Resistenz in *C. albicans* zu verursachen.



### 2.3.5. Induzierbarkeit des *MDR1*-Promotors in *mrr1* $\Delta$ , *cap1* $\Delta$ und *upc2* $\Delta$ Mutanten

Die Expression von *MDR1* kann durch toxische Substanzen, wie z.B. Benomyl oder  $H_2O_2$ , induziert werden [82, 105]. Um zu klären, in welchen Maße Mrr1, Cap1 und Upc2 an der Induzierbarkeit von *MDR1* durch diese Substanzen beteiligt sind, wurde die *MDR1*-Promotoraktivität in An- und Abwesenheit von Benomyl und  $H_2O_2$  im Wildtyp-Hintergrund und den Deletionsmutanten quantifiziert.



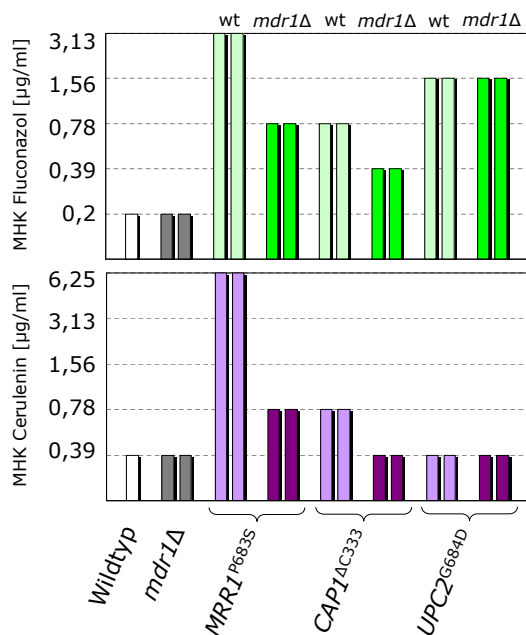
**Abbildung 2.29.:** Induzierbarkeit des *MDR1*-Promotors durch 50  $\mu$ g/ml Benomyl und 0,005 %  $H_2O_2$  im Wildtyp und den *mrr1* $\Delta$ , *cap1* $\Delta$  und *upc2* $\Delta$  Mutanten. Gezeigt sind die Durchschnittsfluoreszenz und die Standardabweichung aus drei Experimenten von jeweils zwei unabhängigen Transformanten (A, B) der unbehandelten und der induzierten Stämme. Verwendete Stämme: SCMPG2 (Wildtyp), SCMRR1M4MPG2 (*mrr1* $\Delta$ ), SC-CAP1M4MPG2 (*cap1* $\Delta$ ) und SCUPC2M4MPG2 (*upc2* $\Delta$ ).

Wie aus Abbildung 2.29 zu entnehmen ist, ließ sich die *MDR1*-Expression im Wildtyp-Hintergrund durch Benomyl und durch  $H_2O_2$  induzieren. Wie bereits in einer früheren Veröffentlichung berichtet wurde [82], war auch in diesem Versuch die Induktion des *MDR1*-Promotors in der *mrr1* $\Delta$  Mutante aufgehoben. Das beweist, dass Mrr1 bei der Aktivierung des *MDR1*-Promotors durch die beiden induzierenden Substanzen unverzichtbar ist. Die Anwesenheit von Upc2 hingegen scheint für die *MDR1*-Expression in Reaktion auf Benomyl und  $H_2O_2$  nicht notwendig zu sein, da die Deletion von *UPC2* keinen Effekt auf die Induzierbarkeit des *MDR1*-Promotors hatte. Die Benomyl-induzierte *MDR1*-Expression war in der *cap1* $\Delta$  Mutante deutlich geringer als im Wildtyp-Hintergrund, während eine  $H_2O_2$ -induzierte Aktivität des *MDR1*-Promotors nicht mehr detektierbar war. Daraus ist zu schließen, dass Cap1 zur *MDR1*-Induktion durch Benomyl beiträgt und essentiell ist für die *MDR1*-Induktion durch  $H_2O_2$ .

### 2.3.6. Anteil der Mdr1 Effluxpumpe an Mrr1-, Cap1- und Upc2-vermittelter Resistenz

Ziel dieses Versuches war es herauszufinden, zu welchem Anteil die Fluconazol- und die Cerulenin-Resistenz, die durch hyperaktives Mrr1, Cap1 und Upc2 verursacht werden, zurückzuführen sind auf die Expression der Mdr1-Effluxpumpe. Dazu wurden die konstitutiv aktiven  $MRR1^{P683S}$ -,  $CAP1^{\Delta C333}$ - und  $UPC2^{G684D}$ -Allele im Wildtyp SC5314 und der  $mdr1\Delta$  Mutante exprimiert und deren Fähigkeit, Resistenz in An- und Abwesenheit von Mdr1 zu verleihen, untersucht.

Dazu mussten vorerst die  $mdr1\Delta$  Stämme, die die hyperaktiven  $MRR1$ - und  $CAP1$ -Allele exprimieren, hergestellt werden. Die SacI-ApaI Fragmente aus pCAP1R1 (Abb. 2.20) und pMRR1R3 (Abb. 2.21) wurden wie unter 2.3.2 beschrieben in die  $mdr1\Delta$  Mutante integriert und im Southern Blot überprüft (nicht gezeigt). Die  $mdr1\Delta$  Mutante wurde von Nico Dunkel angefertigt und für diesen Versuch verwendet. Die Integration der konstitutiv aktiven  $UPC2^{G684D}$ -Allele in die  $mdr1\Delta$  Mutante (Stamm  $\Delta mdr1UPC2R14$ ) wurde von Sabrina Schneider übernommen.



**Abbildung 2.30.:** MHK von Fluconazol und Cerulenin für den Wildtypstamm SC5314 sowie für die  $mdr1\Delta$  Mutante und deren Derivate, in denen die endogenen  $MRR1$ -,  $CAP1$ - und  $UPC2$ -Allele durch die konstitutiv aktive Form des jeweiligen Transkriptionsfaktors ersetzt wurden. Die MHK wurde für jeweils zwei unabhängige Transformanten (A, B) folgender Stämme bestimmt: SC5314 (Wildtyp), SCMDR1M4 ( $mdr1\Delta$ ), SCMRR1R34 und  $\Delta mdr1MRR1R34$  (homozygote  $MRR1^{P683S}$  Mutante im Wildtyp- bzw.  $mdr1\Delta$ -Hintergrund), SCCAP1R14 und  $\Delta mdr1CAP1R14$  (homozygote  $CAP1^{\Delta C333}$  Mutante im Wildtyp bzw.  $mdr1\Delta$ -Hintergrund), SCUPC2R14 und  $\Delta mdr1UPC2R14$  (homozygote  $UPC2^{G684D}$  Mutante im Wildtyp- bzw.  $mdr1\Delta$ -Hintergrund).

Abbildung 2.30 zeigt die Ergebnisse des MHK-Tests für Fluconazol und Cerulenin von Stämmen, die die konstitutiv aktiven  $MRR1^{P683S}$ -,  $CAP1^{\Delta C333}$ - und  $UPC2^{G684D}$ -Allele in An- und Abwesenheit von Mdr1 exprimieren. Die  $MRR1^{P683S}$ -vermittelte Fluconazol-Resistenz sank von einem 16-fachen Anstieg im Wildtyp-Hintergrund auf einen nur 4- bis 8-fachen Anstieg (Abb. 2.30 zeigt nur den 4-fachen Anstieg) in der  $mdr1\Delta$  Mutante. Das bedeutet, dass neben

*MDR1* noch weitere Mrr1-Targets zur Fluconazol-Resistenz in Stämmen mit Mutationen in *MRR1* beitragen. Im Gegensatz dazu sank in Abwesenheit von Mdr1 die Cerulenin-Resistenz in diesen Stämmen vom 16- auf das nur 2-fache, was darlegt, dass die Mrr1 vermittelte Cerulenin-Resistenz fast ausschließlich auf die Aktivität der Mdr1-Effluxpumpe zurückzuführen ist. Die Fluconazol-Resistenz in Stämmen, die das hyperaktive *CAP1*<sup>ΔC333</sup>-Allel exprimieren, war in der *mdr1*Δ Mutante mit einem 2-fachen Anstieg etwas geringer als mit einem 4-fachen Anstieg im Wildtyp-Hintergrund. Daraus lässt sich schließen, dass Mdr1 nur zum Teil zur Cap1-vermittelten Fluconazol-Resistenz beiträgt und weitere Cap1-Targets involviert sind. Cap1-vermittelte Cerulenin-Resistenz, die ohnehin nur sehr gering ist, scheint hingegen abhängig zu sein von einem intakten *MDR1*-Allel, da in der *mdr1*Δ Mutante, die die hyperaktiven *CAP1*<sup>ΔC333</sup>-Allel trägt, keine Cerulenin-Resistenz mehr zu beobachten war. Das hyperaktive *UPC2*<sup>G684D</sup> verursachte im Wildtyp und der *mdr1*Δ Mutante einen Anstieg der Fluconazol-Resistenz um das 8-fache, war also nicht abhängig von der Anwesenheit von Mdr1. Das belegt, dass die Upc2-vermittelte Fluconazol-Resistenz durch die Hochregulierung von *ERG*-Genen und möglicherweise noch weiteren Upc2-Targets verursacht wird. Ein Anstieg der Cerulenin-Resistenz wurde weder im Wildtyp noch in der *mdr1*Δ Mutante beobachtet.

## 2.4. Identifizierung direkter Zielgene von Mrr1

Die Ergebnisse in Abschnitt 2.3.6 zeigten, dass die von den aktivierten *MRR1*<sup>P683S</sup>- und *CAP1*<sup>ΔC333</sup>-Allelen verliehene Fluconazol-Resistenz in *C. albicans* nicht allein auf die Überexpression der Mdr1-Effluxpumpe zurückzuführen ist und demnach vermutlich weitere Targets der Transkriptionsfaktoren in die Resistenzentwicklung involviert sind. Außerdem beeinflusste die Deletion von *MRR1* in klinischen resistenten Isolaten die Fluconazol-Resistenz stärker als die Deletion der *MDR1*-Effluxpumpe selbst, was ebenfalls vermuten ließ, dass Mrr1 die Expression weiterer Gene reguliert, die zur Fluconazol-Resistenz in *C. albicans* beitragen [82]. Morschhäuser *et al.* identifizierten in einer Genom-weiten Expressionsanalyse bereits einige Gene, die von *MRR1*<sup>P683S</sup> reguliert werden [82]. Vergleicht man diese Gene mit Genen, die von Cap1 gebunden und reguliert werden [151], stellt man fest, dass Mrr1 und Cap1 neben *MDR1* einige Targets teilen, wie z.B. *OYE23* und *orf19.251*.

Um Bindestellen von Mrr1 *in vivo* zu identifizieren, wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Martine Raymond (IRIC, Montreal, Kanada) ChIP-on-chip Experimente durchgeführt. Diese Methode vereint Chromatin-Immunopräzipitation mit der Hybridisierung auf Microarrays, die das gesamte *C. albicans* Genom in kurzen Oligonukleotiden abdecken. Ob das Fehlen von Cap1 einen Einfluss auf das *in vivo*-Bindeprofil von Mrr1 hat, wurde ebenfalls in diesen ChIP-on-chip Versuchen untersucht.

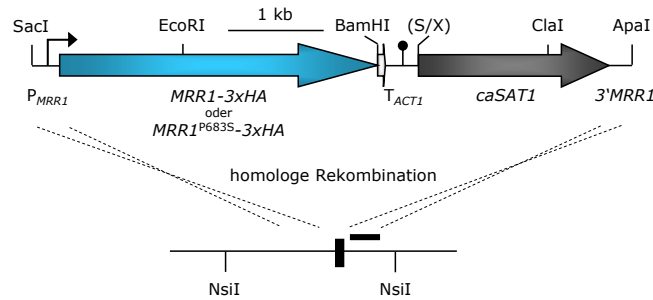
Zusätzlich wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von David Rogers (Memphis, USA) Transkriptionsprofile erstellt, um herauszufinden, ob die von Mrr1 gebunden Gene auch von Mrr1 reguliert werden und ob die Abwesenheit von Cap1 das Transkriptionsprofil von Mrr1 beeinflusst.

### 2.4.1. ChIP-on-chip: Vorversuche

Wie bereits in Chip-on-chip Studien von Cap1, Upc2 und Tac1 beschrieben [66, 151, 153] wurde für die Immunopräzipitation mit einem anti-HA-Antikörper Mrr1 mit einem C-terminalen HA-Tag versehen.

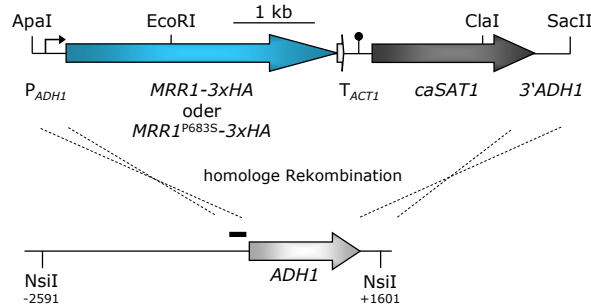
Zuerst wurde der Effekt des HA-Tags auf die Aktivität des wildtypischen und des hyperaktiven Mrr1-Proteins getestet, die sowohl unter der Kontrolle des endogenen *MRR1*-Promotors als auch unter der Kontrolle des konstitutiv aktiven *ADH1*-Promotors exprimiert wurden.

Für die Konstruktion der Expressionskassetten aus den Plasmiden pZCF36H2 und pZCF36H3 wurde das 3xHA-*ACT1T* Fragment aus pYML127HAT zusammen mit dem 5'*caSAT1* Fragment aus pSAT1 in die BamHI/Clal-gespaltenen Vektoren pZCF36G2 und pZCF36G3, die das



**Abbildung 2.31.: Konstrukt aus den Plasmiden pZCF36H2 und pZCF36H3.** Das SacI-ApaI Fragment enthält das wildtypische (pZCF36H2) bzw. das hyperaktive *MRR1*-Allel (pZCF36H3) mit einem C-terminalen HA-Tag, den Aktinterminator  $T_{ACT1}$  und den *caSAT1*-Resistenzmarker. Relevante Schnittstellen (EcoRI, BglIII, Sall (S), XhoI (X) und ClaI) sind angegeben. Durch deren Fusion gingen die Sall- und die XhoI-Schnittstelle verloren. Das SacI-ApaI Fragment wurde über homologe Rekombination der 5'- und der 3'*MRR1*-Region in den *C. albicans MRR1*-Locus der *mrr1* $\Delta$  Mutanten integriert (unten). Über den Verdau mit NsiI und anschließende Hybridisierung der Fragmente im Southern Blot wurde die Transformation überprüft. Der kurze schwarze Balken markiert die Bindestelle der 3'*MRR1*-Sonde.

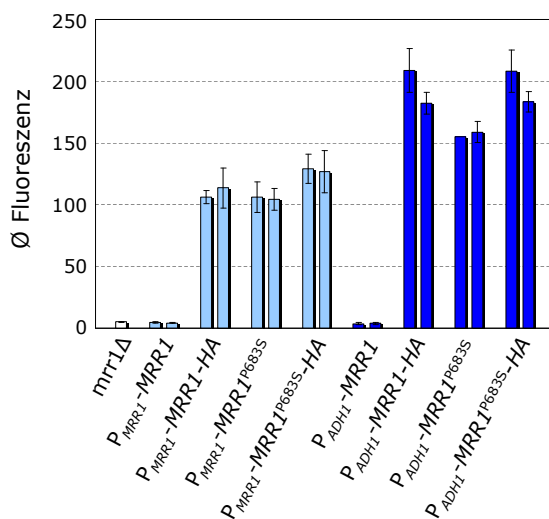
wildtypische *MRR1*- bzw. das mutierte *MRR1*<sup>P683S</sup>-Allel enthalten, kloniert (Abb. 2.31). Über homologe Rekombination wurden die SacI-ApaI Fragmente aus pZCF36H2 und pZCF36H3 in den *MRR1*-Locus der *mrr1* $\Delta$  Mutante, sowohl des Wildtypstammes (SCMRR1M4) als auch des Stammes mit der  $P_{MDR1}$ -GFP-Reporterfusion (CAG48MRR1M4), integriert. Die Transformation wurde durch eine NsiI-Spaltung der genomischen DNA von jeweils zwei unabhängigen Transformanten und anschließender Detektion der Fragmente mit der 5'*MRR1*-Sonde im Southern Blot überprüft (nicht gezeigt). Integrierte das Fragment in den *MRR1*-Locus der *mrr1* $\Delta$  Mutante, war zusätzlich zum  $\sim 1,7$  kb Fragment des Ausgangsstammes (*mrr1* $\Delta$  Mutante) ein ca.  $\sim 7,5$  kb großes Fragment zu erkennen.



**Abbildung 2.32.: Konstrukt aus den Plasmiden pZCF36EH2 und pZCF36EH3.** Das ApaI-SacII Fragment enthält das wildtypische (pZCF36EH2) bzw. das hyperaktive *MRR1*-Allel (pZCF36EH3) mit einem C-terminalen HA-Tag, den Aktinterminator  $T_{ACT1}$  und den *caSAT1*-Resistenzmarker. Zu homologen Rekombination in den *ADH1*-Locus von *C. albicans* (unten) ist die Kasette flankiert von der *ADH1*-Promotorregion und der 3'*ADH1*-Region. Die für die Konstruktion der Plasmide relevanten Schnittstellen EcoRI und ClaI sind angegeben. Über den Verdau mit NsiI und anschließende Hybridisierung der Fragmente im Southern Blot wurde die Transformation überprüft. Der kurze schwarze Balken markiert die Bindestelle der 5'*ADH1*-Sonde.

Zusätzlich wurden die 3'*MRR1*-3xHA-*ACT1T* Fragmente aus pZCF36H2 und pZCF36H3 (Abb. 2.31) über *EcoRI* und *Clal* in das Plasmid pZCF36E2 kloniert. Die erhaltenen Plasmide mit HA-fusioniertem *MRR1* (wildtypisches und aktiviertes) unter der Kontrolle des *ADH1*-Promotors wurden pZCF36EH2 bzw. pZCF36EH3 genannt (siehe Abb. 2.32). Die *Apal*-*SacII* Fragmente aus diesen Plasmiden wurden in den *ADH1*-Locus der *mrr1* $\Delta$  Mutanten SCMRR1M4 und CAG48MRR1M4, das die Reporterfusion enthält, integriert. Zur Kontrolle der Transformation wurde die genomische DNA von jeweils zwei unabhängigen Transformanten mit *NsiI* gespalten und im Southern Blot mit der 5'*ADH1*-Sonde hybridisiert (nicht gezeigt). Bei erfolgreicher Integration der Fragmente in den *ADH1*-Locus der *mrr1* $\Delta$  Mutante, war zusätzlich zum wildtypischen  $\sim 4,2$  kb Fragment ein  $\sim 9,5$  kb Fragment zu beobachten.

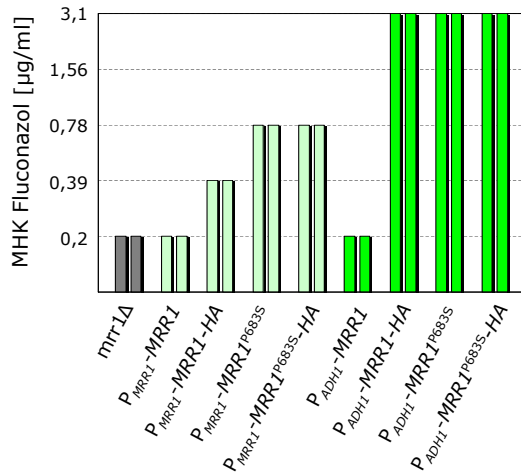
Die Fähigkeit der wildtypischen und hyperaktiven *MRR1*-Allele (mit und ohne HA-Epitop), die unter der Kontrolle des eigenen *MRR1*-Promotors und des konstitutiv aktiven *ADH1*-Promotors exprimiert werden, den *MDR1*-Promotor zu aktivieren, wurde mittels Durchflusssy-tometrie quantifiziert.



**Abbildung 2.33.:** Aktivität des *MDR1*-Promotors in *C. albicans* *mrr1* $\Delta$  Mutanten, die das wildtypische *MRR1*-Allel oder das *MRR1*<sup>P683S</sup> mit und ohne HA-Tag entweder unter der Kontrolle des endogenen *MRR1*-Promotors oder des starken *ADH1*-Promotors exprimieren. Die durchschnittliche Fluoreszenz und die Standardabweichung wurde aus drei Experimenten von jeweils zwei unabhängigen Transformanten (B1, B2) folgender Stämme ermittelt (Abb. v.l.n.r.): CAG48MRR1M4B (nur eine Transformante), CAG48MRR1M4K2, CAG48MRR1M4K3, CAG48 $\Delta$ *mrr1*MH2, CAG48 $\Delta$ *mrr1*MH3, CAG48 $\Delta$ *mrr1*ME2, CAG48 $\Delta$ *mrr1*ME3, CAG48 $\Delta$ *mrr1*MEH2, CAG48 $\Delta$ *mrr1*MEH3.

Wie in Abbildung 2.33 zu sehen ist, ist die Aktivität des *MDR1*-Promotors in Stämmen, die HA-fusioniertes wildtypisches *MRR1* exprimieren, hochreguliert. Das Anhängen eines HA-Epitops bewirkte demnach eine konstitutive Aktivität des wildtypischen *MRR1*-Allels, die vergleichbar mit der Aktivität des hyperaktiven *MRR1*<sup>P683S</sup> war. Solch ein aktivierender Effekt eines C-terminalen HA-Tags wurde bereits bei *Upc2* beobachtet [153] und ist möglicherweise auf das Aufdecken einer Aktivierungsdomäne des Transkriptionsfaktors zurückzuführen.

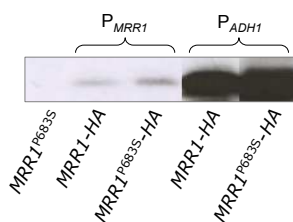
Die Expression derselben Konstrukte unter der Kontrolle des starken *ADH1*-Promotors führte zu einer noch stärkeren Aktivierung des *MDR1*-Promotors, während die Überexpression des



**Abbildung 2.34.:** MHK von Fluconazol für die *C. albicans mrr1Δ* Mutanten, die das wildtypische *MRR1*-Allel oder das *MRR1*<sup>P683S</sup>-Allel mit und ohne HA-Epitop entweder unter der Kontrolle des endogenen *MRR1*-Promotors oder des starken *ADH1*-Promotors exprimieren. Die MHK wurde für jeweils zwei unabhängige Transformanten (A,B) folgender Stämme bestimmt (Abb. v.l.n.r.): SCMRR1M4, SCMRR1M4K2, SCMRR1M4K3, SCΔ*mrr1*MH2, SCΔ*mrr1*MH3, SCΔ*mrr1*ME2, SCΔ*mrr1*ME3, SCΔ*mrr1*MEH2, SCΔ*mrr1*MEH3.

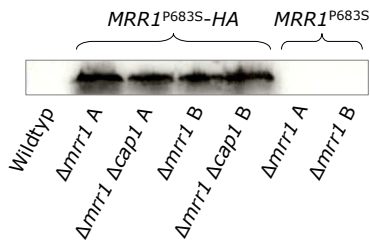
wildtypischen unmarkierten *MRR1*-Allels keinen Effekt auf die *MDR1*-Promotoraktivität hatte (siehe Abb. 2.33).

Die Daten des MHK-Tests (Abb. 2.34) mit Fluconazol für die *mrr1Δ* Mutanten, in die dieselben Konstrukte integriert wurden, unterstreichen die Ergebnisse der FACS-Analyse. Das Anfügen eines HA-Epitops an den C-Terminus von Mrr1 resultierte in einem Anstieg der Fluconazol-Resistenz, woraus zu schließen ist, dass es dem Mrr1-Protein konstitutive Aktivität verleiht. Vergleichbar mit dem Anstieg der *MDR1*-Promotoraktivität stieg auch die Fluconazol-Resistenz weiter an, wenn die HA-fusionierten *MRR1*-Allele und der Kontrolle des konstitutiv aktiven *ADH1*-Promotors anstelle des endogenen *MDR1*-Promotors exprimiert wurden.



**Abbildung 2.35.:** Western Blot zum Vergleich der Expression der *MRR1*-HA- bzw. der *MRR1*<sup>P683S</sup>-HA-Fusion hinter dem endogenen *MRR1*-Promotor (schwache Banden) und dem starken *ADH1*-Promotor (starke Banden) in den *C. albicans mrr1Δ* Mutanten. Als Kontrolle diente die *mrr1Δ* Mutante (keine Bande), die das *MRR1*<sup>P683S</sup>-Allel ohne HA-Tag exprimiert. Gezeigt ist nur jeweils eine Transformante (B) je Stamm. Nicht relevante Spuren wurden aus dem Bild herausgeschnitten.

Aufgrund der stärkeren Aktivität (s.o.) und der stärkeren Expression, wie dem Western Blot aus Abbildung 2.35 zu entnehmen ist, wurden die Chip-on-chip Versuche mit dem Stamm durchgeführt, der das HA-markierte *MRR1*<sup>P683S</sup> unter der Kontrolle des *ADH1*-Promotors anstelle des eigenen *MRR1*-Promotors trägt.



**Abbildung 2.36.:** Western Blot zum Vergleich der Expression der  $MRR1^{P683S}$ -HA Fusion in der *C. albicans*  $mrr1\Delta$  und der  $mrr1\Delta cap1\Delta$  Mutante. Als Negativkontrolle dienten der Wildtypstamm SC5314 und die  $mrr1\Delta$  Mutante, die das  $MRR1^{P683S}$ -Allel ohne HA-Tag exprimiert ( $mrr1\Delta$  A und B). Gezeigt sind jeweils zwei Transformanten (A,B) je Stamm.

Um in Abwesenheit von Cap1 ein *in vivo*-Bindeprofil von Mrr1 erstellen zu können, wurde das ApaI-SacII Fragment aus pZCF36EH3 (Abb. 2.32) zusätzlich in die  $mrr1\Delta cap1\Delta$  Doppelmutante integriert und die positiven Transformanten wie oben beschrieben identifiziert.

Um vergleichbare Ergebnisse bei den ChIP-on-chip Versuchen in der  $mrr1\Delta$  Singlemutante und der  $mrr1\Delta cap1\Delta$  Doppelmutante zu bekommen, ist eine etwa gleichstarke Expression der Mrr1-Proteine in den Mutanten notwendig. Die Expression in den Mutanten wurde überprüft, indem die Proteine der jeweiligen Stämme isoliert und jeweils die gleiche Menge Gesamtprotein auf einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt wurde. Die Detektion der Proteine mit dem anti-HA-Antikörper ließ in allen Spuren eine Bande gleicher Stärke sichtbar werden (siehe Abb. 2.36), was belegt, dass  $Mrr1^{P683S}$  in beiden unabhängigen Transformanten sowohl der  $mrr1\Delta$  Singlemutante als auch der  $mrr1\Delta cap1\Delta$  Doppelmutante in gleicher Menge exprimiert wird.

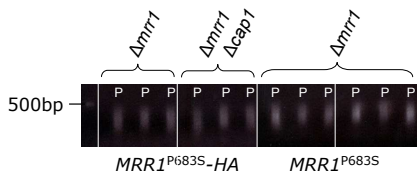
#### 2.4.2. ChIP-on-chip: Durchführung und Ergebnisse

Die Chip-on-chip Versuche wurden mit jeweils einer  $mrr1\Delta$  und einer  $mrr1\Delta cap1\Delta$  Mutante durchgeführt, die das hyperaktive HA-fusionierte  $MRR1^{P683S}$  unter der Kontrolle des *ADH1*-Promotors exprimieren. Als Vergleichsstamm wurde der Stamm, der das unmarkierte  $MRR1^{P683S}$  unter dem *ADH1*-Promotor trägt, verwendet.

Die genaue Versuchsdurchführung ist im Kapitel Material und Methoden unter 4.7.16 im Detail beschrieben, an dieser Stelle werden nur einige wichtige Zwischenschritte erwähnt. Es wurden je Stamm drei unabhängige Kulturen verwendet. Die Proteine wurden mit der DNA vernetzt (Crosslink), die DNA extrahiert und zerschnitten. Nach der Immunopräzipitation mit dem anti-HA-Antikörper wurden die DNA-Fragmente amplifiziert und gleichzeitig für das Labeling mit Cy3 bzw. Cy5 mit AA-dUTP Gruppen versehen. Abbildung 2.37 zeigt die DNA-Fragmente jedes Stammes vor und nach der PCR.

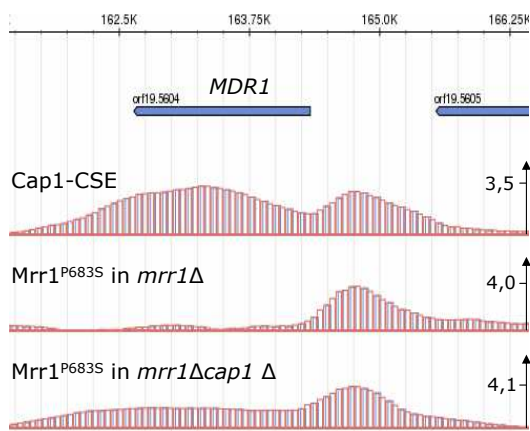
Die Fragmente der HA-markierten Stämme wurden mit dem Farbstoff Cy3 und die des Kontrollstammes mit Cy5 gelabelt, vermischt und mit dem *C. albicans* Whole Genome Tiling Array (NimbleGen) hybridisiert, der das gesamte *C. albicans*-Genom abdeckt. Die Chips wurden gescannt und mittels der NimbleScan Software so prozessiert, dass die Cy3- und Cy5-Werte





**Abbildung 2.37.: Überprüfung der Amplifikation der immunopräzipitierten DNA-Fragmente.** Die nach der Immunopräzipitation aufgereinigten DNA-Fragmente wurden in einer PCR amplifiziert. Die Abbildung zeigt Aliquots der Fragmente aus jeweils drei unabhängigen Ansätzen folgender Stämme vor und nach (P) der PCR (v.l.n.r.):  $SC\Delta mrr1EH3$  und  $SC\Delta mrr1CAP1M4MEH3$  ( $MRR1^{P683S}$ -HA in der  $\Delta mrr1$  Mutante bzw. der  $\Delta mrr1 \Delta cap1$  Mutante),  $SC\Delta mrr1E3$  ( $MRR1^{P683S}$  in  $\Delta mrr1$  Mutante).

von jedem unabhängigen Replikat mit dem Programm Telescope [149] weiterverarbeitet werden konnten. Die Daten der jeweils drei unabhängigen Replikate wurden normalisiert und miteinander kombiniert. Die so erlangte Datenflut konnte mit Hilfe der Candida albicans Montreal Database (MCDB; <https://www.candida-montreal.ca/>) visualisiert und ausgewertet werden.



**Abbildung 2.38.: Visualisierung der ChIP-on-chip Daten in der Candida albicans Montreal Database.** Die kleinen Balken repräsentieren die Bindeintensität der ChIP-on-chip Fragmente an jedes einzelne 50mer-Oligo auf dem Microarray. Dargestellt ist die Bindung von C-terminal verkürztem Cap1 im Wildtyp-Hintergrund (Cap1-CSE; Daten von S. Znaidi [151]) und von  $Mrr1^{P683S}$  in der  $mrr1\Delta$  und der  $mrr1\Delta cap1\Delta$  Mutante an die  $MDR1$ -Region. Die Pfeile stehen für die ORFs und der obere Balken zeigt die Position des ORFs auf dem jeweiligen Contig aus dem *C. albicans* Assembly 19 an (hier Contig19-10230).

Abbildung 2.38 zeigt am Beispiel der Bindung von  $Mrr1^{P683S}$  an die Region des orf19.5605 ( $MDR1$ ), wie eine Visualisierung der Daten in der Candida albicans Montreal Database aussieht. Die Bindung der ChIP-on-chip Fragmente kann entweder als einzelner Peak (hit list; nicht gezeigt) oder als Balken für jedes einzelne 50mer- bzw. 70mer-Oligo (signal map; Abb. 2.38) dargestellt werden. Mit einem Mausklick auf den Pfeil, der das ORF repräsentiert, konnte somit Name und Funktion des gebundenen Gens (bzw. des Gens in dessen Promotorregion  $Mrr1$  gebunden hat) abgelesen werden, sofern diese bereits bekannt waren. Zusätzlich zur Bindung des  $Mrr1^{P683S}$ -Proteins im wildtypischen Hintergrund wurde auch dessen Bindung in der  $cap1\Delta$  Mutante dargestellt, um zu untersuchen, ob es einen Unterschied im Bindeprofil von  $Mrr1^{P683S}$  gibt, wenn Cap1 nicht vorhanden ist. Außerdem konnten die Daten des ChIP-on-chip Versuches mit hyperaktivem Cap1-CSE (von S. Znaidi [151]) mit hochgeladen werden, um gemeinsame Zielgene von  $Mrr1$  und Cap1 zu identifizieren.

Die Auswertung der Daten ergab 710  $Mrr1$ -Bindestellen, die bei einem  $P$ -Value  $\leq 0,01$  mit einer mindestens zweifachen Intensität gebunden wurden (siehe auch Tabelle S3 in supplemental

material in Schubert *et al.* (2011) [120]). Davon wurden 608 ebenfalls als Hits in der *cap1*Δ Mutante identifiziert, was zeigte, dass Mrr1 die meisten seiner Zielgene unabhängig von Cap1 bindet.

