



**Funktionelle Analyse der Zink-Cluster-
Transkriptionsfaktorfamilie von *Candida albicans*
durch artifizielle Aktivierung**

Functional analysis of the zinc cluster transcription
factor family by artificial activation

Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Graduate School of Life Science,
Julius-Maximilians-Universität Würzburg,
Klasse Infection and Immunity

vorgelegt von
Rebecca Schillig

Würzburg 2013



Eingereicht am:

Mitglieder des Promotionskomitees:

Vorsitzender: Prof. Dr. Thomas Dandekar

1. Betreuer: Prof. Dr. Joachim Morschhäuser

2. Betreuer: Prof. Dr. Axel Rethwilm

3. Betreuer: Prof. Dr. Frank Brombacher

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation »Funktionelle Analyse der Zink-Cluster-Transkriptionsfaktoren von *Candida albicans* durch artifizielle Aktivierung« 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 einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Würzburg, April 2013

Rebecca Schillig

Affidavit

I hereby confirm that my thesis entitled »Functional analysis of the zinc cluster transcription factor family of *Candida albicans* by artificial activation« is the result of my own work. I did not receive any help or support from commercial consultants. All sources and / or materials applied are listed and specified in the thesis.

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

Würzburg, April 2013

Rebecca Schillig

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|-----------|
| Zusammenfassung | 1 |
| Summary | 3 |
| 1. Einleitung | 5 |
| 1.1. Allgemeine Einführung | 5 |
| 1.2. Therapie von <i>Candida</i> -Infektionen..... | 7 |
| 1.3. Resistenzmechanismen..... | 8 |
| 1.4. Regulation der Effluxpumpen..... | 10 |
| 1.5. Zink-Cluster-Transkriptionsfaktoren..... | 11 |
| 1.6. Genetik von <i>C. albicans</i> | 13 |
| 1.7. Genanalysemethoden in <i>C. albicans</i> | 14 |
| 1.8. Die artifizielle Aktivierung von Zink-Cluster-Transkriptionsfaktoren..... | 16 |
| 1.9. Ziel der Arbeit..... | 18 |
| 2. Material und Methoden | 21 |
| 2.1. Anzucht von <i>Escherichia coli</i> | 21 |
| 2.2. Anzucht von <i>Candida</i> -Stämmen..... | 21 |
| 2.3. Plasmidherstellung | 21 |
| 2.3.1. Herstellung der Plasmidbibliothek mit den artifiziell aktivierten Zink-Cluster-Transkriptionsfaktoren | 22 |
| 2.3.2. Plasmide..... | 26 |
| 2.3.3. Oligonukleotide..... | 27 |
| 2.4. Herstellung von genetisch veränderten <i>C.-albicans</i> -Stämmen..... | 34 |
| 2.4.1. Transformation von <i>C. albicans</i> | 35 |
| 2.4.2. Isolierung genomischer DNA und Southern Hybridisierung | 35 |
| 2.4.3. Proteinextraktion und Western Blot Analysen..... | 36 |
| 2.4.4. Herstellung von Deletionsmutanten, Überexpressions- und Reporterstämmen | 37 |
| 2.4.5. Hergestellte/verwendete <i>C.-albicans</i> -Stämme | 38 |
| 2.5. Fluconazolsensitivitäts-Assay..... | 47 |
| 2.6. Transkriptionsprofil-Analysen..... | 48 |

| | |
|--|------------|
| 2.6.1. RNA-Isolierung..... | 48 |
| 2.6.2. Microarray-Analysen | 49 |
| 2.6.3. Northern Hybridisierung..... | 49 |
| 2.7. Nachweis der <i>GFP</i> -Expression mittels Durchflusszytometrie (FACS)..... | 51 |
| 2.8. Biofilm Assay..... | 51 |
| 2.9. Lösungen..... | 52 |
| 3. Ergebnisse..... | 55 |
| 3.1. Etablierung der Methode der artifiziellen Aktivierung..... | 56 |
| 3.2. Die Bibliothek der artifiziell aktivierten Zink-Cluster-Transkriptionsfaktoren ... | 58 |
| 3.3. Neue Regulatoren der Fluconazolresistenz..... | 60 |
| 3.4. Genexpressionsprofile von <i>CTA4*</i> , <i>STB5*</i> , <i>MRR2*</i> & <i>ZNC1*</i> | 63 |
| 3.5. <i>Mrr2</i> , ein neuer Regulator von <i>CDR1</i> | 66 |
| 3.5.1. <i>MRR2*</i> und <i>ZNC1*</i> erhöhen die <i>CDR1</i> -Expression | 67 |
| 3.5.2. Die Überexpression von <i>CDR1</i> ist für die Fluconazolresistenz von <i>MRR2*</i> und <i>ZNC1*</i> verantwortlich..... | 70 |
| 3.5.3. <i>MRR2</i> reguliert die basale Expression von <i>CDR1</i> | 71 |
| 3.5.4. <i>MRR2</i> und <i>TAC1</i> sind für die <i>CDR1</i> -Expression notwendig..... | 74 |
| 4. Diskussion | 77 |
| 4.1. Die artifizielle Aktivierung der Zink-Cluster-Transkriptionsfaktoren | 77 |
| 4.2. Die Bibliothek der artifiziell aktivierten Zink-Cluster-Transkriptionsfaktoren ... | 80 |
| 4.3. Neue Regulatoren der Fluconazolresistenz..... | 83 |
| 4.4. <i>Mrr2</i> – ein wichtiger Regulator von <i>CDR1</i> | 87 |
| 4.5. Abschließende Worte und Ausblick..... | 91 |
| Literaturverzeichnis | 93 |
| Anhang | 101 |
| 1. Übersicht der Microarray-Daten | 101 |
| 2. Danksagung..... | 111 |
| 3. Lebenslauf..... | 113 |

Zusammenfassung

Der Hefepilz *Candida albicans* gehört zu den opportunistischen Infektionserregern. Er ist Teil der natürlichen Mikroflora der Schleimhäute des Gastrointestinal- und Urogenitaltraktes des Menschen. Bei Störungen des natürlichen Gleichgewichts dieser Flora kann es zu oberflächlichen Mykosen, z. B. der oropharyngealen Candidiasis (Mundsoor), kommen. Besonders immunsupprimierte Patienten, wie AIDS-Patienten, leiden häufig unter immer wiederkehrenden Infektionen, die mitunter auch zu schwerwiegenden Infektionsverläufen, bis hin zu lebensbedrohlichen systemischen Mykosen führen können. Zur Therapie solcher Erkrankungen werden oft Ergosterolbiosyntheseinhibitoren, wie Fluconazol, eingesetzt. Besonders bei wiederkehrenden Infektionen und wiederholender Therapie ist *C. albicans* in der Lage, gegen diese häufig verabreichten Antimykotika Resistenzen zu entwickeln. Hierbei spielen Zink-Cluster-Transkriptionsfaktoren eine zentrale Rolle. Zink-Cluster-Proteine gehören zu einer pilzspezifischen Familie von Transkriptionsfaktoren, die ein großes Spektrum an zellulären Prozessen regulieren. Die gut charakterisierten Regulatoren Upc2, Tac1 und Mrr1 gehören zu den Zink-Cluster-Transkriptionsfaktoren, die maßgeblich zur Resistenzentwicklung von *C. albicans* beitragen. Upc2 kontrolliert die Expression vieler Ergosterolbiosynthesegene, besonders die von *ERG11*, welches für die Zielstruktur des gängigen Antimykotikums Fluconazol kodiert. Tac1 und Mrr1 hingegen regulieren die Expression von *Multidrug*-Effluxpumpen, den ABC-Transportern *CDR1* und *CDR2* bzw. dem Major Facilitator *MDR1*. *Gain-of-function*-Mutationen in diesen Transkriptionsfaktoren resultieren in einer konstitutiven Überexpression ihrer Zielgene und sind verantwortlich für die Resistenz vieler klinischer Isolate.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Fusion von Mrr1 mit der Gal4-Aktivierungsdomäne von *Saccharomyces cerevisiae* zu einem konstitutiv aktiven Hybridtranskriptionsfaktor führte, der eine *MDR1*-Überexpression bewirkte und Fluconazolresistenz vermittelte. Dieses Hybridprotein vermittelte sogar eine höhere Resistenz als ein Mrr1 mit natürlich vorkommenden *gain-of-function*-Mutationen.

Analoge Fusionen mit Tac1 und Upc2 resultierten ebenfalls in einer konstitutiven Aktivierung dieser Transkriptionsfaktoren, die einen starken Anstieg der Fluconazolresistenz zur Folge hatte. Daraus ergab sich die Schlussfolgerung, dass dies eine generelle Methode sein könnte, die Zink-Cluster-Transkriptionsfaktoren künstlich zu aktivieren und so ihre biologischen Funktionen zu offenbaren, ohne die genauen Bedingungen für ihre Aktivität zu kennen. Deshalb wurde auf der Basis dieser Strategie eine Bibliothek von *C.-albicans*-Stämmen konstruiert, in der alle 82 putativen Zink-Cluster-Transkriptionsfaktoren in dieser möglicherweise hyperaktiven Form exprimiert werden. Untersuchungen dieser Bibliothek offenbarten neue Transkriptionsfaktoren, die Fluconazolresistenz vermittelten, aber auch noch unbekannte Regulatoren der Morphogenese und andere Phänotypen konnten beobachtet werden. Um einen tieferen Einblick in die Funktionsweise zu bekommen, wurden die Transkriptionsprofile der vier Transkriptionsfaktoren ermittelt, die in ihrer hyperaktiven Form die höchste Fluconazolresistenz bewirkten. Dabei stellte sich heraus, dass die zwei künstlich aktivierten (*) Regulatoren *ZCF34** und *ZNC1** die Expression der wichtigsten *Multidrug*-Effluxpumpe *CDR1* stark hochregulierten. Der Transkriptionsfaktor mit dem vorläufigen Namen *ZCF34* konnte im Verlauf dieser Arbeit als ein wichtiger Regulator für die *CDR1*-Expression identifiziert werden. Er ist sowohl an der Aktivierung der Expression von *CDR1* beteiligt als auch für die basale *CDR1*-Promotoraktivität notwendig. Aus diesem Grund wurde er in *MRR2* (*multidrug resistance regulator 2*) umbenannt.

Mit der Entdeckung eines neuen Regulators der wichtigsten *Multidrug*-Effluxpumpe von *C. albicans* wurde ein wichtiger Beitrag zum Verständnis der Regulation solcher Transporter geleistet. Die Überexpression dieser Pumpen ist einer der häufigsten Resistenzmechanismen in *C. albicans*. Auf diesem Wege kann Resistenz gegen strukturell völlig unterschiedliche Antimykotika bewirkt werden. Somit stellen sowohl diese Effluxpumpen, als auch deren Regulatoren mögliche Angriffsziele für die Entwicklung neuer oder Weiterentwicklung bereits vorhandener Antimykotika dar.

Summary

The yeast *Candida albicans* is an opportunistic fungal pathogen, usually a harmless colonizer of mucosal surfaces of the gastrointestinal and urogenital tract of healthy people. If the balance of this microflora is disturbed, it can cause superficial mycoses, like oropharyngeal candidiasis. Especially immunocompromised patients, like AIDS patients suffer from recurrent infections, occasionally causing life-threatening systemic infections. The antifungal agent fluconazole, which inhibits ergosterol biosynthesis, is frequently used to treat *Candida*-infections. Particularly during long term treatments of recurrent infections, *C. albicans* can develop resistance to the commonly used antifungal drugs. Zinc cluster transcription factors often play key roles in the development of such resistances. The zinc cluster proteins are a fungus-specific family of transcription factors that regulate a variety of cellular processes. The well characterized regulators Upc2, Tac1 and Mrr1 are among these zinc cluster transcription factors, being significantly involved in mediating drug resistance. Upc2 controls the expression of ergosterol biosynthesis genes, e. g. of *ERG11*, encoding the target enzyme of fluconazole. Tac1 and Mrr1 regulate the expression of multidrug efflux pumps, the ABC transporters *CDR1* and *CDR2* and the major facilitator *MDR1*, respectively. Gain-of-function mutations in these transcription factors result in constitutive overexpression of their target genes and are responsible for drug resistance in many clinical *C. albicans* strains.

In this thesis it could be shown that fusion of the full-length Mrr1 with the Gal4 activation domain from *Saccharomyces cerevisiae* produced a constitutively active hybrid transcription factor that mediated *MDR1* overexpression and increased drug resistance. The hybrid transcription factor exhibited even higher activity than Mrr1 with a naturally occurring gain-of-function mutation. Analogous fusions with Tac1 and Upc2 also resulted in constitutively activated transcription factors that conferred strongly increased drug resistance, suggesting that this might be a generally applicable approach for the artificial activation of zinc cluster transcription factors, which could reveal their

biological function without prior knowledge about inducing conditions. Therefore a library of *C. albicans* strains expressing all 82 predicted zinc cluster transcription factors of this pathogen was constructed, by using this strategy, resulting in strains with potentially hyperactive regulators. Screening of this comprehensive set of strains revealed novel transcription factors mediating drug resistance, but also previously unknown regulators of morphogenesis and other phenotypes. To gain insight into their mechanism of action, transcriptional profiles were determined of the four transcription factors that produced the strongest increase in fluconazole resistance when expressed in a hyperactive form. This analysis revealed that two out of these four artificially activated (*) transcription factors, *ZCF34** and *ZNC1**, strongly upregulate the expression of the most important multidrug efflux pump *CDR1*, which could be verified by Northern hybridization. The transcription factor previously named *ZCF34* could be identified as a new and important regulator of *CDR1*, being involved in the activation of *CDR1* expression as well as in basal promoter activity of this pump. Therefore it was renamed *MRR2* (multidrug resistance regulator 2).

The identification of *MRR2* as a new regulator of the most important multidrug efflux pump in *C. albicans* represents a major step forward in understanding the regulation of such transporters. The overexpression of these efflux pumps is one of the most common resistance mechanism in *C. albicans*, conferring resistance to many structurally and functionally unrelated toxic compounds. Therefore these transporters, as well as their regulators, provide potential targets of new or further developed antifungal agents.

1. Einleitung

1.1. Allgemeine Einführung

Bis vor wenigen Jahrzehnten haben Pilzinfektionen, verglichen mit bakteriellen oder viralen Infektionen, noch eine untergeordnete Rolle gespielt. Doch durch den medizinischen Fortschritt und die Immunschwächekrankheit AIDS ist die Anzahl solcher Erkrankungen deutlich angestiegen. Medikamente, wie Antibiotika, diverse Immunsuppressiva und andere Chemotherapeutika erhöhen die Überlebensrate von Patienten mit gefährlichen bakteriellen oder viralen Erkrankungen, Organversagen oder Krebs. Sie führen aber auch zur Zerstörung der normalen Körperflora oder zur Schwächung des Immunsystems und bedingen somit eine Zunahme an Infektionen mit opportunistischen Krankheitserregern. Pathogene Pilze gehören zu solchen Infektionserregern [Sternberg, 1994; Odds, 2000].

Von den über 100.000 bekannten Pilzarten sind nur wenige (ca. 150) für den Menschen klinisch relevant. Diese werden nach ihrem morphologischen Erscheinungsbild eingeteilt. So gibt es die Sprosspilze, zu denen *Candidia albicans* und *Cryptococcus neoformans* gehören, die Fadenpilze, wie *Aspergillus fumigatus*, und die klassischen dimorphen Pilze wie *Histoplasma capsulatum* und *Blastomyces dermatidis*. Haupterreger pilzbedingter klinischer Infektionen sind jedoch *C. albicans* und andere *Candida*-Spezies [Staib *et al.*, 2000; Hibbett *et al.*, 2007; Lass-Flörl, 2009]. Zu den opportunistisch pathogenen *Candida*-Arten gehören neben *C. albicans* vor allem *C. dubliniensis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. lusitanae*, *C. parapsilosis* und *C. tropicalis* [Odds *et al.*, 2006]. Die Verbreitung der einzelnen Spezies und somit deren klinische Relevanz ist von Region zu Region unterschiedlich [Sandven, 2000]. Auch wenn *C. albicans* längst nicht mehr der Alleinverursacher ernsthafter *Candida*-Infektionen ist, so ist er doch in unseren Breiten für mehr als die Hälfte aller Fälle invasiver Candidiasis verantwortlich [Lass-Flörl, 2009].

C. albicans als opportunistischer Krankheitserreger gehört zur normalen Mikroflora des gesunden Menschen und besiedelt als Kommensale die Schleimhäute des Mundes, des Gastrointestinal- und Urogenitaltraktes. Bei einem intakten Immunsystem und einer gesunden Mikroflora leben deren Mikroorganismen in einem natürlichen Gleichgewicht. Verschiebt sich das Gleichgewicht dieser Mikroflora durch die Gabe von Antibiotika bzw. wird das Immunsystem geschwächt, kann es zu oberflächlichen Mykosen kommen. Dabei ist Mundsoor (oropharyngeale Candidiasis) eine der häufigsten Candidainfektionen. Sie tritt oft bei Neugeborenen oder Patienten mit geschwächtem Immunsystem, z. B. AIDS-Patienten, auf [Sternberg, 1994; Chapman, 2003]. Als Bestandteil der natürlichen Mikroflora der Schleimhäute des Urogenitaltraktes verursacht *C. albicans* bei ca. 75 % der gesunden Frauen mindestens einmal im Leben eine Vaginalmykose [Sobel, 1985, 2003]. Diese oberflächlichen Mykosen sind in der Regel leicht durch die Einnahme bzw. Anwendung eines Antimykotikums zu behandeln. Problematisch wird es jedoch meist bei Langzeittherapien, welche oft bei AIDS-Patienten erforderlich sind, da diese häufig an wiederkehrenden Mykosen leiden. Unglücklicherweise führen diese Langzeittherapien oftmals zu Resistenzen, die der Pilz unter permanentem Selektionsdruck ausbildet. Dies hat oft den Verlust der Wirksamkeit der Antimykotika zur Folge. Besonders bei AIDS-Patienten oder jenen mit anderweitig supprimierten Immunsystem, wie Organ- oder Knochenmarksempfängern oder Krebspatienten zum Zeitpunkt einer Chemotherapie, besteht die Gefahr eines schwerwiegenden Infektionsverlaufs bis hin zur lebensbedrohlichen systemischen Mykose. Bei diesen Infektionen durchbricht *C. albicans* die natürlichen Barrieren der Haut und Schleimhäute, disseminiert über die Blutbahn und befällt innere Organe, wie Leber oder Nieren [Engelmann, 1999]. Dort kommt es dann zur Ansiedelung der *Candida*-Zellen und zur Ausbildung von Abszessen, was eine Mortalitätsrate von 30 % mit sich bringt [Kullberg and Oude, 2002; Martin *et al.*, 2003]. Außerdem ist *C. albicans* das vierthäufigste Pathogen, welches für Blutbahninfektionen verantwortlich ist [Holzheimer and Dralle, 2002].

Das Umschalten von *C. albicans* von dem Kommensalen-Modus in den Pathogen-Modus erfordert eine Menge an Regulationsprozessen, die noch nicht im Detail verstanden oder aufgeklärt sind. Der offensichtlichste Virulenzfaktor von *C. albicans* ist die Fähigkeit von der Hefe- zur Hyphenform zu wechseln. Dieser Dimorphismus unterliegt komplexen Regulationsmechanismen. *C. albicans* ist in der Lage, sowohl längliche,

ellipsoide Pseudohyphen, als auch länger werdende, echte Hyphen auszubilden. Letztere stehen im direkten Zusammenhang mit der Virulenz des Pilzes, da sie z. B. der Penetration des Wirtsgewebes dienen [Kumamoto and Vines, 2005]. Die Hefe-Hyphen-Transition wird durch komplexe Signaltransduktionswege reguliert, von denen einige bereits gut erforscht wurden [Whiteway *et al.*, 2006]. Neben dem genannten Dimorphismus ist *C. albicans* auch in der Lage durch Produktion von Adhäsinen an Wirtsgewebe zu adhären und somit unterschiedliche Gewebe und Nischen im Wirt zu besiedeln. Durch die metabolische Flexibilität können daraufhin die verschiedensten zur Verfügung stehenden Nährstoffe genutzt werden. Die Fähigkeit zur Biofilmbildung ist ein weiterer Mechanismus verschiedene Lebensräume zu erschließen und sich vor der Immunabwehr des Wirtes oder vor verabreichten Medikamenten zu schützen.

1.2. Therapie von *Candida*-Infektionen

Die zur Behandlung einer *Candida*-Infektion eingesetzten und verfügbaren Medikamente sind begrenzt. Die zellulären Gemeinsamkeiten zwischen dem eukaryotischen Pilz und dem Wirt sind der Grund dafür, dass nur wenige Angriffspunkte für Wirkstoffe existieren. Die gängigen Antimykotika können in verschiedene Stoffklassen eingeteilt werden. Die RNA- und DNA-Synthese-Inhibitoren bilden eine dieser Klassen. Zu ihnen gehören die Fluoropyrimidine mit 5-Flucytosin, als einziges Antimykotikum dieser Klasse. Dieses Basenanalogen wird durch einen speziellen Transporter (Cytosinpermease) in die Zelle aufgenommen und dort durch die Cytosin-Deaminase und die Uracil-Phosphoribosyltransferase zu 5-Fluorouridin-Monophosphat konvertiert. Das daraus gebildete, entsprechende Triphosphat führt anschließend zu einer fehlerhaften RNA-Synthese und zur Inhibition der DNA-Synthese [Polak and Scholer, 1975]. Durch häufige Resistenzentwicklungen kommen diese Medikamente, trotz ihrer geringen Toxizität, jedoch nur selten oder in Kombination mit anderen Antimykotika zum Einsatz. Eine weitere Stoffklasse stellen die Zellwandsynthese-Inhibitoren, vertreten durch die Echinocandine (z. B. Caspofungin), dar [Odds, 1988; Odds *et al.*, 2003]. Sie wirken durch Inhibierung der Synthese von β -1,3-D-Glucan, einem Hauptbestandteil der Zellwand von *C. albicans*. Des Weiteren gibt es Antimykotika, die mit dem Membranbestandteil Ergosterol, dem wichtigsten Sterol der

pilzlichen Zellmembran, interagieren oder dessen Biosynthese inhibieren. Polyene, wie Amphotericin B, stören die Membranfunktionen durch Anlagerung an Ergosterol [Odds *et al.*, 2003; Gray *et al.*, 2012], was den Tod der Pilzzelle zur Folge hat. Amphotericin B wurde, auch wegen der seltenen Resistenzentwicklung, lange Zeit am häufigsten zur Bekämpfung systemischer Pilzinfektionen verwendet. Heute findet es aber meist nur als Reserveantimykotikum Anwendung, da dessen Einsatz mit starken Nebenwirkungen, wie einer hohen Nephrotoxizität, verbunden ist. Allylamine, Morpholine und Azole inhibieren die Biosynthese von Ergosterol. Da Ergosterol im menschlichen Organismus nicht vorkommt, bietet dessen Biosynthese vielfältige Angriffspunkte für Antimykotika. Allylamine, wie Terbinafin, greifen an einem frühen Schritt in die Biosynthese mit fungiziden Konsequenzen ein, wohingegen die Morpholine (z. B. Fenpropimorph) zu einem späten Zeitpunkt den Syntheseweg blockieren [Odds *et al.*, 2003]. Beide werden meist nur in Kombination mit anderen Ergosterolbiosyntheseinhibitoren oder bei oberflächlichen Infektionen mit Dermatophyten eingesetzt. Azole, welche die größte klinische Relevanz besitzen, inhibieren die Sterol-14- α -Demethylase [Odds *et al.*, 2003; Morschhäuser, 2010]. Dies hat einen Ergosterolmangel und eine Ansammlung toxischer, methylierter Sterole in der Zelle zur Folge. Imidazole, wie Ketokonazol, werden häufig bei oberflächlichen Haut- und Schleimhautinfektionen eingesetzt. Triazole, wie Fluconazol, kommen aufgrund der guten Verträglichkeit und der geringen Toxizität sowohl bei lokalen als auch bei systemischen Mykosen zum Einsatz.

1.3. Resistenzmechanismen

C. albicans kann gegen alle unter 1.2. erwähnten Medikamente Resistenzen entwickeln. Mutationen in dem speziellen Transporter, der für die Aufnahme von Flucytosin verantwortlich ist, kommen sehr häufig vor. Ebenso mutieren jene Proteine, die die intrazelluläre Konversion bewirken, und verursachen somit entsprechende Resistenzen gegen dieses Basenanaloga-Medikament [Dodgson *et al.*, 2004; Hope *et al.*, 2004]. Auch gegen die Zellwandsyntheseinhibitoren, wie die Echinocandine, kann *C. albicans* resistent werden. Mutationen im β -1,3-Glucan-Synthase-Komplex können dies bewirken [Perlin, 2007].

Resistenzen gegen Amphotericin B, ein Polyen, kommen zwar selten vor, konnten aber dennoch beobachtet werden [Kelly *et al.*, 1997]. Eine Reduktion von Ergosterol in der Zellmembran kann zu einer verminderten Polyen-Empfindlichkeit führen. Azolresistenzen treten besonders häufig während Langzeitbehandlungen, z. B. bei AIDS-Patienten, auf. *C. albicans* hat verschiedenste Mechanismen entwickelt, gegen diese Medikamente resistent zu werden. Mutationen im *ERG11*-Gen, welches für die Sterol-14- α -Demethylase kodiert, der Zielstruktur der Azole, inklusive Fluconazol, verringern die Affinität dieser Medikamente zu dem Enzym. Dies führt zu einer erhöhten Azolresistenz [Morschhäuser, 2010]. Eine verstärkte Expression von *ERG11* resultiert ebenfalls in einer solchen Resistenz. Diese Überexpression von *ERG11* und anderen Ergosterolbiosynthesegenen kann durch eine *gain-of-function*-Mutation in dem Transkriptionsfaktor *Upc2* (*sterol uptake control*) bewirkt werden [Dunkel *et al.*, 2008b]. Dieser gehört zu einer speziellen Proteinfamilie mit einem pilzspezifischen DNA-Bindemotiv, dem sogenannten Zink-Cluster-Motiv (siehe Abschnitt 1.5.). Des Weiteren kann *C. albicans* durch Alterationen in der Sterolbiosynthese, die die Akkumulation der toxischen methylierten Sterole umgehen, azolresistent werden [Morschhäuser, 2010].

Zu den bedeutendsten Resistenzmechanismen zählt jedoch die Überexpression von Effluxpumpen. Auf diese Weise werden Azole und andere toxische Substanzen ebenso wie endogene Metabolite aus der Zelle herausgepumpt. In *C. albicans* konnten bisher zwei Typen solcher, in der Zytoplasmamembran lokalisierten, *Multidrug*-Effluxpumpen identifiziert und charakterisiert werden. Der Mdr1-Transporter ist die erste in *C. albicans* identifizierte *Multidrug*-Effluxpumpe, welche eine *Multidrug*-Resistenz verleiht, was zugleich namensgebend für diesen Transporter war [Goldway *et al.*, 1995]. Mdr1 gehört zur Proteinfamilie der Major Facilitator, die den Protonengradienten über der zytoplasmatischen Membran als Energiequelle für den Transport benutzen. Diese Effluxpumpe wird unter Standardbedingungen kaum exprimiert, weshalb ihre Deletion auch nicht zu einer Überempfindlichkeit gegenüber Antimykotika führt. Deletiert man Mdr1 jedoch in klinischen Isolaten, die eine hohe Mdr1-bedingte Azolresistenz aufweisen, verlieren diese Pilzstämme ihre Resistenz, zumindest partiell [Wirsching *et al.*, 2000b]. Die Überexpression von Mdr1 hingegen, z. B. unter der Kontrolle des starken *ADH1*-Promotors, resultiert in einer erhöhten Resistenz gegenüber Antimykotika bzw. Substraten dieser Effluxpumpe [Hiller *et al.*, 2006]. Dies

ist ein weiterer Beweis für die Rolle von Mdr1 als *Multidrug*-Effluxpumpe und dadurch bedingte Resistenzen. Der zweite Typ von *Multidrug*-Transportern gehört zur Proteinfamilie der ABC-Transporter, welche ATP als Energiequelle benutzen. In *C. albicans* konnten zwei dieser ABC-Transporter als *Multidrug*-Effluxpumpen identifiziert werden. Aufgrund ihrer Funktion wurden sie Cdr1 und Cdr2 genannt, was für *Candida drug resistance* steht. Cdr1 war der erste ABC-Transporter eines pathogenen Pilzes, der in Zusammenhang mit *Multidrug*-Resistenz gebracht werden konnte [Prasad *et al.*, 1995; Sanglard *et al.*, 1995]. Die Deletion von Cdr1 resultiert in einer Hypersensitivität gegenüber allen getesteten Azolen und anderen metabolischen Inhibitoren [Sanglard *et al.*, 1996]. Seine Überexpression im Gegenzug erhöhte die Antimykotikaresistenz maßgeblich [Niimi *et al.*, 2004]. Das lieferte letztlich auch den Beweis dafür, dass Cdr1 als *Multidrug*-Effluxpumpe fungiert. Der ABC-Transporter Cdr2 ist hoch homolog zu Cdr1 und weist eine 84 %ige Aminosäureidentität auf [Sanglard *et al.*, 1997; Gauthier *et al.*, 2003]. Cdr2 besitzt ein ähnliches Substratspektrum wie Cdr1 und verleiht somit gegenüber vieler Xenobiotika Resistenz. Eine Überexpression von Cdr2, z. B. unter der Kontrolle des *ACT1*-Promotors führt ebenfalls zu einer gesteigerten Resistenz gegen verschiedene Antimykotika [Schuetzer-Muehlbauer *et al.*, 2003].