Eine detaillierte Analyse der Daten ergab, dass 490 dieser Bindestellen einem spezifischen ORF zugeordnet werden konnten. Davon wiesen 453 einen und 31 mehr als einen Bindingpeak auf, sodass insgesamt 484 ORF charakterisiert werden konnten, die von Mrr1 gebunden wurden. Einundsiebzig Bindestellen schienen zu mehr als einem ORF zu gehören, während 149 Hits hingegen nicht in der Nähe eines ORF zu finden waren.

Auch das *MDR1*-Gen konnte als Target von Mrr1 identifiziert werden sowie auch alle weiteren der 19 Gene, die von Morschhäuser *et al.* (2007) als von Mrr1 reguliert beschrieben wurden [82]. Außerdem scheint Mrr1 sich selbst zu regulieren, da es auch an seinen eigenen Promotor bindet.

### 2.4.3. Mrr1-Transkriptionsprofil

Wie schon oben erwähnt, haben Morschhäuser *et al.* bei einem Vergleich der Transkriptionsprofile eines Stammes, der wildtypisches *MRR1*, und eines Stammes, der hyperaktives *MRR1*<sup>P683S</sup> exprimiert, gezeigt, dass neben *MDR1* noch 18 weitere Gene von Mrr1 signifikant hochreguliert werden, die möglicherweise zur Fluconazol-Resistenz beitragen [82]. Die ChIP-on-chip Experimente zeigten, dass diese 19 von Mrr1 regulierten Gene auch von Mrr1 gebunden werden. Die Experimente von Morschhäuser *et al.* wurden allerdings mit einem Stamm durchgeführt, der nur eine Kopie des *MRR1*<sup>P683S</sup>-Allels trägt. Aufgrund des stärkeren Effekts zweier Kopien des *MRR1*<sup>P683S</sup>-Allels auf die *MDR1*-Expression (siehe Abb. 2.23 und Abb. 2.27) wurden für diese Arbeit in Kooperation mit David Rogers' Labor in Memphis (USA) Expressionsprofile erstellt mit Stämmen, die homozygot für die P683S-Mutation (SCMRR1R34) sind. Um zu untersuchen, ob Mrr1 auch in Abwesenheit von Cap1 seine Zielgene aktivieren kann, wurden die Expressionsprofile der homozygoten *MRR1*<sup>P683S</sup> Mutante nicht nur im Wildtyp-Hintergrund sondern auch im *cap1*Δ-Hintergrund erstellt und diese miteinander verglichen.

Es wurden 83 Gene identifiziert, die in zwei unabhängigen homozygoten *MRR1*<sup>P683S</sup> Transformanten im Vergleich zum Wildtypstamm SC5314 reproduzierbar (in zwei unabhängigen Experimenten) hochreguliert waren (siehe auch Tabelle S2 in supplemental material in Schubert *et al.* (2011) [120]). Von den 83 Genen konnten 67 in der *cap1*Δ Mutante als hochreguliert identifiziert werden, davon allerdings nur 25 signifikant (> 2-fach), während 27 nicht signifikant (< 2-fach) hochreguliert waren. Für 15 Gene war die Hochregulierung in einem Versuch geringer als 2-fach, in der anderen Durchführung höher als 2-fach. Fast alle Gene (21 von 27), die in der *cap1*Δ Mutante weniger als 2-fach hochreguliert waren, waren im Wildtyp-Hintergrund

ebenfalls nur gering (<3-fach) hochreguliert. Von den 31 Genen, die im Wildtyp stark (>4-fach) hochreguliert waren, war allerdings in der *cap1*Δ Mutante nur eins reproduzierbar nicht hochreguliert, nämlich *OYE23*.

#### 2.4.4. Vergleich der von aktiviertem Mrr1 gebundenen Gene mit den von Mrr1 regulierten Genen

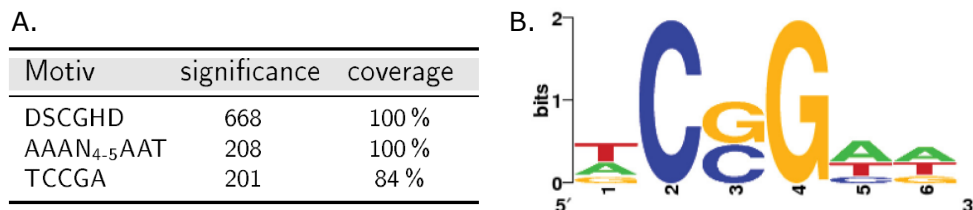
Vergleicht man die ChIP-on-chip Ergebnisse mit den Daten aus der Expressionsanalyse stellt man fest, dass 40 der von Mrr1 gebundenen Gene auch hochreguliert werden in *C. albicans*-Stämmen, die hyperaktives Mrr1<sup>P683S</sup> exprimieren. Diese 40 von Mrr1 gebundenen und hochregulierten Gene scheinen also direkte Targets von Mrr1 zu sein, unter ihnen die *MDR1*-Effluxpumpe und *MRR1* selbst. Tabelle 2.1 zeigt eine Zusammenfassung der Daten und eine Beschreibung der Funktion der von aktiviertem Mrr1 gebundenen und hochregulierten Gene. Auffällig ist das häufige Auftreten von putativen Oxidoreduktasen (z.B. Arylalkohol-Dehydrogenasen), die eventuell benötigt werden, die durch Fluconazol entstandene Zellschädigung zu beheben. Neun der von Mrr1 gebundenen Gene waren in der Expressionsanalyse herunterreguliert (nicht gezeigt), was aber wahrscheinlich auf einen indirekten Effekt zurückzuführen ist.

**Tabelle 2.1.:** von Mrr1 hochregulierte und gebundenen Gene.

ORF	Gen	molekulare Funktion	Hochregulierung		Bindung	
			WT	<i>cap1</i> Δ	WT	<i>cap1</i> Δ
orf19.4476		Arylalkohol-Dehydrogenase	15424,4	2019,7	4,5	4,0
orf19.1048	<i>IFD6</i>	Arylalkohol-Dehydrogenase	778,0	422,9	4,1	3,9
orf19.271	<i>ADH4</i>	Coenzym-A-Reduktase	269,6	90,4	4,6	4,9
orf19.5604	<i>MDR1</i>	Multidrug-Effluxpumpe	263,1	829,5	5,5	4,6
orf19.629	<i>IFD6</i>	Arylalkohol-Dehydrogenase	222,0	260,3	3,6	
orf19.4477	<i>CSH1</i>	Arylalkohol-Dehydrogenase	203,3	202,1	3,7	4,0
orf19.7306		unbekannt	81,8	83,9	2,7	4,3
orf19.4309	<i>GRP2</i>	Oxidoreduktase	34,5	32,8	5,1	4,1
orf19.251		unbekannt	27,1	51,8	5,0	4,3
orf19.3131	<i>OYE32</i>	NADPH-Dehydrogenase	16,6	9,2	3,7	3,7
orf19.7166		unbekannt	12,7	17,8	4,6	3,8
orf19.7042		unbekannt	11,5	16,1	5,8	7,2
orf19.4505	<i>ADH3</i>	Alkohol-Dehydrogenase	8,1		4,7	4,8
orf19.5862		Aginase	7,7		2,7	3,1
orf19.1449		unbekannt	6,5	15,4	3,3	4,0
orf19.3433	<i>OYE23</i>	NADPH-Dehydrogenase	6,1		5,4	3,7
orf19.6993	<i>GAP2</i>	Polyamin-Transmembrantransporter	5,9		3,0	3,1
orf19.7204		unbekannt	5,4	29,9	3,9	5,6
orf19.3668	<i>HGT2</i>	Glucose-Transmembrantransporter	5,1		2,1	
orf19.780	<i>DUR1,2</i>	Allophanat-Hydrolase, Harnstoff-Carboxylase	5,0	4,3	2,7	2,8
orf19.6311		unbekannt	4,6	3,6	3,6	3,3
orf19.1523	<i>FMO1</i>	unbekannt	4,4		2,3	2,1
orf19.86		Gluthathion-Peroxidase	4,3	6,0	3,4	3,2
orf19.5741	<i>ALS1</i>	Zelladhäsionsmolekül	4,2		2,8	3,0
orf19.111	<i>CAN2</i>	Aginin-Transmembrantransporter	4,0		2,5	2,7
orf19.1240		unbekannt	3,0	4,6	5,3	6,0
orf19.742	<i>ALD6</i>	Aldehyd-Dehydrogenase	2,9		2,7	2,4
orf19.2726		unbekannt	2,8	2,7	3,5	3,5
orf19.918	<i>CDR11</i>	Xenobiontischer ATPase-Transporter	2,7		4,3	4,1
orf19.789	<i>PYC2</i>	Pyruvat-Carboxylase	2,7		2,5	
orf19.5911	<i>CMK1</i>	Calmodulin-abh. Proteinkinase	2,6		3,0	3,0
orf19.7148	<i>TPO2</i>	Drug-Transmembrantransporter	2,6		5,8	5,1
orf19.4056	<i>GAT2</i>	Transkriptionsfaktor	2,5		2,7	2,8
orf19.6586		unbekannt	2,4	2,8	4,2	3,5
orf19.4527	<i>HGT1</i>	Glucose-Transmembrantransporter	2,4		3,0	2,1
orf19.5713	<i>YMX6</i>	NADH-Dehydrogenase	2,4	2,8	4,2	4,7
orf19.3364		unbekannt	2,4		2,9	3,7
orf19.7372	<i>MRR1</i>	RNA-Pol. II Transkriptionsfaktor	2,3	2,7	3,7	4,0
orf19.4778	<i>LYS142</i>	Transkriptionsfaktor	2,3		3,7	4,0
orf19.5282		unbekannt	2,2		3,6	4,0

### 2.4.5. Identifikation eines potentiellen Mrr1-Bindemotivs

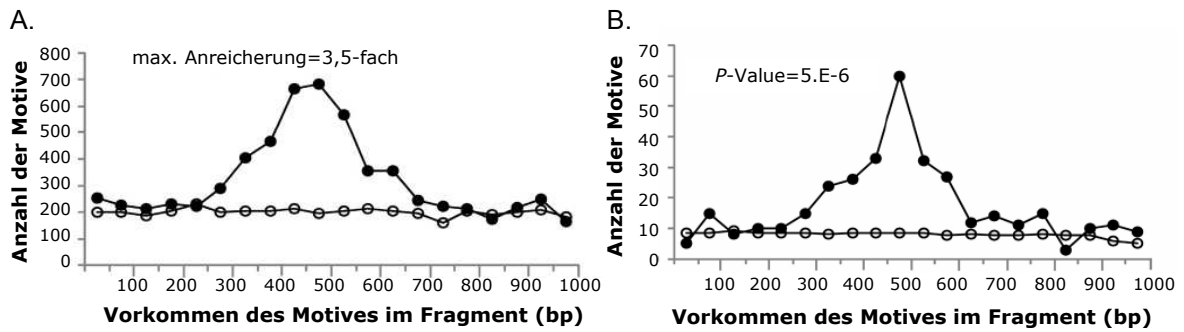
Es konnte bereits gezeigt werden, dass Bindemotive von Transkriptionsfaktoren sich in ChIP-on-chip Fragmenten in der Nähe des Peakmaximums befinden [17]. Für die Identifikation eines potentiellen Mrr1-Bindemotivs wurden daher aus allen 710 Hits aus den ChIP-on-chip Daten die Sequenzen der 500 bp up- und downstream des Peakmaximums aus der *C. albicans* Assembly 19 Sequenz extrahiert. In Kooperation mit Bioinformatikern aus dem Institute for Research in Immunology and Cancer in Montreal wurden mit Hilfe des Programmes SCOPE (Suite for Computational Identification of Promoter Elements; <http://genie.dartmouth.edu/scope/> [16]) die 100 Sequenzen analysiert, die die stärkste Mrr1-Bindeintensität (> 4-fach) aufwiesen. Die 1000 bp um die Spitze des Peaks der 100 von Mrr1 am stärksten gebundenen Sequenzen wurden mit drei unterschiedlichen Algorithmen auf Motive mit hoher Häufigkeit (significance) und Verteilung (coverage) analysiert [149].



**Abbildung 2.39.: Identifikation möglicher Mrr1-Bindemotive mit SCOPE.** **A.** Drei mögliche Mrr1-Bindemotive, die innerhalb der 100 untersuchten Sequenzen häufig (significance) und mit einer hohen Verteilung (coverage) vorkommen. D kann Aminosäure A, T oder G sein, S Aminosäure C oder G und H Aminosäure A, T oder C. **B.** Weblogo des Motivs DCSGHD.

Die Motive in Abbildung 2.39 A waren die drei am häufigsten vorkommenden Motive mit der besten Verteilung innerhalb der 100 untersuchten Sequenzen. Das Motiv DCSGHD (Abb. 2.39 B) war 668 mal und zwar in 100% der Sequenzen vorhanden. Vergleicht man das Vorkommen dieses Motivs in den 710 Bindestellen von Mrr1 mit dem Vorkommen in 710 zufällig ausgewählten Promotorsequenzen, war es in den 710 ChIP-on-chip Hits signifikant häufiger vertreten (Abb. 2.40 A). Auch in der Sequenz der 40 von Mrr1 hochregulierten Gene wurde das DCSGHD-Motiv wesentlich häufiger gefunden als in den Promotorregionen aller anderen Gene (Abb. 2.40 B).

Wie schon in der Einleitung beschrieben weiß man von einigen Zinc-Cluster-Transkriptionsfaktoren, dass sie häufig als Dimere an CGG-Triplets mit unterschiedlicher Orientierung und unterschiedlichen Abständen binden [71]. In dieser Arbeit konnten mit dem Programm SCOPE keine spezifischen CSG-Motive identifiziert werden. Allerdings konnte gezeigt werden, dass Mrr1 wahrscheinlich an einzelne CGG-Triplets bindet, die von AT-reichen Sequenzen flankiert



**Abbildung 2.40.: Anreicherung des DCSGHD-Motivs. A.** Vorkommen des DCSGHD-Motivs in den 710 ChIP-on-chip Sequenzen (ausgefüllte Kreise) im Vergleich zum Vorkommen in 710 zufällig ausgewählten Sequenzen (offene Kreise). Die maximale Anreicherung des Motivs wurde mit einem 3,5-fachen Vorkommen in der Mitte der 1 kb Sequenzen beobachtet. **B.** Vorkommen des DCSGHD-Motivs in den Sequenzen der 40 Gene, die von Mrr1 gebunden und hochreguliert wurden (ausgefüllte Kreise) im Vergleich zum Vorkommen in allen anderen Genen (offene Kreise). Der *P*-Value von 5.E-06 beschreibt die Wahrscheinlichkeit, diese Motiv-Verteilung in einem zufälligen Datenset zu beobachten.

sind (siehe Motiv DCSGHD in Abb. 2.39 B), eventuell auch als Monomer, wie es bereits für einige Zinc-Cluster-Transkriptionsfaktoren gezeigt werden konnte [13]. Die Tatsache, dass das DCSGHD-Motiv innerhalb einer Promotorregion mehrfach vorhanden ist, lässt jedoch vermuten, dass Mrr1 mehr als eine Bindestelle benutzt, um die Transkription der Targets zu aktivieren.

## 3. Diskussion

### 3.1. Gain-of-function Mutationen in CdMRR1 verursachen MDR1-Überexpression und Fluconazol-Resistenz

Der Zinc-Cluster-Transkriptionsfaktor Mrr1 ist ein wichtiger Regulator der *MDR1*-Effluxpumpe in *C. albicans*. Alle bisher untersuchten klinischen und *in vitro* generierten Fluconazol-resistenten *C. albicans*-Isolate, die die *MDR1*-Effluxpumpe überexprimieren, weisen aktivierende Mutationen in *MRR1* auf, was die konstitutive Hochregulierung von *MDR1* verursacht [28, 82]. In *C. albicans* wird eine Resistenz häufig auch durch die Hochregulierung der ABC-Transporter *CDR1* und *CDR2* verursacht [94]. In *C. dubliniensis* hingegen, einer Spezies, die mit *C. albicans* nahe verwandt ist, ist die Resistenz in fast allen resistenten Stämmen auf die *MDR1*-Überexpression zurückzuführen, da *CDR1* in vielen Stämmen eine Nonsense-Mutation trägt und *CDR2* nur gering exprimiert wird [97]. Es stellte sich die Frage, ob *C. dubliniensis* ein Ortholog zu *MRR1* aus *C. albicans* enthält und ob ebenfalls aktivierende Mutationen in diesem Transkriptionsfaktor für die Überexpression der *MDR1*-Effluxpumpe und die Resistenz in *C. dubliniensis* verantwortlich sind. Es konnte das zu CaMRR1 homologe CdMRR1 identifiziert werden, das in der Lage war, die Benomyl-induzierte *MDR1*-Expression in *C. albicans mrr1*Δ Mutanten wieder herzustellen. In allen fünf zur Verfügung stehenden *MDR1*-überexprimierenden Stämmen, einem klinischen Isolat und vier *in vitro* generierten Stämmen (beschrieben in Moran *et al.* [78, 79]), wurden Mutationen in CdMRR1 entdeckt, die die *MDR1*-Überexpression (siehe Abb. 2.4) und eine Resistenz (siehe Abb. 2.5) bewirkten. Das lässt vermuten, dass Mutationen in *MRR1* nicht nur in *C. albicans* sondern auch in *C. dubliniensis* die Hauptursache und eventuell sogar die einzige Ursache für die Überexpression von *MDR1* sind.

Abbildung 3.1 zeigt die Positionen der in dieser Arbeit entdeckten Mutationen im CdMrr1-Protein mit entsprechenden Positionen im CaMrr1-Protein (oben) und die Positionen der gain-of-function Mutationen, die bereits in Fluconazol-resistenten *C. albicans*-Stämmen beschrieben wurden (unten). Vier der fünf CdMrr1 gain-of-function Mutationen (T374I aus dem

Stamm CD57B , C866Y aus CM2, T985 $\Delta$  und [D987-I998] $\Delta$  aus CD51-IIA bzw. CD51-IIB) befanden sich in den Hotspot-Regionen, in denen Mutationen in CaMrr1 häufig auftreten und die T374I Mutation entsprach sogar genau der T381I Mutation in CaMrr1 eines *MDR1*-überexprimierenden *C. albicans*-Stammes. Nur die S595Y-Mutation aus dem Stamm CD57A wurde in einer Region gefunden, in der bisher keine aktivierenden Mutationen in *C. albicans* beschrieben wurden und befindet sich im Gegensatz zu den anderen vier Mutationen in einem Bereich, dem durch Sequenzanalysen eine regulatorische Funktion vorausgesagt werden konnte, der MHR. Noch ist nicht bekannt, wie die gain-of-function Mutationen CdMrr1 und auch CaMrr1 aktivieren und welche Rolle die Lokalisation der aktivierenden Mutationen spielt. Daher war es auch Ziel dieser Arbeit, Mrr1 funktionell zu analysieren, was in 3.2 diskutiert wird.

In früheren Veröffentlichungen konnte gezeigt werden, dass ein aktiviertes *MRR1*-Allel zwar in Anwesenheit eines nicht-mutierten *MRR1*-Allels eine *MDR1*-Expression und eine Resistenz vermitteln kann, dass aber die Anwesenheit des wildtypischen *MRR1*-Allels einen geringen negativen Effekt auf die Aktivität des *MRR1*-Allels mit einer gain-of-function Mutation hat [28, 82]. Die meisten bisher untersuchten *MDR1*-überexprimierenden *C. albicans*-Stämme waren homozygot für das mutierte *MRR1*-Allel und die Deletion eines der beiden mutierten Allele resultierte in einer geringeren *MDR1*-Expression und einem teilweisen Verlust der Fluconazol-Resistenz. Die Ergebnisse zeigten, dass der Verlust der Heterozygotie in einer erhöhten Resistenz resultierte, sobald eine gain-of-function Mutation in *MRR1* vorhanden war. Auch in der vorliegenden Arbeit konnte in allen fünf *MDR1*-überexprimierenden Stämmen nur das jeweilige mutierte Cd*MRR1*-Allel gefunden werden. Weder in den parentalen noch in den zugehörigen Fluconazol-resistenten Stämmen wurden Polymorphismen in den direkten PCR-Produkten der *MRR1*-Allele festgestellt. Geht man davon aus, dass die Stämme nicht noch ein *MRR1*-Allel beinhalten, das von den Primern nicht erfasst wurde, kann man aus den Sequenzierungen schließen, dass wie in *C. albicans* auch in *C. dubliniensis* bei Anwesenheit von Fluconazol die Ausbildung der Homozygotie mutierter *MRR1*-Allele einen Selektionsvorteil darstellt.

Interessanterweise sind zwei der in dieser Arbeit entdeckten aktivierenden Mutationen in Cd*MRR1* keine Punktmutationen, wie alle bisher dokumentierten Ca*MRR1* und die anderen Cd*MRR1* gain-of-function Mutationen. Es handelt sich im Stamm CD51-IIA und CD51-IIB, die *in vitro* unabhängig voneinander aus dem Stamm CD51-II kultiviert wurden, um kleine In-frame-Deletionen, wie sie schon aus Tac1 bekannt sind, dem Zinc-Cluster-Transkriptionsfaktor, der in *C. albicans* die Expression der Effluxpumpen *CDR1* und *CDR2* reguliert [19]. Möglicherweise ist in diesen Stämmen häufiger das Einfügen von In-frame-Deletionen als von Punktmutationen ein Mechanismus zur genetischen Adaption und zur Ausprägung genetischer Diversität. Wei-



tere Untersuchungen an solchen Stämmen können dazu beitragen, mehr über die molekulare Basis genetischer Adaptionsmechanismen in *Candida*-Spezies zu erfahren.

## 3.2. Identifikation funktioneller Domänen in *C. albicans* Mrr1

Wie bereits erwähnt ist bisher nicht bekannt, wie Zinc-Cluster-Transkriptionsfaktoren durch die Anwesenheit induzierender Substanzen oder durch gain-of-function Mutationen aktiviert werden. Um zu verstehen, wie die Aktivität von Mrr1 in *C. albicans* reguliert wird, wurden in dieser Arbeit Deletionsstudien durchgeführt, um funktionelle Bereiche in Mrr1 zu identifizieren, die dazu notwendig sind, den Transkriptionsfaktor zum Promotor der *MDR1*-Effluxpumpe zu dirigieren, bei Zugabe von Benomyl die Transkription zu aktivieren und dessen Aktivität unter nicht-induzierenden Bedingungen zu reprimieren.

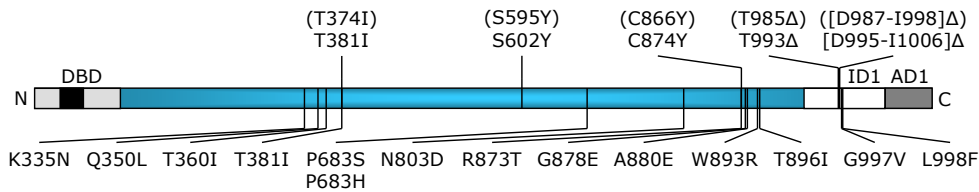
Es wurde gezeigt, dass die N-terminale DNA-Bindedomäne von Mrr1 (Aminosäuren 1 bis 106) in Fusion mit der Gal4-Aktivierungsdomäne in der Lage ist, den *MDR1*-Promotor zu aktivieren (siehe Abb. 2.14), was belegt, dass die 106 N-terminalen Aminosäuren von Mrr1 ausreichen, den Transkriptionsfaktor zum *MDR1*-Promotor zu dirigieren. Die 900 C-terminalen Aminosäuren sind also für die Bindung an den *MDR1*-Promotor verzichtbar. Möglicherweise interagiert aber die DNA-Bindedomäne mit anderen Proteinen, die die Bindung an den *MDR1*-Promotor begünstigen. Das Hybridprotein mit den ersten 90 N-terminalen Aminosäuren konnte zwar den *MDR1*-Promotor nicht mehr signifikant aktivieren, aber noch immer eine leichte Fluconazol-Resistenz verursachen, was dafür spricht, dass es noch immer in der Lage war, andere Gene zu aktivieren, die in die Fluconazol-Resistenz involviert sind. Welche Gene wann aktiviert werden, hängt daher möglicherweise mit der Interaktion von Mrr1 mit anderen Faktoren zusammen, die abhängig von bestimmten Bedingungen ist. Dieser Aspekt wird später in der Diskussion noch einmal aufgegriffen.

Aktivierende Domänen befinden sich in Zinc-Cluster-Transkriptionsfaktoren häufig in der C-terminalen Region [71]. Diese können im Gegensatz zur DNA-Bindedomäne und der MHR, die durch Sequenzanalysen vorhergesagt werden können, nicht über definierte Sequenzen aufgedeckt werden, sondern müssen experimentell bestimmt werden. Dazu wurden in dieser Arbeit serielle C-terminal verkürzte Mrr1-Proteine auf ihre Fähigkeit untersucht, in An- und Abwesenheit von Benomyl den *MDR1*-Promotor zu aktivieren (siehe Abb. 2.9). Auf diese Weise konnte eine C-terminale Aktivierungsdomäne (AD1) zwischen Aminosäure 1001 und 1108 identifiziert werden sowie eine inhibierende Domäne (ID1) zwischen AD1 und Aminosäure 955. Eine weitere Aktivierungsdomäne (AD2) muss sich innerhalb der ersten 948 Aminosäuren befinden,

da das Mrr1 Protein, dem die letzten 160 C-terminalen Aminosäuren fehlen, in Anwesenheit von Benomyl den *MDR1*-Promotor vollständig aktivierte. Nachdem die Deletionen der Hotspots (Aminosäure 342-381 und 873-896), in nicht-funktionellen Mrr1-Proteinen resultierten, bestätigten Versuche mit Mrr1-Proteinen mit internen Deletionen, die von Christina Popp durchgeführt wurden, das Vorkommen von AD1 und ID1 [121]. Fünfzig Aminosäuren lange Deletionen zwischen den Aminosäuren 251 und 950, ausgenommen der  $\Delta 601-650$ , bei der der *MDR1*-Promotor leicht induziert war, resultierten in einem inaktiven Protein. Die Deletionen der Aminosäuren 951 bis 1000 und 1001 bis 1050 hingegen bewirkten ein konstitutiv aktives Protein, das den *MDR1*-Promotor auch in Abwesenheit von Benomyl aktivierte. Das Entfernen der ganzen Region ( $\Delta 951-1051$ ) hob zwar die konstitutive Mrr1-Aktivität auf, die durch Benomyl-induzierte Aktivität jedoch blieb. Die Ergebnisse zeigten, dass es sich bei den Aminosäuren 951 bis 1050 um einen Teil einer inhibierenden Domäne handelt, die den Transkriptionsfaktor in Abwesenheit einer induzierenden Substanz in einem inaktiven Zustand hält. Die letzten 108 C-terminalen Aminosäuren beinhalten also die aktivierende Domäne (AD1), die nur dann konstitutive Aktivität verleiht, wenn die inhibierende Region zwischen Aminosäure 951 und 1000 fehlt. Zwar war Mrr1 nach Deletion der letzten 108 Aminosäuren ( $\Delta C1001$ ) noch aktiv (Abb. 2.9), die Fusion mit den letzten 58 Aminosäuren jedoch, verlieh dem Transkriptionsfaktor konstitutive Aktivität, was darauf hinweist, dass sich die AD1 zwischen den Aminosäuren 1051 und 1108 befindet. Die Tatsache, dass in den von Christina Popp durchgeführten Experimenten auch die Fusion der letzten 58 Aminosäuren mit der DNA-Bindedomäne und auch mit dem TetR-Repressor in konstitutiver Aktivität resultierte, belegte, dass die 58 C-terminalen Aminosäuren von Mrr1 die AD1 beinhaltet [121].

Interessanterweise waren Fusionsproteine, die sowohl die AD1 als auch die ID1 beinhalten ( $Mrr1^{168-1108}$ ,  $Mrr1^{269-1108}$ ,  $Mrr1^{524-1108}$ ), nicht in der Lage, die Transkription zu aktivieren, wenn sie mit dem TetR-Repressor fusioniert waren (Abb. 2.12). Das weist daraufhin, dass die C-terminale Aktivierungsdomäne (AD1) in Anwesenheit der Inhibierungsdomäne (ID1) für die Aktivierung der Transkription weitere N-terminale Regionen aus Mrr1 benötigt. Dafür spricht auch, dass alle Deletionen zwischen Aminosäure 250 und 950 die induzierte Mrr1-Aktivität aufheben [121], was wahrscheinlich auf eine daraus resultierende inaktive Konformation oder ein instabiles Protein zurückzuführen ist. Ein weiterer Hinweis darauf, dass Mrr1 weitere regulatorische Domänen beinhalten muss, ist, dass ein Mrr1-Protein ohne ID1 und AD1 ( $\Delta C955$  bis  $\Delta C946$ ) in Anwesenheit von Benomyl den *MDR1*-Promotor aktivieren kann (Abb. 2.9). Da das Mrr1 Protein, das bei Aminosäure 948 endet, mit derselben Effizienz den *MDR1*-Promotor aktivierte wie das wildtypische Protein, zeigt, dass AD1 bei Abwesenheit der ID1 für die volle Mrr1-Aktivität nicht notwendig ist. Zwar wies das Verkürzen von Mrr1 um vier weitere Amino-

säuren, was die Mrr1-Aktivität komplett aufhob, darauf hin, dass sich nahe Aminosäure 948 eine weitere Aktivierungsdomäne befindet, diese konnte jedoch in diesen Deletionsstudien nicht genauer lokalisiert werden.



**Abbildung 3.1.: Positionen der gain-of-function Mutationen und der identifizierten funktionellen Domänen in Mrr1.** Das Mrr1-Protein ist durch einen linearen Balken dargestellt. Der hellgraue Bereich repräsentiert die DNA-Bindedomäne (DBD) mit den Aminosäuren 1 bis 106, die notwendig waren, um den *MDR1*-Promotor zu aktivieren und enthält das Zinc-Cluster-Motiv von Aminosäure 31 bis 59 (schwarzer Bereich). Der dunkelgraue Bereich im C-Terminus konnte als Aktivierungsdomäne (AD1) identifiziert werden und umfasst die Aminosäuren 1051 bis 1108. Der weiße Bereich (Aminosäure 951 bis 1050) stellt eine inhibitorische Domäne (ID1) dar. Gain-of-function Mutationen, die bereits aus *MRR1*-Allelen Fluconazol-resistenter *C. albicans*-Stämme bekannt sind, sind unterhalb des Balkens angezeigt. Die Mutationen, die während dieser Arbeit in den *MRR1*-Allelen Fluconazol-resistenter *C. dubliniensis*-Isolate identifiziert wurden, sind überhalb des Balkens in Klammern angegeben und die entsprechenden Positionen im CaMrr1-Protein stehen darunter.

Vergleicht man die in dieser Arbeit identifizierten regulatorischen Domänen aus Mrr1 mit Hotspots der gain-of-function Mutationen, stellt man fest, dass vier der bisher gefundenen Mutationen aus *C. albicans* und *C. dubliniensis* sich in der ID1 zwischen den Aminosäuren 993 und 1005 befinden. Diese Aminosäuren scheinen wichtig für die Funktionalität der inhibitorischen Domäne zu sein, da deren Mutationen (G997V, L998F und die aus CdMRR1 entsprechenden T993Δ und [T995-11006]Δ) den selben Effekt wie die Deletion der ID1 haben. Im Gegensatz dazu befinden sich die anderen bisher bekannten aktivierenden Mutationen in Bereichen, deren Deletionen in einem inaktiven Protein resultieren [28, 121]. Das weist darauf hin, dass sie sich in Regionen befinden, die für die transkriptionelle Aktivierung wichtig sind, aber auch Aminosäuren beinhalten, die dafür verantwortlich sind, dass Mrr1 in Abwesenheit induzierender Substanzen sich in einem inaktiven Zustand befindet.

Die MHR umfasst in Mrr1 die Aminosäuren 560 bis 664 [114]. Von einigen Transkriptionsfaktoren weiß man, dass die MHR die transkriptionelle Aktivität kontrolliert. Deletionen in der MHR von Hap1 oder Leu3 aus *S. cerevisiae* resultieren in einer konstitutiven Aktivität der Transkriptionsfaktoren [36, 96] und aktivierende Mutationen in Pdr1 aus *C. glabrata* sind häufig in der MHR aufzufinden [32]. Interessanterweise bewirkte keine der 50 Aminosäuren langen Deletionen in der MHR von Mrr1 eine konstitutive Aktivität. Im Gegenteil, die Proteine waren nicht in der Lage, den *MDR1*-Promotor effizient zu aktivieren [121]. Allerdings führte die S595Y-Mutation in der MHR von Mrr1 aus *C. dubliniensis* zu einer konstitutiven Aktivität des Transkriptionsfaktors. Über die genaue Funktion der MHR von Mrr1 kann daher bisher

keine Aussage gemacht werden, sie scheint jedoch sowohl für die Funktionalität als auch für die Regulation der Aktivität des Transkriptionsfaktors eine Rolle zu spielen.