Mdr1, Cdr1 und Cdr2 vermitteln Resistenzen gegenüber vielen verschiedenen Xenobiotika, inklusive den Azolen. Cdr1 und Cdr2 können sogar auch gegen Allylamine (z. B. Terbinafin) und Morpholine (z. B. Amorolfiin) Resistenzen verursachen. Jedoch sind sie unwirksam gegenüber den anderen klinisch relevanten Medikamenten, wie Flucytosin, Amphotericin B und den Echinocandinen. Resistenzen gegen diese Antimykotika sind spezifischer, wie oben erläutert [Morschhäuser, 2010].

1.4. Regulation der Effluxpumpen

Verschiedene Studien konnten zeigen, dass die Überexpression von *CDR1*, *CDR2* und *MDR1* in azolresistenten klinischen Isolaten durch transkriptionale Aktivierung bedingt wurde [Wirsching *et al.*, 2000b; Micheli *et al.*, 2002]. Doch durch das Fehlen von orthologen Regulatoren in *C. albicans* zu *Multidrug*-Resistenzregulatoren aus *Saccharomyces cerevisiae*, wie z. B. Pdr1, konnten die dafür verantwortlichen

Transkriptionsfaktoren in *C. albicans* lange Zeit nicht identifiziert werden. Die für die konstitutive Überexpression verantwortlichen DREs (*drug responsive elements*) in den Promotorregionen von *CDR1/2* enthalten zwei CGG-Triplets. Dieses Motiv wird oft von Zink-Cluster-Transkriptionsfaktoren erkannt [MacPherson *et al.*, 2006]. Die Beobachtung, dass viele azolresistente *C.-albicans*-Stämme homozygot für den *mating type-like* Locus (*MTL*) geworden sind und die CGG-Triplets in den Promotorregionen von *CDR1/2* ließen Sanglard und seine Mitarbeiter nach Genen suchen, die für Zink-Cluster-Transkriptionsfaktoren kodieren und auf dem Chromosom 5, in der Nähe des *MTL*-Lokus lokalisiert sind. In darauffolgenden Studien konnte ein Zink-Cluster-Transkriptionsfaktor identifiziert werden, der maßgeblich an der Regulation der Gene *CDR1/2* beteiligt ist. Er wurde Tac1 (transcriptional activator of *CDR* genes) genannt [Coste *et al.*, 2004]. In klinischen Isolaten, in denen *CDR1/2* hochreguliert sind, konnten *gain-of-function*-Mutationen in *TAC1* identifiziert werden. Diese führen zu einer konstitutiven Aktivierung dieses Transkriptionsfaktors, was die permanente Expression der *CDR1/2*-Gene zur Folge hat.

Etwas später wurde auch für *MDR1* ein solcher Zink-Cluster-Transkriptionsfaktor identifiziert. Der *multidrug resistance regulator 1* (*MRR1*) ist in einigen fluconazolresistenten klinischen *C.-albicans*-Isolaten zusammen mit *MDR1* hochreguliert [Morschhäuser *et al.*, 2007]. Auch in *MRR1* gibt es viele natürlich vorkommende *gain-of-function*-Mutationen, die zu einer konstitutiven Aktivierung des Transkriptionsfaktors führen und eine permanente *MDR1*-Expression bewirken, was zur Fluconazolresistenz führt [Morschhäuser *et al.*, 2007; Dunkel *et al.*, 2008a].

Diese Transkriptionsfaktoren mit dem pilzspezifischen DNA-Bindemotiv sind auch in anderen Resistenzmechanismen involviert. Für die Überexpression der *ERG*-Gene in azolresistenten Isolaten ist oft eine *gain-of-function*-Mutation im Zink-Cluster-Transkriptionsfaktor *UPC2* verantwortlich (siehe Abschnitt 1.3.). Die Tatsache, dass drei gängige Resistenzmechanismen durch *gain-of-function*-Mutationen in Zink-Cluster-Transkriptionsfaktoren bewirkt werden, zeigt, wie wichtig diese Proteinfamilie für virulenz-assoziierte Eigenschaften von *C. albicans* ist.

1.5. Zink-Cluster-Transkriptionsfaktoren

Das Element Zink ist für eine korrekte Funktion vieler Proteine, inklusive verschiedenster Enzyme, essentiell. Die meisten Zink enthaltenden Proteine sind jedoch Transkriptionsfaktoren, für deren DNA-bindende Fähigkeiten dieses Element verantwortlich ist. Sie werden deshalb Zink-Finger-Proteine genannt. Zu der Klasse der Zink-Finger-Proteine gehören auch die Zink-Cluster-Transkriptionsfaktoren. Diese existieren ausschließlich in Pilzen und besitzen das hochkonservierte Motiv CysX₂CysX₆CysX₅₋₂₄CysX₂CysX₆₋₉Cys [MacPherson *et al.*, 2006]. Das DNA-Bindemotiv ist bei den meisten der Proteinfamilie angehörigen Transkriptionsfaktoren in der N-terminalen Region lokalisiert. Die Zink-Cluster-Transkriptionsfaktoren können sich an die DNA als Monomer, Homodimer oder als Heterodimer anlagern. Wie bereits im Abschnitt 1.4. erwähnt, binden diese Transkriptionsfaktoren häufig als Homodimere an DNA-Sequenzen, welche CGG-Triplets in unterschiedlicher Orientierung, Wiederholung und Anzahl enthalten. Das Zink-Cluster-Protein Gal4 aus *S. cerevisiae*, welches beim Galactose-Metabolismus eine Rolle spielt, wurde als erstes beschrieben und am intensivsten erforscht [Marmorstein *et al.*, 1992]. Es bindet als Homodimer an entsprechende DNA-Sequenzen. Auch in *S. cerevisiae* existieren Zink-Cluster-Transkriptionsfaktoren, die entscheidenden Einfluss auf die *Multidrug*-Resistenz ausüben. Pdr1 und Pdr3 regulieren die Expression des ABC-Transporters *PDR5*. Pdr steht für *pleiotropic drug resistance*. Auch in diesen Zink-Cluster-Transkriptionsfaktoren gibt es natürlich vorkommende *gain-of-function*-Mutationen, die zu einer permanenten Expression von *PDR5* führen und Resistenz verleihen [Gulshan and Moye-Rowley, 2007]. Im *C. albicans*-Genom konnten durch Sequenzvergleiche 82 putative offene Leseraster (englisch: *open-reading-frames*; ORFs) ermittelt werden, welche für Zink-Cluster-Proteine kodieren. Die wenigsten konnten bis jetzt charakterisiert werden. Funktionen einiger Mitglieder dieser Proteinfamilie, die bisher schon aufgedeckt werden konnten, zeigten aber deren Involvierung in der Regulation von wichtigen Virulenz- und Resistenzmechanismen. Letztere wurden genauer in Abschnitt 1.3. und 1.4. beschrieben, in denen die Resistenzmechanismen durch erhöhte *ERG11*-Expression und die Regulation von Effluxpumpen erläutert wurden. Dies wird maßgeblich durch die Zink-Cluster-Transkriptionsfaktoren Upc2, Tac1 und Mrr1 gesteuert. Zu den bisher beschriebenen Zink-Cluster-Proteinen mit Einfluss auf die Virulenzeigenschaften gehört

z. B. *Ume6*, welches essentiell für die Produktion von invasiven Hyphen ist [Banerjee *et al.*, 2008]. *Wor2* ist notwendig für die Stabilität der paarungskompetenten *Opaque*-Zellform von *C. albicans* [Zordan *et al.*, 2007]. Dem *Ahr1*, ehemalig *Zcf37*, konnte kürzlich eine Involvierung an der Regulation von Adhäsionsgenen und eine maßgebliche Beteiligung an der Regulation der Hyphenbildung nachgewiesen werden [Askew *et al.*, 2011]. Außerdem soll er auch in Steuerungsprozessen des *White-opaque-switchs* involviert sein [Wang *et al.*, 2011]. Ebenfalls kürzlich beschrieben wurde der Zink-Cluster-Transkriptionsfaktor *Sef1*, welcher entscheidende Rollen in der Eisenhomeostase und somit beim Übergang von dem Kommensalen *C. albicans* zu dem Pathogen *C. albicans* spielt [Chen *et al.*, 2011]. Dennoch sind die Funktionen der meisten der über 80 putativen Zink-Cluster-Transkriptionsfaktoren von *C. albicans* noch nicht bekannt. Daher war es u. a. Ziel dieser Arbeit eine neuartige Methode zu etablieren, die es ermöglicht die gesamte Proteinfamilie funktionell zu analysieren. Bevor diese Strategie jedoch genauer erläutert werden kann, muss zunächst auf die Genetik und auf die generellen Methoden zur Genanalyse eingegangen werden.

1.6. Genetik von *C. albicans*

C. albicans wird häufig als Modellorganismus für pathogene Pilze verwendet. Dafür spricht eine leichte Transformierbarkeit, was z. B. die Integration fremder DNA mittels homologer Rekombination einschließt [De Backer *et al.*, 2000; Berman and Sudbery, 2002]. Damit sind Geninsertionen und Gendeletionen relativ einfach zu erzeugen. Ein weiteres Pro ist die Fähigkeit von *C. albicans* zwischen der Hefeform und der invasiven Hyphenform zu wechseln. Dagegen spricht die Diploidität und das Fehlen einer haploiden Phase von *C. albicans*, obwohl eine solche vor kurzem von Hickman *et al.*, 2013 beschrieben wurde. Sie tritt allerdings nur unter bestimmten Selektionsbedingungen auf und spielt bislang bei genetischen Manipulationen in der Praxis noch keine Rolle. Des Weiteren weist *C. albicans* einen ungewöhnlichen Codongebrauch auf. Die Verwendung des CTG-Codons für ein Serin statt einem Leucin erfordert bei Integration von Fremdgenen, z. B. des *GFP*-Gens (siehe Reportersysteme unter Abschnitt 1.7.), immer deren Anpassung an den speziellen Codongebrauch. Eine homozygote Gendeletion benötigt durch die Diploidität immer zwei Runden der

Transformation, was einen weiteren Nachteil von *C. albicans* als Modellorganismus darstellt. Seit jedoch die komplette Genomsequenz von *C. albicans* verfügbar ist (www.candidagenome.org), ist die Identifikation und funktionelle Analyse von Genen stark erleichtert. So besitzt *C. albicans* 6202 ORFs, von denen zum Zeitpunkt des Verfassens dieser Arbeit (Frühjahr 2013) 1480 charakterisiert wurden. Sequenzhomologien zwischen *C. albicans* und der verwandten Bäckerhefe *S. cerevisiae* geben Hinweise auf Funktionen von Genen. Jene aus *C. albicans*, zu denen es keine *S.-cerevisiae*-Homologe gibt, könnten möglicherweise wichtige Funktionen in der Pathogenität von *C. albicans* besitzen, die einen entscheidenden Unterschied zur nicht-invasiven Bäckerhefe darstellt.

1.7. Genanalysemethoden in *C. albicans*

Deletionsmutanten können auf unterschiedliche Weise hergestellt werden. Eine der ersten Methoden war die *URA-Blaster*-Strategie [Fonzi and Irwin, 1993]. Die zu deletierenden Allele eines Gens werden durch den *URA3*-Marker im Uridin-auxotrophen Stamm *CAI4* ersetzt. Auxotrophe Marker haben aber einige Nachteile, weshalb Methoden entwickelt wurden, mit denen unter Verwendung dominanter Selektionsmarker Gene direkt im wildtypischen Ausgangsstämmen deletiert werden können. Der *MPA^R*-Marker ist der erste verwendete dominante Selektionsmarker [Wirsching *et al.*, 2000a]. Er verleiht dem Pilz Resistenz gegen Mycophenolsäure. Die *MPA^R-Flipper*-Strategie wurde aber von Reuß *et al.*, 2004 optimiert zur sogenannten *SAT1-Flipper*-Strategie. Die Deletionskassette des *SAT1-Flippers* besteht aus dem dominanten Selektionsmarker *caSAT1* (*candida adapted: an Candida angepasst*), welcher Resistenz gegen das Antibiotikum Nourseothricin verleiht. Dieses Resistenzgen ist flankiert von *FRT-sites*, die von einer *site*-spezifischen Rekombinase (*FLP*), ebenfalls Bestandteil der Kassette, erkannt werden. Das Gen dieser Rekombinase wurde an den ungewöhnlichen Codongebrauch von *C. albicans* angepasst (*candida adapted: caFLP*) und steht unter der Kontrolle eines induzierbaren Promotors, entweder dem *MAL2*-Promotor [Reuß *et al.*, 2004] oder dem *SAP2*-Promotor [Sasse *et al.*, 2011]. Die *SAT1-Flipper*-Kassette wird flankiert von *upstream*- und *downstream*-Sequenzen des zu deletierenden Gens. Nach dem Einbringen dieser Kassette in das Genom eines

Wildtypstammes erfolgt das Recycling der *SAT1-Flipper*-Kassette durch Induktion des *MAL2*-Promotors oder des *SAP2*-Promotors, im entsprechenden Medium (YPM- bzw. YCB-BSA-Medium). Die daraufhin exprimierte Flp-Rekombinase bindet an die *FRT-sites*, was zum Ausschneiden der Deletionskassette führt und deren erneute Verwendung zur Deletion des zweiten Allels ermöglicht. Auf diese Weise können homozygote Deletionsmutanten mit der selben *SAT1-Flipper*-Kassette nach zwei Runden der Integration und Exzision erzeugt werden.

Genexpressions-Systeme stellen eine weitere Methode zur Aufklärung von Genfunktionen dar. Die Deletion von Genen ist zwar eine der beliebtesten Methoden zur Durchführung von funktionellen Analysen, eignet sich jedoch nicht immer dafür. Essentielle Gene z. B. können nicht deletiert werden [De Backer *et al.*, 2000]. Auch ist die Expression von Genen unter Standardwachstumsbedingungen nicht immer angeschaltet, wodurch eine Deletion zu keinem veränderten Phänotyp führt. Mithilfe von Expressionssystemen kann auch die Funktion von essentiellen Genen analysiert werden. Es stehen hierbei verschiedene Systeme zur Verfügung. In denen wird die Genexpression durch verschiedene konstitutiv aktive, induzierbare oder reprimierbare Promotoren reguliert. Eine Expression von Genen unter der Kontrolle des starken *ADH1*-Promotors führt zu einer Überexpression. Zur Quantifizierung der Genexpression wurden für *C. albicans* *GFP*-Reporterkonstrukte entwickelt [Cormack *et al.*, 1997; Morschhäuser *et al.*, 1998]. Hierzu wurde das *GFP*-Gen, welches ursprünglich aus der Qualle *Aequorea victoria* stammt, an den ungewöhnlichen Codongebrauch von *C. albicans* angepasst. Dieses *caGFP*-Gen wird dann unter der Kontrolle des Promotors des zu untersuchenden Gens exprimiert. Unter dem Fluoreszenzmikroskop oder im FACS kann anschließend analysiert werden, ob die Expression dieses Gens unter den entsprechenden Bedingungen induziert oder reprimiert wird. Dies wurde in dieser Arbeit mit den *CDR1*- & *CDR2*-Genen durchgeführt, welche für ABC-Transporter kodieren und maßgeblich an der Resistenzentwicklung beteiligt sind.

Mithilfe der modernen Technik sind heutzutage auch genomweite Expressionsanalysen möglich. Die Erstellung von Transkriptionsprofilen mittels DNA-Microarrays gibt Aufschluss darüber, welche Gene unter bestimmten Bedingungen, wie z. B. beim Einsatz von antimykotischen Substanzen, transkribiert werden. Veränderungen im Transkriptionsprofil zwischen verschiedenen *C.-albicans*-Mutanten können so offenbart werden.

1.8. Die artifizielle Aktivierung von Zink-Cluster-Transkriptionsfaktoren

Die im vorherigen Abschnitt beschriebene Methode der Gendeletion ist eine weit verbreitete Methode zur Ermittlung von Genfunktionen. Transkriptionsfaktoren werden aber oft nur unter bestimmten Bedingungen exprimiert oder aktiviert, weshalb sich deren Deletion nur bedingt zur funktionellen Analyse eignet. Phänotypische Veränderungen von Mutanten unbekannter Transkriptionsfaktoren blieben womöglich unter Standardbedingungen im Verborgenen. Ein komplementärer Ansatz zur Gendeletion, welcher keine Kenntnisse über induzierende Signale voraussetzt, ist die artifizielle Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, z. B. durch deren Überexpression [Chua *et al.*, 2006]. In *C. albicans* können jedoch keine stabilen Multikopievektoren integriert werden, wie das beispielsweise in *S. cerevisiae* möglich ist. Deshalb kann in *C. albicans* eine solche Überexpression nur bedingt erreicht werden, in dem das zu untersuchende Gen unter die Kontrolle eines starken Promotors, z. B. des *ADH1*-Promotors, gebracht wird. *Gain-of-function*-Mutationen, wie sie bereits in Abschnitt 1.4. beschrieben wurden, stellen ebenfalls eine Möglichkeit dar, Transkriptionsfaktoren konstitutiv zu aktivieren. Solche aktivierenden Mutationen würden sich hervorragend eignen, um die Funktionen anderer, noch unbekannter Zink-Cluster-Transkriptionsfaktoren zu analysieren. Es kann allerdings nicht vorhergesagt werden, welche Aminosäureaustausche notwendig sind, um einen hyperaktiven Transkriptionsfaktor zu generieren. In dieser Arbeit konnte jedoch eine andere, generell anwendbare Methode zur artifiziellen Aktivierung von Zink-Cluster-Transkriptionsfaktoren entwickelt werden, die eine potentielle Hyperaktivität dieser Regulatoren bewirkt.

Die Rolle des im Abschnitt 1.4. erwähnten Zink-Cluster-Transkriptionsfaktors Mrr1 in der *Multidrug*-Resistenz wurde in der Arbeitsgruppe von Joachim Morschhäuser entdeckt und beschrieben [Morschhäuser *et al.*, 2007]. Schubert *et al.*, 2011b fusionierte, zur Aufklärung der funktionellen Domänen von Mrr1, dessen DNA-Bindedomäne (DBD) mit der heterologen Aktivierungsdomäne (AD) von Gal4 aus *S. cerevisiae*. Eine ähnliche Strategie wurde bereits im Jahr 2001 von F. Devaux und P. Marc für den Zink-Cluster-Transkriptionsfaktor Pdr1 aus *S. cerevisiae* angewandt,

welcher in diesem Organismus ebenfalls maßgeblich an der *Multidrug*-Resistenz beteiligt ist [Devaux *et al.*, 2001]. Sie konnten zeigen, dass das Fusionsprotein aus der Pdr1-DBD und der Gal4-AD zur Hoch- bzw. Runterregulation ähnlicher Gene führt, wie ein Pdr1 mit natürlich vorkommenden *gain-of-function*-Mutationen. Ding und Johnston zeigten bereits 1997, dass die Gal4-AD ausreicht, um die aktivierenden Eigenschaften eines vollständigen Proteins zu vermitteln. Deshalb eignet sie sich hervorragend als Fusionspartner [Ding and Johnston, 1997]. Devaux und Marc postulierten schon damals, dass dies eine Möglichkeit wäre, die gesamte Proteinfamilie der Zink-Cluster-Transkriptionsfaktoren künstlich zu aktivieren. Sie wurde jedoch weder für *S. cerevisiae* noch für *C. albicans* genomweit angewandt. Schubert *et al.*, 2011b konstruierte, wie eingangs erwähnt, ein solches Fusionsprotein von Mrr1 und integrierte dies in eine *mrr1*-Deletionsmutante unter der Kontrolle des starken *ADH1*-Promotors. Auch im Fall von *C. albicans* verhielt sich dieses Hybridprotein wie ein aktivierter Mrr1-Transkriptionsfaktor, was zu einer erhöhten Fluconazolresistenz führte. Im wildtypischen Hintergrund, also bei Konkurrenz des Hybridproteins mit dem wildtypischen Mrr1, konnte immer noch eine leicht erhöhte Fluconazolresistenz nachgewiesen werden [diese Arbeit, siehe Abschnitt 3.1.]. Um herauszufinden, ob sich diese Strategie der artifiziellen Aktivierung für die gesamte Proteinfamilie eignet, wurden in dieser Arbeit ähnliche Fusionsproteine für Tac1 und Upc2 hergestellt. Beide Zink-Cluster-Transkriptionsfaktoren sind ebenfalls wichtig für die Resistenzentwicklung in *C. albicans* (siehe Abschnitt 1.3. und 1.4.). Die Integration dieser Hybridproteine, auch unter dem starken *ADH1*-Promotor, bewirkte sowohl im entsprechenden Deletions- als auch im Wildtyp-Hintergrund eine erhöhte Fluconazolresistenz (Details siehe Abschnitt 3.1.). Bei weiteren Studien von S. Schubert konnte außerdem gezeigt werden, dass das Anhängen eines HA-Epitops an den C-Terminus des vollständigen Mrr1 ebenfalls zu dessen Aktivierung führt, welche Fluconazolresistenz bewirkte [Schubert *et al.*, 2011b]. Ähnliche aktivierende Eigenschaften eines C-terminalen Anhangs wurden auch für Upc2 beobachtet [Znaidi *et al.*, 2008]. Daraufhin erfolgte in dieser Arbeit die Herstellung von Fusionsproteinen für Mrr1, Tac1 und Upc2, bei denen das vollständige Protein mit der Gal4-AD aus *S. cerevisiae* und einem 3-fachen HA-Epitop gekoppelt wurde. Die Integration dieser Hybridproteine unter der Kontrolle des starken *ADH1*-Promotors bewirkte sowohl im Deletions- als auch im Wildtyp-Hintergrund eine künstliche Aktivierung dieser Zink-Cluster-Transkriptionsfaktoren, was mit einer erhöhten

Fluconazolresistenz einherging. Diese war vergleichbar mit jener, die von natürlich vorkommenden *gain-of-function*-Mutationen in diesen Regulatoren verursacht werden. Detaillierte Daten und dazugehörige Diagramme befinden sich ebenfalls in Abschnitt 3.1.

Somit wurde in der vorliegenden Arbeit eine Methode zu artifizierender Aktivierung der Zink-Cluster-Transkriptionsfaktoren von *C. albicans* etabliert und auch genomweit angewendet.

1.9. Ziel der Arbeit

Die Zunahme opportunistischer Infektionen durch pathogene Pilze, wie *C. albicans*, stellt ein immer größer werdendes Problem dar. Der dadurch bedingte vermehrte Einsatz von Antimykotika fördert die rasche Entwicklung von Resistenzen. Um dem entgegenwirken zu können, ist es wichtig, die molekularen Ursachen der Resistenzmechanismen aufzuklären. Zink-Cluster-Transkriptionsfaktoren spielen bei der Regulation wichtiger Resistenzgene eine zentrale Rolle. Die 82 putativen Mitglieder dieser pilzspezifischen Proteinfamilie in *C. albicans* sind dennoch weitestgehend unerforscht. Generelle Methoden zur funktionellen Analyse ganzer Proteinfamilien, wie die Herstellung von Deletionsmutanten, eignen sich nur bedingt zur Erforschung von Transkriptionsfaktoren, da diese meist nur unter bestimmten, oft unbekanntem Bedingungen exprimiert und aktiviert werden. Deshalb war es zunächst Ziel dieser Arbeit, eine Methode zu etablieren, bei der die Zink-Cluster-Transkriptionsfaktoren artifiziell aktiviert und überexprimiert werden, um so einen Einblick in ihre biologischen Funktionen zu erhalten, ohne die genauen Umstände, unter denen sie normalerweise aktiv sind, kennen zu müssen. Anschließend sollte diese Methode genomweit für alle 82 putativen Zink-Cluster-Transkriptionsfaktoren von *C. albicans* angewandt werden. Mit der auf dieser Strategie basierenden Bibliothek von *C.-albicans*-Stämmen, die die Transkriptionsfaktoren in einer potentiell hyperaktiven Form exprimieren, sollten unterschiedliche Screenings zum Offenbaren von eventuellen Veränderungen im Resistenz- bzw. Virulenzverhalten durchgeführt werden.

Aufgrund der zentralen Rolle der Zink-Cluster-Transkriptionsfaktoren bei der Resistenzentwicklung sollten besonders die Regulatoren, die durch erhöhte Resistenz gegen das gängige Antimykotikum Fluconazol auffielen, genauer charakterisiert werden. Hierbei sollten vor allem die Veränderungen in den Genexpressionsprofilen ermittelt werden, um so mögliche neue resistenzvermittelnde Gene oder deren Regulatoren identifizieren zu können. Auf diese Weise sollte ein tieferer Einblick in die molekularen Mechanismen der Resistenzentwicklung von *C. albicans* gewonnen werden.

2. Material und Methoden

2.1. Anzucht von *Escherichia coli*

E.-coli-Zellen wurden bei 37°C, schüttelnd mit ca. 200 rpm, in LB-Flüssigmedium herangezogen. Die Inkubation mit *E. coli* beimpften Agarplatten erfolgte über Nacht bei ebenfalls 37°C. Plasmid-tragende *E.-coli*-Stämme wurden sowohl in Flüssigmedium, als auch auf Agarplatten unter Selektionsdruck mit 100 µg/ml Ampicillin kultiviert.

2.2. Anzucht von *Candida*-Stämmen

Candida-Zellen wurden standardmäßig in YPD-Medium oder auf YPD-Agarplatten bei 30°C angezüchtet. Die Selektion von Transformanten geschah auf Nourseothricin-haltigen YPD-Agarplatten (200 µg/ml). Zum Recyclen des *SAT1-Flippers* wurden die entsprechenden *Candida*-Zellen, je nach Art des induzierbaren Promotors, in YPM-Medium (*MAL2*-Promotor) oder in YCB-BSA-Medium (*SAP2*-Promotor) kultiviert. Flüssigkulturen wurden standardmäßig über Nacht bei 30°C und ca. 220 rpm herangezüchtet. Die Bebrütung der Agarplatten erfolgte je nach Medienart für zwei Tage (Vollmedium) oder für drei Tage und mehr (Minimalmedium) bei 30°C.

2.3. Plasmidherstellung

Im Folgenden werden die in dieser Arbeit angewendeten Techniken zur Plasmidherstellung am Beispiel der Herstellung der Plasmidbibliothek mit den künstlich aktivierten Zink-Cluster-Transkriptionsfaktoren von *C. albicans* erläutert. Des Weiteren sind in diesem Kapitel alle in der vorliegenden Arbeit hergestellten bzw.

verwendeten Plasmide tabellarisch aufgelistet. Im Anschluss daran befindet sich eine Tabelle mit verwendeten Oligonukleotiden.