In der C-terminalen Aktivierungsdomäne (AD1) wurden bisher keine gain-of-function Mutationen in *C. albicans* beschrieben. Für die Transkriptionsfaktoren Tac1 aus *C. albicans*, Pdr1 aus *C. glabrata* sowie für Pdr1 und Pdr3 aus *S. cerevisiae* existieren allerdings einige solcher Mutationen in der bestätigten oder möglichen C-terminalen Aktivierungsdomäne [114]. Möglicherweise sorgen die Mutationen dafür, dass die Transkriptionsfaktoren durch inhibierende Domänen nicht im inaktiven Zustand gehalten werden können. Es ist nicht auszuschließen, dass es *C. albicans* Stämme gibt, die eine gain-of-function Mutation in der AD1 tragen.

### 3.3. Regulation der *MDR1*-Überexpression und der Resistenz durch Mrr1, Cap1 und Upc2 und die Identifikation eines Mrr1-Bindemotivs

Auch von weiteren Transkriptionsfaktoren weiß man, dass sie in die *MDR1*-Regulation verwickelt sind, da sie an den *MDR1*-Promotor binden. Es konnte gezeigt werden, dass Cap1 den *MDR1*-Promotor *in vivo* bindet [151] und die Expression eines hyperaktiven *CAP1*-Allels in einer Hochregulierung der *MDR1*-Effluxpumpe und in einer Resistenz resultiert [2]. Upc2 bindet ebenfalls an den *MDR1*-Promotor und aktiviert oder reprimiert abhängig von den Wachstumsbedingungen die Expression [153]. Sowohl für Cap1 als auch für Upc2 wurden bereits ebenfalls gain-of-function Mutationen beschrieben, die eine konstitutive Aktivität der Transkriptionsfaktoren bewirkten [2, 29, 41]. Die Vermutung liegt nahe, dass Cap1 und Upc2 ebenfalls eine wichtige Rolle in der Regulation der *MDR1*-Expression spielen und dass eventuell aktivierende Mutationen in diesen Transkriptionsfaktoren die Ursache für *MDR1*-abhängige Resistenz sein könnten. Auch die Tatsache, dass Mrr1 und Cap1 zum Teil dieselben Zielgene zu kontrollieren scheinen [82, 151], lässt vermuten, dass die beiden Transkriptionsfaktoren miteinander kooperieren. In dieser Arbeit wurde untersucht, welche Rolle Cap1 und Upc2 in der *MDR1*-Expression spielen.

Die Ergebnisse zeigten, dass die Anwesenheit von Upc2 für eine Benomyl- und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierte *MDR1*-Expression nicht notwendig war (siehe Abb. 2.29). Bisher wurden in Fluconazol-resistenten *C. albicans*-Isolaten drei gain-of-function Mutationen in Upc2 beschrieben, die für die konstitutive Aktivität des Transkriptionsfaktors und die daraus resultierende *ERG11*-Überexpression verantwortlich waren, nämlich G648D [29], A643T [41] und A643V [46]. Die G648D-Mutation hat den stärksten Effekt auf die *ERG11*-Expression und die Fluconazol-

Resistenz, verursacht aber, sogar wenn sie in beiden *UPC2*-Allelen vorhanden ist, nur eine geringe *MDR1*-Expression, die keine Erhöhung der Fluconazol-Resistenz bewirkt [29]. Demnach haben aktivierende Mutationen in *Upc2* scheinbar keinen Einfluss auf die *Mdr1*-vermittelte Resistenz in *C. albicans*.

*Cap1* hingegen war essentiell für die  $H_2O_2$ -vermittelte *MDR1*-Expression (siehe Abb. 2.29). Zwar nicht essentiell aber dennoch beteiligt war *Cap1* auch an der *MDR1*-Expression als Antwort auf Benomyl, denn eine volle Benomyl-vermittelte *MDR1*-Induktion war nur in Anwesenheit von *Cap1* möglich. Eine Beteiligung von *Cap1* an der Benomyl-induzierten *MDR1*-Expression konnten auch *Znaidi et al.* zeigen, da in Anwesenheit von Benomyl das Level der *MDR1*-Transkripte in der *cap1* $\Delta$  Mutante im Vergleich zum Wildtyp um das vierfache reduziert war [151]. *Rognon et al.* berichteten bereits in einer früheren Veröffentlichung, dass *Cap1* notwendig ist für die  $H_2O_2$ -induzierte *MDR1*-Expression [106]. Sie konnten jedoch nicht feststellen, dass *Cap1* auch in die Benomyl-induzierte *MDR1*-Expression involviert ist, was den Ergebnissen dieser Arbeit widerspricht.

Da *Mrr1* essentiell für die *MDR1*-Hochregulierung durch Benomyl und  $H_2O_2$  ist (Abb. 2.29), scheint *Mrr1* bezüglich der *MDR1*-Induktion mit *Cap1* zu interagieren, nicht aber mit *Upc2*.

Obwohl *Cap1* nur in Anwesenheit von *Mrr1* die *MDR1*-Expression, die durch Benomyl und  $H_2O_2$  induziert wird, aktivieren kann, war ein hyperaktives, C-terminal verkürztes *CAP1*-Allel in der Lage, auch in Abwesenheit von *Mrr1* die *MDR1*-Expression und eine Resistenz zu verursachen (Abb. 2.24, Abb. 2.23). Ebenso könnten auch aktivierende Mutationen in *Cap1* für die *MDR1*-Überexpression und die Resistenz klinischer *C. albicans*-Isolate verantwortlich sein. Wie auch in dieser Arbeit wurden bisher allerdings als Ursache für die Überexpression von *MDR1* in Fluconazol-resistenten Isolaten aus Patienten nur gain-of-function Mutationen in *Mrr1* identifiziert [28, 82]. Die Ursache dafür könnte sein, dass hyperaktive *MRR1*-Allele eine stärkere Fluconazol-Resistenz verleihen als das C-terminal verkürzte *Cap1* oder dass die C-terminale Verkürzung für eine eingeschränkte *Cap1*-Funktion sorgt. Für letzteres spricht auch, dass ein mutiertes *Cap1* nicht in der Lage war, die  $H_2O_2$ -Hypersensitivität einer *cap1* $\Delta$  Mutante zu komplementieren [2]. Eventuell haben Stämme mit einem mutierten *CAP1*-Allel, dessen Funktion eingeschränkt ist, *in vivo* im Falle einer Fluconazol-Resistenz auch einen Selektionsnachteil. Interessant wäre zu wissen, ob es aktivierende *Cap1*-Mutationen gibt, die den Transkriptionsfaktor bei der Induktion der Expression all seiner Zielgene nicht beeinträchtigen. Es wurde bereits in früheren Veröffentlichungen gezeigt, dass in Fluconazol-resistenten Stämmen die Resistenz nach der Deletion von *MRR1* geringer war als nach der Deletion der *MDR1*-Effluxpumpe selbst [82]. Das stimmt überein mit den Ergebnissen dieser Arbeit, die zeigen, dass die Fluconazol-Resistenz in Stämmen, die hyperaktives *Mrr1* exprimieren nicht vollstän-

dig aufgehoben sondern nur reduziert war, wenn *MDR1* deletiert wurde (siehe Abb. 2.30). Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass neben *MDR1* noch weitere Gene, die durch Mrr1 hochreguliert werden, zur Fluconazol-Resistenz in *C. albicans* beitragen. Die Tatsache dass die von hyperaktivem Mrr1 vermittelte Fluconazol-Resistenz, die im Wildtyp-Hintergrund um das 16-fache erhöht war, in Abwesenheit von Mdr1 noch immer 4- bis 8-fach erhöht ist (siehe Abb. 2.30), spricht dafür, dass die andere Mrr1-Targets sogar mehr als *MDR1* zur Fluconazol-Resistenz beitragen. Welche Mrr1-Targets das sind, ist bisher nicht bekannt, aber mit großer Wahrscheinlichkeit sind es Gene, die von Mrr1 unabhängig von Cap1 gebunden und hochreguliert werden, da die Resistenz, die von hyperaktivem Mrr1 verursacht wird, nicht von der Anwesenheit eines intakten *CAP1*-Allels abhängt (siehe Abb. 2.24). In dieser Arbeit konnten 40 Gene identifiziert werden, die von Mrr1 gebunden und hochreguliert werden und 19 davon wurden bereits zuvor von Morschhäuser *et al.* als von Mrr1 hochreguliert beschrieben [82]. Einige der 40 Mrr1 Targets codieren für putative Oxidoreduktasen (siehe Abb. 2.1), die eventuell eine durch Fluconazol verursachte Zellschädigung beheben.

Dass auch die Fluconazol-Resistenz, die durch hyperaktives Cap1 verursacht wurde, nicht vollständig aufgehoben war, wenn *MDR1* deletiert wurde (Abb. 2.30), spricht dafür, dass auch Cap1 neben *MDR1* noch weitere Gene aktiviert, die in die Entwicklung der Fluconazol-Resistenz in *C. albicans* involviert sind. Da Cap1 auch unabhängig von Mrr1 Fluconazol-Resistenz verursachen kann (Abb. 2.24), sind für den Cap1-abhängigen Fluconazol-resistenten Phänotyp eventuell die Cap1-Targets verantwortlich, die nicht als von Mrr1 hochreguliert identifiziert werden konnten. Dazu gehören z.B. das Phosphatidylinositol-Transportprotein *PDR16* [109, 151], der MFS-Transporter *FLU1* [14] und die putative Flippase *RTA2* [51], die auch schon vorher mit Fluconazol-Resistenz in Verbindung gebracht wurden.

Wie schon erwähnt wurden 40 der 83 Gene, die von hyperaktivem Mrr1 reproduzierbar hochreguliert wurden, auch von Mrr1 *in vivo* gebunden (Abb. 2.4.4). Die meisten davon konnte Mrr1 auch in Abwesenheit von Cap1 binden, darunter auch die Cap1-Targets *OYE32* (orf19.3131), eine NADPH-Dehydrogenase, sowie die ORFs orf19.251, orf19.7042 und orf19.6586 mit bisher unbekannter Funktion [151]. Auch falls Mrr1 mit Cap1 bei der Induktion der Expression gemeinsamer Targets kooperiert, scheinen aktivierende Mutationen in Mrr1 jedoch dafür zu sorgen, dass der Transkriptionsfaktor unabhängig von Cap1 agiert. Für die transkriptionelle Hochregulierung mancher Gene, wie z.B. *OYE23*, scheint hyperaktives Mrr1 jedoch die Anwesenheit von Cap1 zu benötigen, denn diese Gene wurden in Abwesenheit von Cap1 zwar von hyperaktivem Mrr1 gebunden aber nicht hochreguliert.

Nur 40 der 710 Bindestellen von Mrr1 konnten auch Genen zugeordnet werden, die auch von aktiviertem Mrr1 hochreguliert wurden. Grund dafür könnte sein, dass das hyperaktive

HA-fusionierte Mrr1 einige Bindestellen unspezifisch gebunden hat oder dass es zwar an die Targets bindet, deren Expression aber nur in Kooperation mit anderen Regulatoren, die unter den Wachstumsbedingungen des Assays nicht aktiv sind, induzieren kann.

### 3.4. Identifikation eines Mrr1-Bindemotivs

Eine Analyse der *in vivo* identifizierten Mrr1-Bindestellen ergab ein potentielles Mrr1-Bindemotiv, was innerhalb der untersuchten Sequenzen häufig und mit einer 100%-igen Verteilung zu finden war. Wie schon in 1.3.1 beschrieben konnten Hiller *et al.* in einer früheren Veröffentlichung zeigen, dass unterschiedliche Regionen im *MDR1*-Promotor *MDR1*-Überexpression vermitteln können [44]. Das häufige Vorkommen des DCSGHD-Motivs im *MDR1*-Promotor, was auch in Promotorregionen anderer Mrr1-Targets beobachtet wurde, stützt die Ergebnisse von Hiller *et al.*, dass keine einzelne Promotorregion für die konstitutive *MDR1*-Expression in Stämmen, die gain-of-function Mutationen in Mrr1 tragen, absolut notwendig ist.

Um zu untersuchen, ob Mrr1 tatsächlich an diese Motive im *MDR1*-Promotor bindet, wurden in dieser Arbeit erste Gel Shift Assays durchgeführt. Für Tac1 konnte bereits mit Band Shift Assays gezeigt werden, dass ein Fusionsprotein aus der N-terminalen DNA-Bindedomäne mit GST (Glutathion S-Transferase) an das DRE sowohl im *CDR1*- als auch im *CDR2*-Promotor bindet [21]. Auch die DNA-Bindedomäne von Upc2 in Fusion mit GST band *in vitro* an das putative SRE (sterol response element) im *ERG2*-Promotor, was vermuten ließ, dass Upc2 die Expression der *ERG*-Gene durch direktes Binden an die Promotoren induziert [70]. In dieser Arbeit wurden die 128 N-terminalen Aminosäuren von Mrr1, von denen gezeigt werden konnte, dass sie in Fusion mit der Gal4-Aktiverungsdomäne den *MDR1*-Promotor aktivieren können (siehe Abschnitt 2.2.3), mit GST fusioniert. Erste Inkubationen des Fusionsproteins mit einem DNA-Fragment, das aus den 600 Nukleotiden upstream des *MDR1*-Startcodons bestand und neben mehreren putativen Mrr1-Bindestellen auch das Bindemotiv von Cap1 und das BRE/MDRE mit dem Mcm1-Bindemotiv enthielt, resultierten im Vergleich zur Inkubation von nur GST mit dem DNA-Fragment in einem Bandshift. Jedoch konnte mit allen weiteren Assays, die mit Hilfe von EMSA-Kits durchgeführt wurden, um wichtige Kontrollen mit einzubeziehen, im Rahmen dieser Arbeit die Bindung von Mrr1 an die putativen Bindestellen im *MDR1*-Promotor nicht bestätigt werden.

### 3.5. Abschließende Worte und Ausblick

Die physiologische Funktion der Mdr1-Effluxpumpe ist bisher nicht bekannt. Unter normalen Wachstumsbedingungen wird sie nur wenig exprimiert. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Mrr1 und Cap1 unter bestimmten Bedingungen bei der Induktion des *MDR1*-Promotors kooperieren, dass sie aber auch unabhängig voneinander *MDR1* hochregulieren, wenn aktivierende Mutationen in den Transkriptionsfaktoren vorhanden sind. Wie auch schon von Morschhäuser *et al.* gezeigt werden konnte [82], reguliert besonders hyperaktives Mrr1 neben der *MDR1*-Effluxpumpe noch einige andere Gene, die zur Fluconazol-Resistenz in *C. albicans* beitragen.

Mcm1, ein essentieller MADS-Box-Transkriptionsfaktor, bindet ebenfalls an den *MDR1*-Promotor [63] und wird für die volle *MDR1*-Induktion durch Benomyl benötigt [76]. Bei oxidativem Stress kooperiert Mrr1 hauptsächlich mit Cap1 und Mcm1 ist verzichtbar. Ohne die Anwesenheit induzierender Substanzen verbleibt Cap1 im Zytoplasma und hyperaktives Mrr1 benötigt Mcm1, um eine *MDR1*-Überexpression zu verursachen. Mogavero *et al.* konnten zeigen, dass Mcm1 zur *MDR1*-Expression beiträgt und zwar unabhängig von seiner Bindestelle im BRE/MDRE. Askew *et al.* fanden heraus, dass Mcm1 nicht nur direkt an seine bekannte Bindestelle bindet sondern auch indirekt via Ahr1 (Adhesion and hyphal regulator) an ein weiteres Bindemotiv. Der Zinc-Cluster-Transkriptionsfaktor Ahr1 dirigiert Mcm1 nicht nur an eine zusätzliche Bindestelle innerhalb eines Promotors, wie es für den *MDR1*-Promotor der Fall ist, sondern auch an die Promotoren von Zielgenen, die nicht das übliche Mcm1-Bindemotiv aufweisen. Der Ahr1-Mcm1-Komplex spielt eine wichtige Rolle in der Adhäsion, da er Adhäsionsgene direkt aktiviert, und ist in Hyphenwachstum und Virulenz involviert [3]. Mcm1 bindet auch an den *MRR1*-Promotor, was auch dafür spricht, dass es die *MDR1*-Expression indirekt durch die Regulation von *MRR1* reguliert [139]. Im Gegensatz dazu konnte von Morschhäuser *et al.* [82] und auch in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass hyperaktives Mrr1 nicht die Expression von *MCM1* oder *CAP1* beeinflusst und Znaidi *et al.* [151] haben gezeigt, dass aktiviertes Cap1 weder die *MCM1*- noch die *MRR1*- Expressionslevel beeinflusst.

Die Tatsache, dass der Transkriptionsfaktor Ndt80 in die Hochregulierung von *CDR1* und *ERG11* involviert ist und ebenfalls an die Promotoren von *CDR2* und *MDR1* bindet, ließ vermuten, dass er ein wichtiger Regulator von Genen ist, die in die Fluconazol-Resistenz involviert sind, und eventuell mit Mrr1, Tac1 und Upc2 interagiert [123]. Sasse *et al.* konnten jedoch kürzlich zeigen, dass Ndt80 nicht notwendig ist für die induzierte *MDR1*- und die *CDR2*-Expression und dass hyperaktive Mrr1-, Tac1- und Upc2-Proteine unabhängig von Ndt80 die konstitutive Überexpression ihrer Zielgene *MDR1*, *CDR1/CDR2* und *ERG11* induzieren [118].



In einer weiteren Veröffentlichung konnte auch gezeigt werden, dass Mrr1 und Cap1 mit Ada2 interagieren, um die Transkription zu induzieren [122]. Ada2 ist eine Untereinheit des SAGA/ADA-Coaktivator-Komplexes, der durch Histon-Acetylierung mehrere zelluläre Prozesse koordiniert. Die Bindung von Ada2 an die untersuchten Promotoren der Mrr1-Targets war komplett abhängig von der Anwesenheit von Mrr1 und Ada2 scheint als Coaktivator von Cap1 zu agieren [122]. Pdr1 und Pdr3 aus *S. cerevisiae* interagieren mit Untereinheiten des Mediatorkomplexes, um die RNA-Polymerase zu ihren Zielgenen zu führen [135]. Daher ist es nicht auszuschließen, dass dieser Mechanismus auch in *C. albicans* zur Hochregulierung der *MDR1*-Expression beiträgt.

Ein wichtiges Ziel der zukünftigen Forschung wird sein, weiterhin herauszufinden, wie die unterschiedlichen Transkriptionsfaktoren, Mrr1, Cap1 und Mcm1 und eventuell noch einige weitere bei der Aktivierung der *MDR1*-Expression miteinander interagieren. Einige Interaktionen und Mechanismen sind bereits bekannt oder konnten in dieser Arbeit identifiziert werden. Die ganze Komplexität des Netzwerkes der Transkriptionsfaktoren und anderer Mechanismen, die eventuell zur Expression der *MDR1*-Effluxpumpe beitragen, gilt es jedoch in Zukunft weiterhin zu analysieren. Regulatoren von Effluxpumpen, wie auch Effluxpumpen selbst, könnten in Zukunft ein wichtiges Angriffsziel bei der Entwicklung antimykotischer Substanzen darstellen bzw. könnte die Inhibierung dieser Gene eine erfolgreiche Therapie mit derzeitig verwendeten Antimykotika unterstützen.



# 4. Material und Methoden

## 4.1. Verwendete Bakterienstämme und Plasmide

### 4.1.1. *Escherichia coli* K12 Stamm

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Klonierungsarbeiten wurde der *E. coli*-Stamm DH5 $\alpha$  (F<sup>-</sup>, *endA1*, *hsdR17*[r<sub>k</sub><sup>-</sup>, m<sub>k</sub><sup>-</sup>], *supE44*, *thi-1*, *recA1*, *gyrA96*, *relA1*,  $\Delta$ [*arg-lac*]U169,  $\lambda^-$ ,  $\phi$ 80d *lacZ* $\Delta$ M15) verwendet (Bethesda Research Laboratories, 1986).

### 4.1.2. Plasmide

Für die in dieser Arbeit durch Klonierungen hergestellten Plasmide (Tabelle 4.1) wurde, wenn nicht anders angegeben, als Klonierungsvektor das Ausgangsplasmid pBluescript KSII+ (Stratagene, Heidelberg, Deutschland) verwendet.

**Tabelle 4.1.:** In dieser Arbeit verwendeten Plasmide.

Bezeichnung	relevante Eigenschaften	Referenz
<b>Ausgangs- und Kontrollplasmide</b>		
pADH1E1	enthält P <sub>ADH1</sub> zur Überexpression einzelner Gene	[101]
pGAL4AD2	enthält GAL4AD	[93]
pMPG2S	enthält P <sub>MDR1</sub> -GFP-Reporterfusion	[82]
pSAT1	enthält caSAT1-Marker	[102]
pSFS2	enthält SAT1-Flipper-Kassette (mit P <sub>MAL2</sub> )	[102]
pSFS4	enthält SAT1-Flipper-Kassette (mit P <sub>MAL2</sub> ), C533A-Austausch im Intron des caSAT1-Markers (Sall-site zerstört)	diese Arbeit
pZCF36G2	enthält wildtypisches MRR1 mit GFP fusioniert	Labor AG Morschhäuser
pZCF36G3	enthält hyperaktives MRR1 mit P683S gain-of-function Mutation mit GFP fusioniert	Labor AG Morschhäuser
pZCF36K2	enthält wildtypisches MRR1	[82]
pZCF36K3	enthält hyperaktives MRR1 mit P683S gain-of-function Mutation	[82]

Bezeichnung	relevante Eigenschaften	Referenz
pYML127HAT1	enthält drei Kopien des HA-Epitops und T <sub>ACT1</sub>	Labor AG Morschhäuser
<b>Plasmide mit <i>MRR1</i> mit und ohne C-terminalem HA-Epitop unter der Kontrolle von P<sub>ADH1</sub></b>		
pZCF36H2	enthält <i>MRR1</i> mit C-terminalem HA-Epitop	diese Arbeit
pZCF36H3	enthält hyperaktives <i>MRR1</i> mit P683S gain-of-function Mutation und C-terminalem HA-Epitop	diese Arbeit
pZCF36E1	enthält wildtypisches <i>MRR1</i> unter der Kontrolle von P <sub>ADH1</sub> im Vektor pBC	[82]
pZCF36E2	enthält wildtypisches <i>MRR1</i> unter der Kontrolle von P <sub>ADH1</sub>	diese Arbeit
pZCF36EH2	enthält <i>MRR1</i> mit C-terminalem HA-Epitop unter der Kontrolle von P <sub>ADH1</sub>	diese Arbeit
pZCF36E3	enthält hyperaktives <i>MRR1</i> mit P683S gain-of-function Mutation unter der Kontrolle von P <sub>ADH1</sub>	diese Arbeit
pZCF36EH3	enthält hyperaktives <i>MRR1</i> mit P683S gain-of-function Mutation mit C-terminalem HA-Epitop unter der Kontrolle von P <sub>ADH1</sub>	diese Arbeit
<b>Plasmide mit C-terminal verkürztem <i>MRR1</i> (Ausgangsplasmid pZCF36K2)</b>		
pZCF36K2ΔC1066	codiert für Mrr1 Aminosäuren 1-1066	diese Arbeit
pZCF36K2ΔC1040	codiert für Mrr1 Aminosäuren 1-1040	diese Arbeit
pZCF36K2ΔC1031	codiert für Mrr1 Aminosäuren 1-1031	diese Arbeit
pZCF36K2ΔC1015	codiert für Mrr1 Aminosäuren 1-1015	diese Arbeit
pZCF36K2ΔC1001	codiert für Mrr1 Aminosäuren 1-1001	diese Arbeit
pZCF36K2ΔC955	codiert für Mrr1 Aminosäuren 1-955	diese Arbeit
pZCF36K2ΔC952	codiert für Mrr1 Aminosäuren 1-952	diese Arbeit
pZCF36K2ΔC948	codiert für Mrr1 Aminosäuren 1-948	diese Arbeit
pZCF36K2ΔC947	codiert für Mrr1 Aminosäuren 1-947	diese Arbeit
pZCF36K2ΔC946	codiert für Mrr1 Aminosäuren 1-946	diese Arbeit
pZCF36K2ΔC945	codiert für Mrr1 Aminosäuren 1-945	diese Arbeit
pZCF36K2ΔC944	codiert für Mrr1 Aminosäuren 1-944	diese Arbeit
pZCF36K2ΔC933	codiert für Mrr1 Aminosäuren 1-933	diese Arbeit
pZCF36K2ΔC911	codiert für Mrr1 Aminosäuren 1-911	diese Arbeit
pZCF36K2ΔC812	codiert für Mrr1 Aminosäuren 1-812	diese Arbeit
pZCF36K2ΔC706	codiert für Mrr1 Aminosäuren 1-706	diese Arbeit
pZCF36K2ΔC366	codiert für Mrr1 Aminosäuren 1-366	diese Arbeit
pZCF36K2Δ342-381	codiert für Mrr1 mit interner Deletion der Aminosäuren 342-381	diese Arbeit
pZCF36K2Δ873-896	codiert für Mrr1 mit interner Deletion der Aminosäuren 873-896	diese Arbeit

Bezeichnung	relevante Eigenschaften	Referenz
<b>Plasmide mit TET-System</b>		
pNIM1	enthält <i>catetR-GAL4AD</i> Fusion unter der Kontrolle von $P_{ADH1}$ und <i>GFP</i> unter der Kontrolle von $P_{tet}$ , C533A-Austausch im Intron des <i>caSAT1</i> -Markers (Sall-site zerstört)	[93]
pNIM6	wie pNIM1, statt $P_{ACT1}$ $P_{TEF3}$	Labor AG Morschhäuser
pTET17	enthält <i>tetR</i>	[93]
pTET23	enthält <i>rtetR-GAL4AD</i> unter der Kontrolle von $P_{ADH1}$ und <i>ecaFLP</i> unter der Kontrolle von $P_{tet}$	Labor AG Morschhäuser
pTET49	enthält <i>catetR</i>	diese Arbeit
pTET50	enthält <i>catetR</i> mit $T_{ACT1}$	diese Arbeit
pTET51	pNIM1 mit BglII linearisiert, BglII-site durch Auffüllen zerstört, zusätzliche Dam-methylierte Clal-site	diese Arbeit
pTET52	enthält <i>catetR</i> unter der Kontrolle von $P_{ADH1}$ und <i>GFP</i> unter der Kontrolle von $P_{tet}$	diese Arbeit
pTET53	enthält <i>catetR-GAL4AD</i> Fusion unter der Kontrolle von $P_{ADH1}$ und <i>GFP</i> unter der Kontrolle von $P_{tet}$	diese Arbeit
pZCF36 <sup>67-1108</sup> -TETR	codiert für Mrr1 Aminosäuren 67-1108 fusioniert mit TetR	diese Arbeit
pZCF36 <sup>91-1108</sup> -TETR	codiert für Mrr1 Aminosäuren 91-1108 fusioniert mit TetR	diese Arbeit
pZCF36 <sup>104-1108</sup> -TETR	codiert für Mrr1 Aminosäuren 104-1108 fusioniert mit TetR	diese Arbeit
pZCF36 <sup>122-1108</sup> -TETR	codiert für Mrr1 Aminosäuren 122-1108 fusioniert mit TetR	diese Arbeit
pZCF36 <sup>144-1108</sup> -TETR	codiert für Mrr1 Aminosäuren 144-1108 fusioniert mit TetR	diese Arbeit
pZCF36 <sup>168-1108</sup> -TETR	codiert für Mrr1 Aminosäuren 168-1108 fusioniert mit TetR	diese Arbeit
pZCF36 <sup>269-1108</sup> -TETR	codiert für Mrr1 Aminosäuren 269-1108 fusioniert mit TetR	diese Arbeit
pZCF36 <sup>67-526</sup> -TETR	codiert für Mrr1 Aminosäuren 67-526 fusioniert mit TetR	diese Arbeit
pZCF36 <sup>269-812</sup> -TETR	codiert für Mrr1 Aminosäuren 269-812 fusioniert mit TetR	diese Arbeit
<b>Plasmide mit <i>MRR1DB-GAL4AD</i> Fusionen (unter der Kontrolle von <math>P_{ADH1}</math>)</b>		
pZCF36DBH2	codiert für Mrr1 Aminosäuren 1-128 fusioniert mit Gal4AD mit C-terminalem HA-Epitop	diese Arbeit
pZCF36DBH4	codiert für Mrr1 Aminosäuren 1-121 fusioniert mit Gal4AD mit C-terminalem HA-Epitop	diese Arbeit
pZCF36DBH5	codiert für Mrr1 Aminosäuren 1-106 fusioniert mit Gal4AD mit C-terminalem HA-Epitop	diese Arbeit
pZCF36DBH6	codiert für Mrr1 Aminosäuren 1-90 fusioniert mit Gal4AD mit C-terminalem HA-Epitop	diese Arbeit
<b>Plasmide zur Deletion von <i>CAP1</i> und zum Ersetzen der wildtypischen <i>CAP1</i>- und <i>MRR1</i>-Allele durch die jeweilige hyperaktive Form</b>		
pMRR1R1	enthält <i>SAT1</i> -Flipper-Kassette (mit $P_{MAL2}$ ), Vorstufe zu pMRR1R3	Labor AG Morschhäuser

Bezeichnung	relevante Eigenschaften	Referenz
pMRR1R3	enthält <i>SAT1</i> -Flipper-Kassette (mit $P_{MAL2}$ ) zum Austausch von <i>MRR1</i> durch hyperaktives <i>MRR1</i> mit P683S gain-of-function Mutation	diese Arbeit
pCAP1M1	Vorstufe zu pCAP1M2	diese Arbeit
pCAP1M2	enthält <i>SAT1</i> -Flipper-Kassette (mit $P_{MAL2}$ ) zur Inaktivierung von <i>CAP1</i>	diese Arbeit
pCAP1R1	enthält <i>SAT1</i> -Flipper-Kassette (mit $P_{MAL2}$ ) zum Austausch von <i>CAP1</i> durch hyperaktives, C-terminal verkürztes <i>CAP1</i> ( $\Delta C333$ )	diese Arbeit
<b>Plasmide mit <i>Candida dubliniensis</i> <i>MRR1</i> (unter der Kontrolle von <math>P_{ADH1}</math>)</b>		
pCdMRR1E1	enthält Cd <i>MRR1</i> aus Fluconazol-sensitivem <i>C. dubliniensis</i> -Isolat CM1	diese Arbeit
pCdMRR1E2	enthält Cd <i>MRR1</i> mit G2597A-Austausch aus Fluconazol-resistentem Isolat CM2	diese Arbeit
pCdMRR1E3	enthält Cd <i>MRR1</i> aus Fluconazol-sensitivem <i>C. dubliniensis</i> -Isolat CD57	diese Arbeit
pCdMRR1E4	enthält Cd <i>MRR1</i> mit C1784A-Austausch aus Fluconazol-resistentem Isolat CD57A	diese Arbeit
pCdMRR1E5	enthält Cd <i>MRR1</i> mit C1121T-Austausch aus Fluconazol-resistentem Isolat CD57B	diese Arbeit
pCdMRR1E5	enthält Cd <i>MRR1</i> mit Deletion der Basenpaare 2959-2994 aus Fluconazol-resistentem <i>C. dubliniensis</i> -Isolat CD51-IIA	diese Arbeit
pCdMRR1E6	enthält Cd <i>MRR1</i> mit Deletion der Basenpaare 2952-2954 aus Fluconazol-resistentem <i>C. dubliniensis</i> -Isolat CD51-IIB	diese Arbeit

## 4.2. Verwendete *C. albicans*-Stämme

Alle in dieser Arbeit verwendeten *C. albicans* Transformanten, deren Ausgangsstämme sowie die entsprechenden Genotypen und Referenzen sind in Tabelle 4.2 aufgelistet.

**Tabelle 4.2.:** In dieser Arbeit verwendeten *Candida albicans*-Stämme.

Stamm	Ausgangsstamm	Genotyp	Referenz
SC5314		Wildstamm	[37]
<b>Stämme, die ungekoppelte oder 3xHA-gekoppelte <i>MRR1</i>- und <i>MRR1</i><sup>P683S</sup>-Allele unter der Kontrolle des <i>MRR1</i>- oder des <i>ADH1</i>-Promotors exprimieren</b>			
SCMRR1M4K2A	SCMRR1M4A	<i>mrr1</i> Δ:: <i>FRT</i> / <i>mrr1</i> Δ:: <i>MRR1-caSAT1</i>	[82]
SCMRR1M4K2B	SCMRR1M4B	<i>mrr1</i> Δ:: <i>FRT</i> / <i>mrr1</i> Δ:: <i>MRR1-caSAT1</i>	[82]
SCMRR1M4K3A	SCMRR1M4A	<i>mrr1</i> Δ:: <i>FRT</i> / <i>mrr1</i> Δ:: <i>MRR1</i> <sup>P683S</sup> - <i>caSAT1</i>	[82]
SCMRR1M4K3B	SCMRR1M4B	<i>mrr1</i> Δ:: <i>FRT</i> / <i>mrr1</i> Δ:: <i>MRR1</i> <sup>P683S</sup> - <i>caSAT1</i>	[82]
SCΔ <i>mrr1</i> MH2B	SCMRR1M4B	<i>mrr1</i> Δ:: <i>FRT</i> / <i>mrr1</i> Δ:: <i>MRR1-3xHA-caSAT1</i>	diese Arbeit
SCΔ <i>mrr1</i> MH3A	SCMRR1M4A	<i>mrr1</i> Δ:: <i>FRT</i> / <i>mrr1</i> Δ:: <i>MRR1</i> <sup>P683S</sup> -3xHA- <i>caSAT1</i>	diese Arbeit
SCΔ <i>mrr1</i> MH3B	SCMRR1M4B	<i>mrr1</i> Δ:: <i>FRT</i> / <i>mrr1</i> Δ:: <i>MRR1</i> <sup>P683S</sup> -3xHA- <i>caSAT1</i>	diese Arbeit
SCΔ <i>mrr1</i> MEH2A	SCMRR1M4A	<i>mrr1</i> Δ:: <i>FRT</i> / <i>mrr1</i> Δ:: <i>FRT</i> <i>ADH1/adh1</i> :: <i>MRR1-3xHA-caSAT1</i>	diese Arbeit
SCΔ <i>mrr1</i> MEH2B	SCMRR1M4B	<i>mrr1</i> Δ:: <i>FRT</i> / <i>mrr1</i> Δ:: <i>FRT</i> <i>ADH1/adh1</i> :: <i>MRR1-3xHA-caSAT1</i>	diese Arbeit
SCΔ <i>mrr1</i> MEH3A	SCMRR1M4A	<i>mrr1</i> Δ:: <i>FRT</i> / <i>mrr1</i> Δ:: <i>FRT</i> <i>ADH1/adh1</i> :: <i>MRR1</i> <sup>P683S</sup> -3xHA- <i>caSAT1</i>	diese Arbeit
SCΔ <i>mrr1</i> MEH3B	SCMRR1M4B	<i>mrr1</i> Δ:: <i>FRT</i> / <i>mrr1</i> Δ:: <i>FRT</i> <i>ADH1/adh1</i> :: <i>MRR1</i> <sup>P683S</sup> -3xHA- <i>caSAT1</i>	diese Arbeit
SCΔ <i>mrr1</i> ME2A	SCMRR1M4A	<i>mrr1</i> Δ:: <i>FRT</i> / <i>mrr1</i> Δ:: <i>FRT</i> <i>ADH1/adh1</i> :: <i>MRR1-caSAT1</i>	diese Arbeit
SCΔ <i>mrr1</i> ME2B	SCMRR1M4B	<i>mrr1</i> Δ:: <i>FRT</i> / <i>mrr1</i> Δ:: <i>FRT</i> <i>ADH1/adh1</i> :: <i>MRR1-caSAT1</i>	diese Arbeit
SCΔ <i>mrr1</i> ME3A	SCMRR1M4A	<i>mrr1</i> Δ:: <i>FRT</i> / <i>mrr1</i> Δ:: <i>FRT</i> <i>ADH1/adh1</i> :: <i>MRR1</i> <sup>P683S</sup> - <i>caSAT1</i>	diese Arbeit
SCΔ <i>mrr1</i> ME3B	SCMRR1M4B	<i>mrr1</i> Δ:: <i>FRT</i> / <i>mrr1</i> Δ:: <i>FRT</i> <i>ADH1/adh1</i> :: <i>MRR1</i> <sup>P683S</sup> - <i>caSAT1</i>	diese Arbeit

Stamm	Ausgangsstamm	Genotyp	Referenz
SCΔ <i>mrr1</i> CAP1M4 MEH3A	SCΔ <i>mrr1</i> CAP1 M4A	<i>mrr1</i> Δ::FRT / <i>mrr1</i> Δ::FRT <i>cap1</i> Δ::FRT / <i>cap1</i> Δ::FRT <i>ADH1</i> / <i>adh1</i> ::P <sub>ADH1</sub> - <i>MRR1</i> <sup>P683S</sup> - <i>HA</i> - <i>caSAT1</i>	diese Arbeit
SCΔ <i>mrr1</i> CAP1M4 MEH3B	SCΔ <i>mrr1</i> CAP1 M4B	<i>mrr1</i> Δ::FRT / <i>mrr1</i> Δ::FRT <i>cap1</i> Δ::FRT / <i>cap1</i> Δ::FRT <i>ADH1</i> / <i>adh1</i> ::P <sub>ADH1</sub> - <i>MRR1</i> <sup>P683S</sup> - <i>HA</i> - <i>caSAT1</i>	diese Arbeit
<b>Stämme, die eine P<sub>MDR1</sub>-GFP-Reporterfusion enthalten und ungekoppelte oder 3xHA-gekoppelte MRR1- und MRR1<sup>P683S</sup>-Allele unter der Kontrolle des MRR1- oder des ADH1-Promotors exprimieren</b>			
CAG48MRR136M4B	SC5314	<i>MDR1</i> / <i>mdr1</i> ::P <sub>MDR1</sub> -GFP-URA <i>mrr1</i> Δ::FRT / <i>mrr1</i> Δ::FRT	[82]
CAG48MRR1M4K2 B1 und B2	CAG48MRR1M4B	<i>MDR1</i> / <i>mdr1</i> ::P <sub>MDR1</sub> -GFP-URA <i>mrr1</i> Δ::FRT / <i>mrr1</i> Δ::MRR1- <i>caSAT1</i>	[82]
CAG48MRR1M4K3 B1 und B2	CAG48MRR1M4B	<i>MDR1</i> / <i>mdr1</i> ::P <sub>MDR1</sub> -GFP-URA <i>mrr1</i> Δ::FRT / <i>mrr1</i> Δ::MRR1 <sup>P683S</sup> - <i>caSAT1</i>	[82]
CAG48Δ <i>mrr1</i> MH2 B1 und B2	CAG48MRR1M4B	<i>MDR1</i> / <i>mdr1</i> ::P <sub>MDR1</sub> -GFP-URA <i>mrr1</i> Δ::FRT / <i>mrr1</i> Δ:: <i>MRR1</i> -3xHA- <i>caSAT1</i>	diese Arbeit
CAG48Δ <i>mrr1</i> MH3 B1 und B2	CAG48MRR1M4B	<i>MDR1</i> / <i>mdr1</i> ::P <sub>MDR1</sub> -GFP-URA <i>mrr1</i> Δ::FRT / <i>mrr1</i> Δ::MRR1 <sup>P683S</sup> -3xHA- <i>caSAT1</i>	diese Arbeit
CAG48Δ <i>mrr1</i> MEH2 B1 und B2	CAG48MRR1M4B	<i>MDR1</i> / <i>mdr1</i> ::P <sub>MDR1</sub> -GFP-URA <i>mrr1</i> Δ::FRT / <i>mrr1</i> Δ::FRT <i>ADH1</i> / <i>adh1</i> ::MRR1-3xHA- <i>caSAT1</i>	diese Arbeit
CAG48Δ <i>mrr1</i> MEH3 B1 und B2	CAG48MRR1M4B	<i>MDR1</i> / <i>mdr1</i> ::P <sub>MDR1</sub> -GFP-URA <i>mrr1</i> Δ::FRT / <i>mrr1</i> Δ::FRT <i>ADH1</i> / <i>adh1</i> ::MRR1 <sup>P683S</sup> -3xHA- <i>caSAT1</i>	diese Arbeit
CAG48Δ <i>mrr1</i> ME2 B1 und B2	CAG48MRR1M4B	<i>MDR1</i> / <i>mdr1</i> ::P <sub>MDR1</sub> -GFP-URA <i>mrr1</i> Δ::FRT / <i>mrr1</i> Δ::FRT <i>ADH1</i> / <i>adh1</i> ::MRR1- <i>caSAT1</i>	diese Arbeit
CAG48Δ <i>mrr1</i> ME3 B1 und B2	CAG48MRR1M4B	<i>MDR1</i> / <i>mdr1</i> ::P <sub>MDR1</sub> -GFP-URA <i>mrr1</i> Δ::FRT / <i>mrr1</i> Δ::FRT <i>ADH1</i> / <i>adh1</i> ::MRR1 <sup>P683S</sup> - <i>caSAT1</i>	diese Arbeit



Stamm	Ausgangsstamm	Genotyp	Referenz
<b><i>mrr1</i>Δ Mutanten mit reintegrierten, modifizierten <i>MRR1</i>-Allelen und <i>P<sub>MDR1</sub>-GFP</i>-Reporterfusionen</b>			
CAG48Δ <i>mrr1</i> MK2 ΔC1066 B1 und B2	CAG48MRR1M4B	<i>MDR1/mdr1::P<sub>MDR1</sub>-GFP-URA</i> <i>mrr1</i> Δ:: <i>FRT</i> / <i>mrr1</i> Δ:: <i>MRR1</i> <sup>ΔC1066</sup> - <i>caSAT1</i>	diese Arbeit
CAG48Δ <i>mrr1</i> MK2 ΔC1040 B1 und B2	CAG48MRR1M4B	<i>MDR1/mdr1::P<sub>MDR1</sub>-GFP-URA</i> <i>mrr1</i> Δ:: <i>FRT</i> / <i>mrr1</i> Δ:: <i>MRR1</i> <sup>ΔC1040</sup> - <i>caSAT1</i>	diese Arbeit
CAG48Δ <i>mrr1</i> MK2 ΔC1031 B1 und B2	CAG48MRR1M4B	<i>MDR1/mdr1::P<sub>MDR1</sub>-GFP-URA</i> <i>mrr1</i> Δ:: <i>FRT</i> / <i>mrr1</i> Δ:: <i>MRR1</i> <sup>ΔC1031</sup> - <i>caSAT1</i>	diese Arbeit
CAG48Δ <i>mrr1</i> MK2 ΔC1015 B1 und B2	CAG48MRR1M4B	<i>MDR1/mdr1::P<sub>MDR1</sub>-GFP-URA</i> <i>mrr1</i> Δ:: <i>FRT</i> / <i>mrr1</i> Δ:: <i>MRR1</i> <sup>ΔC1015</sup> - <i>caSAT1</i>	diese Arbeit
CAG48Δ <i>mrr1</i> MK2 ΔC1001 B1 und B2	CAG48MRR1M4B	<i>MDR1/mdr1::P<sub>MDR1</sub>-GFP-URA</i> <i>mrr1</i> Δ:: <i>FRT</i> / <i>mrr1</i> Δ:: <i>MRR1</i> <sup>ΔC1001</sup> - <i>caSAT1</i>	diese Arbeit
CAG48Δ <i>mrr1</i> MK2 ΔC955 B1 und B2	CAG48MRR1M4B	<i>MDR1/mdr1::P<sub>MDR1</sub>-GFP-URA</i> <i>mrr1</i> Δ:: <i>FRT</i> / <i>mrr1</i> Δ:: <i>MRR1</i> <sup>ΔC955</sup> - <i>caSAT1</i>	diese Arbeit
CAG48Δ <i>mrr1</i> MK2 ΔC952 B1 und B2	CAG48MRR1M4B	<i>MDR1/mdr1::P<sub>MDR1</sub>-GFP-URA</i> <i>mrr1</i> Δ:: <i>FRT</i> / <i>mrr1</i> Δ:: <i>MRR1</i> <sup>ΔC952</sup> - <i>caSAT1</i>	diese Arbeit
CAG48Δ <i>mrr1</i> MK2 ΔC948 B1 und B2	CAG48MRR1M4B	<i>MDR1/mdr1::P<sub>MDR1</sub>-GFP-URA</i> <i>mrr1</i> Δ:: <i>FRT</i> / <i>mrr1</i> Δ:: <i>MRR1</i> <sup>ΔC948</sup> - <i>caSAT1</i>	diese Arbeit
CAG48Δ <i>mrr1</i> MK2 ΔC947 B1 und B2	CAG48MRR1M4B	<i>MDR1/mdr1::P<sub>MDR1</sub>-GFP-URA</i> <i>mrr1</i> Δ:: <i>FRT</i> / <i>mrr1</i> Δ:: <i>MRR1</i> <sup>ΔC947</sup> - <i>caSAT1</i>	diese Arbeit
CAG48Δ <i>mrr1</i> MK2 ΔC946 B1 und B2	CAG48MRR1M4B	<i>MDR1/mdr1::P<sub>MDR1</sub>-GFP-URA</i> <i>mrr1</i> Δ:: <i>FRT</i> / <i>mrr1</i> Δ:: <i>MRR1</i> <sup>ΔC946</sup> - <i>caSAT1</i>	diese Arbeit
CAG48Δ <i>mrr1</i> MK2 ΔC945 B1 und B2	CAG48MRR1M4B	<i>MDR1/mdr1::P<sub>MDR1</sub>-GFP-URA</i> <i>mrr1</i> Δ:: <i>FRT</i> / <i>mrr1</i> Δ:: <i>MRR1</i> <sup>ΔC945</sup> - <i>caSAT1</i>	diese Arbeit
CAG48Δ <i>mrr1</i> MK2 ΔC944 B1 und B2	CAG48MRR1M4B	<i>MDR1/mdr1::P<sub>MDR1</sub>-GFP-URA</i> <i>mrr1</i> Δ:: <i>FRT</i> / <i>mrr1</i> Δ:: <i>MRR1</i> <sup>ΔC944</sup> - <i>caSAT1</i>	diese Arbeit
CAG48Δ <i>mrr1</i> MK2 ΔC933 B1 und B2	CAG48MRR1M4B	<i>MDR1/mdr1::P<sub>MDR1</sub>-GFP-URA</i> <i>mrr1</i> Δ:: <i>FRT</i> / <i>mrr1</i> Δ:: <i>MRR1</i> <sup>ΔC933</sup> - <i>caSAT1</i>	diese Arbeit

Stamm	Ausgangsstamm	Genotyp	Referenz
CAG48 $\Delta$ <i>mrr1</i> MK2 $\Delta$ C911 B1 und B2	CAG48MRR1M4B	<i>MDR1/mdr1::P<sub>MDR1</sub>-GFP-URA</i> <i>mrr1</i> $\Delta$ :: <i>FRT</i> / <i>mrr1</i> $\Delta$ :: <i>MRR1</i> $\Delta$ <sup>C911</sup> <i>caSAT1</i>	diese Arbeit
CAG48 $\Delta$ <i>mrr1</i> MK2 $\Delta$ C812 B1 und B2	CAG48MRR1M4B	<i>MDR1/mdr1::P<sub>MDR1</sub>-GFP-URA</i> <i>mrr1</i> $\Delta$ :: <i>FRT</i> / <i>mrr1</i> $\Delta$ :: <i>MRR1</i> $\Delta$ <sup>C812</sup> <i>caSAT1</i>	diese Arbeit
CAG48 $\Delta$ <i>mrr1</i> MK2 $\Delta$ C706 B1 und B2	CAG48MRR1M4B	<i>MDR1/mdr1::P<sub>MDR1</sub>-GFP-URA</i> <i>mrr1</i> $\Delta$ :: <i>FRT</i> / <i>mrr1</i> $\Delta$ :: <i>MRR1</i> $\Delta$ <sup>C706</sup> <i>caSAT1</i>	diese Arbeit
CAG48 $\Delta$ <i>mrr1</i> MK2 $\Delta$ C366 B1 und B2	CAG48MRR1M4B	<i>MDR1/mdr1::P<sub>MDR1</sub>-GFP-URA</i> <i>mrr1</i> $\Delta$ :: <i>FRT</i> / <i>mrr1</i> $\Delta$ :: <i>MRR1</i> $\Delta$ <sup>C366</sup> <i>caSAT1</i>	diese Arbeit
CAG48 $\Delta$ <i>mrr1</i> MK2 $\Delta$ 342-381 B1 und B2	CAG48MRR1M4B	<i>MDR1/mdr1::P<sub>MDR1</sub>-GFP-URA</i> <i>mrr1</i> $\Delta$ :: <i>FRT</i> / <i>mrr1</i> $\Delta$ :: <i>MRR1</i> $\Delta$ <sup>C342-381</sup> <i>caSAT1</i>	diese Arbeit
CAG48 $\Delta$ <i>mrr1</i> MK2 $\Delta$ C873-896 B1 und B2	CAG48MRR1M4B	<i>MDR1/mdr1::P<sub>MDR1</sub>-GFP-URA</i> <i>mrr1</i> $\Delta$ :: <i>FRT</i> / <i>mrr1</i> $\Delta$ :: <i>MRR1</i> $\Delta$ <sup>C873-896</sup> <i>caSAT1</i>	diese Arbeit
<b>Stämme, die <i>catetR-MRR1</i> Fusionen unter der Kontrolle von <i>P<sub>ADH1</sub></i> exprimieren und deren Kontrollstämme</b>			
SCTET 52	SC5314	<i>ADH1/adh1::catetR-caSAT1-P<sub>tet</sub>-GFP</i>	diese Arbeit
SCTET 53	SC5314	<i>ADH1/adh1::catetR-GAL4AD-caSAT1-P<sub>tet</sub>-GFP</i>	diese Arbeit
SCMRR1 <sup>67-1108</sup> -TETR A und B	SC5314	<i>ADH1/adh1::catetR-MRR1</i> <sup>67-1108</sup> <i>-caSAT1-P<sub>tet</sub>-GFP</i>	diese Arbeit
SCMRR1 <sup>91-1108</sup> -TETR A und B	SC5314	<i>ADH1/adh1::catetR-MRR1</i> <sup>91-1108</sup> <i>-caSAT1-P<sub>tet</sub>-GFP</i>	diese Arbeit
SCMRR1 <sup>104-1108</sup> -TETR A und B	SC5314	<i>ADH1/adh1::catetR-MRR1</i> <sup>104-1108</sup> <i>-caSAT1-P<sub>tet</sub>-GFP</i>	diese Arbeit
SCMRR1 <sup>122-1108</sup> -TETR A und B	SC5314	<i>ADH1/adh1::catetR-MRR1</i> <sup>122-1108</sup> <i>-caSAT1-P<sub>tet</sub>-GFP</i>	diese Arbeit
SCMRR1 <sup>144-1108</sup> -TETR A und B	SC5314	<i>ADH1/adh1::catetR-MRR1</i> <sup>144-1108</sup> <i>-caSAT1-P<sub>tet</sub>-GFP</i>	diese Arbeit
SCMRR1 <sup>168-1108</sup> -TETR A und B	SC5314	<i>ADH1/adh1::catetR-MRR1</i> <sup>168-1108</sup> <i>-caSAT1-P<sub>tet</sub>-GFP</i>	diese Arbeit
SCMRR1 <sup>269-1108</sup> -TETR A und B	SC5314	<i>ADH1/adh1::catetR-MRR1</i> <sup>269-1108</sup> <i>-caSAT1-P<sub>tet</sub>-GFP</i>	diese Arbeit
SCMRR1 <sup>67-526</sup> -TETR A und B	SC5314	<i>ADH1/adh1::catetR-MRR1</i> <sup>67-526</sup> <i>-caSAT1-P<sub>tet</sub>-GFP</i>	diese Arbeit
SCMRR1 <sup>269-812</sup> -TETR A und B	SC5314	<i>ADH1/adh1::catetR-MRR1</i> <sup>269-812</sup> <i>-caSAT1-P<sub>tet</sub>-GFP</i>	diese Arbeit

Stamm	Ausgangsstamm	Genotyp	Referenz
<b><i>mrr1</i>Δ Mutanten, die <i>MRR1DB-GAL4AD</i> Fusionen unter der Kontrolle von <i>P<sub>ADH1</sub></i> exprimieren</b>			
SCΔ <i>mrr1</i> MDB1A	SCMRR1M4A	<i>mrr1</i> Δ:: <i>FRT</i> / <i>mrr1</i> Δ:: <i>FRT</i> <i>ADH1/adh1</i> :: <i>MRR1</i> <sup>1-128</sup> - <i>GAL4AD</i> - <i>caSAT1</i>	diese Arbeit
SCΔ <i>mrr1</i> MDB1B	SCMRR1M4B	<i>mrr1</i> Δ:: <i>FRT</i> / <i>mrr1</i> Δ:: <i>FRT</i> <i>ADH1/adh1</i> :: <i>MRR1</i> <sup>1-128</sup> - <i>GAL4AD</i> - <i>caSAT1</i>	diese Arbeit
SCΔ <i>mrr1</i> MDB2A	SCMRR1M4A	<i>mrr1</i> Δ:: <i>FRT</i> / <i>mrr1</i> Δ:: <i>FRT</i> <i>ADH1/adh1</i> :: <i>MRR1</i> <sup>1-78</sup> - <i>GAL4AD</i> - <i>caSAT1</i>	diese Arbeit
SCΔ <i>mrr1</i> MDB2B	SCMRR1M4B	<i>mrr1</i> Δ:: <i>FRT</i> / <i>mrr1</i> Δ:: <i>FRT</i> <i>ADH1/adh1</i> :: <i>MRR1</i> <sup>1-78</sup> - <i>GAL4AD</i> - <i>caSAT1</i>	diese Arbeit
SCΔ <i>mrr1</i> MDBH2A	SCMRR1M4A	<i>mrr1</i> Δ:: <i>FRT</i> / <i>mrr1</i> Δ:: <i>FRT</i> <i>ADH1/adh1</i> :: <i>MRR1</i> <sup>1-128</sup> -3xHA- <i>GAL4AD</i> - <i>caSAT1</i>	diese Arbeit
SCΔ <i>mrr1</i> MDBH2B	SCMRR1M4B	<i>mrr1</i> Δ:: <i>FRT</i> / <i>mrr1</i> Δ:: <i>FRT</i> <i>ADH1/adh1</i> :: <i>MRR1</i> <sup>1-128</sup> -3xHA- <i>GAL4AD</i> - <i>caSAT1</i>	diese Arbeit
SCΔ <i>mrr1</i> MDBH4A	SCMRR1M4A	<i>mrr1</i> Δ:: <i>FRT</i> / <i>mrr1</i> Δ:: <i>FRT</i> <i>ADH1/adh1</i> :: <i>MRR1</i> <sup>1-121</sup> -3xHA- <i>GAL4AD</i> - <i>caSAT1</i>	diese Arbeit
SCΔ <i>mrr1</i> MDBH4B	SCMRR1M4B	<i>mrr1</i> Δ:: <i>FRT</i> / <i>mrr1</i> Δ:: <i>FRT</i> <i>ADH1/adh1</i> :: <i>MRR1</i> <sup>1-121</sup> -3xHA- <i>GAL4AD</i> - <i>caSAT1</i>	diese Arbeit
SCΔ <i>mrr1</i> MDBH5A	SCMRR1M4A	<i>mrr1</i> Δ:: <i>FRT</i> / <i>mrr1</i> Δ:: <i>FRT</i> <i>ADH1/adh1</i> :: <i>MRR1</i> <sup>1-106</sup> -3xHA- <i>GAL4AD</i> - <i>caSAT1</i>	diese Arbeit
SCΔ <i>mrr1</i> MDBH5B	SCMRR1M4B	<i>mrr1</i> Δ:: <i>FRT</i> / <i>mrr1</i> Δ:: <i>FRT</i> <i>ADH1/adh1</i> :: <i>MRR1</i> <sup>1-106</sup> -3xHA- <i>GAL4AD</i> - <i>caSAT1</i>	diese Arbeit
SCΔ <i>mrr1</i> MDBH6A	SCMRR1M4A	<i>mrr1</i> Δ:: <i>FRT</i> / <i>mrr1</i> Δ:: <i>FRT</i> <i>ADH1/adh1</i> :: <i>MRR1</i> <sup>1-90</sup> -3xHA- <i>GAL4AD</i> - <i>caSAT1</i>	diese Arbeit
SCΔ <i>mrr1</i> MDBH6B	SCMRR1M4B	<i>mrr1</i> Δ:: <i>FRT</i> / <i>mrr1</i> Δ:: <i>FRT</i> <i>ADH1/adh1</i> :: <i>MRR1</i> <sup>1-90</sup> -3xHA- <i>GAL4AD</i> - <i>caSAT1</i>	diese Arbeit

Stamm	Ausgangsstamm	Genotyp	Referenz
CAG48Δ <i>mrr1</i> MDB1 B1 und B2	CAG48MRR1M4B	<i>MDR1/mdr1::P<sub>MDR1</sub>-GFP-URA</i> <i>mrr1Δ::FRT / mrr1Δ::FRT</i> <i>ADH1/adh1::MRR1<sup>1-128</sup>-GAL4AD-</i> <i>caSAT1</i>	diese Arbeit
CAG48Δ <i>mrr1</i> MDB2 B1 und B2	CAG48MRR1M4B	<i>MDR1/mdr1::P<sub>MDR1</sub>-GFP-URA</i> <i>mrr1Δ::FRT / mrr1Δ::FRT</i> <i>ADH1/adh1::MRR1<sup>1-78</sup>-GAL4AD-</i> <i>caSAT1</i>	diese Arbeit
CAG48Δ <i>mrr1</i> MDBH2 B1 und B2	CAG48MRR1M4B	<i>MDR1/mdr1::P<sub>MDR1</sub>-GFP-URA</i> <i>mrr1Δ::FRT / mrr1Δ::FRT</i> <i>ADH1/adh1::MRR1<sup>1-128</sup>-3xHA-GAL4AD-</i> <i>caSAT1</i>	diese Arbeit
CAG48Δ <i>mrr1</i> MDBH4 B1 und B2	CAG48MRR1M4B	<i>MDR1/mdr1::P<sub>MDR1</sub>-GFP-URA</i> <i>mrr1Δ::FRT / mrr1Δ::FRT</i> <i>ADH1/adh1::MRR1<sup>1-121</sup>-3xHA-GAL4AD-</i> <i>caSAT1</i>	diese Arbeit
CAG48Δ <i>mrr1</i> MDBH5 B1 und B2	CAG48MRR1M4B	<i>MDR1/mdr1::P<sub>MDR1</sub>-GFP-URA</i> <i>mrr1Δ::FRT / mrr1Δ::FRT</i> <i>ADH1/adh1::MRR1<sup>1-106</sup>-3xHA-GAL4AD-</i> <i>caSAT1</i>	diese Arbeit
CAG48Δ <i>mrr1</i> MDBH6 B1 und B2	CAG48MRR1M4B	<i>MDR1/mdr1::P<sub>MDR1</sub>-GFP-URA</i> <i>mrr1Δ::FRT / mrr1Δ::FRT</i> <i>ADH1/adh1::MRR1<sup>1-90</sup>-3xHA-GAL4AD-</i> <i>caSAT1</i>	diese Arbeit

***mrr1*Δ, *upc2*Δ, *cap1*Δ *mdr1*Δ und *mrr1*Δ/*cap1*Δ Mutanten**

SCMRR1M4 A und B	SC5314	<i>mrr1Δ::FRT / mrr1Δ::FRT</i>	[82]
UPC2M4 A und B	SC5314	<i>upc2Δ::FRT / upc2Δ::FRT</i>	[29]
SCCAP1M1A	SC5314	<i>cap1-1Δ::SAT1-FLIP / CAP1-2</i>	diese Arbeit
SCCAP1M1B	SC5314	<i>CAP1-1 / cap1-2Δ::SAT1-FLIP</i>	diese Arbeit
SCCAP1M2A	SCCAP1M1A	<i>cap1-1Δ::FRT / CAP1-2</i>	diese Arbeit
SCCAP1M2B	SCCAP1M1B	<i>CAP1-1 / cap1-2Δ::FRT</i>	diese Arbeit
SCCAP1M3A	SCCAP1M2A	<i>cap1-1Δ::FRT / cap1-2Δ::SAT1-FLIP</i>	diese Arbeit
SCCAP1M3B	SCCAP1M2B	<i>cap1-1Δ::SAT1-FLIP / cap1-2Δ::FRT</i>	diese Arbeit
SCCAP1M4A	SCCAP1M3A	<i>cap1-1Δ::FRT / cap1-2Δ::FRT</i>	diese Arbeit
SCCAP1M4B	SCCAP1M3B	<i>cap1-1Δ::FRT / cap1-2Δ::FRT</i>	diese Arbeit
SCMDR1M4A	SCMDR1M3A	<i>mdr1Δ::FRT / mdr1Δ::FRT</i>	diese Arbeit
SCMDR1M4B	SCMDR1M3B	<i>mdr1Δ::FRT / mdr1Δ::FRT</i>	diese Arbeit
SCΔ <i>mrr1</i> CAP1M1A	SCMRR1M4A	<i>cap1-1Δ::SAT1-FLIP / CAP1-2</i> <i>mrr1Δ::FRT / mrr1Δ::FRT</i>	diese Arbeit

Stamm	Ausgangsstamm	Genotyp	Referenz
SC $\Delta$ <i>mrr1</i> CAP1M1B	SCMRR1M4B	<i>CAP1-1/cap1-2<math>\Delta</math>::SAT1-FLIP</i> <i>mrr1<math>\Delta</math>::FRT / mrr1<math>\Delta</math>::FRT</i>	diese Arbeit
SC $\Delta$ <i>mrr1</i> CAP1M2A	SC $\Delta$ <i>mrr1</i> CAP1 M1A	<i>cap1-1<math>\Delta</math>::FRT / CAP1-2</i> <i>mrr1<math>\Delta</math>::FRT / mrr1<math>\Delta</math>::FRT</i>	diese Arbeit
SC $\Delta$ <i>mrr1</i> CAP1M2B	SC $\Delta$ <i>mrr1</i> CAP1 M1B	<i>CAP1-1/cap1-2<math>\Delta</math>::FRT</i> <i>mrr1<math>\Delta</math>::FRT / mrr1<math>\Delta</math>::FRT</i>	diese Arbeit
SC $\Delta$ <i>mrr1</i> CAP1M3A	SC $\Delta$ <i>mrr1</i> CAP1 M2A	<i>cap1-1<math>\Delta</math>::FRT / cap1-2<math>\Delta</math>::SAT1-FLIP</i> <i>mrr1<math>\Delta</math>::FRT / mrr1<math>\Delta</math>::FRT</i>	diese Arbeit
SC $\Delta$ <i>mrr1</i> CAP1M3B	SC $\Delta$ <i>mrr1</i> CAP1 M2B	<i>cap1-1<math>\Delta</math>::SAT1-FLIP / cap1-2<math>\Delta</math>::FRT</i> <i>mrr1<math>\Delta</math>::FRT / mrr1<math>\Delta</math>::FRT</i>	diese Arbeit
SC $\Delta$ <i>mrr1</i> CAP1M4A	SC $\Delta$ <i>mrr1</i> CAP1 M3A	<i>cap1-1<math>\Delta</math>::FRT / cap1-2<math>\Delta</math>::FRT</i> <i>mrr1<math>\Delta</math>::FRT / mrr1<math>\Delta</math>::FRT</i>	diese Arbeit
SC $\Delta$ <i>mrr1</i> CAP1M4B	SC $\Delta$ <i>mrr1</i> CAP1 M3B	<i>cap1-1<math>\Delta</math>::FRT / cap1-2<math>\Delta</math>::FRT</i> <i>mrr1<math>\Delta</math>::FRT / mrr1<math>\Delta</math>::FRT</i>	diese Arbeit
<b>Stämme, die hyperaktive <i>MRR1</i>-, <i>UPC2</i>- und <i>CAP1</i>-Allele im Wildtyp-Hintergrund exprimieren</b>			
SCMRR1R31 A und B	SC5314	<i>MRR1 / MRR1<sup>P683S</sup>-SAT1-FLIP</i>	diese Arbeit
SCMRR1R32A	SCMRR1R31A	<i>MRR1 / MRR1<sup>P683S</sup>-FRT</i>	diese Arbeit
SCMRR1R32B	SCMRR1R31B	<i>MRR1 / MRR1<sup>P683S</sup>-FRT</i>	diese Arbeit
SCMRR1R33A	SCMRR1R32A	<i>MRR1<sup>P683S</sup>-SAT1-FLIP / MRR1<sup>P683S</sup>- FRT</i>	diese Arbeit
SCMRR1R33B	SCMRR1R32B	<i>MRR1<sup>P683S</sup>-SAT1-FLIP / MRR1<sup>P683S</sup>- FRT</i>	diese Arbeit
SCMRR1R34A	SCMRR1R33A	<i>MRR1<sup>P683S</sup>-FRT / MRR1<sup>P683S</sup>-FRT</i>	diese Arbeit
SCMRR1R34B	SCMRR1R33B	<i>MRR1<sup>P683S</sup>-FRT / MRR1<sup>P683S</sup>-FRT</i>	diese Arbeit
SCUPC2R12 A und B	SC5314	<i>UPC2<sup>G648D</sup>-FRT / UPC2-2</i>	[41]
SCUPC2R14A	SCUPC2R12A	<i>UPC2<sup>G648D</sup>-FRT / UPC2<sup>G648D</sup>-FRT</i>	[41]
SCUPC2R14B	SCUPC2R12B	<i>UPC2<sup>G648D</sup>-FRT / UPC2<sup>G648D</sup>-FRT</i>	[41]
SCCAP1R11A	SC5314	<i>CAP1<math>\Delta</math><sup>C333</sup>-SAT1-FLIP / CAP1-2</i>	diese Arbeit
SCCAP1R11B	SC5314	<i>CAP1-1 / CAP1<math>\Delta</math><sup>C333</sup>-SAT1-FLIP</i>	diese Arbeit
SCCAP1R12A	SCCAP1R11A	<i>CAP1<math>\Delta</math><sup>C333</sup>-FRT / CAP1-2</i>	diese Arbeit
SCCAP1R12B	SCCAP1R11B	<i>CAP1-1 / CAP1<math>\Delta</math><sup>C333</sup>-FRT</i>	diese Arbeit
SCCAP1R13A	SCCAP1R12A	<i>CAP1<math>\Delta</math><sup>C333</sup>-FRT / CAP1<math>\Delta</math><sup>C333</sup>-SAT1- FLIP</i>	diese Arbeit
SCCAP1R13B	SCCAP1R12B	<i>CAP1<math>\Delta</math><sup>C333</sup>-SAT1-FLIP / CAP1<math>\Delta</math><sup>C333</sup>- FRT</i>	diese Arbeit
SCCAP1R14A	SCCAP1R13A	<i>CAP1<math>\Delta</math><sup>C333</sup>-FRT / CAP1<math>\Delta</math><sup>C333</sup>-FRT</i>	diese Arbeit
SCCAP1R14B	SCCAP1R13B	<i>CAP1<math>\Delta</math><sup>C333</sup>-FRT / CAP1<math>\Delta</math><sup>C333</sup>-FRT</i>	diese Arbeit
<b>Stämme, die ein hyperaktive <i>CAP1</i>- und <i>UPC2</i>-Allele im <i>mrr1<math>\Delta</math></i>-Hintergrund exprimieren</b>			
$\Delta$ <i>mrr1</i> UPC2R12A	$\Delta$ <i>mrr1</i> UPC2R11A	<i>UPC2<sup>G648D</sup>-FRT / UPC2-2</i> <i>mrr1<math>\Delta</math>::FRT / mrr1<math>\Delta</math>::FRT</i>	diese Arbeit