2.3.1. Herstellung der Plasmidbibliothek mit den artifiziell aktivierten Zink-Cluster-Transkriptionsfaktoren

Die zur Amplifizierung der Gene der Zink-Cluster-Transkriptionsfaktoren von *C. albicans* gewählten Primer bestehen aus 20-25 Basenpaaren. Vorwärtsprimer beginnen mit dem Startcodon und einer davor angefügten Sequenz der XhoI bzw. SalI-Schnittstelle. Die reversen Primer bestehen aus den letzten 20-25 Basenpaaren der entsprechenden Gene, unter Ausschluss des Stoppcodons (Übersicht: siehe Tabelle 2). An diese wurde die Sequenz der KasI-site angefügt. Die Amplifizierung der Zink-Cluster-Transkriptionsfaktorgene erfolgte mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) mit der Phusion-DNA-Polymerase (Invitrogen oder New England Biolabs: NEB) nach Herstellerangaben. Als Template diente chromosomale DNA vom *C.-albicans*-Wildtypstamm SC5314 (0,1-1 µg). Die *Annealing*-Temperaturen wurden entsprechend den Herstellerangaben der verschiedenen Oligonukleotide angepasst. Die Aufreinigung der PCR-Produkte erfolgte mit PCR Purifikation Kits der Firmen Qiagen, Fermentas oder Machery und Nagel entsprechend ihrer Angaben. Im Anschluss daran wurden die PCR-Produkte unter Verwendung der spezifischen Restriktionsendonukleasen der Firma NEB gespalten. Dies geschah laut Herstellerangaben. Als Plasmid-Rückgrat bzw. Vektor diente der pBluescript KSII+ (Stratagene, Heidelberg, Deutschland). Dieser Vektor enthielt die in Abbildung 1 schematisch dargestellte Expressionskassette. Da diese Kassette später in den *ADH1*-Lokus von *C. albicans* integriert werden sollte, wurde sie mit Sequenzen des entsprechenden Promotors und der kodierenden Region flankiert. Außerdem enthält diese Expressionskassette Sequenzen der HA-markierten *GAL4*-Aktivierungsdomäne (AD; Aminosäure (AS) 767 bis 881; die letzten 115 AS) von *S. cerevisiae* und Sequenzen des *ACT1*-Terminators, der die sichere Termination der Transkription gewährleisten sollte. Der *caSAT1*-Marker, ebenfalls Bestandteil der Kassette wurde zur späteren Selektion positiver *C.-albicans*-Transformanten integriert. Er verleiht Resistenz gegen das Antibiotikum Nourseothricin. Dieser Expressionsvektor wurde mit den Restriktionsendonukleasen XhoI und KasI gespalten und so für die

anschließende Ligation, mit den ebenfalls XhoI und KasI gespaltenen PCR-Produkten, vorbereitet. Diese wurden zuvor, ebenso wie der verdaute Vektor, über ein Agarosegel sorgfältig aufgetrennt (über Nacht bei ca. 38 V) und darauffolgend mit dem GeneClean-Kit von MP Biomedicals nach Herstellerangaben aus dem Gel aufgereinigt.

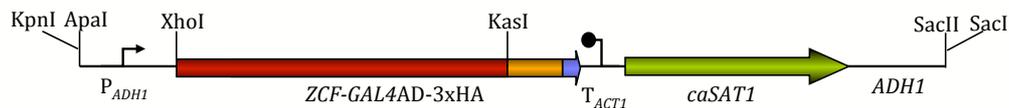


Abb. 1: Expressionskassette zur künstlichen Aktivierung der Zink-Cluster-Transkriptionsfaktoren. Die PCR-amplifizierten Zink-Cluster-Transkriptionsfaktoren (*ZCF*; rot) wurden zwischen die XhoI- und KasI-site kloniert und mit der *caGAL4-AD* (orange) und einem 3x HA-Epitop (blau) fusioniert. Flankierende Sequenzen des *ADHI*-Gens ermöglichten die Integration der Kassette in den *ADHI*-Lokus (P_{ADHI} : *ADHI*-Promotor; *ADHI*: Sequenzen der kodierenden Region von *ADHI*). Der Actin-Terminator (T_{ACT1}) sichert die Termination der Transkription und der *caSAT1*-Marker (grün) erlaubt die Selektion Nourseothricin-resistenter *C. albicans*-Transformanten. Flankierenden Restriktionsschnittstellen ermöglichen die Exzision der Kassette aus dem Vektor. Die Kassette befindet sich in der *multiple-cloning-site* des pBluescript KSII+.

Als Nächstes erfolgte die Ligation des Vektors mit den PCR-Produkten mittels der T4-Ligase von NEB, über Nacht bei ca. 12°C, im Wasserbad. Mengenangaben wurden entsprechend den Herstellerhinweisen berechnet und eingesetzt (Gesamtvolumen 20 µl). Am darauffolgenden Tag wurden 10-15 µl des Ligationsansatzes in den K12 Stamm *Escherichia coli* (DH5α) transformiert. Dieser wurde zuvor mittels Calciumchlorid-Methode kompetent gemacht, mit Glycerin versetzt und bei -80°C gelagert. Die Transformation erfolgte per Hitzeschock bei 42°C für 90 s. Nach kurzem Abkühlen der Bakterien auf Eis wurden diese für ca. 1 h bei 37°C in LB-Medium geschüttelt. Die Selektion der Bakterienkolonien erfolgte auf Ampicillin-haltigen LB-Agarplatten, über Nacht bei 37°C. Am nächsten Tag wurden die Bakterienklone geerntet und angezüchtet, um eine geeignete Menge zur Plasmidpräparation zu erhalten. Dies geschah mit Plasmid-Miniprep-Kits der Firmen Qiagen, Fermentas oder Machery und Nagel entsprechend ihrer Angaben. Zur Überprüfung, ob das isolierte Plasmid die gewünschten Sequenzen enthält, wurden Restriktionsendonukleasen so gewählt, dass eine Unterscheidung zum Ausgangsplasmid zweifellos möglich war. Meist wurden hierzu ebenfalls XhoI und KasI gewählt. Der Kontrollverdau wurde anschließend mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt. Entsprach das Bandenmuster den Erwartungen, wurde das entsprechende Plasmid zum Sequenzieren an die Firma SeqLab (Sequence

Laboratories, Göttingen, Deutschland) geschickt. Nach Überprüfung der Sequenzdaten und bei deren Richtigkeit wurden die DH5 α -Zellen, welche das gewünschte Plasmid enthielten, mit Glycerin versehen und bei -80°C konserviert.

Die Herstellung aller Plasmide in dieser Arbeit erfolgte nach diesem Prinzip. Als Vektor wurden immer Derivate des pBluescript KSII+ verwendet, die sich jedoch hinsichtlich bestimmter, integrierter Sequenzbereiche unterschieden. Zur Konstruktion von *Knock-out*-(KO-)Plasmiden wurden *upstream*- und *downstream*-Regionen der zu deletierenden Gene amplifiziert. Hierfür verwendete Primer (Tabelle 2) enthielten verschiedene Restriktionsschnittstellen (*upstream*-Fragment: SacI und SacII; *downstream*-Fragment: XhoI und ApaI oder *vice versa*). Die entsprechend gespaltenen PCR-Produkte wurden meist nacheinander in einen Vektor kloniert, der eine *SAT1-Flipper*-Kassette enthielt (detaillierte Informationen siehe Abschnitt 1.7.). Abbildung 2 zeigt eine Plasmidkarte eines solchen KO-Plasmids, am Beispiel von pZCF34M1. Für die Überexpression bestimmter Zink-Cluster-Transkriptionsfaktoren wurden Expressionskassetten konstruiert, die den gesamten ORF dieser Gene enthielten (siehe Abbildung 3). Der Actin-Terminator diente auch hier wieder zur Gewährleistung der Transkriptionstermination. Zur späteren Selektion positiver *C. albicans*-Transformanten wurde ebenfalls der *caSAT1*-Marker integriert. Die flankierenden Sequenzen des *ADH1*-Gens ermöglichten die Integration der Expressionskassette in den *ADH1*-Lokus von *C. albicans*. Zur Konstruktion von Reporterstämmen wurde ebenfalls der *SAT1-Flipper* verwendet. Hierbei erfolgte aber eine Fusion der Promotorsequenz des Reportergens mit dem *caGFP*. Abbildung 4 zeigt ein solches Reporterkonstrukt, am Beispiel des so hergestellten *CDR1*-Reporter-Plasmids.

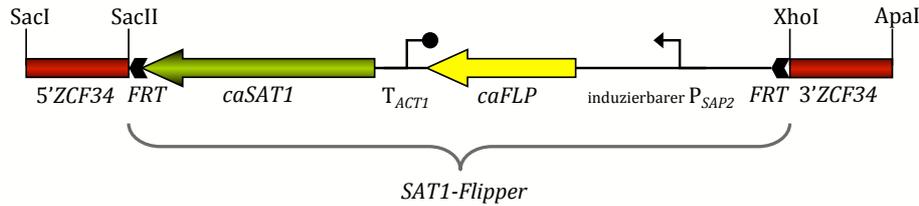


Abb. 2: Deletionskassette für ZCF34 (MRR2). Upstream- und downstream-Sequenzen von ZCF34 (rot) flankieren den SAT1-Flipper, bestehend aus dem caSAT1-Marker (grün), der caFLP-Rekombinase (gelb), hier unter der Kontrolle des induzierbaren SAP2-Promotors, flankiert von den FRT-sites. Relevante Restriktionsschnittstellen sind eingezeichnet. Die Kassette befindet sich in der multiple-cloning-site des pBluescript KSII+.

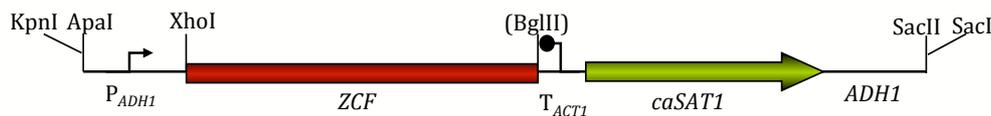


Abb. 3: Expressionskassette zur Überexpression der Zink-Cluster-Transkriptionsfaktoren. Der gesamte ORF der Zink-Cluster-Transkriptionsfaktoren (ZCF; rot) wurde amplifiziert und zwischen die XhoI- und BglII-site kloniert. Der Actin-Terminator sichert das korrekte Ende der Transkription. Der caSAT1-Marker (grün) erlaubt die spätere Selektion Nourseothricin-resistenter *C.-albicans*-Transformanten. Flankierende ADH1-Sequenzen ermöglichen die Integration der Kassette in den ADH1-Lokus von *C. albicans*. Relevante Restriktionsschnittstellen sind eingezeichnet. Die Kassette befindet sich in der multiple-cloning-site des pBluescript KSII+.

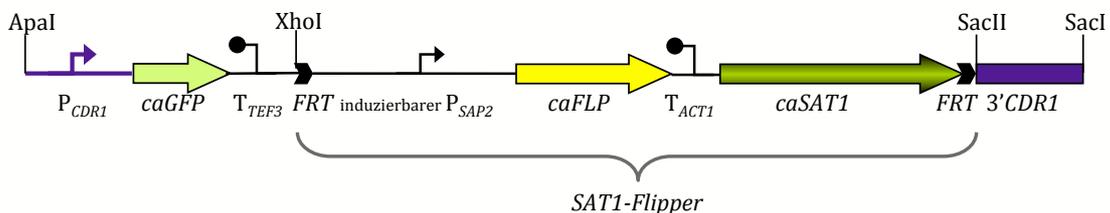


Abb. 4: CDR1-GFP-Reporter-Kassette. Die Promotorregion von CDR1 (violett) wurde mit dem caGFP (hellgrün) fusioniert. Der SAT1-Flipper mit dem induzierbaren SAP2-Promotor ermöglicht die spätere Selektion positiver *C.-albicans*-Transformanten und das Recyclen des dominanten Selektionsmarkers. Downstream-Regionen von CDR1 (violett) befinden sich am Ende der Kassette und gewährleisten die Integration der Kassette in den CDR1-Lokus von *C. albicans*. Relevante Restriktionsschnittstellen sind eingezeichnet. Die Kassette befindet sich in der multiple-cloning-site des pBluescript KSII+.

2.3.2. Plasmide

Die in der vorliegenden Arbeit erzeugten bzw. verwendeten Plasmide, sowie deren einzelne Bestandteile, sind in Tabelle 1 aufgelistet.

Tab. 1: In dieser Arbeit hergestellte und verwendete Plasmide

| Plasmid | Beschreibung | Referenz |
|-------------------------|--|--------------|
| ZCF-Plasmid-Bibliothek | | |
| pZCF-GAD1 | enthält Expressionskassette mit artifiziell aktivierten Zink-Cluster Transkriptionsfaktoren von <i>C. albicans</i> | diese Arbeit |
| KO-Plasmide | | |
| pALS1M1 | enthält Deletionskassette für <i>ALS1</i> | diese Arbeit |
| pAOX2M1 | enthält Deletionskassette für <i>AOX2</i> | diese Arbeit |
| pCDR1M2 | enthält Deletionskassette für <i>CDR1</i> | diese Arbeit |
| pCTA4M1 | enthält Deletionskassette für <i>CTA4</i> | diese Arbeit |
| pGST2M1 | enthält Deletionskassette für <i>GST2</i> | diese Arbeit |
| pPDR16M1 | enthält Deletionskassette für <i>PDR16</i> | diese Arbeit |
| pSOD3M1 | enthält Deletionskassette für <i>SOD3</i> | diese Arbeit |
| pSTB5M1 | enthält Deletionskassette für <i>STB5</i> | diese Arbeit |
| pTAC1M1 | enthält Deletionskassette für <i>TAC1</i> | diese Arbeit |
| pZCF34M1 | enthält Deletionskassette für <i>ZCF34 (MRR2)</i> | diese Arbeit |
| pZNC1M1 | enthält Deletionskassette für <i>ZNC1</i> | diese Arbeit |
| p344M1 | enthält Deletionskassette für orf19.344 | diese Arbeit |
| p5777M1 | enthält Deletionskassette für orf19.5777 | diese Arbeit |
| p7042M1 | enthält Deletionskassette für orf19.7042 | diese Arbeit |
| Überexpressionsplasmide | | |
| pCTA4E1 | enthält wildtypisches <i>CTA4</i> unter der Kontrolle von P _{ADH1} | diese Arbeit |
| pSTB5E1 | enthält wildtypisches <i>STB5</i> unter der Kontrolle von P _{ADH1} | diese Arbeit |
| pTAC1E2 | enthält wildtypisches <i>TAC1</i> unter der Kontrolle von P _{ADH1} | diese Arbeit |
| pUPC2E2 | enthält wildtypisches <i>UPC2</i> unter der Kontrolle von P _{ADH1} | diese Arbeit |
| pZCF34E1 | enthält wildtypisches <i>ZCF34 (MRR2)</i> unter der Kontrolle von P _{ADH1} | diese Arbeit |

| Plasmid | Beschreibung | Referenz |
|-------------------------|--|----------------------------------|
| Überexpressionsplasmide | | |
| pZCF36E2 | enthält wildtypisches <i>MRR1</i> unter der Kontrolle von P_{ADH1} | [Schubert <i>et al.</i> , 2008] |
| pZNC1E1 | enthält wildtypisches <i>ZNC1</i> unter der Kontrolle von P_{ADH1} | diese Arbeit |
| weitere Plasmide | | |
| pCDR1G2 | enthält P_{CDR1} - <i>caGFP</i> -Reporterfusion und die <i>SAT1</i> -Flipper-Kassette mit P_{SAP2} | diese Arbeit |
| pCDR2G5 | enthält P_{CDR2} - <i>caGFP</i> -Reporterfusion und die <i>SAT1</i> -Flipper-Kassette mit P_{SAP2} | AG Morschhäuser |
| pTAC1DBH1 | enthält DBD von <i>TAC1</i> fusioniert mit der <i>GAL4</i> -AD von <i>S. cerevisiae</i> und 3 Kopien des HA-Epitops unter der Kontrolle von P_{ADH1} | AG Morschhäuser |
| pUPC2DBH1 | enthält DBD von <i>UPC2</i> fusioniert mit der <i>GAL4</i> -AD von <i>S. cerevisiae</i> und 3 Kopien des HA-Epitops unter der Kontrolle von P_{ADH1} | AG Morschhäuser |
| pZCF36DBH2 | enthält DBD von <i>MRR1</i> fusioniert mit der <i>GAL4</i> -AD von <i>S. cerevisiae</i> und 3 Kopien des HA-Epitops unter der Kontrolle von P_{ADH1} | AG Morschhäuser |
| pZCF36EH2 | enthält wildtypisches <i>MRR1</i> unter der Kontrolle von P_{ADH1} fusioniert mit 3 Kopien des HA-Epitops | [Schubert <i>et al.</i> , 2011b] |

2.3.3. Oligonukleotide

Zur Amplifizierung bestimmter Gensequenzen wurden die in Tabelle 2 aufgelisteten Oligonukleotide über die Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland) bezogen. Eingefügte Restriktionsschnittstellen sind mit dickgedruckten Buchstaben hervorgehoben. Startcodons sind unterstrichen.

Tab. 2: In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide.

| Primer | Sequenz 5' → 3' | Verwendung |
|---|---|-------------|
| Primer zur Herstellung der Plasmid-Bibliothek mit den artifiziell aktivierten <i>ZCFs</i> | | |
| ARG81-1 | ATAT GTCGACA <u>ATG</u> TCATCACCATCTATACTATC | pARG81-GAD1 |
| ARG81AR1 | ATAT GGCGCCT GCTAACATTAAATTCATTTCCC | |
| ARG83AF1 | ATAT CTCGAGA <u>ATG</u> GCAAGGAGAAAAGGTCG | pARG83-GAD1 |
| ARG83AR1 | ATAT GGCGCCT CCTAAATTAAACACAATTCC | |

2. Material und Methoden

| Primer | Sequenz 5' → 3' | Verwendung |
|---|--|--------------|
| Primer zur Herstellung der Plasmid-Bibliothek mit den artifiziell aktivierten <i>ZCFs</i> | | |
| ARO80AF1 | ATATCTCGAGAATGTC AATTGTCGAACCAAG | pARO80-GAD1 |
| ARO80AR1 | ATATGGCGCCATTC AAAAACTCCACAAGTC | |
| ASG1AF1 | ATATCTCGAGAATGCT AAAAAAGGAAATGAAG | pASG1-GAD1 |
| ASG1AR1 | ATATGGCGCCAAATGG ATCTAAATATTCTAATCC | |
| CAT8AF1 | ATATCTCGAGAATGTC GATAAAGTTAGAACAACAG | pCAT8-GAD1 |
| CAT8AR1 | ATATGGCGCCTTTC CAGAAATGACTATCATTATGT | |
| CTA4AF1 | ATATCTCGAGAATGAC ATCTGAACATAAAGTATC | pCTA4-GAD1 |
| CTA4AR1 | ATATGGCGCCTCC ATAAAAATATCCATCATCC | |
| CTA7AF1 | ATATCTCGAGAATGGGT ACAGCAAGAGAACATC | pCTA7-GAD1 |
| CTA7AR1 | ATATGGCGCCAAAATCA ATGTTGAAGTCTGTCC | |
| CTF1-1 | ATATCTCGAGAATGACTG ATCAAATAAATAAAGTGG | pCTF1-GAD1 |
| CTF1AR1 | ATATGGCGCCATTC ATCATATGAAATAATGAATG | |
| CWT1AF1 | ATATCTCGAGAATGCTC TACCATGAGTACTCAAAA | pCWT1-GAD1 |
| CWT1AR1 | ATATGGCGCCAGGATCA ATGGGGATAAAATTACC | |
| CZF1AF1 | ATATCTCGAGAATGAGT TCAATACCCAATATCAA | pCZF1-GAD1 |
| CZF1AR1 | ATATGGCGCCTTACTT CTGTATTCAACAATACC | |
| DAL81AF1 | ATATCTCGAGAATGGATA ATCAATCACC AAAATTTT | pDAL81-GAD1 |
| DAL81AR1 | ATATGGCGCCTTTGGT TAGTTCGGGTGATTTTAC | |
| FCR1AF1 | ATATCTCGAGAATGCTG CACGATCATTC AATCC | pFCR1-GAD1 |
| FCR1AR1 | ATATGGCGCCAATATT GAAGAAAGGATCCAATG | |
| FGR17AF1 | ATATGTGACAATGCTGT CAAAATCTAGATCTTAC | pFGR17-GAD1 |
| FGR17AR1 | ATATGGCGCCTAAC ATATCAAGTATGCCTTCTTCT | |
| FGR27AF1 | ATATCTCGAGAATGTC CAGCTCCTATAGTTGAAACC | pFGR27-GAD1 |
| FGR27AR1 | ATATGGCGCCCAATTT GTCCACGGAAAAACAAATTA | |
| GAL4AF1 | ATATCTCGAGAATGCTG AAATAATGAAATCAAA | pGAL4-GAD1 |
| GAL4AR1 | ATATGGCGCCAACGTT AACAGTTTCATCGACC | |
| HAL9-1 | ATATCTCGAGAATGGAT CCTGCTTATGATATACAATC | pHAL9-GAD1 |
| HAL9AR1 | ATATGGCGCCGTATA AAAATATATCAGGAAAGTTC | |
| LEU3-1 | ATATCTCGAGAATGAATA ATAACGTCGCAAGTAGCC | pLEU3-GAD1 |
| LEU3AR1 | ATATGGCGCCACTTGT GTGAAAAACAAAATCGTTG | |
| LYS14AF1 | ATATCTCGAGAATGTC CACAATCACCATCTTCTTTA | pLYS14-GAD1 |
| LYS14AR1 | ATATGGCGCCGTATAT CAATGTATCATCATTTTCA | |
| LYS142AF1 | ATATCTCGAGAATGCTACT TCCAAGAGAGCTTAT | pLYS142-GAD1 |
| LYS142AR1 | ATATGGCGCCGTAGG CAACATTATCGATATGAATT | |
| LYS143AF1 | ATATCTCGAGAATGGCGT CAAATATTTCCAAAGAT | pLYS143-GAD1 |
| LYS143AR1 | ATATGGCGCCGTATG ATAACAAAATCCCTGTTCTC | |
| LYS144AF1 | ATATCTCGAGAATGGGTT CATCTAGCCCAAACC | pLYS144-GAD1 |
| LYS144AR1 | ATATGGCGCCTGAAAAT GGTATAATTTCCGAATC | |

| Primer | Sequenz 5' → 3' | Verwendung |
|---|---|-------------|
| Primer zur Herstellung der Plasmid-Bibliothek mit den artifiziell aktivierten <i>ZCFs</i> | | |
| ZCF36-21 | TCTAACTCGAGAAAAATGTC AATTGCCACCACCC | pMRR1-GAD1 |
| MRR1AR1 | AATCGGCGCCATTGGTAAAAAGTTGATCAAATGG | |
| PPR1AF1 | ATATGTCGACAATGCTGAATCACCATCACAACC | pPPR1-GAD1 |
| PPR1AR1 | ATATGGCGCCTTGT TTTGTTGGCAAAAAATTCATCC | |
| PUT3AF1 | ATATCTCGAGAATG GATTCCACAAGAGCCTTCGG | pPUT3-GAD1 |
| PUT3AR1 | ATATGGCGCCAGATTGATCCATGAAATCTTGAAAT | |
| RGT1AF1 | ATATCTCGAGAATGACAACAACAACAATAGCCAAT | pRGT1-GAD1 |
| RGT1AR1 | ATATGGCGCCTATCCAACCGTCTTTAAAATCTTGA | |
| SEF1AF1 | ATATCTCGAGAATGAAGTTTGAAAAAGGTAAAGTG | pSEF1-GAD1 |
| SEF1AR1 | ATATGGCGCCTTCTCTTGCATCATATTAACATC | |
| SEF2AF1 | ATATCTCGAGAATGACCACTATAACCAGTTAAGAA | pSEF2-GAD1 |
| SEF2AR1 | ATATGGCGCCGAATATAGATTCATTAGATTTCAA | |
| STB5AF1 | ATATCTCGAGAATGAGACCAATAGACTCCATAGTT | pSTB5-GAD1 |
| STB5AR1 | ATATGGCGCCAAAATTGTACATGAAATCAGTATCG | |
| SUC1-1 | ATATGTCGACAATGTCCAAAGGTAAAAGAGCACC | pSUC1-GAD1 |
| SUC1AR1 | ATATGGCGCCTTTTTGATAATCTGGTATGTA ACTG | |
| TAC1-9B | TCTCCTCGAGAATG GACACTTCACTGTCACTGG | pTAC1-GAD1 |
| TAC1AR1 | TTAAGGGGCCAATCCCCAAAT TATTGTCAAAG | |
| TEA1AF1 | ATATCTCGAGAATGTC AATCAATTCATCAACTTC | pTEA1-GAD1 |
| TEA1AR1 | ATATGGCGCCATTTTTCGAAT TAAATATATAATCA | |
| UGA3AF1 | ATATCTCGAGAATG ATAGTAACATTTAATTCAAGA | pUGA3-GAD1 |
| UGA3AR1 | ATATGGCGCCTGCAAAAT TATATCCCAACCC | |
| UGA32AF1 | ATATCTCGAGAATG TTTCTACGTATTCGATTTAAC | pUGA32-GAD1 |
| UGA32AR1 | ATATGGCGCCGCAAAATGAGATGTTCCAATTG | |
| UGA33AF1 | ATATCTCGAGAATG TCCTCACAATCCCCAAGAT | pUGA33-GAD1 |
| UGA33AR1 | ATATGGCGCCAATCATGGATATTTTCCAATTGAAA | |
| UME6AF1 | ATATCTCGAGAATG ATTACCCATATGGTTACAC | pUME6-GAD1 |
| UME6AR1 | ATATGGCGCCATCATTGGTTATATCATTACTTGAT | |
| UME7AF1 | ATATCTCGAGAATG GTATTTTCGATATACGGGTC | pUME7-GAD1 |
| UME7AR1 | ATATGGCGCCTTGAGTATTACTAGTTCTCAATCC | |
| UPC2-1 | ATATCTCGAGAATG ATGATGATGACAGTGAAACAAGAATC | pUPC2-GAD1 |
| UPC2AR1 | TAGTGGCGCCTTTCATATTCATAAACCCATTATC | |
| WAR1-1 | ATATCTCGAGAATG TCGGATACTACACCGAAAAACG | pWAR1-GAD1 |
| WAR1AR1 | ATATGGCGCCATTGTT CATGAAGAAA ACTTCATCA | |
| WOR2AF1 | ATATCTCGAGAATG ACACAATTACCTTCTGTTTC | pWOR2-GAD1 |
| WOR2AR1 | ATATGGCGCCTTTAAGTAAATCAGCCACTGAAAC | |
| ZCF1-1 | ATATCTCGAGAATG AGTTCCGCGTTACTTCCAATTTTC | pZCF1-GAD1 |
| ZCF1AR1 | ATATGGCGCCATAGTTG TAAAAATGGCCAATTGAA | |