Stamm	Ausgangsstamm	Genotyp	Referenz
$\Delta mrr1UPC2R12B$	$\Delta mrr1UPC2R11B$	$UPC2^{G648D}-FRT / UPC2-2$ $mrr1\Delta::FRT / mrr1\Delta::FRT$	diese Arbeit
$\Delta mrr1UPC2R14A$	$\Delta mrr1UPC2R13A$	$UPC2^{G648D}-FRT / UPC2_{G648D}-FRT$ $mrr1\Delta::FRT / mrr1\Delta::FRT$	diese Arbeit
$\Delta mrr1UPC2R14B$	$\Delta mrr1UPC2R13B$	$UPC2^{G648D}-FRT / UPC2_{G648D}-FRT$ $mrr1\Delta::FRT / mrr1\Delta::FRT$	diese Arbeit
$\Delta mrr1CAP1R11A$	SCMRR1M4A	$CAP1^{\Delta C333}-SAT1-FLIP / CAP1-2$ $mrr1\Delta::FRT / mrr1\Delta::FRT$	diese Arbeit
$\Delta mrr1CAP1R11B$	SCMRR1M4B	$CAP1-1 / CAP1^{\Delta C333}-SAT1-FLIP$ $mrr1\Delta::FRT / mrr1\Delta::FRT$	diese Arbeit
$\Delta mrr1CAP1R12A$	$\Delta mrr1CAP1R11A$	$CAP1^{\Delta C333}-FRT / CAP1-2$ $mrr1\Delta::FRT / mrr1\Delta::FRT$	diese Arbeit
$\Delta mrr1CAP1R12B$	$\Delta mrr1CAP1R11B$	$CAP1-1 / CAP1^{\Delta C333}-FRT$ $mrr1\Delta::FRT / mrr1\Delta::FRT$	diese Arbeit
$\Delta mrr1CAP1R13A$	$\Delta mrr1CAP1R12A$	$CAP1^{\Delta C333}-FRT / CAP1^{\Delta C333}-SAT1-FLIP$ $mrr1\Delta::FRT / mrr1\Delta::FRT$	diese Arbeit
$\Delta mrr1CAP1R13B$	$\Delta mrr1CAP1R12B$	$CAP1^{\Delta C333}-SAT1-FLIP$ $/ CAP1^{\Delta C333}-FRT$ $mrr1\Delta::FRT / mrr1\Delta::FRT$	diese Arbeit
$\Delta mrr1CAP1R14A$	$\Delta mrr1CAP1R13A$	$CAP1^{\Delta C333}-FRT / CAP1^{\Delta C333}-FRT$ $mrr1\Delta::FRT / mrr1\Delta::FRT$	diese Arbeit
$\Delta mrr1CAP1R14B$	$\Delta mrr1CAP1R13B$	$CAP1^{\Delta C333}-FRT / CAP1^{\Delta C333}-FRT$ $mrr1\Delta::FRT / mrr1\Delta::FRT$	diese Arbeit
<b>Stämme, die hyperaktive <i>MRR1</i>-, <i>UPC2</i>- und <i>CAP1</i>-Allele im <i>mdr1</i><math>\Delta</math>-Hintergrund exprimieren</b>			
$\Delta mdr1MRR1R31A$	SCMDR1M4A	$MRR1 / MRR1^{P683S}-SAT1-FLIP$ $mdr1\Delta::FRT / mdr1\Delta::FRT$	diese Arbeit
$\Delta mdr1MRR1R31B$	SCMDR1M4B	$MRR1 / MRR1^{P683S}-SAT1-FLIP$ $mdr1\Delta::FRT / mdr1\Delta::FRT$	diese Arbeit
$\Delta mdr1MRR1R32A$	$\Delta mdr1MRR1R31A$	$MRR1 / MRR1^{P683S}-FRT$ $mdr1\Delta::FRT / mdr1\Delta::FRT$	diese Arbeit
$\Delta mdr1MRR1R32B$	$\Delta mdr1MRR1R31B$	$MRR1 / MRR1^{P683S}-FRT$ $mdr1\Delta::FRT / mdr1\Delta::FRT$	diese Arbeit
$\Delta mdr1MRR1R33A$	$\Delta mdr1MRR1R32A$	$MRR1^{P683S}-SAT1-FLIP / MRR1^{P683S}-FRT$ $mdr1\Delta::FRT / mdr1\Delta::FRT$	diese Arbeit
$\Delta mdr1MRR1R33B$	$\Delta mdr1MRR1R32B$	$MRR1^{P683S}-SAT1-FLIP / MRR1^{P683S}-FRT$ $mdr1\Delta::FRT / mdr1\Delta::FRT$	diese Arbeit
$\Delta mdr1MRR1R34A$	$\Delta mdr1MRR1R33A$	$MRR1^{P683S}-FRT / MRR1^{P683S}-FRT$ $mdr1\Delta::FRT / mdr1\Delta::FRT$	diese Arbeit
$\Delta mdr1MRR1R34B$	$\Delta mdr1MRR1R33B$	$MRR1^{P683S}-FRT / MRR1^{P683S}-FRT$ $mdr1\Delta::FRT / mdr1\Delta::FRT$	diese Arbeit

Stamm	Ausgangsstamm	Genotyp	Referenz
$\Delta mdr1$ UPC2R11A	SCMDR1M4A	<i>UPC2<sup>G648D</sup>-SAT1-FLIP/UPC2-2</i> <i>mdr1<math>\Delta</math>::FRT/mdr1<math>\Delta</math>::FRT</i>	diese Arbeit
$\Delta mdr1$ UPC2R11B	SCMDR1M4B	<i>UPC2<sup>G648D</sup>-SAT1-FLIP/UPC2-2</i> <i>mdr1<math>\Delta</math>::FRT/mdr1<math>\Delta</math>::FRT</i>	diese Arbeit
$\Delta mdr1$ UPC2R12A	$\Delta mdr1$ UPC2R11A	<i>UPC2<sup>G648D</sup>-FRT/UPC2-2</i> <i>mdr1<math>\Delta</math>::FRT/mdr1<math>\Delta</math>::FRT</i>	diese Arbeit
$\Delta mdr1$ UPC2R12B	$\Delta mdr1$ UPC2R11B	<i>UPC2<sup>G648D</sup>-FRT/UPC2-2</i> <i>mdr1<math>\Delta</math>::FRT/mdr1<math>\Delta</math>::FRT</i>	diese Arbeit
$\Delta mdr1$ UPC2R13A	$\Delta mdr1$ UPC2R12A	<i>UPC2<sup>G648D</sup>-FRT/UPC2<sup>G648D</sup>-SAT1-FLIP</i> <i>mdr1<math>\Delta</math>::FRT/mdr1<math>\Delta</math>::FRT</i>	diese Arbeit
$\Delta mdr1$ UPC2R13B	$\Delta mdr1$ UPC2R12B	<i>UPC2<sup>G648D</sup>-FRT/UPC2<sup>G648D</sup>-SAT1-FLIP</i> <i>mdr1<math>\Delta</math>::FRT/mdr1<math>\Delta</math>::FRT</i>	diese Arbeit
$\Delta mdr1$ UPC2R14A	$\Delta mdr1$ UPC2R13A	<i>UPC2<sup>G648D</sup>-FRT/UPC2<sup>G648D</sup>-FRT</i> <i>mdr1<math>\Delta</math>::FRT/mdr1<math>\Delta</math>::FRT</i>	diese Arbeit
$\Delta mdr1$ UPC2R14B	$\Delta mdr1$ UPC2R13B	<i>UPC2<sup>G648D</sup>-FRT/UPC2<sup>G648D</sup>-FRT</i> <i>mdr1<math>\Delta</math>::FRT/mdr1<math>\Delta</math>::FRT</i>	diese Arbeit
$\Delta mdr1$ CAP1R11A	SCMDR1M4A	<i>CAP1<math>\Delta</math><sup>C333</sup>-SAT1-FLIP/CAP1-2</i> <i>mdr1<math>\Delta</math>::FRT/mdr1<math>\Delta</math>::FRT</i>	diese Arbeit
$\Delta mdr1$ CAP1R11B	SCMDR1M4B	<i>CAP1-1/CAP1<math>\Delta</math><sup>C333</sup>-SAT1-FLIP</i> <i>mdr1<math>\Delta</math>::FRT/mdr1<math>\Delta</math>::FRT</i>	diese Arbeit
$\Delta mdr1$ CAP1R12A	$\Delta mdr1$ CAP1R11A	<i>CAP1<math>\Delta</math><sup>C333</sup>-FRT/CAP1-2</i> <i>mdr1<math>\Delta</math>::FRT/mdr1<math>\Delta</math>::FRT</i>	diese Arbeit
$\Delta mdr1$ CAP1R12B	$\Delta mdr1$ CAP1R11B	<i>CAP1-1/CAP1<math>\Delta</math><sup>C333</sup>-FRT</i> <i>mdr1<math>\Delta</math>::FRT/mdr1<math>\Delta</math>::FRT</i>	diese Arbeit
$\Delta mdr1$ CAP1R13A	$\Delta mdr1$ CAP1R12A	<i>CAP1<math>\Delta</math><sup>C333</sup>-FRT/CAP1<math>\Delta</math><sup>C333</sup>-SAT1-FLIP</i> <i>mdr1<math>\Delta</math>::FRT/mdr1<math>\Delta</math>::FRT</i>	diese Arbeit
$\Delta mdr1$ CAP1R13B	$\Delta mdr1$ CAP1R12B	<i>CAP1<math>\Delta</math><sup>C333</sup>-SAT1-FLIP/CAP1<math>\Delta</math><sup>C333</sup>-FRT</i> <i>mdr1<math>\Delta</math>::FRT/mdr1<math>\Delta</math>::FRT</i>	diese Arbeit
$\Delta mdr1$ CAP1R14A	$\Delta mdr1$ CAP1R13A	<i>CAP1<math>\Delta</math><sup>C333</sup>-FRT/CAP1<math>\Delta</math><sup>C333</sup>-FRT</i> <i>mdr1<math>\Delta</math>::FRT/mdr1<math>\Delta</math>::FRT</i>	diese Arbeit
$\Delta mdr1$ CAP1R14B	$\Delta mdr1$ CAP1R13B	<i>CAP1<math>\Delta</math><sup>C333</sup>-FRT/CAP1<math>\Delta</math><sup>C333</sup>-FRT</i> <i>mdr1<math>\Delta</math>::FRT/mdr1<math>\Delta</math>::FRT</i>	diese Arbeit
<b>Stämme, die hyperaktive <i>MRR1</i>- und <i>CAP1</i>-Allele co-exprimieren</b>			
SCMRR1R34CAP1R1 1A	SCMRR1R34A	<i>MRR1<sup>P683S</sup>-FRT/MRR1<sup>P683S</sup>-FRT</i> <i>CAP1-1/CAP1<math>\Delta</math><sup>C333</sup>-SAT1-FLIP</i>	diese Arbeit
SCMRR1R34CAP1R1 1B	SCMRR1R34B	<i>MRR1<sup>P683S</sup>-FRT/MRR1<sup>P683S</sup>-FRT</i> <i>CAP1<math>\Delta</math><sup>C333</sup>-SAT1-FLIP/CAP1-2</i>	diese Arbeit
SCMRR1R34CAP1R1 2A	SCMRR1R34 CAP1R11A	<i>MRR1<sup>P683S</sup>-FRT/MRR1<sup>P683S</sup>-FRT</i> <i>CAP1-1/CAP1<math>\Delta</math><sup>C333</sup>-FRT</i>	diese Arbeit

Stamm	Ausgangsstamm	Genotyp	Referenz
SCMRR1R34CAP1R1 2B	SCMRR1R34 CAP1R11B	<i>MRR1</i> <sup>P683S</sup> - <i>FRT</i> / <i>MRR1</i> <sup>P683S</sup> - <i>FRT</i> <i>CAP1</i> <sup>ΔC333</sup> - <i>FRT</i> / <i>CAP1</i> -2	diese Arbeit
SCMRR1R34CAP1R1 3A	SCMRR1R34 CAP1R12A	<i>MRR1</i> <sup>P683S</sup> - <i>FRT</i> / <i>MRR1</i> <sup>P683S</sup> - <i>FRT</i> <i>CAP1</i> <sup>ΔC333</sup> - <i>SAT1-FLIP</i> / <i>CAP1</i> <sup>ΔC333</sup> - <i>FRT</i>	diese Arbeit
SCMRR1R34CAP1R1 3B	SCMRR1R34 CAP1R12B	<i>MRR1</i> <sup>P683S</sup> - <i>FRT</i> / <i>MRR1</i> <sup>P683S</sup> - <i>FRT</i> <i>CAP1</i> <sup>ΔC333</sup> - <i>FRT</i> / <i>CAP1</i> <sup>ΔC333</sup> - <i>SAT1-FLIP</i>	diese Arbeit
SCMRR1R34CAP1R1 4A	SCMRR1R34 CAP1R13A	<i>MRR1</i> <sup>P683S</sup> - <i>FRT</i> / <i>MRR1</i> <sup>P683S</sup> - <i>FRT</i> <i>CAP1</i> <sup>ΔC333</sup> - <i>FRT</i> / <i>CAP1</i> <sup>ΔC333</sup> - <i>FRT</i>	diese Arbeit
SCMRR1R34CAP1R1 4B	SCMRR1R34 CAP1R13B	<i>MRR1</i> <sup>P683S</sup> - <i>FRT</i> / <i>MRR1</i> <sup>P683S</sup> - <i>FRT</i> <i>CAP1</i> <sup>ΔC333</sup> - <i>FRT</i> / <i>CAP1</i> <sup>ΔC333</sup> - <i>FRT</i>	diese Arbeit
<b>Stämme, die eine P<sub>MDR1</sub>-GFP-Reporterfusion tragen und wildtypische oder hyperaktive MRR1-, UPC2- und CAP1-Allele in Wildtyp-, mrr1Δ-, upc2Δ- und cap1Δ-Hintergründen exprimieren</b>			
SCMPG2 A und B	SC5314	<i>ACT1/act1::P<sub>MDR1</sub>-GFP-caSAT1</i>	
SCMRR1R32MPG2A	SCMRR1R32A	<i>MRR1/MRR1</i> <sup>P683S</sup> - <i>FRT</i> <i>ACT1/act1::P<sub>MDR1</sub>-GFP-caSAT1</i>	diese Arbeit
SCMRR1R32MPG2B	SCMRR1R32B	<i>MRR1/MRR1</i> <sup>P683S</sup> - <i>FRT</i> <i>ACT1/act1::P<sub>MDR1</sub>-GFP-caSAT1</i>	diese Arbeit
SCMRR1R34MPG2A	SCMRR1R34A	<i>MRR1</i> <sup>P683S</sup> - <i>FRT</i> / <i>MRR1</i> <sup>P683S</sup> - <i>FRT</i> <i>ACT1/act1::P<sub>MDR1</sub>-GFP-caSAT1</i>	diese Arbeit
SCMRR1R34MPG2B	SCMRR1R34B	<i>MRR1</i> <sup>P683S</sup> - <i>FRT</i> / <i>MRR1</i> <sup>P683S</sup> - <i>FRT</i> <i>ACT1/act1::P<sub>MDR1</sub>-GFP-caSAT1</i>	diese Arbeit
SCUPC2R12MPG2A	SCUPC2R12A	<i>UPC2</i> <sup>G648D</sup> - <i>FRT</i> / <i>UPC2</i> -2 <i>ACT1/act1::P<sub>MDR1</sub>-GFP-caSAT1</i>	diese Arbeit
SCUPC2R12MPG2B	SCUPC2R12B	<i>UPC2</i> <sup>G648D</sup> - <i>FRT</i> / <i>UPC2</i> -2 <i>ACT1/act1::P<sub>MDR1</sub>-GFP-caSAT1</i>	diese Arbeit
SCUPC2R14MPG2A	SCUPC2R14A	<i>UPC2</i> <sup>G648D</sup> - <i>FRT</i> / <i>UPC2</i> <sup>G648D</sup> - <i>FRT</i> <i>ACT1/act1::P<sub>MDR1</sub>-GFP-caSAT1</i>	diese Arbeit
SCUPC2R14MPG2B	SCUPC2R14B	<i>UPC2</i> <sup>G648D</sup> - <i>FRT</i> / <i>UPC2</i> <sup>G648D</sup> - <i>FRT</i> <i>ACT1/act1::P<sub>MDR1</sub>-GFP-caSAT1</i>	diese Arbeit
SCCAP1R12MPG2A	SCCAP1R12A	<i>CAP1</i> <sup>ΔC333</sup> - <i>FRT</i> / <i>CAP1</i> -2 <i>ACT1/act1::P<sub>MDR1</sub>-GFP-caSAT1</i>	diese Arbeit
SCCAP1R12MPG2B	SCCAP1R12B	<i>CAP1</i> -1 / <i>CAP1</i> <sup>ΔC333</sup> - <i>FRT</i> <i>ACT1/act1::P<sub>MDR1</sub>-GFP-caSAT1</i>	diese Arbeit
SCCAP1R14MPG2A	SCCAP1R14A	<i>CAP1</i> <sup>ΔC333</sup> - <i>FRT</i> / <i>CAP1</i> <sup>ΔC333</sup> - <i>FRT</i> <i>ACT1/act1::P<sub>MDR1</sub>-GFP-caSAT1</i>	diese Arbeit
SCCAP1R14MPG2B	SCCAP1R14B	<i>CAP1</i> <sup>ΔC333</sup> - <i>FRT</i> / <i>CAP1</i> <sup>ΔC333</sup> - <i>FRT</i> <i>ACT1/act1::P<sub>MDR1</sub>-GFP-caSAT1</i>	diese Arbeit
SCMRR1M4MPG2A	SCMRR1M4A	<i>mrr1</i> Δ:: <i>FRT</i> / <i>mrr1</i> Δ:: <i>FRT</i> <i>ACT1/act1::P<sub>MDR1</sub>-GFP-caSAT1</i>	diese Arbeit



Stamm	Ausgangsstamm	Genotyp	Referenz
SCMRR1M4MPG2B	SCMRR1M4B	<i>mrr1</i> Δ::FRT / <i>mrr1</i> Δ::FRT <i>ACT1/act1</i> ::P <sub>MDR1</sub> -GFP- <i>caSAT1</i>	diese Arbeit
Δ <i>mrr1</i> UPC2R12 MPG2A	Δ <i>mrr1</i> UPC2R12A	<i>mrr1</i> Δ::FRT / <i>mrr1</i> Δ::FRT <i>UPC2</i> <sup>G648D</sup> -FRT / <i>UPC2</i> -2 <i>ACT1/act1</i> ::P <sub>MDR1</sub> -GFP- <i>caSAT1</i>	diese Arbeit
Δ <i>mrr1</i> UPC2R12 MPG2B	Δ <i>mrr1</i> UPC2R12B	<i>mrr1</i> Δ::FRT / <i>mrr1</i> Δ::FRT <i>UPC2</i> <sup>G648D</sup> -FRT / <i>UPC2</i> -2 <i>ACT1/act1</i> ::P <sub>MDR1</sub> -GFP- <i>caSAT1</i>	diese Arbeit
Δ <i>mrr1</i> UPC2R14 MPG2A	Δ <i>mrr1</i> UPC2R14A	<i>mrr1</i> Δ::FRT / <i>mrr1</i> Δ::FRT textitUPC2 <sup>G648D</sup> -FRT / textitUPC2 <sup>G648D</sup> - FRT <i>ACT1/act1</i> ::P <sub>MDR1</sub> -GFP- <i>caSAT1</i>	diese Arbeit
Δ <i>mrr1</i> UPC2R14 MPG2B	Δ <i>mrr1</i> UPC2R14B	<i>mrr1</i> Δ::FRT / <i>mrr1</i> Δ::FRT textitUPC2 <sup>G648D</sup> -FRT / textitUPC2 <sup>G648D</sup> - FRT <i>ACT1/act1</i> ::P <sub>MDR1</sub> -GFP- <i>caSAT1</i>	diese Arbeit
Δ <i>mrr1</i> CAP1R12 MPG2A	Δ <i>mrr1</i> CAP1R12A	<i>mrr1</i> Δ::FRT / <i>mrr1</i> Δ::FRT <i>CAP1</i> <sup>ΔC333</sup> -FRT / <i>CAP1</i> -2 <i>ACT1/act1</i> ::P <sub>MDR1</sub> -GFP- <i>caSAT1</i>	diese Arbeit
Δ <i>mrr1</i> CAP1R12 MPG2B	Δ <i>mrr1</i> CAP1R12B	<i>mrr1</i> Δ::FRT / <i>mrr1</i> Δ::FRT <i>CAP1</i> -1 / <i>CAP1</i> <sup>ΔC333</sup> -FRT <i>ACT1/act1</i> ::P <sub>MDR1</sub> -GFP- <i>caSAT1</i>	diese Arbeit
Δ <i>mrr1</i> CAP1R14 MPG2A	Δ <i>mrr1</i> CAP1R14A	<i>mrr1</i> Δ::FRT / <i>mrr1</i> Δ::FRT <i>CAP1</i> <sup>ΔC333</sup> -FRT / <i>CAP1</i> <sup>ΔC333</sup> -FRT <i>ACT1/act1</i> ::P <sub>MDR1</sub> -GFP- <i>caSAT1</i>	diese Arbeit
Δ <i>mrr1</i> CAP1R14 MPG2B	Δ <i>mrr1</i> CAP1R14B	<i>mrr1</i> Δ::FRT / <i>mrr1</i> Δ::FRT <i>CAP1</i> <sup>ΔC333</sup> -FRT / <i>CAP1</i> <sup>ΔC333</sup> -FRT <i>ACT1/act1</i> ::PP <sub>MDR1</sub> -GFP- <i>caSAT1</i>	diese Arbeit
UPC2M4MPG2A	UPC2M4A	<i>upc2</i> Δ::FRT / <i>upc2</i> Δ::FRT <i>ACT1/act1</i> ::PP <sub>MDR1</sub> -GFP- <i>caSAT1</i>	diese Arbeit
UPC2M4MPG2B	UPC2M4B	<i>upc2</i> Δ::FRT / <i>upc2</i> Δ::FRT <i>ACT1/act1</i> ::P <sub>MDR1</sub> -GFP- <i>caSAT1</i>	diese Arbeit
Δ <i>upc2</i> MRR1R32 MPG2A	Δ <i>upc2</i> MRR1R32A	<i>upc2</i> Δ::FRT / <i>upc2</i> Δ::FRT <i>MRR1</i> / <i>MRR1</i> <sup>P683S</sup> -FRT <i>ACT1/act1</i> ::P <sub>MDR1</sub> -GFP- <i>caSAT1</i>	diese Arbeit
Δ <i>upc2</i> MRR1R32 MPG2B	Δ <i>upc2</i> MRR1R32B	<i>upc2</i> Δ::FRT / <i>upc2</i> Δ::FRT <i>MRR1</i> / <i>MRR1</i> <sup>P683S</sup> -FRT <i>ACT1/act1</i> ::P <sub>MDR1</sub> -GFP- <i>caSAT1</i>	diese Arbeit
Δ <i>upc2</i> MRR1R34 MPG2A	Δ <i>upc2</i> MRR1R34A	<i>upc2</i> Δ::FRT / <i>upc2</i> Δ::FRT <i>MRR1</i> <sup>P683S</sup> -FRT / <i>MRR1</i> <sup>P683S</sup> -FRT <i>ACT1/act1</i> ::P <sub>MDR1</sub> -GFP- <i>caSAT1</i>	diese Arbeit

Stamm	Ausgangsstamm	Genotyp	Referenz
$\Delta upc2$ MRR1R34 MPG2B	$\Delta upc2$ MRR1R34B	$upc2\Delta::FRT / upc2\Delta::FRT$ $MRR1^{P683S}-FRT / MRR1^{P683S}-FRT$ $ACT1/act1::P_{MDR1}-GFP-caSAT1$	diese Arbeit
SCCAP1M4MPG2A	SCCAP1M4A	$cap1\Delta::FRT / cap1\Delta::FRT$ $ACT1/act1::P_{MDR1}-GFP-caSAT1$	diese Arbeit
SCCAP1M4MPG2B	SCCAP1M4B	$cap1\Delta::FRT / cap1\Delta::FRT$ $ACT1/act1::P_{MDR1}-GFP-caSAT1$	diese Arbeit
$\Delta cap1$ MRR1R32 MPG2A	$\Delta cap1$ MRR1R32A	$cap1\Delta::FRT / cap1\Delta::FRT$ $MRR1/MRR1^{P683S}-FRT$ $ACT1/act1::P_{MDR1}-GFP-caSAT1$	diese Arbeit
$\Delta cap1$ MRR1R32 MPG2B	$\Delta cap1$ MRR1R32B	$cap1\Delta::FRT / cap1\Delta::FRT$ $MRR1/MRR1^{P683S}-FRT$ $ACT1/act1::P_{MDR1}-GFP-caSAT1$	diese Arbeit
$\Delta cap1$ MRR1R34 MPG2A	$\Delta cap1$ MRR1R34A	$cap1\Delta::FRT / cap1\Delta::FRT$ $MRR1^{P683S}-FRT / MRR1^{P683S}-FRT$ $ACT1/act1::P_{MDR1}-GFP-caSAT1$	diese Arbeit
$\Delta cap1$ MRR1R34 MPG2B	$\Delta cap1$ MRR1R34B	$cap1\Delta::FRT / cap1\Delta::FRT$ $MRR1^{P683S}-FRT / MRR1^{P683S}-FRT$ $ACT1/act1::P_{MDR1}-GFP-caSAT1$	diese Arbeit
SCMRR1R34CAP1R14 MPG2A	SCMRR1R34 CAP1R14A	$MRR1^{P683S}-FRT / MRR1^{P683S}-FRT$ $CAP1^{\Delta C333}-FRT / CAP1^{\Delta C333}-FRT$ $ACT1/act1::P_{MDR1}-GFP-caSAT1$	diese Arbeit
SCMRR1R34CAP1R14 MPG2B	SCMRR1R34 CAP1R14B	$MRR1^{P683S}-FRT / MRR1^{P683S}-FRT$ $CAP1^{\Delta C333}-FRT / CAP1^{\Delta C333}-FRT$ $ACT1/act1::P_{MDR1}-GFP-caSAT1$	diese Arbeit
<b><i>mrr1</i>Δ Mutanten ohne oder mit einer P<sub>MDR1</sub>-GFP-Reporterfusion, die wildtypische oder mutierte CdMRR1-Allele exprimieren</b>			
SCMRR1M4CdE1A	SCMRR1M4A	$mrr1\Delta::FRT / mrr1\Delta::FRT$ $ADH1/adh1\Delta::P_{ADH1}-CdMRR1^{CM1}-$ $caSAT1$	diese Arbeit
SCMRR1M4CdE1B	SCMRR1M4B	$mrr1\Delta::FRT / mrr1\Delta::FRT$ $ADH1/adh1\Delta::P_{ADH1}-CdMRR1^{CM1}-$ $caSAT1$	diese Arbeit
SCMRR1M4CdE2A	SCMRR1M4A	$mrr1\Delta::FRT / mrr1\Delta::FRT$ $ADH1/adh1\Delta::P_{ADH1}-CdMRR1^{CM2}-$ $caSAT1$	diese Arbeit
SCMRR1M4CdE2B	SCMRR1M4B	$mrr1\Delta::FRT / mrr1\Delta::FRT$ $ADH1/adh1\Delta::P_{ADH1}-CdMRR1^{CM2}-$ $caSAT1$	diese Arbeit

Stamm	Ausgangsstamm	Genotyp	Referenz
SCMRR1M4CdE3A	SCMRR1M4A	<i>mrr1</i> Δ::FRT / <i>mrr1</i> Δ::FRT <i>ADH1/adh1</i> Δ::P <sub>ADH1</sub> -CdMRR1 <sup>CD57</sup> - <i>caSAT1</i>	diese Arbeit
SCMRR1M4CdE3B	SCMRR1M4B	<i>mrr1</i> Δ::FRT / <i>mrr1</i> Δ::FRT <i>ADH1/adh1</i> Δ::P <sub>ADH1</sub> -CdMRR1 <sup>CD57</sup> - <i>caSAT1</i>	diese Arbeit
SCMRR1M4CdE4A	SCMRR1M4A	<i>mrr1</i> Δ::FRT / <i>mrr1</i> Δ::FRT <i>ADH1/adh1</i> Δ::P <sub>ADH1</sub> -CdMRR1 <sup>CD57A</sup> - <i>caSAT1</i>	diese Arbeit
SCMRR1M4CdE4B	SCMRR1M4B	<i>mrr1</i> Δ::FRT / <i>mrr1</i> Δ::FRT <i>ADH1/adh1</i> Δ::P <sub>ADH1</sub> -CdMRR1 <sup>CD57A</sup> - <i>caSAT1</i>	diese Arbeit
SCMRR1M4CdE5A	SCMRR1M4A	<i>mrr1</i> Δ::FRT / <i>mrr1</i> Δ::FRT <i>ADH1/adh1</i> Δ::P <sub>ADH1</sub> -CdMRR1 <sup>CD57B</sup> - <i>caSAT1</i>	diese Arbeit
SCMRR1M4CdE5B	SCMRR1M4B	<i>mrr1</i> Δ::FRT / <i>mrr1</i> Δ::FRT <i>ADH1/adh1</i> Δ::P <sub>ADH1</sub> -CdMRR1 <sup>CD57B</sup> - <i>caSAT1</i>	diese Arbeit
SCMRR1M4CdE6A	SCMRR1M4A	<i>mrr1</i> Δ::FRT / <i>mrr1</i> Δ::FRT <i>ADH1/adh1</i> Δ::P <sub>ADH1</sub> -CdMRR1 <sup>CD-IIA</sup> - <i>caSAT1</i>	diese Arbeit
SCMRR1M4CdE6B	SCMRR1M4B	<i>mrr1</i> Δ::FRT / <i>mrr1</i> Δ::FRT <i>ADH1/adh1</i> Δ::P <sub>ADH1</sub> -CdMRR1 <sup>CD-IIA</sup> - <i>caSAT1</i>	diese Arbeit
SCMRR1M4CdE7A	SCMRR1M4A	<i>mrr1</i> Δ::FRT / <i>mrr1</i> Δ::FRT <i>ADH1/adh1</i> Δ::P <sub>ADH1</sub> -CdMRR1 <sup>CD-IIB</sup> - <i>caSAT1</i>	diese Arbeit
SCMRR1M4CdE7B	SCMRR1M4B	<i>mrr1</i> Δ::FRT / <i>mrr1</i> Δ::FRT <i>ADH1/adh1</i> Δ::P <sub>ADH1</sub> -CdMRR1 <sup>CD-IIB</sup> - <i>ccaSAT1</i>	diese Arbeit
CAG48MRR1M4CdE1 B1 und B2	CAG48MRR1M4B	<i>mrr1</i> Δ::FRT / <i>mrr1</i> Δ::FRT <i>MDR1/mdr1</i> ::P <sub>MDR1</sub> -GFP-URA <i>ADH1/adh1</i> Δ::P <sub>ADH1</sub> -CdMRR1 <sup>CM1</sup> - <i>caSAT1</i>	diese Arbeit
CAG48MRR1M4CdE2 B1 und B2	CAG48MRR1M4B	<i>mrr1</i> Δ::FRT / <i>mrr1</i> Δ::FRT <i>MDR1/mdr1</i> ::P <sub>MDR1</sub> -GFP-URA <i>ADH1/adh1</i> Δ::P <sub>ADH1</sub> -CdMRR1 <sup>CM2</sup> - <i>caSAT1</i>	diese Arbeit

Stamm	Ausgangsstamm	Genotyp	Referenz
CAG48MRR1M4CdE3 B1 und B2	CAG48MRR1M4B	<i>mrr1</i> Δ::FRT / <i>mrr1</i> Δ::FRT <i>MDR1</i> / <i>mdr1</i> ::P <sub>MDR1</sub> -GFP-URA <i>ADH1</i> / <i>adh1</i> Δ::P <sub>ADH1</sub> -CdMRR1 <sup>CD57</sup> - <i>caSAT1</i>	diese Arbeit
CAG48MRR1M4CdE4 B1 und B2	CAG48MRR1M4B	<i>mrr1</i> Δ::FRT / <i>mrr1</i> Δ::FRT <i>MDR1</i> / <i>mdr1</i> ::P <sub>MDR1</sub> -GFP-URA <i>ADH1</i> / <i>adh1</i> Δ::P <sub>ADH1</sub> -CdMRR1 <sup>CD57A</sup> - <i>caSAT1</i>	diese Arbeit
CAG48MRR1M4CdE5 B1 und B2	CAG48MRR1M4B	<i>mrr1</i> Δ::FRT / <i>mrr1</i> Δ::FRT <i>MDR1</i> / <i>mdr1</i> ::P <sub>MDR1</sub> -GFP-URA <i>ADH1</i> / <i>adh1</i> Δ::P <sub>ADH1</sub> -CdMRR1 <sup>CD57B</sup> - <i>caSAT1</i>	diese Arbeit
CAG48MRR1M4CdE6 B1 und B2	CAG48MRR1M4B	<i>mrr1</i> Δ::FRT / <i>mrr1</i> Δ::FRT <i>MDR1</i> / <i>mdr1</i> ::P <sub>MDR1</sub> -GFP-URA <i>ADH1</i> / <i>adh1</i> Δ::P <sub>ADH1</sub> -CdMRR1 <sup>CD-IIA</sup> - <i>caSAT1</i>	diese Arbeit
CAG48MRR1M4CdE7 B1 und B2	CAG48MRR1M4B	<i>mrr1</i> Δ::FRT / <i>mrr1</i> Δ::FRT <i>MDR1</i> / <i>mdr1</i> ::P <sub>MDR1</sub> -GFP-URA <i>ADH1</i> / <i>adh1</i> Δ::P <sub>ADH1</sub> -CdMRR1 <sup>CD-IIB</sup> - <i>caSAT1</i>	diese Arbeit

### 4.3. Verwendete *C. dubliniensis*-Stämme

Alle in dieser Arbeit verwendeten *C. dubliniensis*-Stämme, deren Ausgangsstämme sowie die relevanten Eigenschaften und Referenzen sind in Tabelle 4.3 aufgelistet.