2. Material und Methoden

| Primer | Sequenz 5' → 3' | Verwendung |
|---|---|-------------|
| Primer zur Herstellung der Plasmid-Bibliothek mit den artifiziell aktivierten <i>ZCFs</i> | | |
| ZCF2AF1 | ATAT GTCGACA ATGCTGGAAAAAATTAAGAGAGAA | pZCF2-GAD1 |
| ZCF2AR1 | ATAT GGCGCCT AAAAGTGAAGGAAAAGGATCAA | |
| ZCF3AF1 | ATAT CTCGAGA ATGAGTTGAGTTATAGATCG | pZCF3-GAD1 |
| ZCF3AR1 | ATAT GGCGCCT ACTGACCTCACATTACTGTC | |
| ZCF4AF1 | ATAT CTCGAGA ATGAACTATCTACTGTTGGG | pZCF4-GAD1 |
| ZCF4AR1 | ATAT GGCGCCT GGTGAATTATTCAGTTGATCAT | |
| ZCF5AF1 | ATAT CTCGAGA ATGGAAGTGAAGCTAGTGAC | pZCF5-GAD1 |
| ZCF5AR1 | ATAT GGCGCCT TTACTCTCTATATATTTAATCAAT | |
| ZCF6AF1 | ATAT CTCGAGA ATGAGTCAAGATCAAACCCAC | pZCF6-GAD1 |
| ZCF6AR1 | ATAT GGCGCCT TACACATAATTGTTTTGAATTGGC | |
| ZCF7AF1 | ATAT CTCGAGA ATGAATAACCATAACTTTATTTTT | pZCF7-GAD1 |
| ZCF7AR1 | ATAT GGCGCCT TGGGCCCTGTTAAGGGGAATTAC | |
| ZCF8AF1 | ATAT CTCGAGA ATGAAAGTAATCTATCTAATACT | pZCF8-GAD1 |
| ZCF8AR1 | ATAT GGCGCCT TCAAAGATATTTGGTTCAACACAA | |
| ZCF9AF1 | ATAT GTCGACA ATGCCTCTCGATAAATACTATCC | pZCF9-GAD1 |
| ZCF9AR1 | ATAT GGCGCCCCG AGTAGCACCTCCCATC | |
| ZCF10AF1 | ATAT CTCGAGA ATGCTGGAATCAGAGGACCC | pZCF10-GAD1 |
| ZCF10AR1 | ATAT GGCGCCT TTACGTTTCGGATTATGGTTAT | |
| ZCF11AF1 | ATAT CTCGAGA ATGAAGATTAACAGGAAAACATA | pZCF11-GAD1 |
| ZCF11AR1 | ATAT GGCGCCT AGTATTGGTAAAAAGTTCCCC | |
| ZCF12-1 | ATAT CTCGAGA ATGGGAGACTCGCCTCCATTAACGG | pZCF12-GAD1 |
| ZCF12AR1 | ATAT GGCGCCT TGCCTGGGATCAAAATCATTGATT | |
| ZCF13AF1 | ATAT CTCGAGA ATGGATAAGACAAATAGTCCAGG | pZCF13-GAD1 |
| ZCF13AR1 | ATAT GGCGCCT TAGAAGATCATTGAAATCACCATAA | |
| ZCF14AF1 | ATAT CTCGAGA ATGCCAATAACAAAAACAACAAC | pZCF14-GAD1 |
| ZCF14AR1 | ATAT GGCGCCT TTTTTCAATTGTGCCAATATTGAC | |
| ZCF15-1 | ATAT CTCGAGA ATGGATGCCGATTTAGAGAAAAAGAAC | pZCF15-GAD1 |
| ZCF15AR1 | ATAT GGCGCC ATTGGGTTTCACATCATATAAAATA | |
| ZCF16AF1 | ATAT CTCGAGA ATGTCAAAGAAAAATAAAAAATCT | pZCF16-GAD1 |
| ZCF16AR1 | ATAT GGCGCC ATATTGGGGACTTTGAGATGAAG | |
| ZCF17AF1 | ATAT GTCGACA ATGACGAAAACCTACAGTCCAAAG | pZCF17-GAD1 |
| ZCF17AR1 | ATAT GGCGCCT CTATTTCAGCGAAAACAAGCTATC | |
| ZCF18AF1 | ATAT CTCGAGA ATGTCAGTACCACTCACCAAAG | pZCF18-GAD1 |
| ZCF18AR1 | ATAT GGCGCCG CAGTTCAGGTTCTGACCAAC | |
| ZCF19-1 | ATAT CTCGAGA ATGTTTTCAATACCACCTGATACAAC | pZCF19-GAD1 |
| ZCF19AR1 | ATAT GGCGCCT TATAAAATTTCTTTTAAACAAGTT | |
| ZCF20AF1 | ATAT CTCGAGA ATGGGTCCTATAGCTGTAAAAATG | pZCF20-GAD1 |
| ZCF20AR1 | ATAT GGCGCCT CTTGAAAGTAGTTTTCTATATTT | |

| Primer | Sequenz 5' → 3' | Verwendung |
|---|--|-------------|
| Primer zur Herstellung der Plasmid-Bibliothek mit den artifiziell aktivierten <i>ZCFs</i> | | |
| ZCF21AF1 | ATATCTCGAGAATGATGGATATTTATCAGAAGGC | pZCF21-GAD1 |
| ZCF21AR1 | ATATGGCGCCAGTGATCAATTTGGAAATGGTAG | |
| ZCF22AF1 | ATATCTCGAGAATGAATTCAGAAATATCAACGAAT | pZCF22-GAD1 |
| ZCF22AR1 | ATATGGCGCCAAAGGCGACACTTTCGAGGATT | |
| ZCF23AF1 | ATATCTCGAGAATGACTAAAAAGTTAACTCCAC | pZCF23-GAD1 |
| ZCF23AR1 | ATATGGCGCCTACAATTGCAAGAATTGGCC | |
| ZCF24AF1 | ATATCTCGAGAATGCCAATGAGAAATAGAAAAATC | pZCF24-GAD1 |
| ZCF24AR1 | ATATGGCGCCTATATCCAGCCATTTCTGGAGATT | |
| ZCF25AF1 | ATATCTCGAGAATGGATATAGAAACCACTAAAGA | pZCF25-GAD1 |
| ZCF25AR1 | ATATGGCGCCTTGCCCTGAATCACTTCTTCC | |
| ZCF26-1 | ATATCTCGAGAATGGATGTTGATTTAGATAAACG | pZCF26-GAD1 |
| ZCF26AR1 | ATATGGCGCCTTTGGTGTATATAATATATCGTTC | |
| ZCF27-1 | ATATGTTCGACAATGAGTACACCGGTGAAAAATGATTC | pZCF27-GAD1 |
| ZCF27AR1 | ATATGGCGCCTTGTTGTTGAGTTGAAAAGTGTGT | |
| ZCF28AF1 | ATATCTCGAGAATGAATCAAGATTCAACGACTTTG | pZCF28-GAD1 |
| ZCF28AR1 | ATATGGCGCCATTTATTCCTTCACGACCAAATCG | |
| ZCF29AF1 | ATATGTTCGACAATGGGTCAAAAAAGGAACAGAATT | pZCF29-GAD1 |
| ZCF29AR1 | ATATGGCGCCGGAAAAATCTTTGAACAACATCATC | |
| ZCF30AF1 | ATATCTCGAGAATGCCACCAAAGGAGGACAAAAAG | pZCF30-GAD1 |
| ZCF30AR1 | ATATGGCGCCAGGATGCCCATGGTTTGACCCTG | |
| ZCF31-1 | ATATCTCGAGAATGTTTATCTCACATATGTCTGCGCC | pZCF31-GAD1 |
| ZCF31AR1 | ATATGGCGCCTTCCGGTTTTATTTTTGTAAAGTTT | |
| ZCF32AF1 | ATATCTCGAGAATGGAGGAAAAGAAGAAAATCCG | pZCF32-GAD1 |
| ZCF32AR1 | ATATGGCGCCCAACAATGTTAGATCAACACCAAT | |
| ZCF34-1 | ATATCTCGAGAATGACCAAACGTGATCGTACAATC | pZCF34-GAD1 |
| ZCF34AR1 | ATATGGCGCCCAGATTTTGAGGAAATCCCAATAA | |
| ZCF35AF1 | ATATCTCGAGAATGAATAATACTACCTCATCAGCG | pZCF35-GAD1 |
| ZCF35AR1 | ATATGGCGCCTTGATTAAGAATTTGTCTAGAGGC | |
| ZCF37AF1 | ATATCTCGAGAATGGCAAAGAAGAACTAAATTCA | pZCF37-GAD1 |
| ZCF37AR1 | ATATGGCGCCATCACTTACTGGGTGAATGTAGC | |
| ZCF38-1 | ATATGTTCGACAATGTCAAATTCAACAACACTACACC | pZCF38-GAD1 |
| ZCF38AR1 | ATATGGCGCCTATGTTTCATAGCATCATTCCAGT | |
| ZCF39AF1 | ATATCTCGAGAATGTCTACCGATACTAACTGCAA | pZCF39-GAD1 |
| ZCF39AR1 | ATATGGCGCCTGAAAATCTATTTAAATCGGTACTT | |
| ZNC1AF1 | ATATCTCGAGAATGCTGGATGTTAATGATACAC | pZNC1-GAD1 |
| ZNC1AR1 | ATATGGCGCCTATATTTTGCTCATTTAAATCCTAAA | |
| 1604AF1 | ATATCTCGAGAATGAAAGAAAGGAAAACAGAAGA | p1604-GAD1 |
| 1604AR1 | ATATGGCGCCAACACATTTTGCTATTTCTTTTGT | |

2. Material und Methoden

| Primer | Sequenz 5' → 3' | Verwendung |
|---|--|---|
| Primer zur Herstellung der Plasmid-Bibliothek mit den artifiziell aktivierten <i>ZCFs</i> | | |
| 2230AF1 | ATAT CTCGAGA ATGTCACGACATCAATATGATTTA | p2230-GAD1 |
| 2230AR1 | ATAT GGCGCC AAATCCTTGTAGACTTGATTTATTA | |
| 4998AF1 | ATAT GTCGACA ATGACACCAAGTTCAACTAAAAAA | p4998-GAD1 |
| 4998AR1 | ATAT GGCGCC TAAACGAAATCCTTCTGTATCAAAA | |
| 6781AF1 | ATAT CTCGAGA ATGTCTAAAAGAAGAACGGTGAAA | p6781-GAD1 |
| 6781AR1 | ATAT GGCGCC ATTAACATCTAGTTCAGGAAATTCT | |
| 6888AF1 | ATAT CTCGAGA ATGGCAGCCAAGAAGGGACGC | p6888-GAD1 |
| 6888AR1 | ATAT GGCGCC TATGCATTTGTAGTAAAGTGTGG | |
| Primer zur Herstellung weiterer Plasmide und PCR-Sonden | | |
| ADH1.term.1 | AAGGTGCTGAACCAAACCTGTGGTGA | Herstellung der 5' <i>ADH1</i> -Sonde |
| ADH1.term.2 | GACAATCTTGATTGGGCATTTGATC | |
| prom.adh1.fwd | TGATAGAGACCCAATGCAAAGCC | Herstellung der 3' <i>ADH1</i> -Sonde |
| prom.adh1.rev | GGCAGGAGACGGAAACTCTTTAGG | |
| ALS1-5'FW | TATAGGGCGAATT GAGCTCT TCCAACCTGGTATTGCCA | Herstellung des <i>ALS1</i> -KO-Plasmids |
| ALS1-5'RV | AGAGCGGCCGCC ACCGCGG ACAATTGGTAGTTGTTTGAACAA | |
| ALS1-3'FW | AGTATAGGAACCT CCTCGAG TATGATCACCTTTTTGGCTTGAT | |
| ALS1-3'RV | AAAAGCTGGGTAC CGGGCC CTGTTTGCAATCCGTGTGT | |
| AOX2-5'FW | TATAGGGCGAATT GAGCTCT TAAATGCCCATGTGCAA | Herstellung des <i>AOX2</i> -KO-Plasmids |
| AOX2-5'RV | AGAGCGGCCGCC ACCGCGG TGTAATTGAATAAATCTATATCG | |
| AOX2-3'FW | AGTATAGGAACCT CCTCGAG GATTTGTTTGTGTTTGC | |
| AOX2-3'RV | AAAAGCTGGGTAC CGGGCC CTGTGGTACTCAAGAACTTATCTG | |
| CDR1F | GAT CGGGCC CTCGTTACTCAATAAGTAT | Herstellung des <i>CDR1</i> -KO-Plasmids |
| CDR1R | AG CTCTCGAG TTCTTTTTGACCTTTTAAAG | |
| 3'CDR1-FW | CATT ACCGCGG CAGTTTGTTTTTTGGACATGGTGG | |
| 3'CDR1-RV | CATT AGAGCT CGATCATAATATTGCTTAACCATTGTC | |
| CTA4-5'FW | CATT AGAGCT CTGTTTTAAATGAGTGGTTTGC | Herstellung des <i>CTA4</i> -KO-Plasmids |
| CTA4-5'RV | AA ACCGCGG TATTCCAAATGGTTCCGA | |
| CTA4-3'FW | GTTAAT CTCGAGA ATGAATCACTTGTAATTTCCAACC | |
| CTA4-3'RV | CATT AGGGCC CTATGCCAAATCCGATGCTGA | |
| CTA4AF1 | ATAT CTCGAGA ATGACATCTGAACATAAAGTATC | Herstellung des Plasmids zur Überexpression von <i>CTA4</i> |
| CTA4-2 | ATAT GGATC CTATCCATAAAAAATATCCATCATCC | |
| GST2-5'FW | TATAGGGCGAATT GAGCTC GTGCTGTTGAATGGATTGGT | Herstellung des <i>GST2</i> -KO-Plasmids |
| GST2-5'RV | AGAGCGGCCGCC ACCGCGG TGTGCTGCTAGTAGTATAAGTAGA | |
| GST2-3'FW | AGTATAGGAACCT CCTCGAG TTGATCTTTTACTGATTTGTAGGGA | |
| GST2-3'RV | AAAAGCTGGGTAC CGGGCC CTTTGTCTTATGACTCCATCG | |
| NB-Probe-ALS1-FW | GATGGTATTAGTGCTACATCTTCTGA | Herstellung der <i>ALS1</i> -Sonde |
| NB-Probe-ALS1-RV | AGGACAATAATGTGATCAAACCG | |

| Primer | Sequenz 5' → 3' | Verwendung |
|--|--|--|
| Primer zur Herstellung weiterer Plasmide und PCR-Sonden | | |
| NB-Probe-AOX2-FW | CTTACTGCTTCGCTTTACAAAC | Herstellung der AOX2-Sonde |
| NB-Probe-AOX2-RV | CTTGTTTTTCCCAACCAGTTG | |
| NB-Probe-CDR1-FW | CCAAGAGATAATGATCCAGAAGCG | Herstellung der CDR1-Sonde |
| NB-Probe-CDR1-RV | TTTCTCTCTGTTACCCTTTGGA | |
| NB-ERG11-FW | AGAAAAAAGCTCATGGGGTTGC | Herstellung der ERG11-Sonde |
| NB-ERG11-RV | CATACAAGTTTCTCTTTTTTCCC | |
| NB-Probe-GST2-FW | ACCAATTC AATTCTACACATACG | Herstellung der GST2-Sonde |
| NB-Probe-GST2-RV | TTCTCTGGGACATTGACACCTT | |
| NB-MDR1-FW | TGGGTGGATTCTTTGCTAGT | Herstellung der MDR1-Sonde |
| NB-MDR1-RV | GCATACTTAGATCTTGCTCTCCAAC | |
| NB-Probe-PDR16-FW | CTTCTTCATGGGAAATCACCA | Herstellung der PDR16-Sonde |
| NB-Probe-PDR16-RV | ATGGATCCAACGGGATGAAT | |
| NB-Probe-SOD3-FW | CCATGTTGCTTATGTAAACGGG | Herstellung der SOD3-Sonde |
| NB-Probe-SOD3-RV | AGTATCTTGACTCTGCCTCAGC | |
| NB-Probe-344-FW | CGAAATTAATTGGCGTAACTTACT | Herstellung der orf19.344-Sonde |
| NB-Probe-344-RV | CTATACGAATCGGACATTTTTCT | |
| NB-Probe-5777-FW | CTACCATTTGCCTATGTGATTCG | Herstellung der orf19.5777-Sonde |
| NB-Probe-5777-RV | TGTAAGTCTTCAGCTATCTTCTC | |
| NB-Probe-7042-FW | CTAAAGTATCACCAGCAAGTACTACTA | Herstellung der orf19.7042-Sonde |
| NB-Probe-7042-RV | CTCTTTCAATATCGTCATCTTCC | |
| PDR16-5'FW | TATAGGGCGAATTGG GAGCT CTGGCAACATTTTTTTTTCCG | Herstellung des PDR16-KO-Plasmids |
| PDR16-5'RV | AGAGCGGCCGCC ACCGCGGA AGTATGGGTGGACAGTCAAAG | |
| PDR16-3'FW | AGTATAGGAACCT CTCGAGA ATGATACATGTACCTTTATAT | |
| PDR16-3'RV | AAAAGCTGGGTACC GGGCC CTAGTCAATCAACTAATCAATCAG | |
| SOD3-5'FW | TATAGGGCGAATTGG GAGCT CGGAAACTTACCATGAATGTGTT | Herstellung des SOD3-KO-Plasmids |
| SOD3-5'RV | AGAGCGGCCGCC ACCGGG CGTGGTTGATAAGAGAAGAGA | |
| SOD3-3'FW | AGTATAGGAACCT CTCGAG GTGTAATACGTATTATAGTGCGCC | |
| SOD3-3'RV | AAAAGCTGGGTACC GGGCC CCAGCAATCCCAATACCAAT | |
| STB5-5'FW | CATTAG GAGCT CAAAGTATTCGTCAGCGGGTGT | Herstellung des STB5-KO-Plasmids |
| STB5-5'RV | AAAC CCGGG GTGAGCAAAGGTTGTAGGGAA | |
| STB5-3'FW | GTTAAT CTCGAG TTCTTGTATTATTAGTACTGTC | |
| STB5-3'RV | CATTAG GGGCC GAAACTAAAGGTGTACTAGCAGC | |
| STB5AF1 | ATAT CTCGAGA ATGAGACCAATAGACTCCATAGTT | Herstellung des Plasmids zur Überexpression von STB5 |
| STB5-2 | ATAT GGATC CTCAAAAATTGTACATGAAATCAGTATCG | |
| ZCF34-5'FW | CATTAG GAGCT CCATGTCTTTACGTGAACGA | Herstellung des ZCF34-KO-Plasmids (MRR2-Deletion) |
| ZCF34-5'RV | AAAC CCGGG CGGAAGAAGCTATTGGTT | |
| ZCF34-3'FW_ivR | AAAAGCTGGGTACC CTCGAG ACCAAATCTTCCATGCCAAA | |
| ZCF34-3'RV_ivR | AGTATAGGAACCT GGGCC CTATTGGCCCATGGAGAGTTA | |

2. Material und Methoden

| Primer | Sequenz 5' → 3' | Verwendung |
|---|--|---|
| Primer zur Herstellung weiterer Plasmide und PCR-Sonden | | |
| ZCF34-1 | ATAT CTCGAGA ATGACCAAACGTGATCGTACAATC | Herstellung des Plasmids zur Überexpression von <i>ZCF34 (MRR2)</i> |
| ZCF34-2 | ATAT GGATCCT TACGAGATTTTGAGGAAATCCCAAT | |
| ZNC1-5'FW | CATTAG AGCTCT TAGTTGTACTCTGTCCCACC | Herstellung des <i>ZNC1</i> -KO-Plasmids |
| ZNC1-5'RV | AAACCC GGCGG CAACTATTTGTGAGTGTGAA | |
| ZNC1-3'FW | GTTAATCT CGAGTGCT GGAAGAGGTTTTGAATT | |
| ZNC1-3'RV | CATTAG GGCCCG GAATTTTCAATTTGCCTTCG | |
| ZNC1AF1 | ATAT CTCGAGA ATGCTGGATGTTAATGATACAC | Herstellung des Plasmids zur Überexpression von <i>ZNC1</i> |
| ZNC1-2 | ATAT TGATCATT TATATATTTTGTCTAATAATCCTAAAG | |
| 19.344-5'FW | TATAGGGCGAATT GGAGCTC AGTGCGTAGAAATCACAAAAAAG | Herstellung des orf19.344-KO-Plasmids |
| 19.344-5'RV | AGAGCGGCCGCC ACCGCGG TGTTTATATACAAATTAGAGGAAA | |
| 19.344-3'FW | AGTATAGGAAC TCCTCGAG AGTGTTGTATCAGGGATACGA | |
| 19.344-3'RV | AAAAGCTGGGTAC CGGGCCCA AGAACCATATTCACCACCG | |
| orf19.5777-5'FW | TATAGGGCGAATT GGAGCTCA ATTGATAAGCTGCACCTCCT | Herstellung des orf19.5777-KO-Plasmids |
| orf19.5777-5'RV | AGAGCGGCCGCC ACCGCGGA ATACTTAGTAGGGGGTGGTT | |
| orf19.5777-3'FW | AGTATAGGAAC TCCTCGAG GATAAAATTTGTAAAACGATAGAC | |
| orf19.5777-3'RV | AAAAGCTGGGTAC CGGGCCCT GGCAAAATCATACTTCCTAC | |
| orf19.7042-5'FW | TATAGGGCGAATT GGAGCTCG TGGTGGTGGTAGTAAAAATT | Herstellung des orf19.7042-KO-Plasmids |
| orf19.7042-5'RV | AGAGCGGCCGCC ACCGCGGT TAAACAAGAAGAAATATAGAGTTGA | |
| orf19.7042-3'FW | AGTATAGGAAC TCCTCGAG GATATGTGTGCGCTAATCTGAGT | |
| orf19.7042-3'RV | AAAAGCTGGGTAC CGGGCCCA ATCCTATCCATTTTAGGGT | |

2.4. Herstellung von genetisch veränderten *C.-albicans*-Stämmen

Im Folgenden wird die genetische Manipulation von *C. albicans*, durch das Einbringen von Fremd-DNA (Transformation), am Beispiel der Herstellung der Genombibliothek mit künstlich aktivierten Zink-Cluster-Transkriptionsfaktoren beschrieben. Mithilfe der Transformation können Gene sowohl verändert als auch deletiert werden. Außerdem sind alle in dieser Arbeit hergestellten bzw. verwendeten *C.-albicans*-Stämme tabellarisch aufgelistet.

2.4.1. Transformation von *C. albicans*

Die Plasmide der oben beschriebenen Bibliothek wurden in den meisten Fällen mit den Restriktionsendonukleasen *Apal* und *SacII* gespalten. Dies bewirkte die Separierung der in Abbildung 1 dargestellten DNA-Kassette, welche anschließend mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und folgend aus dem Gel aufgereinigt wurde (Genclean-Kit). Diese Kassette ist mit den *ADH1*-Sequenzen von *C. albicans* flankiert. Folglich wurde sie nach der Transformation über den Prozess der homologen Rekombination in den *ADH1*-Lokus integriert. Als Ausgangsstamm zur Herstellung der Bibliothek wurde der Wildtypstamm SC5314 verwendet. Um diesen auf die Transformation mit den linearisierten DNA-Fragmenten vorzubereiten, wurde er mit der Lithiumacetat-Methode kompetent gemacht [Köhler *et al.*, 1997]. Die Transformation erfolgte anschließend mittels Elektroporation bei einer Stromstärke von 1,8 kV. Hierzu wurden Elektroporationsküvetten mit 0,2 cm Durchmesser von der Firma Peqlab verwendet. Die spätere Selektion fand auf Nourseothricin-haltigen YPD-Agarplatten (200 µg/ml) statt. Wie in Abbildung 1 ersichtlich, wurde hinter den künstlich aktivierten Transkriptionsfaktoren und dem *ACT1*-Terminator der *caSAT1*-Marker angefügt, welcher für ein Nourseothricin-Resistenzgen kodiert. Dieses verlieh den erfolgreich transformierten *C.-albicans*-Zellen Resistenz gegen das Antibiotikum, wodurch sie sich von ihrem Ausgangsstamm unterschieden.

2.4.2. Isolierung genomischer DNA und Southern Hybridisierung

Zur Überprüfung der korrekten Integration in das Genom wurden zunächst einzelne Transformanten in YPD-Medium überführt und über Nacht angezchtet. Am darauffolgenden Tag erfolgte die Isolierung der genomischen DNA aus den Zellen der Übernachtskultur mit der Phenol-Chloroform-Methode [Reuß *et al.*, 2004]. Im Anschluss fand die Spaltung der genomischen DNA statt. Hierbei wurden die Restriktionsenzyme so gewählt, dass sich der veränderte Locus, im Fall der Genombibliothek der *ADH1*-Lokus, auf DNA-Fragmenten mit Größen der Spannweite des 1 kb-*Ladders* (Invitrogen) befand. In diesem Falle wurde das Enzym *SpeI* verwendet. Dadurch befand sich das wildtypische *ADH1*-Allel auf einem knapp 3 kb großen Fragment, welches sich durch die

Integration der DNA-Kassette veränderte. Anschließend wurden die DNA-Fragmente der Größe nach aufgetrennt, was standardisiert durch Agarose-Gelelektrophorese passierte. Mittels Southern Hybridisierung wurden diese Fragmente vom Gel auf eine Nylonmembran (Porenweite 0,45 µm; Nytran SuPerCharge der Firma Schleicher und Schuell oder Whatman), unter Verwendung eines Vakuumbloiters bei 0,05 bar, übertragen [Southern, 1975]. Nach dem Transfer wurde 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 DNA-Sonden wurden so gewählt, dass sie mit einer geeigneten Stelle des veränderten DNA-Lokus hybridisierten. Im Fall der Bibliothek waren dies ca. 500 bp aus dem *ADH1*-Promotor und entsprechende große DNA-Abschnitte der *downstream*-Region desselben Lokus. Die DNA-Sonden wurden mit einer Peroxidase gekoppelt. Durch Zugabe der Detektionslösungen des Kits, welche sowohl Substrat für die Peroxidase, als auch bei Oxidation Licht produzierendes Luminol enthielten, erfolgte die enzymatische Reaktion. Somit konnten die entsprechenden DNA-Banden auf der Membran durch Lichtabgabe auf einen ECL-Film (Hyperfilm, Amersham) übertragen und anschließend mit einem Tiscentwickler sichtbar gemacht werden. Nach Bestätigung der korrekten Integration der künstlich aktivierten Zink-Cluster-Transkriptionsfaktoren in den *ADH1*-Lokus erfolgte der Nachweis der Expression der Fusionsproteine.

2.4.3. Proteinextraktion und Western Blot Analysen

Die Proteinisolierung erfolgte während des logarithmischen Wachstums der entsprechenden *C.-albicans*-Kulturen. Hierzu wurden die Zellen mit Hilfe von Glasperlen mechanisch aufgeschlossen. Die Denaturierung des Zelllysats erfolgte anschließend mit diversen Puffern, die u. a. β-Mercaptoethanol zur Reduktion der Disulfidbrücken enthielten. Darauffolgend wurden die Proteine der Zellextrakte mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese der Größe nach aufgetrennt. Die Übertragung der Proteinbanden aus dem Gel auf eine Nitrocellulosemembran (0,2 µm Porenweite; Schleicher und Schuell) geschah unter der Zuhilfenahme eines Semi-Dry Blotters (1 h; 350 mA). Die Koppelung der Fusionsproteine mit einem dreifachen HA-Epitop (siehe

Abbildung 1) ermöglichte den Nachweis der entsprechenden Proteinbanden auf den Nitrocellulosemembranen mit einem Anti-HA-Peroxidase-Antikörper (3F10 Roche), dessen Anwendung gemäß den Herstellerangaben erfolgte. Konnte das entsprechende Protein in zwei unabhängig hergestellten Stämmen nachgewiesen werden, wurden diese mit Glycerin bei -80°C konserviert. Die Herstellung aller Stämme dieser Arbeit erfolgte nach diesem Prinzip, wobei die Proteinexpression nur bei Stämmen der Genombibliothek nachgewiesen wurde.

2.4.4. Herstellung von Deletionsmutanten, Überexpressions- und Reporterstämmen

Die Herstellung von *Knock-out*-Mutanten erfolgte mit der in Reuß *et al.*, 2004 beschriebenen und nach Sasse *et al.*, 2011 veränderten *SAT1-Flipper*-Strategie. Hierzu wurden *Knock-out*-Kassetten, wie in Abbildung 2 dargestellt, in das Genom integriert. Durch den induzierbaren Promotor und die *caFLP* konnte die Kasette, wie in Abschnitt 1.7. beschrieben, recycelt und zur Deletion des zweiten Allels verwendet werden. In *Candida*-Stämmen, die bestimmte Zink-Cluster-Transkriptionsfaktoren überexprimieren, wurden diese schlicht unter die Kontrolle des *ADH1*-Promotors gestellt. Deren Kasette (Abbildung 3) war folglich ähnlich wie die der künstlich aktivierten Transkriptionsfaktoren und konnte in den gleichen Locus integriert werden. Der Nachweis geschah demnach mit den zuvor beschriebenen Methoden, unter Verwendung derselben DNA-Sonden. Reporterstämme wurden ebenfalls mit der *SAT1-Flipper*-Strategie erzeugt. Das Recycling des Markers ermöglichte in diesem Fall das spätere Einbringen von Konstrukten, die den gleichen Marker enthielten. Eine entsprechende Reporter-kasette ist in Abbildung 4 dargestellt.

2.4.5. Hergestellte/verwendete *C.-albicans*-Stämme

Alle in dieser Arbeit hergestellten bzw. verwendeten *C.-albicans*-Stämme, deren Ausgangsstämme, sowie die entsprechenden Genotypen und Referenzen sind in Tabelle 3 aufgelistet.