**Tabelle 4.3.:** In dieser Arbeit verwendete *C. dubliniensis*-Stämme.

Stamm	Ausgangsstamm	Genotyp	Referenz
CM1		Fluconazol-sensitives Isolat von Patient 1	[78, 79]
CM2		<i>MDR1</i> -überexprimierendes Fluconazol-resistentes Isolat von Patient 1	[78, 79]
CD57		Fluconazol-sensitives Isolat von Patient 15 [78, 79]	
CD57A	CD57	<i>in vitro</i> generierter, <i>MDR1</i> -überexprimierender Stamm	[78, 79]
CD57B	CD57	<i>in vitro</i> generierter, <i>MDR1</i> -überexprimierender Stamm	[78, 79]
CD51-II		Fluconazol-sensitives Isolat von Patient 8	[78, 79]
CD51-IIA	CD51-II	<i>in vitro</i> generierter, <i>MDR1</i> -überexprimierender Stamm	[78, 79]
CD51-IIB	CD51-II	<i>in vitro</i> generierter, <i>MDR1</i> -überexprimierender Stamm	[78, 79]

## 4.4. Oligonukleotide

Zur Amplifizierung bestimmter Genomsequenzen wurden die in Tabelle 4.4 aufgelisteten Oligonukleotide über die Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland) bezogen. Vorhandene oder eingefügte Erkennungssequenzen von Restriktionsendonukleasen sind mit fettgedruckten Buchstaben hervorgehoben. Außerdem angegeben ist die Länge der Primer in Nukleotiden (nt) und die für die PCR-Reaktion empfohlene Annealingtemperatur ( $T_A$ ).

**Tabelle 4.4.:** In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide.

Primer	Länge [nt]	$T_A$ [°C]	Sequenz (5' → 3')
ACT37	37	69,5	GGT <b>CCTCGAG</b> TTAG <b>AGATCT</b> AAATTCTGGAAATCTGG
ACT38	39	70,5	ATAT <b>GGGCCCTGCAG</b> ACATTTTATGATGGAATGAATGGG
ACT39	100	>75	ATAT <b>GTCGACT</b> CGAAAGAAACTGAAGCCGAATACACCAA TAATGAACGTA AAAATTCAAAGAAAT <b>CCTCGAG</b> TTAG <b>AGATCT</b> AAATTCTGGAAATCTGG
ADH3	30	72,2	CCACGGCAAAGACGAGCTCTGGATCCACTG
CAP1-5	30	58,9	TATT <b>GAGCTC</b> AGGATTGTAAACGGTGTGTC
CAP1-6	31	59,0	AGTTCCGCGGTATCATCTAGATTTGCTGGTG
CAP1-7	30	58,9	TTCTCTCGAGGGAGTAGTGATAAATACTGC
CAP1-8	29	59,0	CATTGGGCCCTGAAGACAAGAGGGAAGGG
CdMRR1-1	32	65,6	GTTATTCGTATT <b>CCTCGAG</b> AAATGTCAGTTGCC
CdMRR1-2	33	62,0	CAAATCAC <b>AGATCT</b> ATTTCAATTGGTAAAAAG
GAL5	34	63,4	ATAT <b>AGATCT</b> TTACTCTTTTTTTGGGTTTGGTGG
GAL6	31	66,0	ATAT <b>GGATCC</b> CTTTTTTTGGGTTTGGTGG
GFP25	22	62,1	CAGCTGCTGGGATTACACATGG
TETR1	62	72,0	ATAT <b>GTCTAG</b> ATTAGATAAAAGTAAAGTGATTAACAGCGC ATTAGAGTTGCTTAATGAGGTC
TETR2	31	69,5	GGCTGCTCGAGGACCCACTTTCACATTTAAG
ZCF36-2	28	60,7	GCCAATTCAC <b>AGATCT</b> AATTTAATTGG
ZCF36-3	31	65,5	GAATAATTCGGAGCTCAATTTGCGTTTAGCC
ZCF36-9	29	68,1	GAC <b>ACTCGAG</b> TCCTGCAAATTTCTGACC
ZCF36-10	31	64,2	GTTA <b>AGATCT</b> ATTGAGATTGTGACTGCGAAC
ZCF36-11	31	62,9	GATT <b>AGATCT</b> ATTCGCTAGCTACTAATTGAG
ZCF36-12	31	68,2	CT <b>GAGATCT</b> ACAGTCTGCTCGATACGCTAAG
ZCF36-13	32	68,2	CATGT <b>AGATCT</b> ATTCAGGGGATGGATCAGTGG
ZCF36-14	29	69,5	CT <b>GACTCGAG</b> CCCTGAAGCACAAGACATG
ZCF36-15	34	69,5	CTT <b>CCTCGAG</b> TTCGATCCAAATGTCTGTTTCTGG
ZCF36-16	32	63,1	AATT <b>AGATCT</b> AGATCACCATGTCACATACAAC
ZCF36-17	32	64,4	CTCT <b>AGATCT</b> AAAACTCCATACTGGTAATGG
ZCF36-18	32	61,8	TCT <b>TAGATCT</b> ATACTAAATCCAAGCCAAAATC

Primer	Länge [nt]	T <sub>A</sub> [°C]	Sequenz (5' → 3')
ZCF36-19	33	64,5	TCAA <b>AGATCT</b> AAGGTGTATTGCCATAGTAACTG
ZCF36-20	34	71,9	CTCA <b>ACTCGAG</b> CCCTGAATCCAACCCTCTGTATG
ZCF36-21	34	68,3	TCTA <b>ACTCGAG</b> AAAAATGTCAATTGCCACCACCC
ZCF36-22	30	72,2	GTT <b>GGGCGCC</b> GGCAACAGTATTGTCTGGTG
ZCF36-23	36	63,8	TCAC <b>AGATCT</b> AAGATAACATTTGCAACCAAATTTTG
ZCF36-24	31	70,8	GAAC <b>AGATCT</b> ACGGCTGCAGTTCCTGTTGCC
ZCF36-25	33	69,5	CCATA <b>CTCGAG</b> AAGTGCAAGAATCCCAATTCGG
ZCF36-26	31	72,1	CAGT <b>GGCGCC</b> GTGTGATGATCCATTGGTCA
ZCF36-27	31	66,8	CATTGG <b>AGATCT</b> ACTCATCACCCATAACCAG
ZCF36-28	32	61,8	TTT <b>GGATCCT</b> ACATTCTTTTTTCTTTTTTCT
ZCF36-29	33	65,8	TTT <b>GGATCCT</b> TTGGTTTCAATGATGTTGTTCC
ZCF36-30	35	69,5	CGG <b>GGATCCT</b> GTCAAACAAGAAGAAAATTTGCAC
ZCF36-31	31	66,8	GAAG <b>GGATCCA</b> AGGGTCACAATTTTTGTTG
ZCF36-32	34	69,5	AAG <b>CCTCGAG</b> AAAGAACTGAAAGCCGAATACACC
ZCF36-33	35	67,1	CAA <b>ACTCGAGT</b> CCAGACAATACTGTTGCCAATAAT
ZCF36-34	33	63,4	TTAC <b>AGATCT</b> AATTCAATGCCACTTCACAAATG
ZCF36-35	33	61,0	CCATA <b>AGATCT</b> ATTTACCCAATTTATTCAATG
ZCF36-36	34	63,4	GTTTT <b>AGATCT</b> AAGCAATTTGTTCCAACCTTGAC
ZCF36-37A	34	65,9	GA <b>ACTAGATCT</b> ACATAACCAGCGTTTTACCCAAT
ZCF36-37B	31	66,0	TGT <b>CGGCGCCT</b> TTCTTTGAATTTTTACGTTT
ZCF36-38B	30	74,2	TCG <b>GGGCGCCT</b> TTCTTTGAGGAGCTTCGG
ZCF36-39	32	65,9	CACCC <b>AGAGTCT</b> ACGTTTTACCCAATTTATTC
ZCF36-40	32	65,9	CATCAC <b>AGAGTCT</b> ACAGCGTTTTACCCAATTTA
ZCF36-41	31	66,0	ACTCAT <b>AGAGTCT</b> AAACCAGCGTTTTACCCAA
ZCF36-42	31	63,3	GCGTTT <b>AGATCT</b> ATTTATTCAATGCCACTTC
ZCF36-43	31	66,0	CCAGCG <b>AGATCT</b> ACAATTTATTCAATGCCAC
ZCF36-44	32	63,4	TAACCA <b>AGATCT</b> AACCCAATTTATTCAATGCC
ZCF36-45	34	63,5	TTAC <b>CTCGAGT</b> GAATTGAATATGTTGAAACAAAG
ZCF36-46	31	68,2	TTCT <b>GGCGCCT</b> TCTTCATATGGACGTGATTC
ZCF36-89	37	69,5	AATTT <b>AGGATCC</b> ATGTCAATTGCCACCACCCCTATAG
ZCF36-90	35	70,6	TGTTTG <b>CTCGAG</b> CTAGGCAACAGTATTGTCTGGTG

Die eingefügten Restriktionsschnittstellen sind fett hervorgehoben.

## 4.5. Geräte und Chemikalien

### 4.5.1. Geräte

Die wichtigsten in dieser Arbeit verwendeten Geräte sowie deren Hersteller sind in Tabelle 4.5 aufgelistet.

**Tabelle 4.5.:** In dieser Arbeit verwendete Geräte.

Gerät	Modell	Hersteller bzw. Vertreiber
Blotter	Trans-Blot SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell	Bio-Rad
Brutschränke	Heraeus B6200 BE400	Thermo Electron Corporaion Memmert
Durchflusszytometer	FACSCalibur	Becton Dickinson
Elektrophoresekammern	Sub Cell GT/ Mini-Sub Cell GT Mini-PROTEAN 3 Cell	Bio-Rad Bio-Rad
Elektroporationsgerät	EasyjecT prima	EquiBio
Entwicklungsmaschine	Cawomat 2000 IR	CAWO Photochemische Fabrik GmbH
Geldokumentationsanlage	Gel Doc 2000	Bio-Rad
Heizblock	MKR23	HLC BioTech
Homogenisierer	Mini Beadbeater	BioSpec Products
Hybridisierungssystem für Microarrays	Hybridization System 12	NimbleGen
Hybridisierungsofen	HBSNSR220	Thermo Electron Corporation
Netzgeräte	PowerPac 300 PowerPac Basic	Bio-Rad Bio-Rad
pH-Meter	InoLab pH Level 1	WTW
Pipetten	Pipetman P1000, P200, P20 peqPETTE 10E	Gilson Peqlab Biotechnologie GmbH
pH-Elektrode	InLab Basics Pt1000	Mettler Toledo
Photometer	BioPhotometer NanoDrop 1000	Eppendorf Peqlab Biotechnologie GmbH
Scanner für Microarrays	GenePix 4000B	Molecular Devices
Schüttelinkubatoren	TH 15 Certomat BS-1	Edmund Bühler GmbH Sartorius
Schütteltisch	KS 260 basic	IKA
Sterilbank	HERAsafe	Heraeus
Thermocycler	Cyclone 25	Peqlab Biotechnologie GmbH
Ultraschall Homogenisator	Sonic Dismembrator Model 100	Fisher Scientific
UV-Crosslinker	UV Stratalinker 1800	Stratagene
UV-Tisch	UVIS	Desaga
Vakuumblotter	VacuGene XL	Pharmacia Biotech bzw. GE

Gerät	Modell	Hersteller bzw. Vertreiber
Vakuumpumpe	VacuGene XL	Pharmacia Biotech bzw. GE
Vortexer	Vortex Genie 2	Scientific Industries
Wasserbad	1083	GFL
Wippschüttler	PMR-30	Grant-bio
Zentrifugen	Biofuge Pico21	Heraeus
	Biofuge fresco	Heraeus
	Megafuge 1.0R	Kendro

#### 4.5.2. Chemikalien

In Tabelle 4.6 sind alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien sowie deren Hersteller bzw. Vertreiber aufgelistet.

**Tabelle 4.6.:** In dieser Arbeit verwendete Chemikalien.

Firma	Chemikalien
Agilent Technologies	Paq5000 DNA Polymerase
Amersham	Cy5/Cy3 monoreactive dye packs
AppliChem	30 % Acrylamidlösung, APS (Ammoniumpersulfat), Bromphenolblau, Ethanol, $\beta$ -Mercaptoethanol, Essigsäure, Ethidiumbromid, Lithiumacetat, Salzsäure, Tween-20
Becton Dickinson	Difco-Agar, Hefeextrakt (Bacto Yeast Extract)
Bio-Rad	Proteinmarker
Dynal Biotech	Dynabeads panmouse IgG
Fermentas	Page Ruler prestained
Finnzymes	Phusion High-Fidelity DNA Polymerase
Gerbu	BSA Fraction V (Bovines Serumalbumin)
Invitrogen	1 kb DNA-Ladder
Merck	Chloroform
New England Biolabs (NEB)	Klenow Polymerase, Ligasen (T4, Quick), Nukleotide (dNTP), Restriktionsenzyme
NimbleGen	<i>Candida albicans</i> whole genome tiling array
Oxoid	HR-Medium (Pulver)
Peqlab	Agarose
Santa Cruz Biotech	monoklonaler Maus anti-HA Antikörper
Roche	anit-HA-Peroxidase Antikörper (3F10), PIM (Protease Inhibitor Mix) cOplete EDTA-free Tablets



Firma	Chemikalien
Roth	Ampicillin, Calciumchlorid, DTT (Dithiothreitol), EDTA, Ethanol (vergällt), Glassbeads (0,25-0,5 mm), Glycerin, Glycin, Glucose, Harnstoff, HEPES-KOH (N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2-Ethansulfonsäure), Isoamylalkohol, Isopropanol, Magermilchpulver, Maltose, Methanol, Natriumacetat, Natriumchlorid, Natriumcitrat, Natriumhydroxid, SDS (Natriumdodecylsulfat), Sorbitol, TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin), Tris-Base, Tris-Cl, Trypton/Pepton aus Casein, Wasserstoffperoxid
Serva	Coomassie-Brilliant-Blue R250
Sigma-Aldrich	AA-dUTP, Benomyl, Brefeldin A, Cerulenin, DMSO (Dimethylsulfoxid), Fluconazol, Glassbeads, Lyticase, Proteinase K, Ribonuclease A
Werner Bioagents	Nourseothricin

### 4.5.3. Lösungen

Alle während dieser Arbeit verwendeten Lösungen sowie ihre Zusammensetzungen sind in Tabelle 4.7 aufgelistet.

**Tabelle 4.7.:** In dieser Arbeit verwendete Lösungen.

Lösung	Zusammensetzung
5x Auftragspuffer	25 mM Tris-Cl pH7, 150 mM EDTA pH8, 0,05 % Bromphenolblau, 25 % Glycerol
B-Puffer	100 mM Tris-Cl, 200 mM NaCl, 20 % Glycerin, 5 mM EDTA, pH7,5
B <sup>+</sup> -Puffer	B-Puffer, 1:25 PIM, 1:1000 $\beta$ -Mercaptoethanol
Breaking Buffer	100 mM NaCl, 10 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA, 2 % Triton X-100, 1 % SDS
Entfärber	40 % Methanol, 10 % Essigsäure
Färbelösung	0,2 % Coomassie-Brilliant-Blue R250, 40 % Methanol, 10 % Essigsäure
Harnstoffpuffer	6 M Harnstoff, 0,4 % SDS, 0,5x SSC
HR-Medium	14,67 g HR-Medium (Pulver), 1 g NaHCO <sub>3</sub> , 500 ml 0,2 M Phosphatpuffer pH7,5, pH7,2
3x Lämmli	240 mM Tris-Cl, 6 % SDS, 30 % Glycerin, 16 % $\beta$ -Mercaptoethanol, 0,002 % Bromphenol Blau
10x Laufpuffer	2 M Glycin, 250 mM Trisbase, 1 % SDS
LB-Agar	0,5 % Hefeextrakt, 1 % Pepton, 0,5 % NaCl
LB-Medium	0,5 % Hefeextrakt, 0,51 % Pepton, % NaCl, 1,5 % Agar
Lösung 1 (Plasmide)	50 mM Glucose, 10 mM EDTA pH8,0, 25 mM Tris-Cl pH7,5
Lösung 2 (Plasmide)	200 mM NaOH, 1 % SDS
Lösung 3 (Plasmide)	3 M NaAc pH4,8
Lower Tris	1,5 M Tris-Cl pH8,8, 0,4 % SDS
Lysispuffer (Chip-on-chip)	50 mM HEPES-KOH pH7,5, 140 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 % Triton X-100, 0,1 % Na-Deoxycholat, PIM (1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid, 1 mM Benzamidin, 10 $\mu$ g/ml Aprotinin, 1 $\mu$ g/ml Leupeptin, 1 $\mu$ g/ml Pepstatin)

Lösung	Zusammensetzung
Lyticase-Puffer	1 M Sorbitol, 100 mM Na-Citrat pH5,8, 50 mM EDTA pH 8,0, 2% $\beta$ -Mercaptoethanol, 500 units/ml Lyticase
1x PBS(T)	3,8 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 16,2 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 75 mM NaCl, pH7,4 (0,1 % Tween 20)
PCI	Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1)
Proteinase-Puffer	10 mM Tris-Cl pH7,5, 50 mM EDTA pH7,5, 0,5 % SDS, 1 mg/ml Proteinase K
20x SSC	0,3 M Na-Citrat, 3 M NaCl
1x TAE	40 mM Tris, 20 mM Essigsäure, 1 mM EDTA
1x TBS(T)	50 mM HEPES-KOH pH7,5, 140 mM NaCl
10x TE	100 mM Tris-Cl pH7,5, 10 mM EDTA pH7,5
1x Transferpuffer	50 mM Tris, 40 mM Glycin, 0,04 % SDS, 5 % Methanol
Upper Tris	0,5 M Tris-Cl pH6,8, 0,4 % SDS
Waschpuffer (Chip-on-chip)	10 mM Tris-Cl pH 8,0, 250 mM LiCl, 0,5 % NP-40, 0,5 % Na-Deoxycholate, 1 mM EDTA
YPD-Agar	1 % Hefeextrakt, 2 % Pepton, 2 % Glucose, 1,5 % Agar
YPD-Medium	1 % Hefeextrakt, 2 % Pepton, 2 % Glucose
YPM-Medium	1 % Hefeextrakt, 2 % Pepton, 2 % Maltose

Alle nicht erwähnten Geräte, Chemikalien und sonstige Materialien wurden von den Firmen Amersham, Applichem, Biometra, Boehringer, Difco, Eppendorf, GE Healthcare, Gibco, Gilson, Greiner, Merck, MWG-Biotech, Oxoid, Peqlab, Pharmacia, Roth, Sarstedt, Serva und Sigma bezogen. Verwendete Kits sind an anderer Stelle im Methodenteil erwähnt.

## 4.6. Mikrobiologische Methoden

### 4.6.1. Anzucht von *Escherichia coli*

*E. coli* Zellen wurden bei 37 °C mit 180 rpm in LB-Flüssigmedium (1 % Pepton aus Casein, 0,5 % Hefeextrakt, 0,5 % NaCl) herangezogen. Mit *E. coli* beimpfte Agarplatten (1,5 % Agar) wurden über Nacht im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Plasmid-tragende *E. coli*-Stämme wurden sowohl in Flüssigmedium als auch auf Agarplatten unter Selektionsdruck (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Ampicillin) kultiviert.

### 4.6.2. Anzucht von *Candida*-Stämmen

Alle *Candida*-Stämme wurden mit 15 % Glycerol versetzt bei -80 °C aufbewahrt und zur Kultivierung auf YPD-Agarplatten ausgestrichen und 2 Tage bei 30 °C inkubiert. Als Vollmedium diente YPD-Medium. Flüssigkulturen überwiegend zur DNA-Isolierung, zur Transformation

oder zum Überimpfen in andere Medien wurden bei 250 rpm 30 °C herangezogen.

Für die Selektion von Nourseothricin-resistenten Transformanten wurden den YPD-Agarplatten 200 µg/ml Nourseothricin zugesetzt. Um Nourseothricin-sensitive Derivate zu identifizieren, in denen die *SAT1*-Flipper-Kassette durch *FLP*-vermittelte Rekombination deletiert wurde, wurden die Transformanten über Nacht in YPM angezogen, was ohne selektiven Druck zur Induktion des *MAL2*-Promotors und somit zur Expression des *caFLP*-Gens in der *SAT1*-Flipper-Kassette führte. 100 bis 200 Zellen wurden dann auf YPD-Platten mit 10 µg/ml Nourseothricin ausplattiert und 2 Tage bei 30 °C inkubiert. Anhand ihrer im Vergleich zu resistenten Klonen kleineren Koloniegröße konnten Nourseothricin-sensitive Klone identifiziert werden. Wiederausstreichen der Klone auf YPD-Platten mit 100 µg/ml Nourseothricin bestätigte die Selektion [102].

Für die Induktion des *MDR1*-Promotors mit Benomyl wurden Übernachtkulturen der Reporterstämme mit frischem YPD-Medium 10<sup>-2</sup> verdünnt und weitere 3 h bei 30 °C geschüttelt. Nach Zugabe von 50 µg/ml Benomyl wurden die Zellen für eine weitere Stunde inkubiert.

## 4.7. Molekularbiologische Methoden

### 4.7.1. Plasmidisolierung aus *E. coli*

Für die Isolierung von Plasmiden aus *E. coli* wurden je nach Bedarf zwei unterschiedliche Methoden angewendet. Die Isolierung nach dem modifizierten Protokoll der alkalischen Lyse nach Birnboim and Doly [9] ist gegenüber der Isolierung mittels eines Kits die kostengünstigere Variante. Die Verwendung eines Kits ist zeitsparender und die Ausbeute qualitativ hochwertiger. Für die Plasmidisolierung mittels alkalischer Lyse wurden 1,5 ml einer *E. coli* Übernachtkultur 1 min bei 13000 rpm abzentrifugiert, in 100 µl einer Pufferlösung (Lösung 1) resuspendiert und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Abkühlen der Zellen auf Eis wurden die Zellen mit 200 µl einer alkalischen SDS-Lösung (Lösung 2) lysiert. Durch die Zugabe von 150 µl einer hochkonzentrierten NaAc-Lösung (Lösung 3) wurde das Lysat neutralisiert, was zur Renaturierung und daraus folgender Aggregation der chromosomalen DNA und dem Ausfallen von Protein-SDS Komplexen und RNA führte. Nach 5 min Zentrifugation bei 13000 rpm wurde die Plasmid-DNA mit 200 µl PCI aus dem Überstand extrahiert, in 1 ml 100 % Ethanol gefällt und das Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen. Das luftgetrocknete Pellet wurde in 50 µl bidest. H<sub>2</sub>O mit 1 µg/µl RNase A aufgenommen bei -20 °C aufbewahrt.

Für die Plasmidisolierung aus *E. coli* mit dem NucleoSpin Plasmid Kit der Firma Macherey-Nagel wurde der Zellpellet von 1,5 ml Übernachtkultur in Buffer A resuspendiert, die Zellen mittels SDS (Buffer B) alkalisch lysiert und das Lysat mit Buffer 3 neutralisiert. Ausgefällte

Proteine, genomische DNA und Zellbestandteile wurden abzentrifugiert und der Überstand mit enthaltener Plasmid-DNA auf die Silicat Membran einer Säule geladen. Durch waschen mit dem Ethanol-haltigen Buffer 4 wurden Salze, Metabolite und lösliche makromolekulare Zellbestandteile entfernt und die reine Plasmid-DNA mit 50  $\mu$ l H<sub>2</sub>O eluiert.

#### 4.7.2. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Amplifizierung bestimmter DNA-Sequenzen wurde nach der Methode von Saiki *et al.* [110] durchgeführt. Eine standard PCR mit der Phusion-DNA-Polymerase erfolgte nach Herstellerangaben. Einer anfänglichen Denaturierung der DNA für 30 sec bei 98 °C folgten 30 Zyklen mit jeweils einer Denaturierung für 15 sec bei 98 °C, einem Primer Annealing für 30 sec und einer Elongation für 30 sec/kb bei 72 °C. Nach dem letzten Zyklus erfolgte ein Extensionsschritt für 10 min bei 72 °C bevor die PCR bis zur weiteren verwendung bei 4 °C gehalten wurde. Für die Reaktion wurde in den meisten Fällen ein 50  $\mu$ l Ansatz gewählt mit 1-2 ng Plasmid-DNA bzw. 0,1-1  $\mu$ g chromosomaler *C. albicans* DNA als Template, 2  $\mu$ M je Primer, je 0,05 mM der Desoxyribonukleotide ATP, CTP, GTP und TTP sowie der einfachen Konzentration des Puffersystems und 0,02 U/ $\mu$ l Polymerase. Die Annealingtemperaturen der jeweiligen Primer sind in Tabelle 4.4 aufgelistet. Zur Überprüfung der PCR wurden jeweils 5  $\mu$ l des Ansatzes auf einem 1% Agarosegel aufgetrennt, die Banden in Ethidiumbromid angefärbt und unter UV-Licht betrachtet. Zur Aufreinigung des PCR-Produktes wurde das QIAquick PCR Purification Kit von Quiagen bzw. das GeneJET PCR Purification Kit von Fermentas nach Herstellerangaben verwendet. Das PCR-Produkt wurde in 50  $\mu$ l H<sub>2</sub>O eluiert.

Für das Scannen von *E. coli* Kolonien wurde die PCR in 25  $\mu$ l angesetzt und die DNA nach Angaben des Herstellers mit der Paq-Polymerase amplifiziert, die im Gegensatz zur Phusion kostengünstiger ist, aber keine Korrekturlese-Funktion aufweist.

#### 4.7.3. Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Für die Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen wurden die Enzyme und Puffer der Firma New England Biolabs (NEB) nach Herstellerangaben verwendet. Für Kontrollspaltungen von Plasmiden wurden ca. 200 ng Plasmid-DNA mit ca. 10 Units des entsprechenden Enzyms und 1x Spaltpuffer in einem 20  $\mu$ l Ansatz für 1,5 h bei 37 °C inkubiert und anschließend auf einem Agarosegel analysiert. Für präparative Spaltungen mit anschließender Gelaufreinigung der Fragmente wurden 20  $\mu$ l Plasmid-DNA bzw. 40  $\mu$ l PCR-Produkt mit jeweils 10-50 Units der entsprechenden Enzyme in einem 50  $\mu$ l Ansatz für 3 h bei 37 °C inkubiert. Die Verwendung mancher Enzyme, wie z.B. Apal, in einem Doppelverdau erforderte vor Anheben der Tempera-

tur auf 37 °C eine Inkubation des Ansatzes für 1 h bei Raumtemperatur. Nach anschließender Aufreinigung mittels Gelelektrophorese (4.7.4) konnten die Fragmente für eine Ligation zur Herstellung von Plasmiden (4.7.6) oder eine Transformation von *C. albicans* Zellen (4.7.8) verwendet werden. Um die *C. albicans* Transformanten mittels Southern Hybridisierung (4.7.10) zu überprüfen, wurden ca. 10 µg der chromosomalen DNA der jeweiligen Stämme mit 1 µl Enzym (5-25 Units) über Nacht bei 37 °C inkubiert.

#### 4.7.4. Aufreinigung von DNA mittels Agarose-Gelelektrophorese

Die gespaltene DNA wurde mit 6x Auftragspuffer versetzt und auf einem 1 % Agarosegel in 1x TAE aufgetrennt. Die Banden wurden mit Ethidiumbromid angefärbt, unter UV-Licht sichtbar gemacht und aus dem Gel ausgeschnitten. Für die Elution der DNA aus dem Gel wurde nach Herstellerangaben das GENE CLEAN Kit von Q-BIOgene bzw. das GeneJET Gel Extraction Kit von Fermentas verwendet.

Für die Gelextraktion mit dem GENE CLEAN Kit wurde die Bande bei 50 °C in NaI aufgelöst und mit 8 µl Glasmilch gevortext. Nach kurzer Inkubation auf Eis wurde das Gemisch abzentrifugiert und das Pellet 3x mit 180 µl New Wash gewaschen. Das luftgetrocknete Pellet wurde anschließend für eine Transformation von *C. albicans* Zellen (4.7.8) in 8 µl H<sub>2</sub>O und für eine Ligation (4.7.6) in 20 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen, 5 min bei 50 °C inkubiert, abzentrifugiert und der Überstand in ein neues Cap überführt.

Für die Aufreinigung der DNA mit dem GeneJet Kit wurde das Gelstück 1:1 in Binding Buffer bei 50 °C gelöst, die DNA auf eine Säule gebunden, mit Wash Buffer gewaschen und mit 8 µl bzw. 20 µl H<sub>2</sub>O (s.o.) eluiert.

#### 4.7.5. Herstellung kompetenter *E. coli* Zellen

Zur Herstellung kompetenter *E. coli* Zellen wurde die CaCl<sub>2</sub>-Methode angewendet. Eine *E. coli* Übernachtskultur wurde 1:100 in 50 ml frischem LB-Medium verdünnt und bei 37 °C unter Schütteln bis zu einer OD<sub>600</sub> = 0,8 inkubiert. Die folgenden Schritte wurden auf Eis bzw. bei 4 °C durchgeführt. Die Zellen wurden für 10 min bei 4000 rpm abzentrifugiert und das Pellet in 40 ml eiskaltem 50 mM CaCl<sub>2</sub> resuspendiert. Nach 30-minütiger Inkubation auf Eis wurden die Zellen wieder pelletiert und in 2 ml eiskaltem 50 mM CaCl<sub>2</sub> aufgenommen. Nach Zugabe von 15 % Glycerin wurden die kompetenten *E. coli* Zellen in 100 µl Aliquots bei -80 °C aufbewahrt.

#### 4.7.6. Ligation von DNA-Fragmenten und Transformation kompetenter *E. coli* Zellen

Für die Herstellung von Plasmiden wurden geschnittene gelaufgereinigte DNA-Fragmente (4.7.3/4.7.4) mit Hilfe der T4 Ligase (NEB) ligiert. Das molekulare Verhältnis von Vektor zu Insert betrug dabei ca. 1:3, was in einem 20 µl Ansatz 1 µl Vektor und 3-8 µl Insert entsprach. Nach Zugabe von 1 µl (20 U/µl) T4 Ligase und 1x Puffer wurde das Gemisch für 1,5 h bei Raumtemperatur inkubiert. In einigen Fällen wurde die Quick T4 Ligase (NEB) verwendet, die mit 100 U/µl eine erhöhte Konzentration an Ligase aufweist. Dementsprechend konnte die Ligation in 15 min bei Raumtemperatur durchgeführt werden, das Ligationsgemisch wurde wie für die T4 Ligase angesetzt.

Direkt im Anschluss an die Ligation wurde die DNA in *E. coli* Zellen integriert. Dazu wurden 100 µl kompetente *E. coli* Zellen (4.7.5) auf Eis aufgetaut und mit dem gesamten Ligationsansatz für 30 min auf Eis inkubiert. Per Hitzeschock für 2 min bei 42 °C wurden die Zellen transformiert, auf Eis abgekühlt, in 1 ml LB-Medium aufgenommen und für 1 h bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Die Zellen wurden für 5 min bei 8000 rpm abzentrifugiert, in ca. 150 µl LB-Medium resuspendiert und auf LB-Agarplatten mit Ampicillin ausplattiert. Die Platten wurden dann über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Die (Re-)transformation von Zellen mit Plasmid-DNA wurde mit wenigen Ausnahmen wie oben beschrieben durchgeführt. Die kompetenten *E. coli* Zellen wurden mit 0,5 µl Plasmid-DNA beimpft und nach der Inkubation bei 37 °C wurden 100 µl der Zellen auf LB-Platten mit Ampicillin ausplattiert.

#### 4.7.7. DNA-Sequenzierung

Alle klonierten PCR-Produkte wurden von der Firma SeqLab (Sequence Laboratories Göttingen, Deutschland) mittels Kettenabbruch-Methode nach Sanger [112] sequenziert. Es wurden ca. 0,6 µl Plasmid und 20 pmol Primer eingesetzt. Die erhaltene Sequenz wurde später per Sequenzvergleich auf Fehlerfreiheit untersucht.

#### 4.7.8. Transformation von *C. albicans* durch Elektroporation

Mittels Elektroporation wurden kompetente *C. albicans*-Stämme mit DNA-Fragmenten transformiert. Für die Selektion positiver Transformanten wurde zusammen mit dem gewünschten Gen das Nourseothricin-Resistenzgen (*caSAT1*-Marker) ins Genom des zu transformierenden Stammes integriert, so daß in Gegenwart von Nourseothricin positive Transformanten von den sensitiven Ausgangsstämmen selektioniert werden konnten.

Für die Herstellung kompetenter *C. albicans* Zellen wurden 0,5 µl einer *C. albicans* Übernachtskultur in 50 ml frisches YPD-Medium überimpft und über Nacht inkubiert. Die Zellen wurden für 5 min bei 4000 rpm und 4 °C abzentrifugiert und das Pellet in 8 ml kaltem H<sub>2</sub>O, 1 ml 10x TE) und 1 ml 1M Lithiumacetat (pH7,5) aufgenommen. Nach 60-minütiger Inkubation bei leichtem Schütteln bei 30 °C wurden 250 µl 1M DTT zu den Zellen gegeben und die Suspension für weitere 30 min im Schüttler bei 30 °C inkubiert. Zusammen mit 40 ml kaltem sterilen H<sub>2</sub>O wurden die Zellen wieder abzentrifugiert, darauf in 20 ml kaltem H<sub>2</sub>O und anschließend in 5 ml kaltem 1M Sorbitol gewaschen. Das Pellet wurde dann in 100 µl 1M Sorbitol aufgenommen. Für die Transformation der kompetenten *C. albicans* Zellen mittels Elektroporation [57] wurden 40 µl der Zellsuspension mit 5 µl der linearen gelaufgereinigten DNA in einer vorgekühlten Elektroporationsküvette (0,2cm Durchmesser, Peqlab) vermischt und in einem Elektroporationsgerät einer Stromstärke von 1,8 kV ausgesetzt.

Nach der Transformation wurden die Zellen in 1 ml YPD-Medium überführt, 4 h bei 30 °C im Schüttler inkubiert und anschließend auf YPD-Agarplatten mit 200 µg/ml Nourseothricin ausplattiert. Nach 48 h Inkubation bei 30 °C konnten die Nourseothricin-resistenten Kolonien gepickt und erneut auf Selektionsplatten ausplattiert werden.

Zur Deletion der *SAT1*-Flipper-Kassette wurden korrekte Transformanten über Nacht in YPM-Medium inkubiert und anschließend auf YPD-Agarplatten mit 10 µg/ml Nourseothricin ausplattiert, auf denen resistente und sensitive Klone anhand ihrer Koloniegröße unterschieden werden können.

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

Für die Isolierung chromosomaler DNA aus *C. albicans* wurden je nach Bedarf zwei unterschiedliche Protokolle angewendet. Die enzymatische Aufschlussmethode war gegenüber der mechanischen Aufschlussmethode besonders bei einer hohen Anzahl von Proben wesentlich zeitaufwendiger, lieferte jedoch eine qualitativ und quantitativ bessere Ausbeute an DNA. Bei beiden Methoden wurde zunächst eine 10 ml YPD-Übernachtskultur angesetzt. Bei der Anzucht Nourseothricin-resistenter Stämme mit integrierter *SAT1*-Flipper-Kassette wurden zusätzlich 200 µg/ml Nourseothricin zugegeben, um ein vorzeitiges Ausschneiden des Markers zu vermeiden. Die Kulturen wurden für 5 min bei 4000 rpm abzentrifugiert.

Bei der enzymatischen Aufschlussmethode wurden die Zellen in 1 ml 1 M Sorbitol resuspendiert, in 2 ml Eppendorf Caps überführt und 2 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Zum Aufschließen der Zellen wurde das Pellet in 1 ml Lyticase-Puffer resuspendiert und für 45 min bei 37 °C inkubiert. Nach 5 min bei 13000 rpm wurde das Pellet zum Abbau der Proteine und Freisetzen der DNA in 0,8 ml Proteinase-Puffer resuspendiert und für 30 min bei 60 °C inkubiert. Die

DNA-Extraktion erfolgte durch 4 min Schütteln mit 0,8 ml PCI und anschließendem Abzentrifugieren. Aus 700 µl der oberen wässrigen Phase wurde die DNA mit 700 µl Isopropanol gefällt, abzentrifugiert, mit 600 µl kaltem 70 % Ethanol gewaschen und an der Luft getrocknet. Das DNA-Pellet wurde in 100 µl bidest. H<sub>2</sub>O mit gelöst und nach Zugabe von 2 U/ml RNase A für 30 min bei 37 °C inkubiert.

Für die Isolierung chromosomaler DNA mit mechanischem Zellaufschluss wurde das Zellpellet in 1 ml H<sub>2</sub>O gewaschen, kurz zentrifugiert und in 200 µl Breaking Buffer resuspendiert. Zusammen mit ca. 200 µl Glassbeads und 200 µl PCI wurde der Ansatz für 5 min stark geschüttelt und nach Zugabe von 200 µl 1x TE kurz gevortext. Nach Zentrifugation für 5 min bei 13000 rpm wurde die DNA aus dem Überstand mit 100 % Ethanol gefällt, abzentrifugiert und mit 70 % Ethanol gewaschen. Die DNA wurde auf einem Heizblock bei 50 °C getrocknet und in 50 µl H<sub>2</sub>O mit 2 U/ml RNase A bei 50 °C unter Schütteln gelöst.

#### 4.7.10. Southern Hybridisierung

Mittels Southern Hybridisierung werden die auf einem Agarosegel aufgetrennten DNA-Fragmente auf eine Nylonmembran übertragen [127], um dort anschließend mit markierten DNA-Sonden detektiert werden zu können. Dazu wurden in einem 30 µl Ansatz 10 µg chromosomale *C. albicans*-DNA mit geeigneten Restriktionsenzymen und Puffern über Nacht bei 37 °C gespalten und die DNA-Fragmente dann auf einem 1 % Agarosegel über Nacht bei 38 V in 1x TAE-Elektrophoresepuffer aufgetrennt. Zusätzlich wurde ein 1kb DNA-Größenmarker (Invitrogen) mit aufgetragen, um später die Größen der hybridisierten Fragmente zu bestimmen. Zur Kontrolle der korrekten Auftrennung wurde das Gel mit Ethidiumbromid angefärbt und unter UV-Licht betrachtet. Mit Hilfe eines Vakkumblotters wurden die DNA-Banden auf eine Nylonmembran (0,45 µm Porenweite/Nytran SuPerCharge (SPC)/Schleicher und Schuell oder Whatman) übertragen. Dazu wurde die Membran kurz in Wasser und für 5 min in 20xSSC geschwenkt, das Gel auf die Membran gelegt und unter Unterdruck vor dem eigentlichen Transfer jeweils 15 min mit drei verschiedenen Lösungen behandelt. Lösung A (250 mM HCl) diente zur Depurinierung und Lösung B (1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH) zur Denaturierung der DNA, mit Lösung C (1,5 M NaCl, 0,5 M Tris-Cl pH7,5) wurde neutralisiert. Der eigentliche Transfer der DNA auf die Membran erfolgte durch die Beschichtung des Gels mit 20xSSC und Anlegen des Vakuums für 90 min. Die Membran wurde anschließend zur Neutralisierung jeweils 30 sek in 0,4 N NaOH bzw. 0,2 M Tris-Cl geschwenkt und die DNA mit einem UV-Crosslinker auf der Membran fixiert.

Die Hybridisierung der Membran erfolgte nach Herstellerangaben mit dem ECL Direct Nucleic Acid Labeling and Detection System der Firma Amersham. Die Membran wurde für 1-2 h bei



42 °C im Hybridisierungssofen in ECL Goldbuffer vorhybridisiert, während die 0,3-0,6 kb lange Sonde (ca. 100 ng) mit Peroxidase gekoppelt. Die Sonde wurde zum Hybridisierungspuffer auf die Membran gegeben und die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 42 °C. Am nächsten Tag wurde die Membran bei 42 °C 1x 20 min und 2x 10 min mit Harnstoffpuffer sowie bei Raumtemperatur 2x 5 min mit 2xSSC gewaschen. Für die Detektion wurde die Membran für 1 min in einem Gemisch aus Detektionslösung 1 und 2 inkubiert, der ECL-Film (Hyperfilm, Amersham) je nach Signalstärke für 8-90 min exponiert und mit einem Tischentwickler entwickelt. Wenn die Membran zusammen mit der Detektionslösung in Frischhaltefolie aufbewahrt wird, klingt das Signal nach ca. 2 Tagen ab und man kann nach kurzem Waschen in 5xSSC die Membran erneut mit einer weiteren Sonde hybridisieren.

#### 4.7.11. Proteinisolierung aus *C. albicans*

Für die Isolierung von Proteinen aus *C. albicans* Zellen wurden 250 µl einer Übernachtskultur in 50 ml frisches YPD-Medium überimpft und ca. 3,5 h bis zu einer  $OD_{600} = 0,5-1$  bei 30 °C inkubiert. Die Zellen wurden für 5 min bei 4000 rpm abzentrifugiert und das Pellet entweder bei -80 °C aufbewahrt oder gleich im Anschluss weiterverarbeitet. Alle folgenden Schritte wurden auf Eis bzw. bei 4 °C durchgeführt. Das Zellpellet wurde 2x in 1 ml H<sub>2</sub>O gewaschen und anschließend in 300 µl B<sup>+</sup>-Puffer aufgenommen. Mit ca. 200 µl Glassbeads wurden die Zellen für 6 min unter starkem Schütteln zerstört und daraufhin für 5 min bei 13000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand mit den Proteinen wurde in ein neues Cap überführt, die Proteinkonzentration mittels NanoDrop bestimmt und das Isolat bei -20 °C aufgehoben.

#### 4.7.12. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Um die Expression der HA-gekoppelten Gene in *C. albicans* nachzuweisen, wurde das gesamte Zellextrakt aufgereinigt (siehe 4.7.11), ca. 100-200 µg Protein mit 3x Lämmli-Probenpuffer versetzt, für 5 min bei 100 °C inkubiert und zusammen mit 5 µl eines Protein Größenmarkers (Fermentas) auf einem 12 % SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Das Trenngel setzt sich aus 1,25 ml 4x Lower Tris, 2 ml 30 % Acrylamid-/Bisacrylamidlösung (37,5:1), 50 µl 50 % APS und 5 µl Temed und das Sammelgel aus 0,13 ml 4x Upper Tris, 0,17 ml 30 % Acrylamid-/Bisacrylamidlösung, 10 µl 10 % APS und 1 µl Temed zusammen. Für eine gerade Trennlinie zwischen Trenn- und Sammelgel wurde das Trenngel nach dem gießen für einige Minuten mit Isopropanol bedeckt. Die Auftrennung der Proteine im Gel erfolgte für ca. 1 h bei 25 mA in 1x Laufpuffer. Das Proteinbanden konnten anschließend mit Coomassie Blue sichtbar gemacht oder das gesamte Gel für einen Western Blot verwendet werden, um spezifische Proteinbanden

mit einem Antikörper zu detektieren (siehe 4.7.13).

#### 4.7.13. Nachweis von Proteinen mittels Coomassie-Färbung und Western Blot

Um Proteinbanden auf einem SDS-Polyacrylamidgel nachzuweisen wurde das Gel für 1-2 h in einer Coomassie Blue Färbelösung unter leichtem Schwenken inkubiert und später der Hintergrund mit Entfärber (40 % Methanol, 10 % Essigsäure) entfärbt.

Um Proteine, die mit einem HA-Tag gekoppelt sind, später mit einem spezifischen Antikörper zu detektieren, wurde ein Western Blot durchgeführt. Die Proteinbanden wurden mittels eines Semi-Dry Blotters für 1 h bei 350 mA in 1x Transferpuffer auf eine Nitrocellulosemembran (0,2 µm Porenweite/Schleicher und Schuell) übertragen. Nach dem Blockieren der Membran mit 1x PBS/5 % Magermilchpulver für 1 h bei Raumtemperatur oder bei über Nacht bei 4 °C wurde die Membran für 1 h bei Raumtemperatur oder bei über Nacht bei 4 °C mit 50mU/ml anti-HA-Peroxidase Antikörper (3F10, Roche) in 4 ml 1x PBS/5 % Magermilchpulver inkubiert. Nach 4x 10 min Waschen mit 1x PBST (1x PBS, 0,1 % Tween-20) wurden die Banden wie unter 4.7.10 beschrieben detektiert werden. Die Exposition des Filmes war mit 10-60 sec jedoch deutlich kürzer.

#### 4.7.14. Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration von antimykotischen Substanzen (MHK-Test)

Um *C. albicans* Zellen auf ihre Empfindlichkeit gegenüber antimykotischen Substanzen zu testen, wurde die minimale Hemmkonzentration unterschiedlicher Medikamente getestet, wozu diese in folgenden Stocklösungen verwendet wurden: Fluconazol (5 mg/ml) gelöst in H<sub>2</sub>O und Brefeldin A (5 mg/ml) bzw. Cerulenin (5 mg/ml) gelöst in DMSO. Von der jeweiligen Substanz wurden serielle Zweifachverdünnungen in high-resolution Medium (HR-Medium) hergestellt, wobei die Anfangskonzentration von Fluconazol und Brefeldin A 200 µg/ml und von Cerulenin 50 µg/ml betrug. Eine *C. albicans* Kolonie wurde in 2 ml 0,9 % NaCl-Lösung resuspendiert und die Zellen in HR-Medium bis zu einer Endkonzentration von ca. 100 Zellen pro ml verdünnt. Der MHK-Test wurde wie von Ruhnke *et al.* [107] beschrieben durchgeführt. In 96-well Platten wurden je 100 µl von zwölf Verdünnungsschritten des Antimykotikums vorgelegt und mit 100 µl der Zellsuspension vermischt. Nach 24 h bzw. 48 h Inkubation der Platten bei 37 °C wurde die niedrigste Konzentration des Medikamentes, die sichtbares Wachstum der Zellen verhinderte (MHK), durch Ablesen mit bloßem Auge bestimmt. Minimales Wachstum oder einzelne kleine Spots wurden dabei ignoriert.

#### 4.7.15. Nachweis der *GFP*-Expression mittels Durchflusszytometrie (FACS)

Zur Quantifizierung der Expression des *MDR1*-Promotors enthalten einige *C. albicans*-Stämme eine  $P_{MDR1}$ -*GFP*-Reporterfusion, dessen Aktivierung mittels FACS-Analyse (fluorescence activated cell sorting) gemessen wurde. Dazu wurden die entsprechenden *C. albicans* Übernachtskulturen 1:100 mit frischem YPD-Medium verdünnt und weitere 3 h bei 30 °C unter Schütteln inkubiert. Im Falle einer Induktion der Expression wurden die Stämme nach Zugabe von 50 µg/ml Benomyl bzw. 0,005 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> für eine weitere Stunde inkubiert. Die Zellen wurden darauf 1:10 mit kaltem 1x PBS verdünnt und die Fluoreszenz von 20000 Zellen bei einer Durchflussrate von ca. 500 Zellen pro sec gemessen. Das FACSCalibur ist mit einem Argon-Laser (488 nm) ausgestattet, die Fluoreszenz wurde über den FL1-Kanal mit einem 530 nm Bandpass-Filter gemessen. Die durchschnittliche Fluoreszenz wurde anschließend mit der dazugehörigen Software (CellQuest Pro) ermittelt.

#### 4.7.16. ChIP-on-chip

Um neben des *MDR1*-Promotors weitere Bindestellen von Mrr1 im *C. albicans*-Genom zu identifizieren, wurde eine ChIP-on-chip Analyse durchgeführt. Jeweils drei unabhängige 50 ml Übernachtskulturen eines *C. albicans*-Stammes, der HA-gekoppeltes hyperaktives Mrr1 überexprimiert und eines Kontrollstammes, der ungekoppeltes hyperaktives Mrr1 überexprimiert, wurden bis zu einer OD<sub>600</sub> = 0,005 mit YPD-Medium verdünnt und bei 30 °C unter Schütteln bis zu einer OD<sub>600</sub> = 1 inkubiert. Wie bei Liu *et al.* [66] beschrieben wurden die Kulturen für 30 min bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln mit 1 % Formaldehyd behandelt, um die Proteine an der DNA zu fixieren. Die Reaktion wurde mit 1,2 ml 2,5 M Glycin gestoppt, die Zellen nach dem Abzentrifugieren 3x mit 40 ml eiskaltem TBS gewaschen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Pellets wurden in 0,7 ml Lysispuffer aufgenommen und mit 0,5 ml Glassbeads (Sigma) im BeadBeater 4x5 min bei höchster Stufe homogenisiert. Um DNA-Fragmente mit einer Länge von ca. 300 bp zu bekommen, wurden die Extrakte bei 8-9 W für 4x20 sec mit Ultraschall behandelt. Die Immunopräzipitation der Extrakte wurde über Nacht bei 4 °C mit dem monoklonalen Maus anti-HA-Antikörper durchgeführt, der an magnetische Beads (Dynabeads) gekoppelt war. Die Beads wurden 2x mit Lysispuffer, 2x mit Lysispuffer mit 360 mM NaCl, 2x mit Waschpuffer und 1x mit TE pH8 gewaschen. Durch inkubieren der Beads über Nacht bei 65 °C in 50 µl TE mit 1 % SDS wurden die DNA-Fragmente von den Proteinen gelöst, danach mit Proteinase K und RNase A behandelt, 2x mit PCI extrahiert, mit 100 % Ethanol präzipitiert und in 50 µl TE resuspendiert [66]. Die folgenden Schritte,

Labeling der DNA mit Cy-Farbstoffen, Hybridisierung an DNA-Microarrays und Datenauswertung, wurden wie in Liu *et al.* [66] beschrieben durchgeführt. Für das Labeling wurden 40  $\mu$ l der 50  $\mu$ l immunopräzipitierten DNA-Fragmente, nach Anfügen von „blunt ends“ mittels T4 DNA-Polymerase, an unidirektionale Linker ligiert. Die DNA wurde dann in Anwesenheit von Aminoallyl-modifiziertem dUTP (AA-dUTP) amplifiziert und anschließend mit den Farbstoffen Cy3 bzw. Cy5 gelabelt, die spezifisch mit der Aminoallyl-Gruppe reagieren. Die DNA des HA-gekoppelten Stammes (Cy5) und die eines ungekoppelten Kontrollstammes (Cy3) wurden gemischt und auf einem DNA-Microarray, der das gesamte *C. albicans*-Genom abdeckt, hybridisiert. Die Arrays wurden mit dem GenePix 4000B Scanner (Molecular Devices) gescannt und die Bilder der Cy5 und der Cy3 Fluoreszenzintensität mittels NimbleScan Software (version 2.4, NimbleGen Systems, Inc.) bearbeitet. General feature format (.gff) Dateien für die Signalintensität von Cy5 und Cy3 jedes einzelnen unabhängigen Replikats wurden erstellt und mittels des Programmes Telescope (<http://telescope.gersteinlab.org:8080/mosaic/pipeline.html>) [149] normalisiert (quantile normalization). Folgende Parameter wurden dabei gewählt: window size 400 bp, maximum genomic distance 60 bp, minimum length 120 bp. Die Daten der unabhängigen Scans wurden kombiniert und alle Peaks, die eine Mrr1-Bindung von mindestens zweifacher Intensität aufweisen (pseudomedian signal threshold  $\geq 2$ ,  $P$ -value  $\leq 0.01$ ) extrahiert. Die Daten wurden in die *Candida albicans* Montreal Database (<https://www.candida-montreal.ca>) des Institute for Research in Immunology and Cancer der Universität Montreal importiert und die von Mrr1 gebundenen Genabschnitte analysiert.

# A. Literaturverzeichnis

- [1] Alarco, A. M., Balan, I., Talibi, D., Mainville, N. and Raymond, M. (1997). AP1-mediated multidrug resistance in *Saccharomyces cerevisiae* requires FLR1 encoding a transporter of the major facilitator superfamily. *J. Biol. Chem.* **272**, 19304–19313.
- [2] Alarco, A. M. and Raymond, M. (1999). The bZip transcription factor Cap1p is involved in multidrug resistance and oxidative stress response in *Candida albicans*. *J. Bacteriol.* **181**, 700–708.
- [3] Askew, C., Sellam, A., Epp, E., Mallick, J., Hogues, H., Mullick, A., Nantel, A. and Whiteway, M. (2011). The zinc cluster transcription factor Ahr1p directs Mcm1p regulation of *Candida albicans* adhesion. *Mol. Microbiol.* **79**, 940–953.
- [4] Baillie, G. S. and Douglas, L. J. (2000). Matrix polymers of *Candida* biofilms and their possible role in biofilm resistance to antifungal agents. *J. Antimicrob. Chemother.* **46**, 397–403.
- [5] Balan, I., Alarco, A. M. and Raymond, M. (1997). The *Candida albicans* CDR3 gene codes for an opaque-phase ABC transporter. *J. Bacteriol.* **179**, 7210–7218.
- [6] Berg, F. T. (1846). *Om Torsk hos Barn*. Stockholm: L. J. Hjerta .
- [7] Berkhout, M. (1923). *De Schimmelgeschlachten Monilia, Oidium, Oospora en Toruta*. Dissertation, Utrecht , 71 pages.
- [8] Berman, J. and Sudbery, P. E. (2002). *Candida Albicans*: a molecular revolution built on lessons from budding yeast. *Nat. Rev. Genet.* **3**, 918–930.
- [9] Birnboim, H. C. and Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**, 1513–1523.
- [10] Brakhage, A. A. (2005). Systemic fungal infections caused by *Aspergillus* species: epidemiology, infection process and virulence determinants. *Curr Drug Targets* **6**, 875–886.
- [11] Braun, B. R., van Het Hoog, M., d'Enfert, C., Martchenko, M., Dungan, J., Kuo, A., Inglis, D. O., Uhl, M. A., Hogues, H., Berriman, M., Lorenz, M., Levitin, A., Oberholzer, U., Bachewich, C., Harcus, D., Marcil, A., Dignard, D., Iouk, T., Zito, R., Frangeul, L., Tekaia, F., Rutherford, K., Wang, E., Munro, C. A., Bates, S., Gow, N. A., Hoyer, L. L., Köhler, G., Morschhäuser, J., Newport, G., Znaidi, S., Raymond, M., Turcotte, B., Sherlock, G., Costanzo, M., Ihmels, J., Berman, J., Sanglard, D., Agabian, N., Mitchell, A. P., Johnson, A. D., Whiteway, M. and Nantel, A. (2005). A human-curated annotation of the *Candida albicans* genome. *PLoS Genet.* **1**, 36–57.

- [12] Brock, M. (2009). Fungal metabolism in host niches. *Curr. Opin. Microbiol.* **12**, 371–376.
- [13] Cahuzac, B., Cerdan, R., Felenbok, B. and Guittet, E. (2001). The solution structure of an AlcR-DNA complex sheds light onto the unique tight and monomeric DNA binding of a Zn(2)Cys(6) protein. *Structure* **9**, 827–836.
- [14] Calabrese, D., Bille, J. and Sanglard, D. (2000). A novel multidrug efflux transporter gene of the major facilitator superfamily from *Candida albicans* (FLU1) conferring resistance to fluconazole. *Microbiology (Reading, Engl.)* **146 ( Pt 11)**, 2743–2754.
- [15] Cannon, R. D., Lamping, E., Holmes, A. R., Niimi, K., Baret, P. V., Keniya, M. V., Tanabe, K., Niimi, M., Goffeau, A. and Monk, B. C. (2009). Efflux-mediated antifungal drug resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* **22**, 291–321.
- [16] Carlson, J. M., Chakravarty, A., DeZiel, C. E. and Gross, R. H. (2007). SCOPE: a web server for practical de novo motif discovery. *Nucleic Acids Res.* **35**, W259–264.
- [17] Carroll, J. S. and Brown, M. (2006). Estrogen receptor target gene: an evolving concept. *Mol. Endocrinol.* **20**, 1707–1714.
- [18] Chapman, R. L. (2003). *Candida* infections in the neonate. *Curr. Opin. Pediatr.* **15**, 97–102.
- [19] Coste, A., Selmecki, A., Forche, A., Diogo, D., Bougnoux, M. E., d'Enfert, C., Berman, J. and Sanglard, D. (2007). Genotypic evolution of azole resistance mechanisms in sequential *Candida albicans* isolates. *Eukaryotic Cell* **6**, 1889–1904.
- [20] Coste, A., Turner, V., Ischer, F., Morschhäuser, J., Forche, A., Selmecki, A., Berman, J., Bille, J. and Sanglard, D. (2006). A mutation in Tac1p, a transcription factor regulating CDR1 and CDR2, is coupled with loss of heterozygosity at chromosome 5 to mediate antifungal resistance in *Candida albicans*. *Genetics* **172**, 2139–2156.
- [21] Coste, A. T., Karababa, M., Ischer, F., Bille, J. and Sanglard, D. (2004). TAC1, transcriptional activator of CDR genes, is a new transcription factor involved in the regulation of *Candida albicans* ABC transporters CDR1 and CDR2. *Eukaryotic Cell* **3**, 1639–1652.
- [22] Cowen, L. E., Nantel, A., Whiteway, M. S., Thomas, D. Y., Tessier, D. C., Kohn, L. M. and Anderson, J. B. (2002). Population genomics of drug resistance in *Candida albicans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**, 9284–9289.
- [23] De Backer, M. D., Magee, P. T. and Pla, J. (2000). Recent developments in molecular genetics of *Candida albicans*. *Annu. Rev. Microbiol.* **54**, 463–498.
- [24] de Micheli, M., Bille, J., Schueller, C. and Sanglard, D. (2002). A common drug-responsive element mediates the upregulation of the *Candida albicans* ABC transporters CDR1 and CDR2, two genes involved in antifungal drug resistance. *Mol. Microbiol.* **43**, 1197–1214.

- [25] de Repentigny, L., Lewandowski, D. and Jolicoeur, P. (2004). Immunopathogenesis of oropharyngeal candidiasis in human immunodeficiency virus infection. *Clin. Microbiol. Rev.* **17**, 729–759.
- [26] Del Sorbo, G., Schoonbeek, H. and De Waard, M. A. (2000). Fungal transporters involved in efflux of natural toxic compounds and fungicides. *Fungal Genet. Biol.* **30**, 1–15.
- [27] Du, W., Coaker, M., Sobel, J. D. and Akins, R. A. (2004). Shuttle vectors for *Candida albicans*: control of plasmid copy number and elevated expression of cloned genes. *Curr. Genet.* **45**, 390–398.
- [28] Dunkel, N., Blass, J., Rogers, P. D. and Morschhäuser, J. (2008a). Mutations in the multi-drug resistance regulator MRR1, followed by loss of heterozygosity, are the main cause of MDR1 overexpression in fluconazole-resistant *Candida albicans* strains. *Mol. Microbiol.* **69**, 827–840.
- [29] Dunkel, N., Liu, T. T., Barker, K. S., Homayouni, R., Morschhäuser, J. and Rogers, P. D. (2008b). A gain-of-function mutation in the transcription factor Upc2p causes upregulation of ergosterol biosynthesis genes and increased fluconazole resistance in a clinical *Candida albicans* isolate. *Eukaryotic Cell* **7**, 1180–1190.
- [30] Edlind, T. D. (2007). Emergence and evolution of antifungal resistance. In: *Evolutionary Biology of Bacterial and Fungal Pathogens* (eds., F. Baquero, C. Nombela, G.H. Cassell, and J.A. Gutierrez). ASM Press, Washington, DC. , pp.297–306.
- [31] Ernst, J. F. (2000). Transcription factors in *Candida albicans* - environmental control of morphogenesis. *Microbiology (Reading, Engl.)* **146 ( Pt 8)**, 1763–1774.
- [32] Ferrari, S., Ischer, F., Calabrese, D., Posteraro, B., Sanguinetti, M., Fadda, G., Rohde, B., Bauser, C., Bader, O. and Sanglard, D. (2009). Gain of function mutations in CgPDR1 of *Candida glabrata* not only mediate antifungal resistance but also enhance virulence. *PLoS Pathog.* **5**, e1000268.
- [33] Fling, M. E., Kopf, J., Tamarkin, A., Gorman, J. A., Smith, H. A. and Koltin, Y. (1991). Analysis of a *Candida albicans* gene that encodes a novel mechanism for resistance to benomyl and methotrexate. *Mol. Gen. Genet.* **227**, 318–329.
- [34] Fonzi, W. A. and Irwin, M. Y. (1993). Isogenic strain construction and gene mapping in *Candida albicans*. *Genetics* **134**, 717–728.
- [35] Franz, R., Michel, S. and Morschhäuser, J. (1998). A fourth gene from the *Candida albicans* CDR family of ABC transporters. *Gene* **220**, 91–98.
- [36] Friden, P., Reynolds, C. and Schimmel, P. (1989). A large internal deletion converts yeast LEU3 to a constitutive transcriptional activator. *Mol. Cell. Biol.* **9**, 4056–4060.
- [37] Gillum, A. M., Tsay, E. Y. and Kirsch, D. R. (1984). Isolation of the *Candida albicans* gene for orotidine-5'-phosphate decarboxylase by complementation of *S. cerevisiae* *ura3* and *E. coli* *pyrF* mutations. *Mol. Gen. Genet.* **198**, 179–182.

- [38] Goldway, M., Teff, D., Schmidt, R., Oppenheim, A. B. and Koltin, Y. (1995). Multidrug resistance in *Candida albicans*: disruption of the BENr gene. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**, 422–426.
- [39] Gutiérrez, J., Morales, P., González, M. A. and Quindós, G. (2002). *Candida dubliniensis*, a new fungal pathogen. *J. Basic Microbiol.* **42**, 207–227.
- [40] Harry, J. B., Oliver, B. G., Song, J. L., Silver, P. M., Little, J. T., Choiniere, J. and White, T. C. (2005). Drug-induced regulation of the MDR1 promoter in *Candida albicans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**, 2785–2792.
- [41] Heilmann, C. J., Schneider, S., Barker, K. S., Rogers, P. D. and Morschhäuser, J. (2010). An A643T mutation in the transcription factor Upc2p causes constitutive ERG11 upregulation and increased fluconazole resistance in *Candida albicans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**, 353–359.
- [42] Hibbett, D. S., Binder, M., Bischoff, J. F., Blackwell, M., Cannon, P. F., Eriksson, O. E., Huhndorf, S., James, T., Kirk, P. M., Lücking, R., Thorsten Lumbsch, H., Lutzoni, F., Matheny, P. B., McLaughlin, D. J., Powell, M. J., Redhead, S., Schoch, C. L., Spatafora, J. W., Stalpers, J. A., Vilgalys, R., Aime, M. C., Aptroot, A., Bauer, R., Begerow, D., Benny, G. L., Castlebury, L. A., Crous, P. W., Dai, Y. C., Gams, W., Geiser, D. M., Griffith, G. W., Gueidan, C., Hawksworth, D. L., Hestmark, G., Hosaka, K., Humber, R. A., Hyde, K. D., Ironside, J. E., Koljalg, U., Kurtzman, C. P., Larsson, K. H., Lichtwardt, R., Longcore, J., Miadlikowska, J., Miller, A., Moncalvo, J. M., Mozley-Standridge, S., Oberwinkler, F., Parmasto, E., Reeb, V., Rogers, J. D., Roux, C., Ryvarden, L., Sampaio, J. P., Schussler, A., Sugiyama, J., Thorn, R. G., Tibell, L., Untereiner, W. A., Walker, C., Wang, Z., Weir, A., Weiss, M., White, M. M., Winka, K., Yao, Y. J. and Zhang, N. (2007). A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycol. Res.* **111**, 509–547.
- [43] Hiller, D., Sanglard, D. and Morschhäuser, J. (2006a). Overexpression of the MDR1 gene is sufficient to confer increased resistance to toxic compounds in *Candida albicans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**, 1365–1371.
- [44] Hiller, D., Stahl, S. and Morschhäuser, J. (2006b). Multiple cis-acting sequences mediate upregulation of the MDR1 efflux pump in a fluconazole-resistant clinical *Candida albicans* isolate. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**, 2300–2308.
- [45] Holzheimer, R. G. and Dralle, H. (2002). Management of mycoses in surgical patients – review of the literature. *Eur. J. Med. Res.* **7**, 200–226.
- [46] Hoot, S. J., Smith, A. R., Brown, R. P. and White, T. C. (2011). An A643V amino acid substitution in Upc2p contributes to azole resistance in well-characterized clinical isolates of *Candida albicans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **55**, 940–942.
- [47] Hope, W. W., Taberner, L., Denning, D. W. and Anderson, M. J. (2004). Molecular mechanisms of primary resistance to flucytosine in *Candida albicans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**, 4377–4386.