Tab. 3: In dieser Arbeit verwendete *C.-albicans*-Stämme (AGM: AG von Prof. Dr. J. Morschhäuser)

| Stamm | Ausgangsstamm | Relevante Eigenschaften oder Genotyp ¹ | Referenz |
|------------------------|---------------|---|-----------------------------------|
| SC5314 | | Wildtypstamm (WT) | Gillum <i>et al.</i> , 1984 |
| Stämme der Vorversuche | | | |
| SCMRR1DBH2 A/B | SC5314 | <i>ADH1/adh1::P_{ADH1}-MRR1DBD-GAL4AD-3xHA-caSAT1</i> | AGM |
| SCMRR1E2 A/B | SC5314 | <i>ADH1/adh1::P_{ADH1}-MRR1-caSAT1</i> | diese Arbeit |
| SCMRR1E3 A/B | SC5314 | <i>ADH1/adh1::P_{ADH1}-MRR1^(P683S)-caSAT1</i> | AGM |
| SCMRR1EH2 A/B | SC5314 | <i>ADH1/adh1::P_{ADH1}-MRR1-3xHA-caSAT1</i> | diese Arbeit |
| SCMRR1GAD1 A/B | SC5314 | <i>ADH1/adh1::P_{ADH1}-MRR1-GAL4AD-3xHA-caSAT1</i> | diese Arbeit |
| SCZCF36M4 A/B | SC5314 | <i>mrr1Δ::FRT/mrr1Δ::FRT</i> | Morschhäuser <i>et al.</i> , 2007 |
| SCΔzcf36MDBH2 A/B | SCZCF36M4 A/B | <i>mrr1Δ::FRT/mrr1Δ::FRT ADH1/adh1::P_{ADH1}-MRR1DBD-GAL4AD-3xHA-caSAT1</i> | Schubert <i>et al.</i> , 2011b |
| SCΔzcf36MGAD1 A/B | SCZCF36M4 A/B | <i>mrr1Δ::FRT/mrr1Δ::FRT ADH1/adh1::P_{ADH1}-MRR1-GAL4AD-3xHA-caSAT1</i> | diese Arbeit |
| SCTAC1DBH1 A/B | SC5314 | <i>ADH1/adh1::P_{ADH1}-TAC1DBD-GAL4AD-3xHA-caSAT1</i> | diese Arbeit |
| SCTAC1E2 A/B | SC5314 | <i>ADH1/adh1::P_{ADH1}-TAC1-caSAT1</i> | diese Arbeit |
| SCTAC1E1 A/B | SC5314 | <i>ADH1/adh1::P_{ADH1}-TAC1^(G980E)-caSAT1</i> | diese Arbeit |
| SCTAC1GAD1 A/B | SC5314 | <i>ADH1/adh1::P_{ADH1}-TAC1-GAL4AD-3xHA-caSAT1</i> | diese Arbeit |
| SCTAC1M1 A | SC5314 | <i>tac1-1Δ::caSAT1-FLIP/TAC1-2</i> | diese Arbeit |
| SCTAC1M1 B | SC5314 | <i>TAC1-1/tac1-2Δ::caSAT1-FLIP</i> | diese Arbeit |
| SCTAC1M2 A | SCTAC1M1 A | <i>tac1-1Δ::FRT/TAC1-2</i> | diese Arbeit |
| SCTAC1M2 B | SCTAC1M1 B | <i>TAC1-1/tac1-2Δ::FRT</i> | diese Arbeit |
| SCTAC1M3 A | SCTAC1M2 A | <i>tac1-1Δ::FRT/tac1-2Δ::caSAT1-FLIP</i> | diese Arbeit |

2.4. Herstellung von genetisch veränderten C.-albicans-Stämmen

| Stamm | Ausgangs-stamm | Relevante Eigenschaften oder Genotyp ¹ | Referenz |
|--|----------------|---|------------------------------|
| Stämme der Vorversuche | | | |
| SCTAC1M3 B | SCTAC1M2 B | <i>tac1-1Δ::caSAT1-FLIP/tac1-2Δ::FRT</i> | diese Arbeit |
| SCTAC1M4 A | SCTAC1M3 A | <i>tac1-1Δ::FRT/tac1-2Δ::FRT</i> | diese Arbeit |
| SCTAC1M4 B | SCTAC1M3 B | <i>tac1-1Δ::FRT/tac1-2Δ::FRT</i> | diese Arbeit |
| SCΔ <i>tac1</i> TDBH1 A/B | SCZCF36M4 A/B | <i>tac1Δ::FRT/tac1Δ::FRT</i> <i>ADH1/adh1::P_{ADH1}-TAC1DBD-GAL4AD-3xHA-caSAT1</i> | diese Arbeit |
| SCΔ <i>tac1</i> TGAD1 A/B | SCZCF36M4 A/B | <i>tac1Δ::FRT/tac1Δ::FRT</i> <i>ADH1/adh1::P_{ADH1}-TAC1-GAL4AD-3xHA-caSAT1</i> | diese Arbeit |
| SCUPC2DBH1 A/B | SC5314 | <i>ADH1/adh1::P_{ADH1}-UPC2DBD-GAL4AD-3xHA-caSAT1</i> | diese Arbeit |
| SCUPC2E2 A/B | SC5314 | <i>ADH1/adh1::P_{ADH1}-UPC2-caSAT1</i> | diese Arbeit |
| SCUPC2E1 A/B | SC5314 | <i>ADH1/adh1::P_{ADH1}-UPC2^(G648D)-caSAT1</i> | diese Arbeit |
| SCUPC2GAD1 A/B | SC5314 | <i>ADH1/adh1::P_{ADH1}-UPC2-GAL4AD-3xHA-caSAT1</i> | diese Arbeit |
| UPC2M4 A/B | UPC2M3 A/B | <i>upc2Δ::FRT/upc2Δ::FRT</i> | Dunkel <i>et al.</i> , 2008b |
| SCΔ <i>upc2</i> UDBH1 A/B | UPC2M4 A/B | <i>upc2Δ::FRT/upc2Δ::FRT</i> <i>ADH1/adh1::P_{ADH1}-UPC2DBD-GAL4AD-3xHA-caSAT1</i> | diese Arbeit |
| SCΔ <i>upc2</i> UGAD1 A/B | UPC2M4 A/B | <i>upc2Δ::FRT/upc2Δ::FRT</i> <i>ADH1/adh1::P_{ADH1}-UPC2-GAL4AD-3xHA-caSAT1</i> | diese Arbeit |
| Bibliothek der artifiziell aktivierten Zink-Cluster-Transkriptionsfaktoren (ZCF*) | | | |
| SCZCFGAD1 A/B | SC5314 | <i>ADH1/adh1::ZCF-GAL4AD-3xHA-caSAT1</i> | diese Arbeit |
| Überexpressions- und Deletionsmutanten: 4 Zink-Cluster-Transkriptionsfaktor-Kandidaten zur genaueren Funktionsanalyse Gemeinsam hochregulierte Gene der artifiziell aktivierten ZCF-Kandidaten | | | |
| SCCTA4E1 A/B | SC5314 | <i>ADH1/adh1::P_{ADH1}-CTA4-caSAT1</i> | diese Arbeit |
| SCCTA4M1 A/B | SC5314 | <i>CTA4/cta4Δ::caSAT1-FLIP</i> | diese Arbeit |
| SCCTA4M2 A/B | SCCTA4M1 A/B | <i>CTA4/cta4Δ::FRT</i> | diese Arbeit |
| SCCTA4M3 A/B | SCCTA4M2 A/B | <i>cta4Δ::caSAT1-FLIP/cta4Δ::FRT</i> | diese Arbeit |
| SCCTA4M4 A/B | SCCTA4M3 A/B | <i>cta4Δ::FRT/cta4Δ::FRT</i> | diese Arbeit |
| SCSTB5E1 A/B | SC5314 | <i>ADH1/adh1::P_{ADH1}-STB5-caSAT1</i> | diese Arbeit |

2. Material und Methoden

| Stamm | Ausgangs- stamm | Relevante Eigenschaften oder Genotyp ¹ | Referenz |
|---|--------------------|---|--------------|
| Überexpressions- und Deletionsmutanten: 4 Zink-Cluster-Transkriptionsfaktor-Kandidaten zur genaueren Funktionsanalyse Gemeinsam hochregulierte Gene der artifiziiell aktivierten ZCF-Kandidaten | | | |
| SCSTB5M1 A | SC5314 | <i>stb5-1Δ::caSAT1-FLIP/STB5-2</i> | diese Arbeit |
| SCSTB5M1 B | SC5314 | <i>STB5-1/stb5-2Δ::caSAT1-FLIP</i> | diese Arbeit |
| SCSTB5M2 A | SCSTB5M1 A | <i>stb5-1Δ::FRT/STB5-2</i> | diese Arbeit |
| SCSTB5M2 B | SCSTB5M1 B | <i>STB5-1/stb5-2Δ::FRT</i> | diese Arbeit |
| SCSTB5M3 A | SCSTB5M2 A | <i>stb5-1Δ::FRT/stb5-2Δ::caSAT1-FLIP</i> | diese Arbeit |
| SCSTB5M3 B | SCSTB5M2 B | <i>stb5-1Δ::caSAT1-FLIP/stb5-2Δ::FRT</i> | diese Arbeit |
| SCSTB5M4 A | SCSTB5M3 A | <i>stb5-1Δ::FRT/stb5-2Δ::FRT</i> | diese Arbeit |
| SCSTB5M4 B | SCSTB5M3 B | <i>stb5-1Δ::FRT/stb5-2Δ::FRT</i> | diese Arbeit |
| SCZCF34E1 A/B | SC5314 | <i>ADH1/adh1::P_{ADH1}-MRR2-caSAT1</i> | diese Arbeit |
| SCZCF34M1 A/B | SC5314 | <i>MRR2/mrr2Δ::caSAT1-FLIP</i> | diese Arbeit |
| SCZCF34M2 A/B | SCZCF34M1 A/B | <i>MRR2/mrr2Δ::FRT</i> | diese Arbeit |
| SCZCF34M3 A/B | SCZCF34M2 A/B | <i>mrr2Δ::caSAT1-FLIP/mrr2Δ::FRT</i> | diese Arbeit |
| SCZCF34M4 A/B | SCZCF34M3 A/B | <i>mrr2Δ::FRT/mrr2Δ::FRT</i> | diese Arbeit |
| SCZNC1E1 A/B | SC5314 | <i>ADH1/adh1::P_{ADH1}-ZNC1-caSAT1</i> | diese Arbeit |
| SCZNC1M1 A | SC5314 | <i>znc1-1Δ::caSAT1-FLIP/ZNC1-2</i> | diese Arbeit |
| SCZNC1M1 B | SC5314 | <i>ZNC1-1/znc1-2Δ::caSAT1-FLIP</i> | diese Arbeit |
| SCZNC1M2 A | SCZNC1M1 A | <i>znc1-1Δ::FRT/ZNC1-2</i> | diese Arbeit |
| SCZNC1M2 B | SCZNC1M1 B | <i>ZNC1-1/znc1-2Δ::FRT</i> | diese Arbeit |
| SCZNC1M3 A | SCZNC1M2 A | <i>znc1-1Δ::FRT/znc1-2Δ::caSAT1-FLIP</i> | diese Arbeit |
| SCZNC1M3 B | SCZNC1M2 B | <i>znc1-1Δ::caSAT1-FLIP/znc1-2Δ::FRT</i> | diese Arbeit |
| SCZNC1M4 A | SCZNC1M3 A | <i>znc1-1Δ::FRT/znc1-2Δ::FRT</i> | diese Arbeit |
| SCZNC1M4 B | SCZNC1M3 B | <i>znc1-1Δ::FRT/znc1-2Δ::FRT</i> | diese Arbeit |
| SCALS1M1 A | SC5314 | <i>als1-1Δ::caSAT1-FLIP/ALS1-2</i> | diese Arbeit |
| SCALS1M1 B | SC5314 | <i>ALS1-1/als1-2Δ::caSAT1-FLIP</i> | diese Arbeit |
| SCALS1M2 A | SCALS1M1 A | <i>als1-1Δ::FRT/ALS1-2</i> | diese Arbeit |
| SCALS1M2 B | SCALS1M1 B | <i>ALS1-1/als1-2Δ::FRT</i> | diese Arbeit |
| SCALS1M3 A | SCALS1M2 A | <i>als1-1Δ::FRT/als1-2Δ::caSAT1-FLIP</i> | diese Arbeit |

2.4. Herstellung von genetisch veränderten C.-albicans-Stämmen

| Stamm | Ausgangs-stamm | Relevante Eigenschaften oder Genotyp ¹ | Referenz |
|--|----------------|---|--------------|
| Überexpressions- und Deletionsmutanten: 4 Zink-Cluster-Transkriptionsfaktor-Kandidaten zur genaueren Funktionsanalyse Gemeinsam hochregulierte Gene der artifiziell aktivierten ZCF-Kandidaten | | | |
| SCALS1M3 B | SCALS1M2 B | <i>als1-1Δ::caSAT1-FLIP/als1-2Δ::FRT</i> | diese Arbeit |
| SCALS1M4 A | SCALS1M3 A | <i>als1-1Δ::FRT/als1-2Δ::FRT</i> | diese Arbeit |
| SCALS1M4 B | SCALS1M3 B | <i>als1-1Δ::FRT/als1-2Δ::FRT</i> | diese Arbeit |
| SCAOX2M1 A/B | SC5314 | <i>AOX2/aox2Δ::caSAT1-FLIP</i> | diese Arbeit |
| SCAOX2M2 A/B | SCAOX2M1 A/B | <i>AOX2/aox2Δ::FRT</i> | diese Arbeit |
| SCAOX2M3 A/B | SCAOX2M2 A/B | <i>aox2Δ::caSAT1-FLIP/aox2Δ::FRT</i> | diese Arbeit |
| SCAOX2M4 A/B | SCAOX2M3 A/B | <i>aox2Δ::FRT/aox2Δ::FRT</i> | diese Arbeit |
| SCCDR1M1 A/B | SC5314 | <i>CDR1/cdr1Δ::caSAT1-FLIP</i> | diese Arbeit |
| SCCDR1M2 A/B | SCCDR1M1 A/B | <i>CDR1/cdr1Δ::FRT</i> | diese Arbeit |
| SCCDR1M3 A/B | SCCDR1M2 A/B | <i>cdr1Δ::caSAT1-FLIP/cdr1Δ::FRT</i> | diese Arbeit |
| SCCDR1M4 A/B | SCCDR1M3 A/B | <i>cdr1Δ::FRT/cdr1Δ::FRT</i> | diese Arbeit |
| SCGST2M1 A/B | SC5314 | <i>GST2/gst2Δ::caSAT1-FLIP</i> | diese Arbeit |
| SCGST2M2 A/B | SCGST2M1 A/B | <i>GST2/gst2Δ::FRT</i> | diese Arbeit |
| SCGST2M3 A/B | SCGST2M2 A/B | <i>gst2Δ::caSAT1-FLIP/gst2Δ::FRT</i> | diese Arbeit |
| SCGST2M4 A/B | SCGST2M3 A/B | <i>gst2Δ::FRT/gst2Δ::FRT</i> | diese Arbeit |
| SCPDR16M1 A/B | SC5314 | <i>PDR16/pdr16Δ::caSAT1-FLIP</i> | diese Arbeit |
| SCPDR16M2 A/B | SCPDR16M1 A/B | <i>PDR16/pdr16Δ::FRT</i> | diese Arbeit |
| SCPDR16M3 A/B | SCPDR16M2 A/B | <i>pdr16Δ::caSAT1-FLIP/pdr16Δ::FRT</i> | diese Arbeit |
| SCPDR16M4 A/B | SCPDR16M3 A/B | <i>pdr16Δ::FRT/pdr16Δ::FRT</i> | diese Arbeit |
| SCSOD3M1 A/B | SC5314 | <i>SOD3/sod3Δ::caSAT1-FLIP</i> | diese Arbeit |
| SCSOD3M2 A/B | SCSOD3M1 A/B | <i>SOD3/sod3Δ::FRT</i> | diese Arbeit |
| SCSOD3M3 A/B | SCSOD3M2 A/B | <i>sod3Δ::caSAT1-FLIP/sod3Δ::FRT</i> | diese Arbeit |
| SCSOD3M4 A/B | SCSOD3M3 A/B | <i>sod3Δ::FRT/sod3Δ::FRT</i> | diese Arbeit |
| SC344M1 A/B | SC5314 | <i>orf19.344/orf19.344Δ::caSAT1-FLIP</i> | diese Arbeit |
| SC344M2 A/B | SC344M1 A/B | <i>orf19.344/orf19.344Δ::FRT</i> | diese Arbeit |
| SC344M3 A/B | SC344M2 A/B | <i>orf19.344Δ::caSAT1-FLIP/orf19.344Δ::FRT</i> | diese Arbeit |
| SC344M4 A/B | SC344M3 A/B | <i>orf19.344Δ::FRT/orf19.344Δ::FRT</i> | diese Arbeit |

2. Material und Methoden

| Stamm | Ausgangs- stamm | Relevante Eigenschaften oder Genotyp ¹ | Referenz |
|---|--------------------|---|--------------|
| Überexpressions- und Deletionsmutanten: 4 Zink-Cluster-Transkriptionsfaktor-Kandidaten zur genaueren Funktionsanalyse Gemeinsam hochregulierte Gene der artifiziiell aktivierten ZCF-Kandidaten | | | |
| SC5777M1 A/B | SC5314 | <i>orf19.5777/orf19.5777Δ::caSAT1-FLIP</i> | diese Arbeit |
| SC5777M2 A/B | SC5777M1 A/B | <i>orf19.5777/orf19.5777Δ::FRT</i> | diese Arbeit |
| SC5777M3 A/B | SC5777M2 A/B | <i>orf19.5777Δ::caSAT1-FLIP/orf19.5777Δ::FRT</i> | diese Arbeit |
| SC5777M4 A/B | SC5777M3 A/B | <i>orf19.5777Δ::FRT/orf19.5777Δ::FRT</i> | diese Arbeit |
| SC7042M1 A/B | SC5314 | <i>orf19.7042/orf19.7042Δ::caSAT1-FLIP</i> | diese Arbeit |
| SC7042M2 A/B | SC7042M1 A/B | <i>orf19.7042/orf19.7042Δ::FRT</i> | diese Arbeit |
| SC7042M3 A/B | SC7042M2 A/B | <i>orf19.7042Δ::caSAT1-FLIP/orf19.7042Δ::FRT</i> | diese Arbeit |
| SC7042M4 A/B | SC7042M3 A/B | <i>orf19.7042Δ::FRT/orf19.7042Δ::FRT</i> | diese Arbeit |
| Deletionsmutanten mit artifiziiell aktivierten ZCF-Kandidaten | | | |
| SCΔ <i>als1</i> CTA4GAD1 A/B | SCALS1M4 A/B | <i>als1-1Δ::FRT/als1-2Δ::FRT ADH1/adh1::CTA4GAL4AD-caSAT1</i> | diese Arbeit |
| SCΔ <i>als1</i> MRR1GAD1 A/B | SCALS1M4 A/B | <i>als1-1Δ::FRT/als1-2Δ::FRT ADH1/adh1::MRR1GAL4AD-caSAT1</i> | diese Arbeit |
| SCΔ <i>als1</i> STB5GAD1 A/B | SCALS1M4 A/B | <i>als1-1Δ::FRT/als1-2Δ::FRT ADH1/adh1::STB5GAL4AD-caSAT1</i> | diese Arbeit |
| SCΔ <i>als1</i> TAC1GAD1 A/B | SCALS1M4 A/B | <i>als1-1Δ::FRT/als1-2Δ::FRT ADH1/adh1::TAC1GAL4AD-caSAT1</i> | diese Arbeit |
| SCΔ <i>als1</i> ZCF34GAD1 A/B | SCALS1M4 A/B | <i>als1-1Δ::FRT/als1-2Δ::FRT ADH1/adh1::MRR2GAL4AD-caSAT1</i> | diese Arbeit |
| SCΔ <i>als1</i> ZNC1GAD1 A/B | SCALS1M4 A/B | <i>als1-1Δ::FRT/als1-2Δ::FRT ADH1/adh1::ZNC1GAL4AD-caSAT1</i> | diese Arbeit |
| SCΔ <i>aox2</i> CTA4GAD1 A/B | SCAOX2M4 A/B | <i>aox2Δ::FRT/aox2Δ::FRT ADH1/adh1::CTA4GAL4AD-caSAT1</i> | diese Arbeit |
| SCΔ <i>aox2</i> MRR1GAD1 A/B | SCAOX2M4 A/B | <i>aox2Δ::FRT/aox2Δ::FRT ADH1/adh1::MRR1GAL4AD-caSAT1</i> | diese Arbeit |
| SCΔ <i>aox2</i> STB5GAD1 A/B | SCAOX2M4 A/B | <i>aox2Δ::FRT/aox2Δ::FRT ADH1/adh1::STB5GAL4AD-caSAT1</i> | diese Arbeit |
| SCΔ <i>aox2</i> TAC1GAD1 A/B | SCAOX2M4 A/B | <i>aox2Δ::FRT/aox2Δ::FRT ADH1/adh1::TAC1GAL4AD-caSAT1</i> | diese Arbeit |
| SCΔ <i>aox2</i> ZCF34GAD1 A/B | SCAOX2M4 A/B | <i>aox2Δ::FRT/aox2Δ::FRT ADH1/adh1::MRR2GAL4AD-caSAT1</i> | diese Arbeit |

2.4. Herstellung von genetisch veränderten C.-albicans-Stämmen

| Stamm | Ausgangs-stamm | Relevante Eigenschaften oder Genotyp ¹ | Referenz |
|--|----------------|---|--------------|
| Deletionsmutanten mit artifiziell aktivierten ZCF-Kandidaten | | | |
| SCΔ <i>aox2</i> ZNC1GAD1 A/B | SCAOX2M4 A/B | <i>aox2Δ::FRT/aox2Δ::FRT</i> <i>ADH1/adh1::ZNC1GAL4AD-caSAT1</i> | diese Arbeit |
| SCΔ <i>cdr1</i> CTA4GAD1 A/B | SCCDR1M4 A/B | <i>cdr1Δ::FRT/cdr1Δ::FRT</i> <i>ADH1/adh1::CTA4GAL4AD-caSAT1</i> | diese Arbeit |
| SCΔ <i>cdr1</i> STB5GAD1 A/B | SCCDR1M4 A/B | <i>cdr1Δ::FRT/cdr1Δ::FRT</i> <i>ADH1/adh1::STB5GAL4AD-caSAT1</i> | diese Arbeit |
| SCΔ <i>cdr1</i> TAC1GAD1 A/B | SCCDR1M4 A/B | <i>cdr1Δ::FRT/cdr1Δ::FRT</i> <i>ADH1/adh1::TAC1GAL4AD-caSAT1</i> | diese Arbeit |
| SCΔ <i>cdr1</i> ZCF34GAD1 A/B | SCCDR1M4 A/B | <i>cdr1Δ::FRT/cdr1Δ::FRT</i> <i>ADH1/adh1::MRR2GAL4AD-caSAT1</i> | diese Arbeit |
| SCΔ <i>cdr1</i> ZNC1GAD1 A/B | SCCDR1M4 A/B | <i>cdr1Δ::FRT/cdr1Δ::FRT</i> <i>ADH1/adh1::ZNC1GAL4AD-caSAT1</i> | diese Arbeit |
| SCΔ <i>gst2</i> CTA4GAD1 A/B | SCGST2M4 A/B | <i>gst2Δ::FRT/gst2Δ::FRT</i> <i>ADH1/adh1::CTA4GAL4AD-caSAT1</i> | diese Arbeit |
| SCΔ <i>gst2</i> MRR1GAD1 A/B | SCGST2M4 A/B | <i>gst2Δ::FRT/gst2Δ::FRT</i> <i>ADH1/adh1::MRR1GAL4AD-caSAT1</i> | diese Arbeit |
| SCΔ <i>gst2</i> STB5GAD1 A/B | SCGST2M4 A/B | <i>gst2Δ::FRT/gst2Δ::FRT</i> <i>ADH1/adh1::STB5GAL4AD-caSAT1</i> | diese Arbeit |
| SCΔ <i>gst2</i> TAC1GAD1 A/B | SCGST2M4 A/B | <i>gst2Δ::FRT/gst2Δ::FRT</i> <i>ADH1/adh1::TAC1GAL4AD-caSAT1</i> | diese Arbeit |
| SCΔ <i>gst2</i> ZCF34GAD1 A/B | SCGST2M4 A/B | <i>gst2Δ::FRT/gst2Δ::FRT</i> <i>ADH1/adh1::MRR2GAL4AD-caSAT1</i> | diese Arbeit |
| SCΔ <i>gst2</i> ZNC1GAD1 A/B | SCGST2M4 A/B | <i>gst2Δ::FRT/gst2Δ::FRT</i> <i>ADH1/adh1::ZNC1GAL4AD-caSAT1</i> | diese Arbeit |
| SCΔ <i>pdr16</i> CTA4GAD1 A/B | SCPDR16M4 A/B | <i>pdr16Δ::FRT/pdr16Δ::FRT</i> <i>ADH1/adh1::CTA4GAL4AD-caSAT1</i> | diese Arbeit |
| SCΔ <i>pdr16</i> MRR1GAD1 A/B | SCPDR16M4 A/B | <i>pdr16Δ::FRT/pdr16Δ::FRT</i> <i>ADH1/adh1::MRR1GAL4AD-caSAT1</i> | diese Arbeit |
| SCΔ <i>pdr16</i> STB5GAD1 A/B | SCPDR16M4 A/B | <i>pdr16Δ::FRT/pdr16Δ::FRT</i> <i>ADH1/adh1::STB5GAL4AD-caSAT1</i> | diese Arbeit |
| SCΔ <i>pdr16</i> TAC1GAD1 A/B | SCPDR16M4 A/B | <i>pdr16Δ::FRT/pdr16Δ::FRT</i> <i>ADH1/adh1::TAC1GAL4AD-caSAT1</i> | diese Arbeit |
| SCΔ <i>pdr16</i> ZCF34GAD1 A/B | SCPDR16M4 A/B | <i>pdr16Δ::FRT/pdr16Δ::FRT</i> <i>ADH1/adh1::MRR2GAL4AD-caSAT1</i> | diese Arbeit |
| SCΔ <i>pdr16</i> ZNC1GAD1 A/B | SCPDR16M4 A/B | <i>pdr16Δ::FRT/pdr16Δ::FRT</i> <i>ADH1/adh1::ZNC1GAL4AD-caSAT1</i> | diese Arbeit |

2. Material und Methoden

| Stamm | Ausgangs- stamm | Relevante Eigenschaften oder Genotyp ¹ | Referenz |
|--|--------------------|---|--------------|
| Deletionsmutanten mit artifiziell aktivierten ZCF-Kandidaten | | | |
| SCΔ <i>sod3</i> CTA4GAD1 A/B | SCSOD3M4 A/B | <i>sod3Δ::FRT/sod3Δ::FRT</i> <i>ADH1/adh1::CTA4GAL4AD-caSAT1</i> | diese Arbeit |
| SCΔ <i>sod3</i> STB5GAD1 A/B | SCSOD3M4 A/B | <i>sod3Δ::FRT/sod3Δ::FRT</i> <i>ADH1/adh1::STB5GAL4AD-caSAT1</i> | diese Arbeit |
| SCΔ <i>sod3</i> TAC1GAD1 A/B | SCSOD3M4 A/B | <i>sod3Δ::FRT/sod3Δ::FRT</i> <i>ADH1/adh1::TAC1GAL4AD-caSAT1</i> | diese Arbeit |
| SCΔ <i>sod3</i> ZCF34GAD1 A/B | SCSOD3M4 A/B | <i>sod3Δ::FRT/sod3Δ::FRT</i> <i>ADH1/adh1::MRR2GAL4AD-caSAT1</i> | diese Arbeit |
| SCΔ <i>sod3</i> ZNC1GAD1 A/B | SCSOD3M4 A/B | <i>sod3Δ::FRT/sod3Δ::FRT</i> <i>ADH1/adh1::ZNC1GAL4AD-caSAT1</i> | diese Arbeit |
| SCΔ344CTA4GAD1 A/B | SC344M4 A/B | <i>344Δ::FRT/344Δ::FRT</i> <i>ADH1/adh1::CTA4GAL4AD-caSAT1</i> | diese Arbeit |
| SCΔ344 MRR1GAD1 A/B | SC344M4 A/B | <i>344Δ::FRT/344Δ::FRT</i> <i>ADH1/adh1::MRR1GAL4AD-caSAT1</i> | diese Arbeit |
| SCΔ344STB5GAD1 A/B | SC344M4 A/B | <i>344Δ::FRT/344Δ::FRT</i> <i>ADH1/adh1::STB5GAL4AD-caSAT1</i> | diese Arbeit |
| SCΔ344TAC1GAD1 A/B | SC344M4 A/B | <i>344Δ::FRT/344Δ::FRT</i> <i>ADH1/adh1::TAC1GAL4AD-caSAT1</i> | diese Arbeit |
| SCΔ344 ZCF34GAD1 A/B | SC344M4 A/B | <i>344Δ::FRT/344Δ::FRT</i> <i>ADH1/adh1::MRR2GAL4AD-caSAT1</i> | diese Arbeit |
| SCΔ344ZNC1GAD1 A/B | SC344M4 A/B | <i>344Δ::FRT/344Δ::FRT</i> <i>ADH1/adh1::ZNC1GAL4AD-caSAT1</i> | diese Arbeit |
| SCΔ5777 CTA4GAD1 A/B | SC5777M4 A/B | <i>5777Δ::FRT/5777Δ::FRT</i> <i>ADH1/adh1::CTA4GAL4AD-caSAT1</i> | diese Arbeit |
| SCΔ5777 MRR1GAD1 A/B | SC5777M4 A/B | <i>5777Δ::FRT/5777Δ::FRT</i> <i>ADH1/adh1::MRR1GAL4AD-caSAT1</i> | diese Arbeit |
| SCΔ5777 STB5GAD1 A/B | SC5777M4 A/B | <i>5777Δ::FRT/5777Δ::FRT</i> <i>ADH1/adh1::STB5GAL4AD-caSAT1</i> | diese Arbeit |
| SCΔ5777 TAC1GAD1 A/B | SC5777M4 A/B | <i>5777Δ::FRT/5777Δ::FRT</i> <i>ADH1/adh1::TAC1GAL4AD-caSAT1</i> | diese Arbeit |
| SCΔ5777 ZCF34GAD1 A/B | SC5777M4 A/B | <i>5777Δ::FRT/5777Δ::FRT</i> <i>ADH1/adh1::MRR2GAL4AD-caSAT1</i> | diese Arbeit |
| SCΔ5777 ZNC1GAD1 A/B | SC5777M4 A/B | <i>5777Δ::FRT/5777Δ::FRT</i> <i>ADH1/adh1::ZNC1GAL4AD-caSAT1</i> | diese Arbeit |
| SCΔ7042 CTA4GAD1 A/B | SC7042M4 A/B | <i>7042Δ::FRT/7042Δ::FRT</i> <i>ADH1/adh1::CTA4GAL4AD-caSAT1</i> | diese Arbeit |