- [48] Hoyer, L. L. (2001). The ALS gene family of *Candida albicans*. *Trends Microbiol.* **9**, 176–180.
- [49] Jackson, A. P., Gamble, J. A., Yeomans, T., Moran, G. P., Saunders, D., Harris, D., Aslett, M., Barrell, J. F., Butler, G., Citiulo, F., Coleman, D. C., de Groot, P. W., Goodwin, T. J., Quail, M. A., McQuillan, J., Munro, C. A., Pain, A., Poulter, R. T., Rajandream, M. A., Renauld, H., Spiering, M. J., Tivey, A., Gow, N. A., Barrell, B., Sullivan, D. J. and Berriman, M. (2009). Comparative genomics of the fungal pathogens *Candida dubliniensis* and *Candida albicans*. *Genome Res.* **19**, 2231–2244.
- [50] James, T. Y., Kauff, F., Schoch, C. L., Matheny, P. B., Hofstetter, V., Cox, C. J., Celio, G., Gueidan, C., Fraker, E., Miadlikowska, J., Lumbsch, H. T., Rauhut, A., Reeb, V., Arnold, A. E., Amtoft, A., Stajich, J. E., Hosaka, K., Sung, G. H., Johnson, D., O'Rourke, B., Crockett, M., Binder, M., Curtis, J. M., Slot, J. C., Wang, Z., Wilson, A. W., Schussler, A., Longcore, J. E., O'Donnell, K., Mozley-Standridge, S., Porter, D., Letcher, P. M., Powell, M. J., Taylor, J. W., White, M. M., Griffith, G. W., Davies, D. R., Humber, R. A., Morton, J. B., Sugiyama, J., Rossmann, A. Y., Rogers, J. D., Pfister, D. H., Hewitt, D., Hansen, K., Hambleton, S., Shoemaker, R. A., Kohlmeyer, J., Volkmann-Kohlmeyer, B., Spotts, R. A., Serdani, M., Crous, P. W., Hughes, K. W., Matsuura, K., Langer, E., Langer, G., Untereiner, W. A., Lucking, R., Budel, B., Geiser, D. M., Aptroot, A., Diederich, P., Schmitt, I., Schultz, M., Yahr, R., Hibbett, D. S., Lutzoni, F., McLaughlin, D. J., Spatafora, J. W. and Vilgalys, R. (2006). Reconstructing the early evolution of Fungi using a six-gene phylogeny. *Nature* **443**, 818–822.
- [51] Jia, X. M., Ma, Z. P., Jia, Y., Gao, P. H., Zhang, J. D., Wang, Y., Xu, Y. G., Wang, L., Cao, Y. Y., Cao, Y. B., Zhang, L. X. and Jiang, Y. Y. (2008). RTA2, a novel gene involved in azole resistance in *Candida albicans*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **373**, 631–636.
- [52] Karkowska-Kuleta, J., Rapala-Kozik, M. and Kozik, A. (2009). Fungi pathogenic to humans: molecular bases of virulence of *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus fumigatus*. *Acta Biochim. Pol.* **56**, 211–224.
- [53] Kelly, S. L., Lamb, D. C., Corran, A. J., Baldwin, B. C. and Kelly, D. E. (1995). Mode of action and resistance to azole antifungals associated with the formation of 14 alpha-methylergosta-8,24(28)-dien-3 beta,6 alpha-diol. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **207**, 910–915.
- [54] Kelly, S. L., Lamb, D. C. and Kelly, D. E. (1999a). Y132H substitution in *Candida albicans* sterol 14alpha-demethylase confers fluconazole resistance by preventing binding to haem. *FEMS Microbiol. Lett.* **180**, 171–175.
- [55] Kelly, S. L., Lamb, D. C., Loeffler, J., Einsele, H. and Kelly, D. E. (1999b). The G464S amino acid substitution in *Candida albicans* sterol 14alpha-demethylase causes fluconazole resistance in the clinic through reduced affinity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **262**, 174–179.

- [56] Kerkering, T. M., Duma, R. J. and Shadomy, S. (1981). The evolution of pulmonary cryptococcosis: clinical implications from a study of 41 patients with and without compromising host factors. *Ann. Intern. Med.* **94**, 611–616.
- [57] Köhler, G. A., White, T. C. and Agabian, N. (1997). Overexpression of a cloned IMP dehydrogenase gene of *Candida albicans* confers resistance to the specific inhibitor mycophenolic acid. *J. Bacteriol.* **179**, 2331–2338.
- [58] Krcmery, V. and Barnes, A. J. (2002). Non-*albicans* *Candida* spp. causing fungaemia: pathogenicity and antifungal resistance. *J. Hosp. Infect.* **50**, 243–260.
- [59] Kumamoto, C. A. and Vences, M. D. (2005). Contributions of hyphae and hypha-co-regulated genes to *Candida albicans* virulence. *Cell. Microbiol.* **7**, 1546–1554.
- [60] Kurzai, O., Heinz, W. J., Sullivan, D. J., Coleman, D. C., Frosch, M. and Mühlischlegel, F. A. (1999). Rapid PCR test for discriminating between *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* isolates using primers derived from the pH-regulated PHR1 and PHR2 genes of *C. albicans*. *J. Clin. Microbiol.* **37**, 1587–1590.
- [61] Lamb, D. C., Kelly, D. E., White, T. C. and Kelly, S. L. (2000). The R467K amino acid substitution in *Candida albicans* sterol 14 $\alpha$ -demethylase causes drug resistance through reduced affinity. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**, 63–67.
- [62] Lass-Flörl, C. (2009). The changing face of epidemiology of invasive fungal disease in Europe. *Mycoses* **52**, 197–205.
- [63] Lavoie, H., Sellam, A., Askew, C., Nantel, A. and Whiteway, M. (2008). A toolbox for epitope-tagging and genome-wide location analysis in *Candida albicans*. *BMC Genomics* **9**, 578.
- [64] Li, S. S. and Mody, C. H. (2010). *Cryptococcus*. *Proc Am Thorac Soc* **7**, 186–196.
- [65] Liu, T. T., Lee, R. E., Barker, K. S., Lee, R. E., Wei, L., Homayouni, R. and Rogers, P. D. (2005). Genome-wide expression profiling of the response to azole, polyene, echinocandin, and pyrimidine antifungal agents in *Candida albicans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**, 2226–2236.
- [66] Liu, T. T., Znaidi, S., Barker, K. S., Xu, L., Homayouni, R., Saidane, S., Morschhäuser, J., Nantel, A., Raymond, M. and Rogers, P. D. (2007). Genome-wide expression and location analyses of the *Candida albicans* Tac1p regulon. *Eukaryotic Cell* **6**, 2122–2138.
- [67] Lorenz, M. C. (2007). Studying Fungal Virulence by Using Genomics. In: *Evolutionary Biology of Bacterial and Fungal Pathogens* (eds., F. Baquero, C. Nombela, G.H. Cassell, and J.A. Gutierrez). ASM Press, Washington, DC. , pp.591–609.
- [68] Lucau-Danila, A., Lelandais, G., Kozovska, Z., Tanty, V., Delaveau, T., Devaux, F. and Jacq, C. (2005). Early expression of yeast genes affected by chemical stress. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 1860–1868.

- [69] Lupetti, A., Danesi, R., Campa, M., Del Tacca, M. and Kelly, S. (2002). Molecular basis of resistance to azole antifungals. *Trends Mol Med* **8**, 76–81.
- [70] MacPherson, S., Akache, B., Weber, S., De Deken, X., Raymond, M. and Turcotte, B. (2005). *Candida albicans* zinc cluster protein Upc2p confers resistance to antifungal drugs and is an activator of ergosterol biosynthetic genes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**, 1745–1752.
- [71] MacPherson, S., Larochelle, M. and Turcotte, B. (2006). A fungal family of transcriptional regulators: the zinc cluster proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **70**, 583–604.
- [72] Marmorstein, R., Carey, M., Ptashne, M. and Harrison, S. C. (1992). DNA recognition by GAL4: structure of a protein-DNA complex. *Nature* **356**, 408–414.
- [73] Masia Canuto, M. and Gutierrez Rodero, F. (2002). Antifungal drug resistance to azoles and polyenes. *Lancet Infect Dis* **2**, 550–563.
- [74] Miyazaki, H., Miyazaki, Y., Geber, A., Parkinson, T., Hitchcock, C., Falconer, D. J., Ward, D. J., Marsden, K. and Bennett, J. E. (1998). Fluconazole resistance associated with drug efflux and increased transcription of a drug transporter gene, PDH1, in *Candida glabrata*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**, 1695–1701.
- [75] Moen, M. D., Lyseng-Williamson, K. A. and Scott, L. J. (2009). Liposomal amphotericin B: a review of its use as empirical therapy in febrile neutropenia and in the treatment of invasive fungal infections. *Drugs* **69**, 361–392.
- [76] Mogavero, S., Tavanti, A., Senesi, S., Rogers, P. D. and Morschhäuser, J. (2011). Differential requirement of the transcription factor Mcm1 for activation of the *Candida albicans* multidrug efflux pump MDR1 by its regulators Mrr1 and Cap1. *Antimicrob. Agents Chemother.* **55**, 2061–2066.
- [77] Moran, G., Sullivan, D., Morschhäuser, J. and Coleman, D. (2002). The *Candida dubliniensis* CdCDR1 gene is not essential for fluconazole resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**, 2829–2841.
- [78] Moran, G. P., Sanglard, D., Donnelly, S. M., Shanley, D. B., Sullivan, D. J. and Coleman, D. C. (1998). Identification and expression of multidrug transporters responsible for fluconazole resistance in *Candida dubliniensis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**, 1819–1830.
- [79] Moran, G. P., Sullivan, D. J., Henman, M. C., McCreary, C. E., Harrington, B. J., Shanley, D. B. and Coleman, D. C. (1997). Antifungal drug susceptibilities of oral *Candida dubliniensis* isolates from human immunodeficiency virus (HIV)-infected and non-HIV-infected subjects and generation of stable fluconazole-resistant derivatives in vitro. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**, 617–623.
- [80] Morschhäuser, J. (2002). The genetic basis of fluconazole resistance development in *Candida albicans*. *Biochim. Biophys. Acta* **1587**, 240–248.

- [81] Morschhäuser, J. (2010). Regulation of multidrug resistance in pathogenic fungi. *Fungal Genet. Biol.* **47**, 94–106.
- [82] Morschhäuser, J., Barker, K. S., Liu, T. T., Blaß-Warmuth, J., Homayouni, R. and Rogers, P. D. (2007). The transcription factor Mrr1p controls expression of the MDR1 efflux pump and mediates multidrug resistance in *Candida albicans*. *PLoS Pathog.* **3**, e164.
- [83] Morschhäuser, J., Michel, S. and Staib, P. (1999). Sequential gene disruption in *Candida albicans* by FLP-mediated site-specific recombination. *Mol. Microbiol.* **32**, 547–556.
- [84] Naglik, J. R., Challacombe, S. J. and Hube, B. (2003). *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **67**, 400–428.
- [85] Nakayama, H., Mio, T., Nagahashi, S., Kokado, M., Arisawa, M. and Aoki, Y. (2000). Tetracycline-regulatable system to tightly control gene expression in the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Infect. Immun.* **68**, 6712–6719.
- [86] Nett, J., Lincoln, L., Marchillo, K., Massey, R., Holoyda, K., Hoff, B., VanHandel, M. and Andes, D. (2007). Putative role of beta-1,3 glucans in *Candida albicans* biofilm resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**, 510–520.
- [87] Niewerth, M. and Korting, H. C. (2000). The use of systemic antimycotics in dermatotherapy. *Eur J Dermatol* **10**, 155–160.
- [88] Niimi, M., Niimi, K., Takano, Y., Holmes, A. R., Fischer, F. J., Uehara, Y. and Cannon, R. D. (2004). Regulated overexpression of CDR1 in *Candida albicans* confers multidrug resistance. *J. Antimicrob. Chemother.* **54**, 999–1006.
- [89] Nolte, F. S., Parkinson, T., Falconer, D. J., Dix, S., Williams, J., Gilmore, C., Geller, R. and Wingard, J. R. (1997). Isolation and characterization of fluconazole- and amphotericin B-resistant *Candida albicans* from blood of two patients with leukemia. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**, 196–199.
- [90] Odds, F., Gow, N. A. R. and Brown, A. J. P. (2006). Toward a Molecular Understanding of *Candida albicans* Virulence. In: *Molecular Principles of Fungal Pathogenesis* (eds., J. Heitman, S. G. Filler, J. E. Edwards, Jr., A. P. Mitchell). ASM Press, Washington, DC. , pp.305–319.
- [91] Odds, F. C. (1994). Pathogenesis of *Candida* infections. *J. Am. Acad. Dermatol.* **31**, 2–5.
- [92] Oren, I. and Goldstein, N. (2002). Invasive pulmonary aspergillosis. *Curr Opin Pulm Med* **8**, 195–200.
- [93] Park, Y. N. and Morschhäuser, J. (2005). Tetracycline-inducible gene expression and gene deletion in *Candida albicans*. *Eukaryotic Cell* **4**, 1328–1342.

- [94] Perea, S., Lopez-Ribot, J. L., Wickes, B. L., Kirkpatrick, W. R., Dib, O. P., Bachmann, S. P., Keller, S. M., Martinez, M. and Patterson, T. F. (2002). Molecular mechanisms of fluconazole resistance in *Candida dubliniensis* isolates from human immunodeficiency virus-infected patients with oropharyngeal candidiasis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**, 1695–1703.
- [95] Perlin, D. S. (2007). Resistance to echinocandin-class antifungal drugs. *Drug Resist. Updat.* **10**, 121–130.
- [96] Pfeifer, K., Kim, K. S., Kogan, S. and Guarente, L. (1989). Functional dissection and sequence of yeast HAP1 activator. *Cell* **56**, 291–301.
- [97] Pinjon, E., Moran, G. P., Coleman, D. C. and Sullivan, D. J. (2005). Azole susceptibility and resistance in *Candida dubliniensis*. *Biochem. Soc. Trans.* **33**, 1210–1214.
- [98] Polak, A. and Scholer, H. J. (1975). Mode of action of 5-fluorocytosine and mechanisms of resistance. *Chemotherapy* **21**, 113–130.
- [99] Pontón, J., Rüchel, R., Clemons, K. V., Coleman, D. C., Grillot, R., Guarro, J., Aldebert, D., Ambroise-Thomas, P., Cano, J., Carrillo-Muñoz, A. J., Gené, J., Pinel, C., Stevens, D. A. and Sullivan, D. J. (2000). Emerging pathogens. *Med. Mycol.* **38 Suppl 1**, 225–236.
- [100] Prasad, R., De Wergifosse, P., Goffeau, A. and Balzi, E. (1995). Molecular cloning and characterization of a novel gene of *Candida albicans*, CDR1, conferring multiple resistance to drugs and antifungals. *Curr. Genet.* **27**, 320–329.
- [101] Reuss, O. and Morschhäuser, J. (2006). A family of oligopeptide transporters is required for growth of *Candida albicans* on proteins. *Mol. Microbiol.* **60**, 795–812.
- [102] Reuss, O., Vik, A., Kolter, R. and Morschhäuser, J. (2004). The SAT1 flipper, an optimized tool for gene disruption in *Candida albicans*. *Gene* **341**, 119–127.
- [103] Richardson, M. and Lass-Flörl, C. (2008). Changing epidemiology of systemic fungal infections. *Clin. Microbiol. Infect.* **14 Suppl 4**, 5–24.
- [104] Richardson, M. D. (2005). Changing patterns and trends in systemic fungal infections. *J. Antimicrob. Chemother.* **56 Suppl 1**, i5–i11.
- [105] Riggle, P. J. and Kumamoto, C. A. (2006). Transcriptional regulation of MDR1, encoding a drug efflux determinant, in fluconazole-resistant *Candida albicans* strains through an Mcm1p binding site. *Eukaryotic Cell* **5**, 1957–1968.
- [106] Rognon, B., Kozovska, Z., Coste, A. T., Pardini, G. and Sanglard, D. (2006). Identification of promoter elements responsible for the regulation of MDR1 from *Candida albicans*, a major facilitator transporter involved in azole resistance. *Microbiology (Reading, Engl.)* **152**, 3701–3722.

- [107] Ruhnke, M., Eigler, A., Tennagen, I., Geiseler, B., Engelmann, E. and Trautmann, M. (1994). Emergence of fluconazole-resistant strains of *Candida albicans* in patients with recurrent oropharyngeal candidosis and human immunodeficiency virus infection. *J. Clin. Microbiol.* **32**, 2092–2098.
- [108] Rustad, T. R., Stevens, D. A., Pfaller, M. A. and White, T. C. (2002). Homozygosity at the *Candida albicans* MTL locus associated with azole resistance. *Microbiology (Reading, Engl.)* **148**, 1061–1072.
- [109] Saidane, S., Weber, S., De Deken, X., St-Germain, G. and Raymond, M. (2006). PDR16-mediated azole resistance in *Candida albicans*. *Mol. Microbiol.* **60**, 1546–1562.
- [110] Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. and Erlich, H. A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487–491.
- [111] Sandven, P. (2000). Epidemiology of candidemia. *Rev Iberoam Micol* **17**, 73–81.
- [112] Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **74**, 5463–5467.
- [113] Sanglard, D. (2002). Resistance of human fungal pathogens to antifungal drugs. *Curr. Opin. Microbiol.* **5**, 379–385.
- [114] Sanglard, D., Coste, A. and Ferrari, S. (2009). Antifungal drug resistance mechanisms in fungal pathogens from the perspective of transcriptional gene regulation. *FEMS Yeast Res.* **9**, 1029–1050.
- [115] Sanglard, D., Ischer, F., Calabrese, D., Majcherczyk, P. A. and Bille, J. (1999). The ATP binding cassette transporter gene *CgCDR1* from *Candida glabrata* is involved in the resistance of clinical isolates to azole antifungal agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**, 2753–2765.
- [116] Sanglard, D., Ischer, F., Monod, M. and Bille, J. (1996). Susceptibilities of *Candida albicans* multidrug transporter mutants to various antifungal agents and other metabolic inhibitors. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**, 2300–2305.
- [117] Sanglard, D., Ischer, F., Monod, M. and Bille, J. (1997). Cloning of *Candida albicans* genes conferring resistance to azole antifungal agents: characterization of *CDR2*, a new multidrug ABC transporter gene. *Microbiology (Reading, Engl.)* **143 ( Pt 2)**, 405–416.
- [118] Sasse, C., Schillig, R., Dierolf, F., Weyler, M., Schneider, S., Mogavero, S., Rogers, P. D. and Morschhäuser, J. (2011). The transcription factor *Ndt80* does not contribute to *Mrr1*-, *Tac1*-, and *Upc2*-mediated fluconazole resistance in *Candida albicans*. *PLoS ONE* **6**, e25623.
- [119] Schorling, S. R., Kortinga, H. C., Froschb, M. and Mühlischlegel, F. A. (2000). The role of *Candida dubliniensis* in oral candidiasis in human immunodeficiency virus-infected individuals. *Crit. Rev. Microbiol.* **26**, 59–68.

- [120] Schubert, S., Barker, K. S., Znaidi, S., Schneider, S., Dierolf, F., Dunkel, N., Aid, M., Boucher, G., Rogers, P. D., Raymond, M. and Morschhäuser, J. (2011a). Regulation of efflux pump expression and drug resistance by the transcription factors Mrr1, Upc2, and Cap1 in *Candida albicans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **55**, 2212–2223.
- [121] Schubert, S., Popp, C., Rogers, P. D. and Morschhäuser, J. (2011b). Functional dissection of a *Candida albicans* zinc cluster transcription factor, the multidrug resistance regulator Mrr1. *Eukaryotic Cell* **10**, 1110–1121.
- [122] Sellam, A., Askew, C., Epp, E., Lavoie, H., Whiteway, M. and Nantel, A. (2009). Genome-wide mapping of the coactivator Ada2p yields insight into the functional roles of SAGA/ADA complex in *Candida albicans*. *Mol. Biol. Cell* **20**, 2389–2400.
- [123] Sellam, A., Askew, C., Epp, E., Tebbji, F., Mullick, A., Whiteway, M. and Nantel, A. (2010). Role of transcription factor CaNdt80p in cell separation, hyphal growth, and virulence in *Candida albicans*. *Eukaryotic Cell* **9**, 634–644.
- [124] Silver, P. M., Oliver, B. G. and White, T. C. (2004). Role of *Candida albicans* transcription factor Upc2p in drug resistance and sterol metabolism. *Eukaryotic Cell* **3**, 1391–1397.
- [125] Sobel, J. D. (1985). Epidemiology and pathogenesis of recurrent vulvovaginal candidiasis. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **152**, 924–935.
- [126] Sobel, J. D. (2003). Management of patients with recurrent vulvovaginal candidiasis. *Drugs* **63**, 1059–1066.
- [127] Southern, E. M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**, 503–517.
- [128] Staib, P., Moran, G. P., Sullivan, D. J., Coleman, D. C. and Morschhäuser, J. (2001). Isogenic strain construction and gene targeting in *Candida dubliniensis*. *J. Bacteriol.* **183**, 2859–2865.
- [129] Staib, P. and Morschhäuser, J. (1999). Chlamydospore formation on Staib agar as a species-specific characteristic of *Candida dubliniensis*. *Mycoses* **42**, 521–524.
- [130] Stokes, C., Moran, G. P., Spiering, M. J., Cole, G. T., Coleman, D. C. and Sullivan, D. J. (2007). Lower filamentation rates of *Candida dubliniensis* contribute to its lower virulence in comparison with *Candida albicans*. *Fungal Genet. Biol.* **44**, 920–931.
- [131] Subramanian, S. and Mathai, D. (2005). Clinical manifestations and management of cryptococcal infection. *J Postgrad Med* **51 Suppl 1**, S21–26.
- [132] Sullivan, D. J., Moran, G. P., Pinjon, E., Al-Mosaid, A., Stokes, C., Vaughan, C. and Coleman, D. C. (2004). Comparison of the epidemiology, drug resistance mechanisms, and virulence of *Candida dubliniensis* and *Candida albicans*. *FEMS Yeast Res.* **4**, 369–376.

- [133] Sullivan, D. J., Westerneng, T. J., Haynes, K. A., Bennett, D. E. and 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 (Reading, Engl.)* **141** ( Pt 7), 1507–1521.
- [134] Sundstrom, P. (2002). Adhesion in *Candida* spp. *Cell. Microbiol.* **4**, 461–469.
- [135] Thakur, J. K., Arthanari, H., Yang, F., Pan, S. J., Fan, X., Breger, J., Frueh, D. P., Gulshan, K., Li, D. K., Mylonakis, E., Struhl, K., Moye-Rowley, W. S., Cormack, B. P., Wagner, G. and Näär, A. M. (2008). A nuclear receptor-like pathway regulating multidrug resistance in fungi. *Nature* **452**, 604–609.
- [136] Todd, R. B. and Andrianopoulos, A. (1997). Evolution of a fungal regulatory gene family: the Zn(II)2Cys6 binuclear cluster DNA binding motif. *Fungal Genet. Biol.* **21**, 388–405.
- [137] Torelli, R., Posteraro, B., Ferrari, S., La Sorda, M., Fadda, G., Sanglard, D. and Sanguinetti, M. (2008). The ATP-binding cassette transporter-encoding gene *CgSNQ2* is contributing to the *CgPDR1*-dependent azole resistance of *Candida glabrata*. *Mol. Microbiol.* **68**, 186–201.
- [138] Tsai, H. F., Krol, A. A., Sarti, K. E. and Bennett, J. E. (2006). *Candida glabrata* PDR1, a transcriptional regulator of a pleiotropic drug resistance network, mediates azole resistance in clinical isolates and petite mutants. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**, 1384–1392.
- [139] Tuch, B. B., Galgoczy, D. J., Hernday, A. D., Li, H. and Johnson, A. D. (2008). The evolution of combinatorial gene regulation in fungi. *PLoS Biol.* **6**, e38.
- [140] Vedyappan, G., Rossignol, T. and d'Enfert, C. (2010). Interaction of *Candida albicans* biofilms with antifungals: transcriptional response and binding of antifungals to beta-glucans. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**, 2096–2111.
- [141] Vermitsky, J. P., Earhart, K. D., Smith, W. L., Homayouni, R., Edlind, T. D. and Rogers, P. D. (2006). *Pdr1* regulates multidrug resistance in *Candida glabrata*: gene disruption and genome-wide expression studies. *Mol. Microbiol.* **61**, 704–722.
- [142] Vermitsky, J. P. and Edlind, T. D. (2004). Azole resistance in *Candida glabrata*: coordinate upregulation of multidrug transporters and evidence for a *Pdr1*-like transcription factor. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**, 3773–3781.
- [143] Vilela, M. M., Kamei, K., Sano, A., Tanaka, R., Uno, J., Takahashi, I., Ito, J., Yarita, K. and Miyaji, M. (2002). Pathogenicity and virulence of *Candida dubliniensis*: comparison with *C. albicans*. *Med. Mycol.* **40**, 249–257.
- [144] Whiteway, M. and Bachewich, C. (2006). Signal Transduction in the Interactions of Fungal Pathogens and Mammalian Hosts. In: *Molecular Principles of Fungal Pathogenesis* (eds., J. Heitman, S. G. Filler, J. E. Edwards, Jr., A. P. Mitchell). ASM Press, Washington, DC., pp.143–162.



- [145] Wirsching, S., Michel, S., Kohler, G. and 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.
- [146] Wirsching, S., Michel, S. and 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.
- [147] Wirsching, S., Moran, G. P., Sullivan, D. J., Coleman, D. C. and Morschhäuser, J. (2001). MDR1-mediated drug resistance in *Candida dubliniensis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**, 3416–3421.
- [148] Wray, L. V., Jorgensen, R. A. and Reznikoff, W. S. (1981). Identification of the tetracycline resistance promoter and repressor in transposon Tn10. *J. Bacteriol.* **147**, 297–304.
- [149] Zhang, Z. D., Rozowsky, J., Lam, H. Y., Du, J., Snyder, M. and Gerstein, M. (2007). Telescope: online analysis pipeline for high-density tiling microarray data. *Genome Biol.* **8**, R81.
- [150] Zhu, W. and Filler, S. G. (2010). Interactions of *Candida albicans* with epithelial cells. *Cell. Microbiol.* **12**, 273–282.
- [151] Znaidi, S., Barker, K. S., Weber, S., Alarco, A. M., Liu, T. T., Boucher, G., Rogers, P. D. and Raymond, M. (2009). Identification of the *Candida albicans* Cap1p regulon. *Eukaryotic Cell* **8**, 806–820.
- [152] Znaidi, S., De Deken, X., Weber, S., Rigby, T., Nantel, A. and Raymond, M. (2007). The zinc cluster transcription factor Tac1p regulates PDR16 expression in *Candida albicans*. *Mol. Microbiol.* **66**, 440–452.
- [153] Znaidi, S., Weber, S., Al-Abdin, O. Z., Bomme, P., Saidane, S., Drouin, S., Lemieux, S., De Deken, X., Robert, F. and Raymond, M. (2008). Genomewide location analysis of *Candida albicans* Upc2p, a regulator of sterol metabolism and azole drug resistance. *Eukaryotic Cell* **7**, 836–847.



# B. Anhang

## Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation „Funktionelle Analyse des „Multidrug-Resistance“-Regulators *MRR1* im pathogenen Hefepilz *Candida albicans*“ eigenständig, d.h. insbesondere selbständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Würzburg, Dezember 2011

Sabrina Schubert

## Affidavit

I hereby confirm that my thesis entitled „Functional analysis of the multidrug resistance regulator *MRR1* in the pathogenic yeast *Candida albicans*“ is the result of my own work. I did not receive any help or support from commercial consultants. All source and/or materials applied are listed and specified in the thesis.

Furthermore, I confirm that this thesis has not yet been submitted as a part of another examination process neither in identical nor in similar form.

Würzburg, Dezember 2011

Sabrina Schubert



# Danksagung

Besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Joachim Morschhäuser für die Bereitstellung des interessanten Projektes sowie die Förderung und Unterstützung während meiner Zeit als Doktorandin. Ich bedanke mich für eine spannende Zeit in der Forschung, für die Ermöglichung der Teilnahme an internationalen Konferenzen sowie eines wissenschaftlichen Auslandsaufenthalts in Montreal. Für die gute Betreuung, die vielen Vorschläge und hilfreichen Diskussionen zu meiner Arbeit bin ich sehr dankbar.

Bedanken möchte ich mich bei Prof. Klaus Brehm und Dr. Knut Ohlsen für die Erstellung des Zweit- und des Drittgutachtens sowie für ihr Engagement und ihre Diskussionsbereitschaft während der jährlichen Treffen mit dem gesamten Promotionskomitee. Ich danke auch der Graduate School of Life Sciences für die Organisation des Graduiertenprogrammes und die Möglichkeit der Teilnahme an abwechslungsreichen Workshops.

Ich bedanke mich bei der gesamten AG Morschhäuser für eine spannende und lustige Zeit, in der ich viel gelernt und viel gelacht habe. Julia, Tina und besonders Sabrina danke ich für ihre helfenden Hände. Rebecca, Chrissi, Nico, Michael, Bernardo, Ulrich, Benni und Christoph möchte ich nicht nur für anregende Diskussionen und die tolle Atmosphäre im Labor danken sondern auch für lustige Zeiten außerhalb des Labors.

Für all die unterstützenden Worte und die abwechslungsreichen Gespräche zwischendurch bedanke ich mich bei Roswitha, Chrissi und Anna. Danke, Tina und Rebecca, für die Motivationsbox!

Für die Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe danke ich Prof. Martine Raymond aus Montreal. Durch die exzellente Betreuung von Sadri Znaidi war es mir möglich, *in vivo* Bindestudien durchzuführen, die einen wichtigen Teil meiner Arbeit darstellen. Ich bedanke mich bei Sadri, Sarah und Osman sowie der gesamten Arbeitsgruppe im IRIC Montreal für die Unterstützung im Labor und ein paar tolle Wochen in der wunderbaren Stadt.

Außerdem möchte ich mich bedanken bei Prof. David Rogers und Kathy Barker aus Memphis, die die Erstellung von Transkriptionsprofilen für meine Arbeit übernommen haben.

Ich danke Florian und meinem Bruder Alexander, die mir bei Fragen zum Textsatzprogramm LaTeX immer weiterhelfen konnten, und Tina Schäfer, dass ich das Design des Deckblattes ihrer Dokrotarbeit übernehmen durfte.

Schließlich möchte ich mich noch von ganzem Herzen bei meinen Eltern bedanken, die mich in allen Entscheidungen unterstützt haben und immer für mich da waren.



## Publikationsliste

### Veröffentlichungen

- 10/2008 **Schubert S, Rogers PD, Morschhäuser J.** (2008) Gain-of-function mutations in the transcription factor *MRR1* are responsible for overexpression of the *MDR1* efflux pump in fluconazole-resistant *Candida dubliniensis* strains. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**:4274-80
- 03/2011 **Schubert S, Barker KS, Znaidi S, Schneider S, Dierolf F, Dunkel N, Aïd M, Boucher G, Rogers PD, Raymond M, Morschhäuser J.** (2011) Regulation of efflux pump expression and drug resistance by the transcription factors *Mrr1*, *Upc2*, and *Cap1* in *Candida albicans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **55**:2212-23
- 08/2011 **Schubert S, Popp C, Rogers PD, Morschhäuser J.** (2011) Functional dissection of a *Candida albicans* zinc cluster transcription factor, the multidrug resistance regulator *Mrr1*. *Eukaryot Cell.* **10(8)**:1110-21

### Posterpräsentationen

- 03/2008 9<sup>th</sup> ASM Conference on Candida and Candidiasis, New Jersey, USA  
**Schubert S, Morschhäuser J.** Gain-of-function mutations in the transcription factor *MRR1* are responsible for overexpression of the *MDR1* efflux pump and multidrug resistance in *Candida dubliniensis*
- 03/2009 4<sup>th</sup> International Symposium Organized by the Students of the GSLS Revolution Research - Life and Sciences: A journey through time, Würzburg  
**Schubert S, Rogers PD and Morschhäuser J.** Gain-of-function mutations in the transcription factor *MRR1* are responsible for overexpression of the *MDR1* efflux pump and multidrug resistance in *Candida dubliniensis*
- 05/2009 3<sup>rd</sup> FEBS Advanced Lecture Course on Human Fungal Pathogens, La colle sur Loup, Frankreich  
**Schubert S, Rogers PD, Morschhäuser J.** Molecular analysis of the *Candida albicans* multidrug resistance regulator *MRR1*
- 09/2009 61<sup>st</sup> Meeting of the DGHM, Göttingen  
**Schubert S, Dierolf F, Rogers PD, Morschhäuser J.** Functional analysis of the multidrug resistance regulator *MRR1* in *Candida albicans*

- 11/2009 5<sup>th</sup> Joint Ph.D. Students Meeting of the Collaborative Research Centers SFB 544 (Heidelberg) & SFB630 (Würzburg) & SFB766 (Tübingen) - New Trends in Infectious Disease Research, Heidelberg  
**Schubert S, Dierolf F, Rogers PD, Morschhäuser J.** Functional analysis of the multidrug resistance regulator *MRR1* in *Candida albicans*
- 03/2010 10<sup>th</sup> ASM Conference on Candida and Candidiasis, Miami, Florida, USA  
**Schubert et al.** Regulation of efflux pump expression and drug resistance by the transcription factors Mrr1, Upc2 and Cap1 in *Candida albicans*