2.4. Herstellung von genetisch veränderten C.-albicans-Stämmen

| Stamm | Ausgangs-stamm | Relevante Eigenschaften oder Genotyp ¹ | Referenz |
|---|----------------|--|--------------|
| Deletionsmutanten mit artifiziell aktivierten ZCF-Kandidaten | | | |
| SCΔ7042 MRR1GAD1 A/B | SC7042M4 A/B | 7042Δ::FRT/7042Δ::FRT ADH1/adh1::MRR1GAL4AD-caSAT1 | diese Arbeit |
| SCΔ7042 STB5GAD1 A/B | SC7042M4 A/B | 7042Δ::FRT/7042Δ::FRT ADH1/adh1::STB5GAL4AD-caSAT1 | diese Arbeit |
| SCΔ7042 TAC1GAD1 A/B | SC7042M4 A/B | 7042Δ::FRT/7042Δ::FRT ADH1/adh1::TAC1GAL4AD-caSAT1 | diese Arbeit |
| SCΔ7042 ZCF34GAD1 A/B | SC7042M4 A/B | 7042Δ::FRT/7042Δ::FRT ADH1/adh1::MRR2GAL4AD-caSAT1 | diese Arbeit |
| SCΔ7042 ZNC1GAD1 A/B | SC7042M4 A/B | 7042Δ::FRT/7042Δ::FRT ADH1/adh1::ZNC1GAL4AD-caSAT1 | diese Arbeit |
| GFP-Reporterstämme zur Überprüfung der CDR1- und CDR2-Promotoraktivität unter dem Einfluss artifiziell aktivierter ZCFs bzw. deren Deletion | | | |
| SCCDR1G21 A/B | SC5314 | CDR1/cdr1::P _{CDR1} GFP-caSAT1-FLIP | diese Arbeit |
| SCCDR1G22 A/B | SCCDR1G21 A/B | CDR1/cdr1::P _{CDR1} GFP-FRT | diese Arbeit |
| SCCDR1G22 STB5GAD1 A/B | SCCDR1G22 A/B | CDR1/cdr1::P _{CDR1} GFP-FRT ADH1/adh1::STB5GAL4AD-caSAT1 | diese Arbeit |
| SCCDR1G22 TAC1E1 A/B | SCCDR1G22 A/B | CDR1/cdr1::P _{CDR1} GFP-FRT ADH1/adh1::TAC1 ^(G980E) -caSAT1 | diese Arbeit |
| SCCDR1G22 TAC1GAD1 A/B | SCCDR1G22 A/B | CDR1/cdr1::P _{CDR1} GFP-FRT ADH1/adh1::TAC1GAL4AD-caSAT1 | diese Arbeit |
| SCCDR1G22 ZCF34GAD1 A/B | SCCDR1G22 A/B | CDR1/cdr1::P _{CDR1} GFP-FRT ADH1/adh1::MRR2GAL4AD-caSAT1 | diese Arbeit |
| SCCDR1G22 ZNC1GAD1 A/B | SCCDR1G22 A/B | CDR1/cdr1::P _{CDR1} GFP-FRT ADH1/adh1::ZNC1GAL4AD-caSAT1 | diese Arbeit |
| SCCDR2G52 A/B | SCCDR2G51 A/B | CDR2/cdr2::P _{CDR2} GFP-FRT | AGM |
| SCCDR2G52 STB5GAD1 A/B | SCCDR2G52 A/B | CDR2/cdr2::P _{CDR2} GFP-FRT ADH1/adh1::STB5GAL4AD-caSAT1 | diese Arbeit |
| SCCDR2G52 TAC1GAD1 A/B | SCCDR2G52 A/B | CDR2/cdr2::P _{CDR2} GFP-FRT ADH1/adh1::TAC1GAL4AD-caSAT1 | diese Arbeit |
| SCCDR2G52 ZCF34GAD1 A/B | SCCDR2G52 A/B | CDR2/cdr2::P _{CDR2} GFP-FRT ADH1/adh1::MRR2GAL4AD-caSAT1 | diese Arbeit |
| SCCDR2G52 ZNC1GAD1 A/B | SCCDR2G52 A/B | CDR2/cdr2::P _{CDR2} GFP-FRT ADH1/adh1::ZNC1GAL4AD-caSAT1 | diese Arbeit |
| SCΔstb5CDR1G21 A/B | SCSTB5M4 A/B | stb5-1Δ::FRT/stb5-2Δ::FRT CDR1/cdr1::P _{CDR1} GFP-caSAT1-FLIP | diese Arbeit |

2. Material und Methoden

| Stamm | Ausgangs-stamm | Relevante Eigenschaften oder Genotyp ¹ | Referenz |
|--|------------------------------|--|--------------|
| <i>GFP</i> -Reporterstämme zur Überprüfung der <i>CDR1</i> - und <i>CDR2</i> -Promotoraktivität unter dem Einfluss artifiziell aktivierter <i>ZCFs</i> bzw. deren Deletion | | | |
| SCΔ <i>stb5</i> CDR1G22 A/B | SCΔ <i>stb5</i> CDR1G21 A/B | <i>stb5-1Δ::FRT/stb5-2Δ::FRT</i> <i>CDR1/cdr1::P_{CDR1}GFP-FRT</i> | diese Arbeit |
| SCΔ <i>tac1</i> CDR1G21 A/B | SCTAC1M4 A/B | <i>tac1-1Δ::FRT/tac1-2Δ::FRT</i> <i>CDR1/cdr1::P_{CDR1}GFP-caSAT1-FLIP</i> | diese Arbeit |
| SCΔ <i>tac1</i> CDR1G22 A/B | SCΔ <i>tac1</i> CDR1G21 A/B | <i>tac1-1Δ::FRT/tac1-2Δ::FRT</i> <i>CDR1/cdr1::P_{CDR1}GFP-FRT</i> | diese Arbeit |
| SCΔ <i>zcf34</i> CDR1G21 A/B | SCZCF34M4 A/B | <i>mrr2Δ::FRT/mrr2Δ::FRT</i> <i>CDR1/cdr1::P_{CDR1}GFP-caSAT1-FLIP</i> | diese Arbeit |
| SCΔ <i>zcf34</i> CDR1G22 A/B | SCΔ <i>zcf34</i> CDR1G21 A/B | <i>mrr2Δ::FRT/mrr2Δ::FRT</i> <i>CDR1/cdr1::P_{CDR1}GFP-FRT</i> | diese Arbeit |
| SCΔ <i>znc1</i> CDR1G21 A/B | SCZNC1M4 A/B | <i>znc1-1Δ::FRT/znc1-2Δ::FRT</i> <i>CDR1/cdr1::P_{CDR1}GFP-caSAT1-FLIP</i> | diese Arbeit |
| SCΔ <i>znc1</i> CDR1G22 A/B | SCΔ <i>znc1</i> CDR1G21 A/B | <i>znc1-1Δ::FRT/znc1-2Δ::FRT</i> <i>CDR1/cdr1::P_{CDR1}GFP-FRT</i> | diese Arbeit |
| SCΔ <i>tac1</i> ZCF34GAD1 A/B | SCΔ <i>tac1</i> CDR1G22 A/B | <i>tac1-1Δ::FRT/tac1-2Δ::FRT</i> <i>ADH1/adh1::MRR2GAL4AD-caSAT1</i> | diese Arbeit |
| SCΔ <i>tac1</i> CDR1G22 ZCF34GAD1 A/B | SCΔ <i>tac1</i> CDR1G22 A/B | <i>tac1-1Δ::FRT/tac1-2Δ::FRT</i> <i>CDR1/cdr1::P_{CDR1}GFP-FRT</i> <i>ADH1/adh1::MRR2GAL4AD-caSAT1</i> | diese Arbeit |
| SCΔ <i>zcf34</i> TAC1E1 A/B | SCZCF34M4 A/B | <i>mrr2Δ::FRT/mrr2Δ::FRT</i> <i>ADH1/adh1::TAC1^(G980E)-caSAT1</i> | diese Arbeit |
| SCΔ <i>zcf34</i> CDR1G22 TAC1E1 A/B | SCΔ <i>zcf34</i> CDR1G22 A/B | <i>mrr2Δ::FRT/mrr2Δ::FRT</i> <i>CDR1/cdr1::P_{CDR1}GFP-FRT</i> <i>ADH1/adh1::TAC1^(G980E)-caSAT1</i> | diese Arbeit |

¹ *caSAT1-FLIP* bezeichnet die *SAT1-Flipper*-Kassette; *FRT* ist die FLP-Erkennungssequenz, eine Kopie verbleibt nach dem Recyclern des *SAT1-Flippers* im Genom; *caSAT1* ist das an den *Candida*-Codongebrauch angepasste *SAT1*-Gen; 3xHA steht für das 3-fache HA-Epitop; *DBD* bedeutet DNA-Bindedomäne; *GAL4AD* steht für die Gal4-Aktivierungsdomäne. Nummerierte Allele eines Gens unterscheiden sich durch einen Restriktionspolymorphismus oder durch in der Länge variierende interne Wiederholungen; die numerische Reihenfolge wurde willkürlich festgelegt (genauere Informationen unter www.candidagenome.org).

2.5. Fluconazolsensitivitäts-Assay

Die Fluconazolsensitivität wurde durch die Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) nach dem in Ruhnke *et al.*, 1994 beschriebenen Prinzip durchgeführt. Die MHK-Tests aller Vorversuche, die zur Etablierung der Methode zur künstlichen Aktivierung der Zink-Cluster-Transkriptionsfaktoren notwendig waren, wurden mit dem High Resolution Medium (HR) der Firma Oxoid durchgeführt. Der Produktionsstopp dieses Mediums führte dazu, dass alle folgenden MHK-Tests unter der Verwendung von SD-CSM-Medium stattfanden. In diesem Medium verschob sich der MHK-Wert um eine Stufe nach oben. Das für die MHK-Tests eingesetzte Fluconazol wurde von der Firma Sigma-Aldrich bezogen.

Die Untersuchung aller Stämme der Genombibliothek mit den artifiziell aktivierten Zink-Cluster-Transkriptionsfaktoren hinsichtlich ihrer Fluconazolsensitivität war das ausschlaggebendste und richtungsweisende Experiment dieser Arbeit. Für die durchgeführten MHK-Tests wurde eine 5-mg/ml-Fluconazol-Stocklösung verwendet. Von diesem Antimykotikum erfolgte zunächst die Herstellung einer Verdünnungsreihe (Zweifachverdünnungen, 12 Verdünnungsschritte) in SD-CSM-Medium. Die Ausgangskonzentration betrug entweder 100 µg/ml, meist jedoch 50 µg/ml. Je 100 µl der entsprechenden Verdünnungen wurden in Microtiterplatten (96-well-Platten) vorgelegt. Anschließend erfolgte das Resuspendieren von frisch ausgestrichenen Einzelkolonien der zu untersuchenden Stämme in 2 ml einer physiologischen Kochsalzlösung (0,9 % NaCl). Die Überführung von 4 µl dieser Zellsuspensionen in 2 ml SD-CSM-Medium ergab eine ungefähre Endkonzentration von 1000 Zellen pro ml. Das Vermischen von jeweils 100 µl jener Zellsuspensionen mit den bereits vorgelegten Verdünnungen komplettierte den MHK-Test. Zusätzlich wurden von jedem Stamm Wachstumskontrollen angelegt, um eventuelle Fitnessdefekte durch die genetische Manipulation von der tatsächlichen Wachstumshemmung von Fluconazol zu unterscheiden. Nach 24-stündiger Inkubation bei 37°C waren die MHK-Werte ablesbar. Diese wurden mit bloßem Auge bestimmt und stellen jene minimale Fluconazolkonzentrationen dar, welche notwendig sind, um sichtbares Wachstum der entsprechenden *C.-albicans*-Zellen zu verhindern. Der Test wurde mit allen Stämmen der Genombibliothek durchgeführt. Des Weiteren erfolgte auf gleichem Wege die Überprüfung der MHKs der in dieser Arbeit erzeugten KO-Mutanten und der

Überexpressionsstämme, sowie von anderen rekombinanten *C.-albicans*-Stämmen. Durch die Herstellung von je zwei unabhängigen Mutanten konnte sichergestellt werden, dass entsprechende Phänotypen aus der gezielten genetischen Veränderung resultierten.

2.6. Transkriptionsprofil-Analysen

Die Stämme mit den hyperaktiven Zink-Cluster-Transkriptionsfaktoren *CTA4**, *STB5**, *ZCF34** (*MRR2**) und *ZNC1**, welche die höchste Fluconazolresistenz bewirkten, wurden für detailliertere Analysen ausgewählt. Diese umfassten u. a. die Bestimmung der Transkriptionsprofile via Microarray-Analysen und Northern Hybridisierung.

2.6.1. RNA-Isolierung

Die RNA-Isolierung erfolgte nach der *Hot-Phenol*-Methode in Kombination mit dem RNeasy-Mini-Kit der Firma Qiagen. YPD-Übernachtskulturen der zu untersuchenden Stämme wurden 1:100 verdünnt und bei 30°C unter Schütteln bis zu einer $OD_{600} = 1$ (ca. 4 h) angezüchtet. Nach dem Abzentrifugieren der Zellen bei 2500 g und 4°C für 4 min wurden diese mit eiskaltem DEPC-behandeltem und autoklaviertem Wasser gewaschen. Nach einer weiteren Zentrifugation für 10 sec, bei 4°C erfolgte die Aufnahme des Zellpellets in 400 µl TES-Lösung. Nach Zugabe von 400 µl Acid Phenol und dem Vortexen für 10 sec wurden die Suspensionen für 60 min, bei 65°C unter gelegentlichem, kurzem Vortexen inkubiert. Nach 5-minütigem Abkühlen auf Eis folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt bei voller Geschwindigkeit und 4°C. Anschließend wurde die obere, wässrige Phase in ein frisches 1,5-ml-Gefäß überführt, mit 1 vol. RLT-Puffer (RNeasy Mini Kit, Qiagen) versehen und gründlich durchmischt. Die Fällung der Nucleinsäuren erfolgte durch Zugabe von 1 vol. Ethanol. Die gesamten Proben, inklusive der gebildeten Präzipitate, wurden auf eine RNeasy-Mini-Kit-Säule transferiert. Die weiteren Extraktionsschritte wurden gemäß Herstellerangaben zur Aufreinigung der Gesamt-RNA von Hefezellen durchgeführt.

2.6.2. Microarray-Analysen

Für die Microarray-Analysen erfolgte die Extraktion der Gesamt-RNA von drei unabhängigen Replikaten (2x vom A-Stamm und 1x vom B-Stamm). Anschließend wurden die Proben bezüglich RNA-Qualität und -Quantität im hauseigenen Bioanalyser (Agilent 2100) untersucht. Diese Arbeit erfolgte in Zusammenarbeit mit Barbara Plaschke gemäß der Geräte-Hersteller-Angaben. Die Microarray-Transkriptionsprofil-Analysen wurden bei der Firma Febit in Auftrag gegeben. Diese führte zunächst eine eigenständige Qualitätskontrolle durch. Somit diente die eigene Überprüfung lediglich zur Orientierung in Bezug auf Qualität und Quantität der extrahierten RNA. Der Microarray-Auftrag umfasste sowohl das Beschaffen/ Herstellen der DNA-Chips als auch die Hybridisierung dieser mit dem eingeschickten Probenmaterial und eine anschließende vollständige bioinformatische Auswertung.

2.6.3. Northern Hybridisierung

Die Quantität und Qualität der RNAs für die Northern Hybridisierung wurde mit Hilfe eines Nano Drop 1000 Spektrometer ermittelt. Je 5 µg RNA der Stämme, welche die künstlich aktivierten Transkriptionsfaktoren *CTA4**, *STB5**, *ZCF34** (*MRR2**) und *ZNC1** exprimieren, wurden auf ein 1,2% RNA-Agarosegel aufgetragen. Hierzu mussten die Proben wie folgt vorbereitet werden. 4 µl RNA, die 5 µg der Nucleinsäure enthielten, wurden mit 5 µl 5x RP-Puffer, 4 µl 37% Formaldehyd, 12 µl Formamid und 0,1 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) versetzt. Anschließend folgte ein 3-minütiges Aufkochen der RNA-Lösungen bei 95°C und deren Abkühlung auf Eis. Nach Zugabe von 4 µl 5x Ladepuffer konnten die Proben auf das Gel aufgetragen werden. Die Gelelektrophorese fand bei 50 V, für ca. 2 h statt. Alle Arbeiten der RNA-Agarosegelelektrophorese wurden unter dem Abzug durchgeführt. Anschließend erfolgte eine Geldokumentation mittels UV-Licht und Kamera, um die RNA-Qualität und -Quantität zu visualisieren. Nach 2-fachem 20-minütigem Waschen des Gels in 10x SSC wurde der Kapillar-Blot aufgebaut. Auf eine Glasschale, die mit 10x SSC (Transferpuffer) gefüllt war, wurde eine Glasscheibe platziert. Auf diese kam eine Brücke aus Whatmanpapier, welche auf beiden Seiten in den Transferpuffer eintauchte. Darauf

wurde das RNA-Gel mit den Taschen nach unten gelegt, gefolgt von der exakt zugeschnittenen Nylonmembran (Hybond N⁺, Porenweite 0,45 µm; Amersham), vier Lagen Whatmanpapier und einer mindestens 20 cm dicken Schicht aus saugfähigen Tüchern, hier handelsübliche Taschentücher. Zum Abschluss wurde eine Glasplatte auf der Apparatur platziert, auf welche ein Druck von ca. 500 g wirkte. Der Transfer erfolgte über Nacht. Am darauffolgenden Tag wurden zunächst die Geltaschen markiert (mit Bleistift) und die RNA via UV-Licht (*crosslinken*) auf der Membran fixiert. Nach der Markierung der 28S und der 18S rRNA auf einem Transluminator folgte entweder die Lagerung des Blots, eingepackt in Frischhaltefolie und Alufolie im Kühlschrank, oder die Hybridisierung mit entsprechenden DNA-Sonden. Hierzu musste die Membran zunächst mit dem High-SDS-Puffer (Hybridisierungspuffer) für mindestens 7 h oder über Nacht, bei 42°C vorhybridisiert werden. Die entsprechend benötigten DNA-Sonden wurden per PCR mit Digoxigenin (Dig) markierten dNTPs hergestellt und über ein Agarosegel aufgereinigt. Die Denaturierung der Dig-Sonden geschah bei 95°C für 6 min, gefolgt von einem kurzen Abkühlen auf Eis. 1-2 µl der Sonden pro 1 ml High-SDS-Puffer (Gesamtvolumen: 15 ml) hybridisierten mit der Membran über Nacht bei 42°C. Am darauffolgenden Tag wurde der Blot mehrfach gewaschen: zunächst dreimal 10 min mit Waschpuffer I bei Raumtemperatur, dann zweimal 15 min mit dem selben Waschpuffer bei 65°C und einmal 5 min mit Waschpuffer II bei Raumtemperatur, bei der auch alle folgenden Schritte durchgeführt wurden. Anschließend erfolgte das Absättigen der Membran mit dem P2-Puffer für 30 min und die ebenfalls 30 min dauernde Inkubation mit einem mit Peroxidase markierten Anti-Digoxigenin-Antikörper. Nach zweimaligem Waschen mit Waschpuffer II für je 15 min und P3 für 5 min erfolgte die zur Detektion notwendige enzymatische Reaktion, ebenfalls für 5 min. Die Membran wurde anschließend an der Luft getrocknet, in Frischhaltefolie verpackt, für 5 min bei 37°C aufbewahrt, gefolgt von der Detektion des Signals mit einem Hyperfilm der Firma Amersham und einem Tischentwickler.

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

Zur Quantifizierung der *CDR1*- und *CDR2*-Expression wurden Stämme erzeugt, die entsprechende *GFP*-Reporterfusionen enthalten. Somit war es möglich, die Promotoraktivität mittels FACS-Analyse (*fluorescence activated cell sorting*) zu messen. Nachdem die Übernachtskulturen der zu untersuchenden Reporterstämme 1:100 mit frischem YPD-Medium verdünnt wurden, erfolgte eine dreistündige Wachstumsphase unter Schütteln bei 30°C. Wenn notwendig bzw. im experimentellen Design vorgesehenen, wurde die *CDR1*-/*2*-Expression durch Zugabe von 10 µg/ml Fluphenazin bzw. 10 µg/ml Estradiol induziert. Daraufhin folgten weitere 60 min bei 30°C unter Schütteln. Die nichtinduzierten Stämme wurden insgesamt 4 h, bei 30°C schüttelnd inkubiert. Nach der Wachstums- bzw. Induktionsphase erfolgte eine 1:10 Verdünnung der Zellen mit kaltem PBS und die anschließende Messung der Fluoreszenz. Dies geschah mit einem MACS Quant von Miltenyi Biotec. Hierbei wurden die Parameter so gewählt, dass mit Hilfe eines Argon-Lasers (488 nm) die Messung der Fluoreszenz von 20.000 Zellen mit einer Durchflussrate von ca. 500 Zellen pro sec bei 530 nm erfolgte. Die entsprechende Software (MACSQuantify) lieferte die Werte der durchschnittlichen Fluoreszenz. Alle FACS-Versuche wurden in mindestens drei unabhängigen Ansätzen durchgeführt und entsprechende Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet.

2.8. Biofilm Assay

Die Ergebnisse der Microarray-Daten der vier Transkriptionsfaktoren offenbarten eine Hochregulation zweier Gene, welche maßgeblich an der Biofilmproduktion, einer wichtigen Virulenzeigenschaft von *C. albicans*, beteiligt sind: *ALS1* und der orf19.5777. Deshalb sollte überprüft werden, ob die hyperaktiven Regulatoren unter nicht-Biofilm-induzierenden Bedingungen (30°C, keine Induktoren, Standardwachstumsbedingungen) in der Lage sind, einen solchen auszubilden. Für den Biofilm-Assay wurden folgende Stämme verwendet: *CTA4**, *STB5**, *MRR1**, *ZCF34** (*MRR2**) und *ZNC1** (Stämme mit hyperaktiven Regulatoren); *ALS1*- und orf19.5777-Deletionsmutanten; *ALS1*- und orf19.5777-Deletionsmutanten mit den genannten hyperaktiven Regulatoren; SC5314

diente als wildtypischer Referenzstamm. *MRR1* wurde in diese Untersuchung mit einbezogen, da *ALS1* auch ein putatives Zielgen von *MRR1* ist.

3 ml entsprechender YPD-Übernachtskulturen wurden 1:10 in PBS verdünnt. 500 µl der resultierenden Zellsuspensionen wurden in einen Napf einer 24-well-Platte gegeben. Als Nährmedium für die Zellen diente 1 ml YNB-Medium. Die Platten wurden zwei Tage stehend bei 30°C unter Standardwachstumsbedingungen inkubiert. Die Entfernung der Überstände erfolgte nach zwei Tagen, zusammen mit zweimaligem vorsichtigem Waschen der Nöpfe mit PBS. Die Auswertung geschah visuell und unter dem Mikroskop.

2.9. Lösungen

Alle in der Arbeit verwendeten Lösungen und Nährmedien, inklusive deren Zusammensetzung, sind in Tabelle 4 aufgelistet.

Tab. 4: In dieser Arbeit verwendete Lösungen und Nährmedien

| Lösungen/Medien | Zusammensetzung | Firma |
|---|--|--|
| B/B ⁺ -Puffer (Proteinextraktion) | 100 mM Tris-Cl 200 mM NaCl, 20 % Glycerin, 5 mM EDTA pH 7,5/ +1:25 PIM (Protease Inhibitor Mix; complete EDTA-free Tablets) | Roth, Roche |
| Blocking Reagent (10 %) (Northern Blot) | P1 Puffer 1x 1:10 Blocking Reagent (Pulver) | Roth, Böhringer Mannheim |
| Breaking Buffer (DNA-Isolierung) | 100 mM NaCl, 10 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA, 2 % TritonX-100, 1 % SDS | Roth |
| Harnstoffpuffer | 6 M Harnstoff, 0,4 % SDS, 0,5x SSC | Roth |
| High SDS Puffer (Northern Blot) | 7 % SDS 50 % Formamid (deionisiert) 5x SSPE 2% Blocking Reagent | Roth, AppliChem, Böhringer Mannheim |
| Ladepuffer (5x) | 25 mM Tris-Cl pH 7, 150 mM EDTA pH 8, 0,05 % Bromphenolblau, 25 % Glycerin | Roth, AppliChem |
| Lämmli-Puffer (3x) | 240 mM Tris-Cl, 6 % SDS, 30 % Glycerin, 16 % β-Mercaptoethanol, 0,002 % Bromphenolblau | Roth, AppliChem |
| Lauroylsarkosin (10 %) | | Sigma |
| LB-Medium LB-Agar LB-amp Medium/ Agar | 0,5 % Hefeextrakt, 1 % Pepton, 0,5 % NaCl + 1,5 % Agar + 1 µg/ml Ampicillin | Becton Dickinson, Roth |
| PBS/T (1x) | 3,8 mM KH ₂ PO ₄ , 16,2 mM Na ₂ HPO ₄ , 75 mM NaCl, pH 7,4/ 0,1 % Tween 20 | Roth, AppliChem |

| Lösungen/Medien | Zusammensetzung | Firma |
|---|---|--------------------------------|
| PCI (DNA-Isolierung) | Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol | Roth |
| P1 Puffer (10x) (Northern Blot) | 1 M Maleinsäure 1,5 M Natriumchlorid pH 7 | Roth |
| P2 Puffer (Northern Blot) | 1x P1 Puffer 1:10 Blocking Reagent (immer frisch herstellen) | Roth, Böhringer Mannheim |
| P3 Puffer (Northern Blot) | 100 mM Tris-Cl 100 mM NaCl 50 mM MgCl ₂ pH 9,5 | Roth |
| RP Puffer (5x) (RNA-Agarosegel) | 200 mM MOPS 50 mM Natriumacetat-trihydrat 10 mM EDTA pH 7 | Roth |
| SSC (20x) | 0,3 M Na-Citrat, 3 M NaCl | Roth |
| SSPE (20x) | 3 M NaCl 0,2 M Na ₂ HPO ₄ 0,02 M EDTA pH 7,4 | Roth |
| TAE (1x) | 40 mM Tris, 20 mM Essigsäure, 1 mM EDTA | Roth, AppliChem |
| TE-Puffer (10x) | 100 mM Tris-Cl pH 7,5, 10 mM EDTA pH 7,5 | Roth |
| TES Lösung (RNA-Extraktion) | 10 mM Tris-Cl pH 7,5 10 mM EDTA 0,5 % SDS | Roth |
| Transferpuffer (Western Blot) | 50 mM Tris, 40 mM Glycin, 0,04 % SDS, 5 % Methanol | Roth |
| Waschpuffer I (Northern Blot) | 1x SSC 0,1 % SDS | Roth |
| Waschpuffer II (Northern Blot) | 1x SSC 0,3 % Tween 20 | Roth |
| YCB-Medium | 2,34 % Yeast Carbon Base 0,2 % Hefeextrakt pH 4 | Becton Dickinson, GERBU |
| YCB-BSA-Medium | +0,4 % BSA (Rinderserumalbumin) | Biotechnik |
| YNB-Medium (SD-Medium; MM-Medium) | 0,67 % YNB mit Ammoniumsulfat (für MHK: pH 5,8) 2 % Glucose | Becton Dickinson |
| YNB-Agar | + 1,5 % Agar | |
| YNB-CSM-Medium/- Agar | 1 % CSM-Mix (sterilfiltriert) | |
| YPD-Medium | 1 % Hefeextrakt, 2 % Pepton, 2% Glucose | Becton |
| YPD-Agar | + 1,5 % Agar | Dickinson, |
| N200-Agar | + 200 µg/ml Nourseothricin | Roth, Werner |
| YPM-Medium | 1 % Hefeextrakt, 2 % Pepton, 2% Maltose | Bioagents |

3. Ergebnisse

Zink-Cluster-Transkriptionsfaktoren spielen sowohl bei der Entwicklung von Resistenzen, als auch bei der Ausbildung wichtiger Virulenzfaktoren eine entscheidende Rolle in *C. albicans*. Die wichtigsten Vertreter, welche bisher charakterisiert wurden, sind Mrr1 als Masterregulator der *Multidrug*-Effluxpumpe *MDR1* [Morschhäuser *et al.*, 2007], Tac1, der die Expression der ABC-Transportergene *CDR1* und *CDR2* steuert [Coste *et al.*, 2004], aber auch Upc2, ein Transkriptionsfaktor, der die Expression vieler Gene des Ergosterolbiosyntheseweges reguliert [Silver *et al.*, 2004; MacPherson *et al.*, 2005]. Ume6, Ahr1 (Zcf37) und Sef1 gehören zu den Zink-Cluster-Transkriptionsfaktoren, denen wichtige Funktionen in der Virulenzfaktor-Regulierung zugeschrieben wurden [Banerjee *et al.*, 2008; Askew *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2011]. *Gain-of-function*-Mutationen in den resistenzbeeinflussenden Transkriptionsfaktoren sind häufig für die Resistenz in klinischen Isolaten verantwortlich [Coste *et al.*, 2006; Morschhäuser *et al.*, 2007; Dunkel *et al.*, 2008b]. Viele der zu dieser Proteinfamilie gehörenden Regulatoren sind aber nach wie vor nicht charakterisiert worden. Durch die Hypothese, dass es weitere Zink-Cluster-Transkriptionsfaktoren geben könnte, die an der Resistenzentwicklung beteiligt sind, sollte in dieser Arbeit zunächst eine Strategie entwickelt werden, die die Charakterisierung der ganzen Proteinfamilie ermöglicht. Herkömmliche Charakterisierungsmethoden, wie das Inaktivieren oder Überexprimieren von Genen im Laborstamm SC5314, offenbarten weder im Fall von *MRR1* noch von *TAC1* deren wichtige Funktionen bei der Resistenzausbildung. Deshalb sollte eine völlig neuartige Methode zur Charakterisierung der Mitglieder der Zink-Cluster-Proteinfamilie etabliert werden. Diese Methode basierte auf der Entdeckung, dass die Fusion der *MRR1*-DNA-Bindedomäne (DBD) mit der *GAL4*-Aktivierungsdomäne (AD) von *S. cerevisiae* und die Integration des Hybrids in eine *mrr1*-Deletionsmutante zu einem funktionellen und sogar hyperaktiven Transkriptionsfaktor führte, welcher Fluconazolresistenz vermittelt [Schubert *et al.*, 2011b].

3.1. Etablierung der Methode zur artifiziellen Aktivierung von Zink-Cluster-Transkriptionsfaktoren in *C. albicans*

Um zu überprüfen, ob sich eine Fusion der DBD der Zink-Cluster-Transkriptionsfaktoren mit der *ScGAL4-AD* als eine generelle Methode zur Aktivierung dieser Regulatoren eignet, wurden zunächst solche Fusionen auch für Tac1 und Upc2 hergestellt, zwei Regulatoren die ebenfalls maßgeblich an der Resistenzentwicklung beteiligt sind. Die Expression dieser Hybride erfolgte unter der Kontrolle des *ADH1*-Promotors. Anschließende MHK-Analysen zeigten, dass auch die Hybridproteine der Tac1-DBD und der Upc2-DBD eine erhöhte Fluconazoltoleranz, verglichen mit dem Wildtyp, bewirkten (siehe Abbildung 5, B und C). Zum Vergleich wurden ebenfalls die MHKs der entsprechenden Deletionsmutanten, sowie die MHKs von Stämmen, die das wildtypische bzw. ein natürlich vorkommendes hyperaktives *MRR1*, *TAC1* und *UPC2* unter der Kontrolle des *ADH1*-Promotors exprimieren, bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 5 A-C dargestellt.

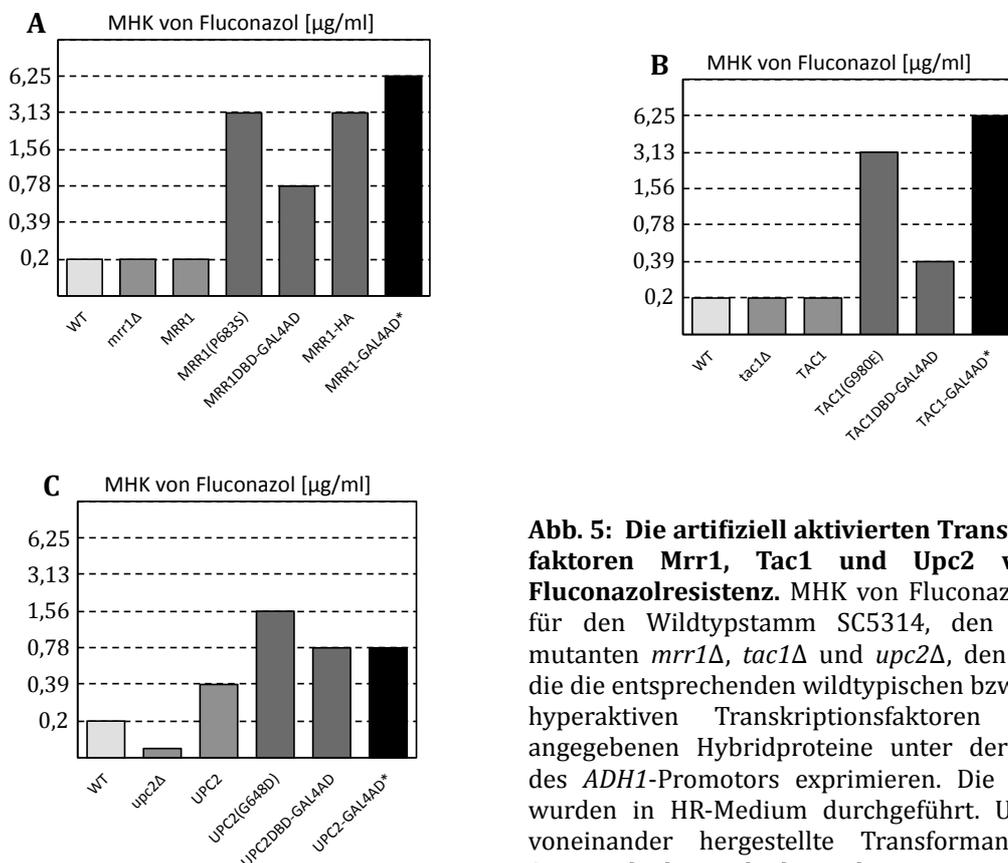


Abb. 5: Die artifiziell aktivierten Transkriptionsfaktoren Mrr1, Tac1 und Upc2 vermitteln Fluconazolresistenz. MHK von Fluconazol [µg/ml] für den Wildtypstamm SC5314, den Deletionsmutanten *mrr1Δ*, *tac1Δ* und *upc2Δ*, den Stämmen, die die entsprechenden wildtypischen bzw. natürlich hyperaktiven Transkriptionsfaktoren und die angegebenen Hybridproteine unter der Kontrolle des *ADH1*-Promotors exprimieren. Die MHK-Tests wurden in HR-Medium durchgeführt. Unabhängig voneinander hergestellte Transformanten einer Serie verhielten sich identisch.

Abbildung 5 A vereint die wichtigsten Ergebnisse der MHK-Untersuchungen, die mit *MRR1* durchgeführt wurden. Hierbei ist deutlich zu erkennen, dass das Fusionsprotein aus der Mrr1-DBD und der Gal4-AD auch im wildtypischen Hintergrund, also bei Anwesenheit beider endogener *MRR1*-Allele, in der Lage war, eine erhöhte Fluconazolresistenz zu bewirken, wenn auch nicht so effizient wie ein hyperaktives Mrr1 mit einer P683S *gain-of-function*-Mutation. Die Deletion von *MRR1* oder die Expression des wildtypischen Transkriptionsfaktors unter dem starken *ADH1*-Promotor hatte keinen Einfluss auf die Fluconazolresistenz (Abbildung 5 A). Im Wildtypstamm ist Tac1 ebenso wie Mrr1 nicht aktiv unter Standardbedingungen, weshalb auch seine Deletion oder Überexpression unter dem *ADH1*-Promotor die Fluconazolresistenz nicht beeinflussten (siehe Abbildung 5 B). Das Fusionsprotein aus der Tac1-DBD und der Gal4-AD war jedoch in der Lage, diese Resistenz leicht zu erhöhen. Der Zink-Cluster-Transkriptionsfaktor Upc2 spielt schon für die wildtypische Toleranz gegenüber Fluconazol eine wichtige Rolle. Somit führte die Deletion von *UPC2* zu einer Hypersensitivität gegenüber diesem Antimykotikum (Abbildung 5 C). Die Expression dieses Regulators unter dem *ADH1*-Promotor bewirkte dementsprechend auch schon einen leichten Anstieg der Fluconazoltoleranz. Stämme mit dem Fusionsprotein der Upc2-DBD und der Gal4-AD waren dennoch resistenter gegenüber Fluconazol. Diese erhöhte Fluconazolresistenz war durchaus vergleichbar mit der, die von einem hyperaktiven Upc2 mit einer G648D *gain-of-function*-Mutation bewirkt wurde.

Interessanter Weise konnte Schubert *et al.*, 2011b zeigen, dass das bloße Anhängen eines C-terminalen Epitops (3x HA-Epitop) an Mrr1 zu einem hyperaktiven Regulator führte. Dieser war in der Lage, die Fluconazolresistenz genauso zu erhöhen wie ein Mrr1 mit einer natürlich vorkommenden *gain-of-function*-Mutation (Abbildung 5 A). Ähnliche Beobachtungen konnten auch von Znaidi *et al.*, 2008 für Upc2 gemacht werden. Aufgrund dessen lag die Vermutung nahe, dass die Fusion der kompletten offenen Leseraster von *MRR1*, *TAC1* und *UPC2* mit der *GAL4*-AD eventuell zu einer höheren konstitutiven Aktivität dieser Regulatoren führen könnte. Die daraufhin hergestellten Stämme, die diese neuen Fusionen exprimierten, wiesen in allen drei Fällen eine stark erhöhte Fluconazolresistenz auf (siehe Abbildung 5 A-C, schwarze Balken). Diese Resistenz der Stämme mit den artifiziell aktivierten (*) Mrr1*, Tac1* und Upc2* war durchaus vergleichbar mit jener die von Stämmen erreicht wird, die natürlich vorkommende *gain-of-function*-Mutationen in den entsprechenden

Regulatoren besitzen. Mrr1* und Tac1* bewirkten hierbei einen 32-fachen Anstieg der Fluconazolresistenz (Abbildung 5 A und B). Im Fall des künstlich aktivierten Upc2* konnte eine 4-fach erhöhte Resistenz, verglichen mit dem Wildtyp, vermerkt werden. Alle drei aktivierten Regulatoren waren in der Lage, trotz Anwesenheit der entsprechenden endogenen wildtypischen Allele, Resistenz zu bewirken. Zusammengenommen demonstrieren diese Ergebnisse, dass die Fusion von den Zink-Cluster-Transkriptionsfaktoren Mrr1, Tac1 und Upc2 mit der Gal4-AD aus *S. cerevisiae* tatsächlich zu einer künstlichen Aktivierung führte. Diese Methode könnte sich demzufolge als eine generelle Strategie zur funktionellen Analyse der Zink-Cluster-Transkriptionsfaktoren eignen. Sie stellt ein erfolgsversprechendes zusätzliches Werkzeug zu den konventionellen Methoden der funktionellen Charakterisierung dieser Proteinfamilie dar. Die Tatsache, dass weder die Deletion, noch die Überexpression von *MRR1* und auch *TAC1* deren Rolle in der Resistenzentwicklung offenbaren konnte, wohingegen jedoch die artifizielle Aktivierung deren Fähigkeit zur Resistenzvermittlung aufdeckte, machte diesen neuartigen Ansatz noch attraktiver. Deshalb wurde diese Strategie genomweit für alle putativen Zink-Cluster-Transkriptionsfaktoren von *C. albicans* angewendet.

3.2. Die Bibliothek der artifiziell aktivierten Zink-Cluster-Transkriptionsfaktoren

Um die gesamte Proteinfamilie der Zink-Cluster-Transkriptionsfaktoren von *C. albicans* artifiziell zu aktivieren, wurden zunächst alle Gene mit dem typischen Zink-Cluster-Motiv mithilfe der Genomsequenz identifiziert und in eine entsprechende Expressionskassette (siehe Material und Methoden 2.1. Abbildung 1) kloniert. Für jeden einzelnen Transkriptionsfaktor wurden jeweils zwei unabhängige Expressionskassetten hergestellt, um via Sequenzierung noch unbekannte Polymorphismen von möglichen PCR-Fehlern zu unterscheiden. Die so entstandene Plasmidbibliothek umfasste alle 82 putativen Zink-Cluster-Transkriptionsfaktoren von *C. albicans*. Die entsprechenden Expressionskassetten wurden anschließend isoliert und in den Wildtypstamm SC5314 transformiert. Es konnten für alle Regulatoren dieser Familie positive Transformanten

erzeugt werden, mit Ausnahme von *ZCF29*, dessen Expression in dieser hyperaktiven Form scheinbar zu einem letalen Phänotyp führte. Der Nachweis der potentiell hyperaktiven Proteine erfolgte per Western Blot Analysen mithilfe eines Anti-HA-Antikörpers. Für jeden Transkriptionsfaktor wurden zwei unabhängige Transformanten erzeugt, um die Reproduzierbarkeit der entsprechenden Phänotypen zu verifizieren.

Die künstliche Aktivierung einiger Transkriptionsfaktoren führte zu einer direkt sichtbaren phänotypischen Veränderung. Dadurch konnten bereits nach der Transformation Rückschlüsse auf deren Funktionen gezogen werden. Exemplarisch sind in Abbildung 6 die Stämme mit den hyperaktiven Regulatoren *Ume6**, *Ahr1** (*Zcf37**), *Zcf17**, *orf19.1604** und *Sef1** dargestellt. Zum Vergleich dient eine wildtypische Kolonie von SC5314 im oberen Bildteil.

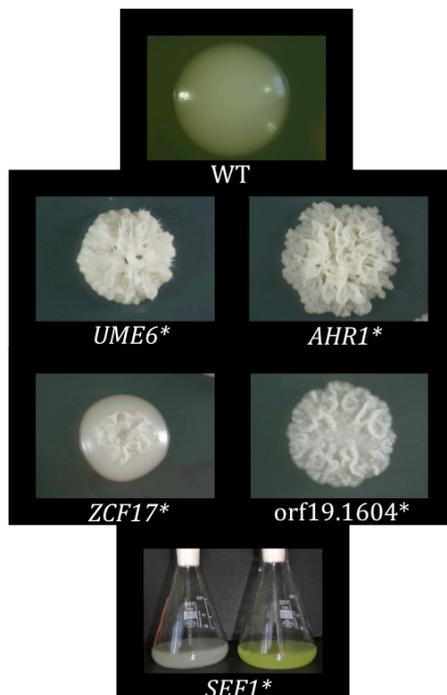


Abb. 6: Phänotypen von Stämmen mit artifiziell aktivierten Zink-Cluster-Transkriptionsfaktoren. Die Expression des artifiziell aktivierten *UME6**, *AHR1** und *ZCF17** bedingt filamentöses Wachstum unter Standardbedingungen. Gezeigt sind repräsentative Kolonien nach 2-tägigem Wachstum bei 30°C auf YPD-Agarplatten. Die artifizielle Aktivierung des *orf19.1604** führte unter Selektionsdruck von Nourseothricin zu stark gerunzelten Kolonien. (Wachstum: 2 Tage, 30°C auf N200-Platten). Die Expression des hyperaktiven *SEF1** bewirkte die Produktion eines gelblichen Überstandes in Flüssigkulturen. Dargestellt sind Übernachtkulturen des Wildtypstammes SC5314 (links) und dessen Derivat mit der *SEF1-GALAD*-Fusion (*SEF1**; rechts). Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 30°C in SD-Medium.

Ume6 ist ein Regulator, der essentiell für die Virulenz von *C. albicans* ist [Banerjee *et al.*, 2008]. Er ist maßgeblich für filamentöses Wachstum verantwortlich. Unter Standardbedingungen wird er in *C. albicans* nicht exprimiert [Kadosh and Johnson, 2005]. In Abbildung 6 ist ersichtlich, dass *Ume6* durch die Fusion mit der Gal4-AD scheinbar in einem permanent aktiven Zustand vorhanden ist. Dadurch produzierten die transformierten Zellen obligatorisch Hyphen und die dafür typischen, stark gerunzelten Kolonien. Eine ähnliche Morphologie konnte auch bei *AHR1** beobachtet

werden. Für diesen Transkriptionsfaktor wurden ebenfalls wichtige Funktionen bei der Regulation von Virulenzfaktoren nachgewiesen [Askew *et al.*, 2011]. Auch der Transkriptionsfaktor *ZCF17* scheint beim filamentösen Wachstum eine Rolle zu spielen [Vandeputte *et al.*, 2011]. Obwohl für *zcf17*-Deletionsmutanten sowohl verstärktes als auch vermindertes Hyphenwachstum berichtet wurden, so scheint er im hyperaktiven Zustand die Filamentierung zu verstärken. Mithilfe der artifiziellen Aktivierung der Transkriptionsfaktoren konnten auch noch unbekannte Regulatoren des Hyphenwachstums entdeckt werden. Der Transkriptionsfaktor mit der Nummer orf19.1604 führte im hyperaktiven Zustand unter Nourseothricin-Selektionsdruck zu stark gerunzelten Kolonien. Unverkennbar ist auch der Einfluss des hyperaktiven Sef1*. Die *SEF1**-Zellen produzierten immer einen gelb-grünen Überstand, der besonders deutlich im flüssigen Minimalmedium zu erkennen ist. Für diesen Transkriptionsfaktor wurde kürzlich gezeigt, dass er bei der Eisen-Homöostase eine Rolle spielt und besonders unter Eisen-Mangelbedingungen aktiv ist [Chen *et al.*, 2011]. Mit diesen Bedingungen soll eine Produktion von Flavinen einhergehen, was ein Grund für die Farbe des Überstandes sein könnte [Knight *et al.*, 2002].

3.3. Neue Regulatoren der Fluconazolresistenz

Einige Vertreter bisher beschriebener Zink-Cluster-Transkriptionsfaktoren haben einen entscheidenden Einfluss auf die *Multidrug*-Resistenz in *C. albicans*. Darum lag die Vermutung nahe, dass weitere bislang noch unentdeckte Mitglieder dieser Proteinfamilie ebenfalls bei der Resistenzentwicklung eine Rolle spielen. Um herauszufinden, ob und welche dieser Regulatoren die Resistenz von *C. albicans* beeinflussen, wurden MHK-Tests mit dem gängigen Antimykotikum Fluconazol durchgeführt. Hierfür wurde für die gesamte Bibliothek der künstlich aktivierten Zink-Cluster-Transkriptionsfaktoren die MHK mit der unter 2.5. beschriebenen Methode bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 7 veranschaulicht.

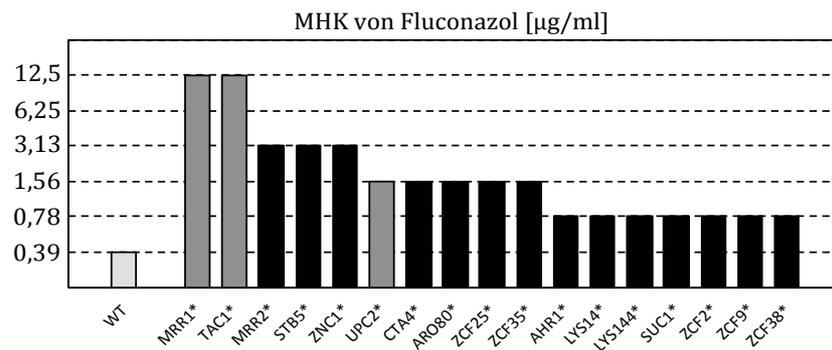


Abb. 7: Die artifizielle Aktivierung der Zink-Cluster-Transkriptionsfaktoren identifizierte neue Resistenzregulatoren in *C. albicans*. MHK von Fluconazol [µg/ml] für den Wildtypstamm SC5314 (hellgrau), den künstlich aktivierten Stämmen *MRR1**, *TAC1** und *UPC2** (grau) und den Stämmen mit künstlich aktivierten Zink-Cluster-Transkriptionsfaktoren, die durch eine erhöhte Resistenz auffielen (schwarz). Die MHK-Tests wurden in SD-CSM-Medium durchgeführt. Unabhängig voneinander hergestellte Transformanten einer Serie verhielten sich identisch.

Mithilfe der künstlichen Aktivierung konnten 14 zusätzliche, zu den drei bislang bekannten, Zink-Cluster-Transkriptionsfaktoren entdeckt werden, die einen Einfluss auf die Fluconazolresistenz ausüben. Drei von ihnen vermittelten sogar eine höhere Resistenz als *UPC2**, bei dem es verglichen mit dem Wildtyp zu einem 4-fachen Anstieg der Resistenz kam. Der Transkriptionsfaktor, welcher in der oben stehenden Abbildung als *MRR2* bezeichnet wird, hatte den vorläufigen Namen *ZCF34*. Da diesem in der vorliegenden Arbeit wichtige Funktionen bei der Regulation der *Multidrug*-Effluxpumpe *CDR1* nachgewiesen werden konnten (siehe Abschnitt 3.5.), wird er im Folgenden als *MRR2* (*multidrug resistance regulator 2*) bezeichnet. Zusammen mit den Stämmen *STB5** und *ZNC1** wuchs er bis zu einen MHK-Wert von 3,13 µg/ml, was einem Anstieg der Fluconazolresistenz um das 8-fache, verglichen mit dem Wildtyp, entspricht. *CTA4**, *ARO80**, *ZCF25** und *ZCF35** wiesen eine 4-fach erhöhte Fluconazolresistenz auf. Die Stämme mit den hyperaktiven *Ahr1**, *Lys14**, *Lys144**, *Suc1**, *Zcf9** und *Zcf38** konnten die Fluconazol-MHK zumindest noch um eine Stufe erhöhen. Alle anderen Stämme der Bibliothek, die nicht in der Abbildung 7 gezeigt sind, besaßen eine wildtypische Fluconazolempfindlichkeit.

Die Stämme *CTA4**, *STB5**, *MRR2** und *ZNC1** wurden für weitere Analysen ausgewählt, da sie die höchste Fluconazolresistenz verursachten. *CTA4** befand sich trotz der MHK von 1,6 µg/ml mit in der Auswahl, weil er in dem ersten Screening ebenfalls eine 8-fach erhöhte Resistenz aufwies. Zunächst sollte überprüft werden, ob die Deletion dieser vier

Transkriptionsfaktoren oder die Expression der entsprechenden wildtypischen Gene unter dem starken *ADH1*-Promotor auch deren Funktion in der Resistenzentwicklung offenbart. Demzufolge wurden entsprechende Deletionsmutanten und Überexpressionsstämme hergestellt. Anschließend wurde deren Sensitivität gegenüber Fluconazol in einem MHK-Test bestimmt (Abbildung 8).

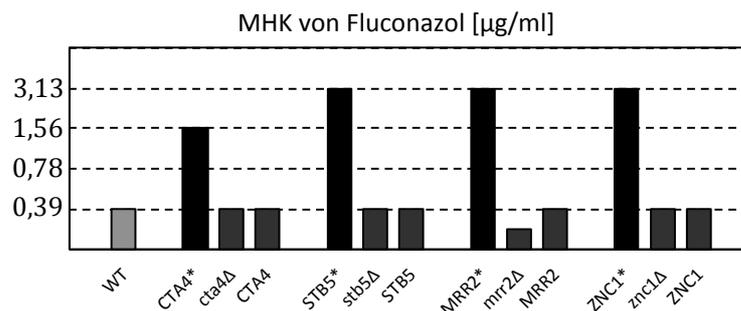


Abb. 8: Vergleich: künstliche Aktivierung, Deletion und Überexpression. MHK von Fluconazol [$\mu\text{g/ml}$] für den Wildtypstamm SC5314, für die Stämme, die die hyperaktiven Transkriptionsfaktoren *CTA4**, *STB5**, *MRR2** und *ZNC1** bzw. die entsprechenden wildtypischen Regulatoren unter der Kontrolle des starken *ADH1*-Promotors (über-)exprimieren und für die Deletionsmutanten *cta4Δ*, *stb5Δ*, *mrr2Δ* und *znc1Δ*. Die MHK-Tests wurden in SD-CSM-Medium durchgeführt. Unabhängig voneinander hergestellte Transformanten einer Serie verhielten sich identisch.

In Abbildung 8 sind die Vorzüge der neu etablierten Methode noch einmal deutlich demonstriert. Weder die Deletion von *CTA4*, *STB5* noch die von *ZNC1* führte zu einer erhöhten Fluconazolempfindlichkeit. Lediglich die *mrr2*-Deletionsmutante zeigte eine leichte Sensitivität gegenüber Fluconazol, was zuvor auch schon von Homann *et al.*, 2009 beschrieben wurde. Die Expression der genannten Transkriptionsfaktoren unter der Kontrolle des *ADH1*-Promotors hatte keinerlei Auswirkungen auf die Fluconazoltoleranz.

3.4. Genexpressionsprofile von *CTA4**, *STB5**, *MRR2** & *ZNC1**

Um herauszufinden, welche Gene von *C. albicans* in den Stämmen *CTA4**, *STB5**, *MRR2** und *ZNC1** hochreguliert sind, also potentielle Zielgene der vier Zink-Cluster-Transkriptionsfaktoren sein könnten, wurden bei der Firma Febit Microarray-Analysen der entsprechenden Stämme in Auftrag gegeben. Hierbei wurden deren Transkriptionsprofile mit dem des Wildtypstamms SC5314 verglichen. Eine Liste der vollständigen Profile, mit allen mindestens 2-fach hochregulierten Genen, befindet sich im Anhang dieser Arbeit (Tabelle 6; Seite 101ff).

Das rechts stehende Diagramm gibt einen kompakten Überblick über die Anzahl der hochregulierten Gene in den Stämmen mit den vier künstlich aktivierten Transkriptionsfaktoren. So konnten für *CTA4** insgesamt 153 hochregulierte Gene festgestellt werden. In *STB5** sind es 137 Hochregulierungen und in *MRR2** und *ZNC1** 32 bzw. 104.

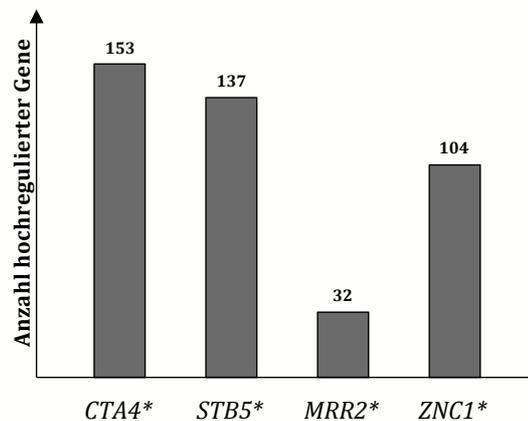


Abb. 9: Anzahl hochregulierter Gene in *CTA4**, *STB5**, *MRR2** und *ZNC1**.

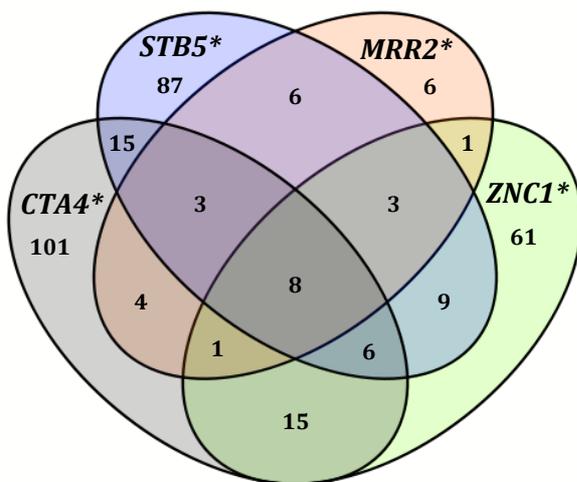


Abb. 10: Venndiagramm der hochregulierten Gene.

Interessanterweise gab es in allen vier Stämmen 71 überlappende Hochregulierungen, d. h. es gab zahlreiche Gene, die von mindestens zwei der hyperaktiven Transkriptionsfaktoren beeinflusst werden. Zur besseren Übersicht wurde dies in dem nebenstehenden Venndiagramm veranschaulicht.

Beeindruckender Weise gab es unter den hochregulierten Genen ein Set aus acht Genen, welches in allen vier Stämmen verstärkt exprimiert wurde (siehe Tabelle 5; Seite 64). Zu diesen acht Genen gehört z. B. *PDR16* und der orf19.344, die beide auch Teil des Tac1-Regulons sind [Liu *et al.*, 2007; Znaidi *et al.*, 2007]. Der orf19.7042, ebenfalls Bestandteil des Sets, konnte zuvor auch schon in Zusammenhang mit Azolresistenz gebracht werden. Er ist eines der Zielgene von Mrr1 [Schubert *et al.*, 2011a]. Des Weiteren wurden die Gene für eine Glutathion-S-Transferase (*GST2*), eine Superoxiddismutase (*SOD3*) und eine alternative Oxidase (*AOX2*) in allen vier Stämmen stärker exprimiert. Aber auch die Gene *ALS1* und der orf19.5777, die wesentliche Funktionen bei der Adhäsion und der Biofilmbildung in *C. albicans* besitzen, zählten zu dem Set der acht verstärkt exprimierten Gene. Eine Übersicht über die gemeinsam hochregulierten Gene und die entsprechenden *fold-change*-Werte befindet sich in Tabelle 5.

Tab. 5: Übersicht der acht gemeinsam hochregulierten Gene.

| Gen | fold change | | | | Annotation |
|--------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---|
| | <i>CTA4</i> * | <i>STB5</i> * | <i>MRR2</i> * | <i>ZNC1</i> * | |
| <i>ALS1</i> | 3,84 | 4,56 | 7,13 | 21,92 | Adhäsion, ALS-Familie, Zelloberflächen Glykoprotein; wichtig bei der Biofilmproduktion und Virulenz |
| <i>AOX2</i> | 266,57 | 240,10 | 6,39 | 6,16 | Alternative Oxidase; wichtig bei oxidativem Stress |
| <i>GST2</i> | 38,08 | 7,24 | 4,48 | 4,52 | Glutathion-S-Transferase; hochreguliert in Fluconazol-exponierten Zellen |
| <i>PDR16</i> | 3,80 | 2,67 | 3,00 | 3,60 | Phosphatityl-Inositol-Transferprotein; korreliert mit <i>CDR1/CDR2</i> Überexpression und Azolresistenz |
| <i>SOD3</i> | 18,89 | 12,63 | 19,58 | 24,05 | Mangan-enthaltende, zytosolische Superoxiddismutase, in der stationären Phase exprimiert |
| orf19.344 | 19,73 | 17,06 | 77,97 | 61,27 | hochreguliert nach Fluphenazin-Behandlung und in azolresistenten Stämmen mit hochregulierten <i>CDR1</i> und <i>CDR2</i> , eventuell Tac1 reguliert |
| orf19.5777 | 4,50 | 6,78 | 2,79 | 9,03 | induziert während Biofilmproduktion |
| orf19.7042 | 22,72 | 8,70 | 4,54 | 25,88 | hochreguliert in azolresistenten, <i>MDR1</i> überexprimierenden Stämmen |

Um die Microarray-Daten zu verifizieren wurden anschließend Northern-Hybridisierungen durchgeführt. Hierfür wurden Digoxigenin-markierte PCR-Sonden für die acht gemeinsam hochregulierten Gene hergestellt. Die Gesamt-RNA des

Wildtypstamms SC5314 und der Stämme *CTA4**, *STB5**, *MRR2** und *ZNC1** wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. Da diese zuvor mit Ethidiumbromid versehen wurde, diente die anschließende Geldokumentation gleichzeitig als Ladekontrolle. Der Transfer und die Hybridisierung erfolgten nach dem unter 2.3. beschriebenen Prinzip. Die Ergebnisse der Northern Hybridisierungen sind in der Abbildung 11 dokumentiert.

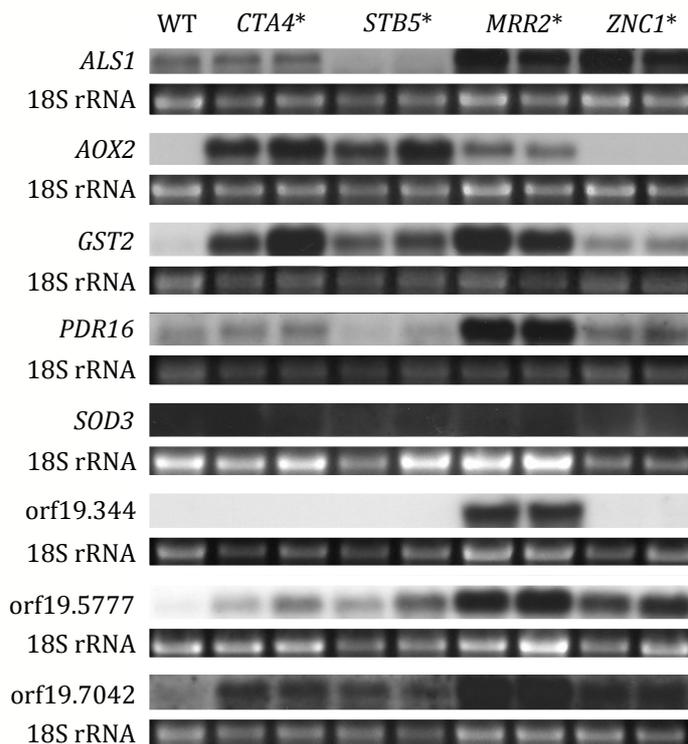


Abb. 11: Northern Hybridisierung. Nachweis der Transkripte, der acht in den Microarray-Analysen hochregulierten Gene in den Stämmen *CTA4**, *STB5**, *MRR2**, *ZNC1** und dem Wildtypstamm SC5314. Ethidiumbromid-gefärbte 18S rRNA diente als Ladekontrolle.

Mithilfe der Northern-Blot-Analysen konnten die Microarray-Daten nur teilweise bestätigt werden. So war eine verstärkte *ALS1*-Expression nur in den Stämmen *MRR2** und *ZNC1** mit der Northern-Blot-Technik nachweisbar. Eine erhöhte Expression von *AOX2* war für *ZNC1** mittels Northern Hybridisierung nicht detektierbar, wohingegen eine erhöhte *GST2*-mRNA-Konzentration in allen vier Stämmen festgestellt werden konnte. Eine stärkere *PDR16*-Transkription war auf diesem Wege nur in *MRR2** zu verifizieren. Der Nachweis der *SOD3*-Expression gestaltete sich in vier allen Stämmen schwierig, da die entsprechenden Banden immer von einem starken unspezifischen Signal überschattet wurden. Die mRNAs vom orf19.344 konnten mit der angewandten Northern-Blot-Methode nur in *MRR2** detektiert werden, wogegen sich die erhöhte Expression des orf19.5777 und des orf19.7042 in allen vier Stämmen verifizieren ließ.

Zur Überprüfung, ob eines der laut Microarray-Daten hochregulierten acht Gene für die Fluconazolresistenz verantwortlich ist, wurden parallel dazu Deletionsmutanten dieser acht Gene hergestellt. Anschließend wurden die künstlich aktivierten Zink-Cluster-Transkriptionsfaktoren in die Deletionsmutanten integriert. Da einige der acht Gene auch potentielle Zielgene von Mrr1 und Tac1 darstellen, erfolgte die Integration der künstlich aktivierten Versionen dieser Regulatoren ebenfalls in die konstruierten Deletionsmutanten. Anschließende MHK-Analysen mit Fluconazol offenbarten keine neuen Erkenntnisse im Hinblick auf noch unbekannte Resistenzmechanismen. (Daten nicht gezeigt). Keine der Deletionsmutanten war hypersensitiv gegenüber Fluconazol. Die getesteten Stämme mit den hyperaktiven Transkriptionsfaktoren waren trotz der verschiedenen Deletionen in der Lage, die entsprechende erhöhte Fluconazolresistenz zu bewirken. Lediglich die Deletion von *pdr16* reduzierte sowohl in *CTA4** und *ZNC1** als auch in *MRR1** und *TAC1** die Resistenz um eine Stufe, wohingegen sich die MHK, bedingt durch das hyperaktive *Stb5** in der *pdr16*-Mutante, sogar um eine Stufe erhöhte.

Interessanterweise zeigten die Microarray-Analysen von *STB5**, *MRR2** und *ZNC1** auch eine Hochregulation von *CDR1*, eine der wichtigsten *Multidrug*-Effluxpumpen in *C. albicans*. Die Überexpression solcher Transporter, von denen in *C. albicans* bislang nur drei beschrieben werden konnten, ist einer der wichtigsten und effektivsten Resistenzmechanismen (siehe Abschnitt 1.3. und 1.4.) in *Candida*.

3.5. Mrr2, ein neuer Regulator von *CDR1*, der wichtigsten *Multidrug*-Effluxpumpe in *C. albicans*

Die Resistenzentwicklung gegen die limitierte Anzahl von Antimykotika stellt ein zunehmend größer werdendes Problem bei *C.-albicans*-Infektionen dar. Um so wichtiger ist das Aufklären der molekularen Ursachen dieser Problematik. In der Einleitung dieser Arbeit wurden die bisher bekannten Resistenzstrategien von *C. albicans* detailliert geschildert. Dabei wurde auch beschrieben, dass die *Multidrug*-Transporter *CDR1*, *CDR2* und *MDR1* häufig durch deren Überexpression zu solchen *Multidrug*-Resistenzen führen [Morschhäuser, 2010]. Die Expression dieser Gene wird durch Zink-Cluster-Transkriptionsfaktoren reguliert, in denen es zu *gain-of-function*-Mutationen

kommen kann. Die somit bewirkte Hyperaktivität der Regulatoren ist letztendlich die Ursache für die Überexpression der Effluxpumpen [Coste *et al.*, 2006; Morschhäuser *et al.*, 2007]. Für die Regulierung der Expression von *CDR1* und *CDR2* wurde der Transkriptionsfaktor *TAC1*, als zentraler Regulator der *CDR1/2*-vermittelten *Multidrug*-Resistenz, beschrieben. Der Zink-Cluster-Transkriptionsfaktor *MRR1* ist der zentrale Regulator von *MDR1*. Die *MDR1*-Überexpression in azolresistenten klinischen Isolaten wird meist durch *gain-of-function*-Mutationen in *MRR1* verursacht.

3.5.1. *MRR2** und *ZNC1** erhöhen die *CDR1*-Expression

Wie bereits oben erwähnt, konnte anhand der Microarray-Daten eine Hochregulierung der *Multidrug*-Effluxpumpe *CDR1* in den Stämmen *STB5**, *MRR2** und *ZNC1** festgestellt werden, wogegen weder für *MDR1* noch für *ERG11* eine erhöhte Expression nachweisbar war. Die Überexpression von Ergosterolbiosynthesegenen, wie *ERG11*, gehört ebenfalls zu den gängigen Resistenzmechanismen gegen Fluconazol. Diese werden u. a. durch den Zink-Cluster-Transkriptionsfaktor Upc2 reguliert (siehe Abschnitt 1.3.). Da sich die Microarray-Ergebnisse jedoch zuvor nur zu ca. 70% verifizieren ließen, wurde auch die Expression von *CDR1*, *MDR1* und *ERG11* mittels Northern Hybridisierung überprüft. Dabei fand ebenfalls der Vergleich zwischen der wildtypischen mRNA von SC5314 mit der von *CTA4**, *STB5**, *MRR2** und *ZNC1** statt. In der folgenden Abbildung sind die entsprechenden Ergebnisse dokumentiert. Die Detektion der *MDR1*-Transkripte ist nicht abgebildet, da die *MDR1*-Expression unter Standardbedingungen nicht angeschaltet und somit im Wildtyp kaum nachweisbar ist. Gleiches galt auch für die Stämme *CTA4**, *STB5**, *MRR2** und *ZNC1**, wodurch die entsprechenden Microarray-Ergebnisse bestätigt wurden.

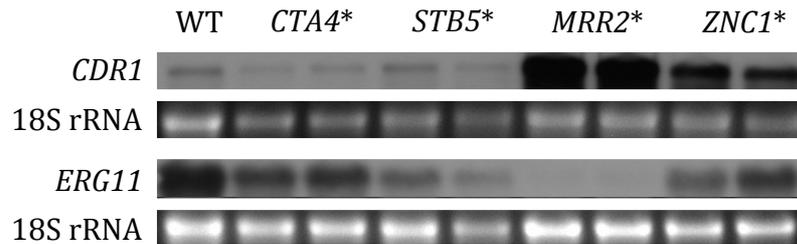


Abb. 12: Nachweis der Genexpression von *CDR1* und *ERG11* via Northern Hybridisierung. *CDR1*- und *ERG11*-Transkripte wurden im Wildtypstamm SC5314 und in zwei unabhängigen Transformanten, die die angegebenen hyperaktiven Regulatoren exprimieren, mit entsprechenden Sonden detektiert. Als Ladekontrolle fungierte die Ethidiumbromid-gefärbte 18S rRNA.

Wie deutlich in Abbildung 12 zu erkennen, war die *CDR1*-Expression in den Stämmen *MRR2** und *ZNC1** stark erhöht. Hiermit bestätigen sich demnach die Microarray-Daten, die für die entsprechenden Stämme eine mehr als 4-fache Hochregulierung von *CDR1* zeigten. Die erhöhte Expression von *CDR1* in *STB5** konnte mittels Northern Hybridisierung nicht verifiziert werden. Auch für *ERG11* konnte in keinem der Stämme eine erhöhte Expression nachgewiesen werden. Im Fall von *MRR2** war im Northern Blot sogar eine deutliche Reduktion der *ERG11*-Expression sichtbar. Dies wurde auch schon mit den Microarray-Daten impliziert. Gleiches galt für die verminderte *ERG11*-Expression in *STB5**.

Obwohl für die Northern Hybridisierung zum Nachweis der *CDR1*-Expression ein Sonde hergestellt wurde, die möglichst spezifisch für *CDR1* ist, so kann durch die hohe Homologie zu *CDR2*, ein weiterer *Multidrug*-Transporter, nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass nur die *CDR1*-Expression nachgewiesen wurde. Dafür sprachen die Microarray-Ergebnisse, in denen keine erhöhte *CDR2*-Expression detektiert wurde. Um jedoch sicher zu gehen, dass es sich tatsächlich um eine erhöhte *CDR1*-Expression handelte, wurden entsprechende *GFP*-Reporterstämme konstruiert. Hierbei befand sich das *GFP*-Gen unter der Kontrolle des *CDR1*- bzw. *CDR2*-Promotors. Durch das Einbringen der artifiziell aktivierten Transkriptionsfaktoren *STB5**, *MRR2** und *ZNC1** in diese Reporter sollte festgestellt werden, ob diese in der Lage sind, die entsprechenden Promotoren anzuschalten. Als Kontrolle wurde *TAC1** verwendet, von dem bekannt ist, sowohl die *CDR1*- als auch die *CDR2*-Expression zu regulieren [Coste *et al.*, 2004]. Anschließend erfolgten FACS-Analysen, deren Ergebnisse in Abbildung 13 dargestellt sind.

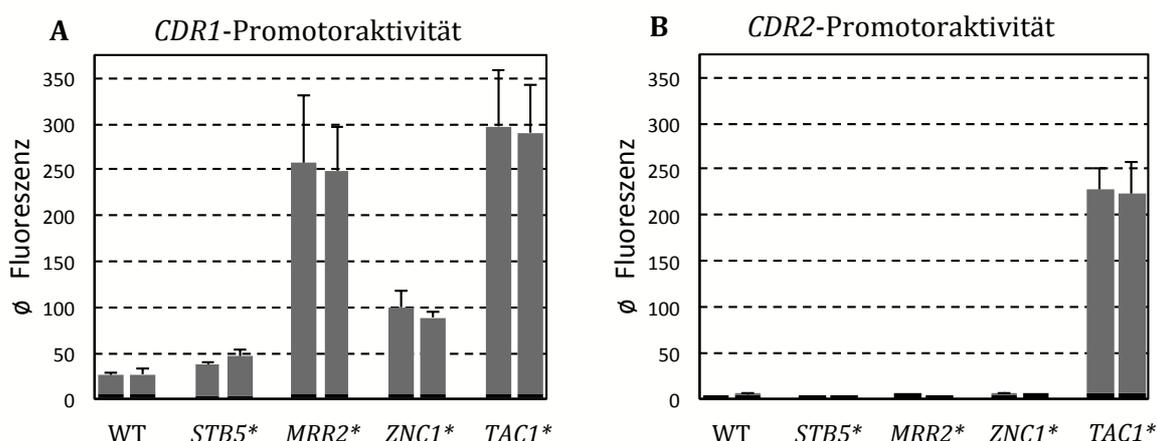


Abb. 13: CDR1- und CDR2-Promotoraktivität in Stämmen mit artifiziiell aktivierten Zink-Cluster-Transkriptionsfaktoren. Die getesteten *C. albicans*-Stämme enthielten P_{CDR1} -GFP- (A) oder P_{CDR2} -GFP- (B) Reporterfusionen und exprimierten die angegebenen hyperaktiven Regulatoren unter der Kontrolle des *ADH1*-Promotors. Nach der Anzucht in YPD-Medium bis zur *log*-Phase wurde die durchschnittliche Fluoreszenz der Zellen mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Gezeigt sind jeweils die Ergebnisse zweier unabhängig hergestellter Reporterstämmen. Die Durchschnittswerte und Standardabweichungen berechneten sich aus den Ergebnissen von drei unabhängigen Experimenten. Die Hintergrundfluoreszenz von sonst identischen Stämmen ohne GFP ist mithilfe der schwarzen Bereiche in jeder Säule dargestellt.

Die FACS-Analysen bestätigten eindeutig eine erhöhte *CDR1*-Expression in *MRR2** und *ZNC1**. Somit war zweifelsfrei bewiesen, dass es sich bei den detektierten Transkripten in den Northern Hybridisierungen um die von *CDR1* handelte. Mithilfe der Reporterstämmen konnte ebenfalls keine verstärkte *CDR1*-Expression in *STB5** nachgewiesen werden, was die diesbezüglichen Northern-Blot-Ergebnisse bestätigte. Die besonders starke *CDR1*-Promotoraktivität in dem Stamm mit dem artifiziiell aktivierten *MRR2** war durchaus vergleichbar mit jener, die von dem künstlich hyperaktiven *TAC1** bewirkt wurde. In der Abbildung 13 B ist deutlich zu erkennen, dass nur *TAC1** in der Lage war, den *CDR2*-Promotor anzuschalten. Die anderen Transkriptionsfaktoren scheinen also bei der Regulierung der *CDR2*-Expression keine Rolle zu spielen. Dem Teil A der Abbildung 13 ist ferner zu entnehmen, dass *CDR1* als einzige der *Multidrug*-Effluxpumpen über eine basale Expression verfügt. Weder eine *CDR2*- (siehe Abbildung 13 B) noch eine *MDR1*-Expression kann unter Standardbedingungen in wildtypischen Stämmen detektiert werden. Außerdem ist die Überexpression von *CDR1* die häufigste Ursache für die Azolresistenz in klinischen Isolaten. So geht die Deletion dieses *Multidrug*-Transporters in *CDR1/2*-überexprimierenden klinischen Isolaten mit einem stärkeren Verlust der Azolresistenz

einher, als es die Deletion von *CDR2* bewirkt [Tsao *et al.*, 2009]. Auch in wildtypischen Laborstämmen führt die Inaktivierung der *CDR1*-Allele zu einer Hypersensitivität gegenüber vielen Antimykotika, inklusive Fluconazol [Sanglard *et al.*, 1996]. Damit stellt Cdr1 die wichtigste *Multidrug*-Effluxpumpe für *C. albicans* dar.

3.5.2. Die Überexpression von *CDR1* ist für die Fluconazolresistenz von *MRR2** und *ZNC1** verantwortlich

Um zu überprüfen, ob die erhöhte Expression von *CDR1* für die Fluconazolresistenz in den Stämmen *MRR2** und *ZNC1** verantwortlich war, wurden Deletionsmutanten von *CDR1* hergestellt. In diese erfolgte anschließend die Integration der hyperaktiven Transkriptionsfaktoren *CTA4**, *STB5**, *MRR2**, *ZNC1** und *TAC1**. Die *cdr1Δ*-Mutante mit dem hyperaktiven *TAC1** fungierte als Positivkontrolle, weil bekannt ist und in dieser Arbeit auch demonstriert wurde, dass *TAC1* die *CDR1*-Expression reguliert und im hyperaktiven Zustand, sei es natürlich oder künstlich, für deren Überexpression und daraus resultierende Fluconazolresistenz verantwortlich ist. Im Anschluss wurden die MHK-Werte von Fluconazol für diese Stämme bestimmt. Das Resultat ist in Abbildung 14 dokumentiert.

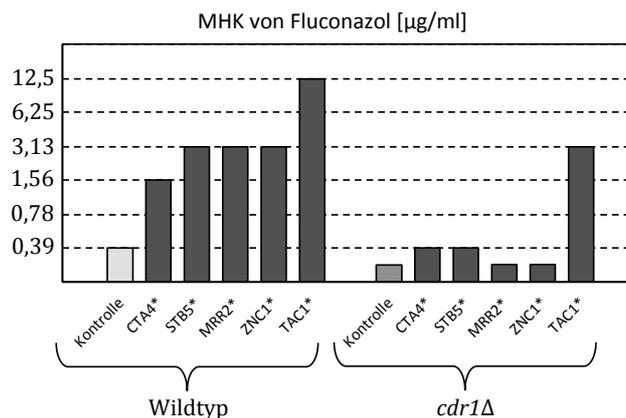


Abb. 14: Cdr1 ist für die Fluconazolresistenz in *MRR2 und *ZNC1** verantwortlich.** MHK von Fluconazol der Stämme mit den angegebenen künstlich aktivierten Zink-Cluster-Transkriptionsfaktoren im Wildtyp-Hintergrund und in den entsprechenden *cdr1Δ*-Mutanten. Die MHK-Tests wurden in SD-CSM-Medium durchgeführt. Unabhängig voneinander hergestellte Transformanten einer Serie verhielten sich identisch.

Wie bereits erwähnt, führt die Deletion von *CDR1* zur Hypersensitivität gegenüber Fluconazol. Dies ist auch an der erniedrigten Fluconazol-MHK, verglichen mit der des Wildtyps, in Abbildung 14 ersichtlich. Obwohl keine erhöhte *CDR1*-Expression in den Stämmen mit den künstlich aktivierten Regulatoren *CTA4** und *STB5** nachgewiesen werden konnte, reduzierte sich die *CTA4**- und *STB5**-bedingte Resistenz. Trotzdem waren beide hyperaktiven Transkriptionsfaktoren immer noch in der Lage, die MHK von Fluconazol, verglichen mit der des Ausgangsstammes *cdr1Δ*, um eine Stufe zu erhöhen. Das verdeutlicht erneut die Wichtigkeit des *Multidrug*-Transporters Cdr1. Beim Fehlen dieser Effluxpumpe kann trotz anderer Resistenzmechanismen die gewohnte Fluconazol-Toleranz nicht mehr erzielt werden. Die *cdr1Δ*-Mutanten mit den artifiziell aktivierten Regulatoren *MRR2** und *ZNC1** zeigten die gleiche Fluconazol-hypersensitivität, wie die *cdr1Δ*-Mutanten ohne hyperaktive Transkriptionsfaktoren. Damit wies alles daraufhin, dass die Überexpression von *CDR1* in den Stämmen mit den genannten aktivierten Regulatoren im wildtypischen Hintergrund für die erhöhte Fluconazolresistenz verantwortlich war. Fehlt *CDR1* konnte weder *MRR2** noch *ZNC1** eine Resistenz gegen Fluconazol verursachen. Im Vergleich dazu vermittelte *TAC1** trotz deletierter *CDR1*-Effluxpumpe Fluconazolresistenz. Dies bestätigt wiederum, dass *TAC1* auch an der Regulation anderer Resistenzgene, wie *CDR2* und *PDR16*, beteiligt ist [Coste *et al.*, 2004; Znaidi *et al.*, 2007].

3.5.3. *MRR2* reguliert die basale Expression von *CDR1*

Wie schon in Abbildung 13 A demonstriert, exprimiert *C. albicans* die *CDR1*-Effluxpumpe immer auf einem basalen Level. Sehr wahrscheinlich unterliegt auch diese basale Expression verschiedenen Regulationsprozessen. Chen *et al.*, 2004 zeigten, dass der Transkriptionsfaktor Ndt80, unter bestimmten Bedingungen, sowohl einen Einfluss auf die basale als auch auf die *Drug*-induzierte *CDR1*-Expression besitzt. Weitere Untersuchungen, bezüglich der Involvierung von Ndt80 in verschiedenste Regulationsprozesse der *Multidrug*-Resistenzmechanismen, konnten diese Funktionen von Ndt80 jedoch nicht bestätigen [Sasse *et al.*, 2011]. Aller Voraussicht nach ist die Regulierung der basalen *CDR1*-Expression ein komplex gesteuerter Prozess, für den nicht nur ein Regulator alleine verantwortlich sein kann und der höchstwahrscheinlich

von vielen verschiedenen Bedingungen reguliert wird. So demonstrierten [Shukla *et al.*, 2011], dass Ncb2, die β -Untereinheit des NC2-Komplexes (ein heterodimerischer Regulator der Transkription) als Repressor der *CDR1*-Expression fungiert und auch bei der Regulierung von Tac1-aktivierten Genen eine Rolle spielt. Tac1 ist der bekannteste Transaktivator der *CDR*-Gene [Coste *et al.*, 2004]. Er ist jedoch bewiesenermaßen nicht für die basale Expression verantwortlich, was auch in dieser Arbeit nochmals gezeigt wurde (siehe Abbildung 15). Außerdem kann die Expression der *CDR*-Gene auch durch verschiedene chemische Induktoren angeschaltet werden. Dazu gehört z. B. Fluphenazin, ein metabolischer Inhibitor, und β -Estradiol, ein Sexualhormon [Sanglard *et al.*, 1996; Cheng *et al.*, 2006].

Um herauszufinden, ob *MRR2* auch für die basale Expression oder die Induzierbarkeit von *CDR1* verantwortlich ist, wurde die P_{CDR1} -GFP-Reporterfusion in die *mrr2*-Deletionsmutanten eingebracht. Gleiches geschah auch mit den Deletionsmutanten *stb5* Δ , *znc1* Δ und *tac1* Δ . Anschließend wurde die *CDR1*-Promotoraktivität mittels Durchflusszytometrie uninduziert und nach Induktion mit Fluphenazin und β -Estradiol gemessen. Das Ergebnis ist im folgenden Diagramm dargestellt.

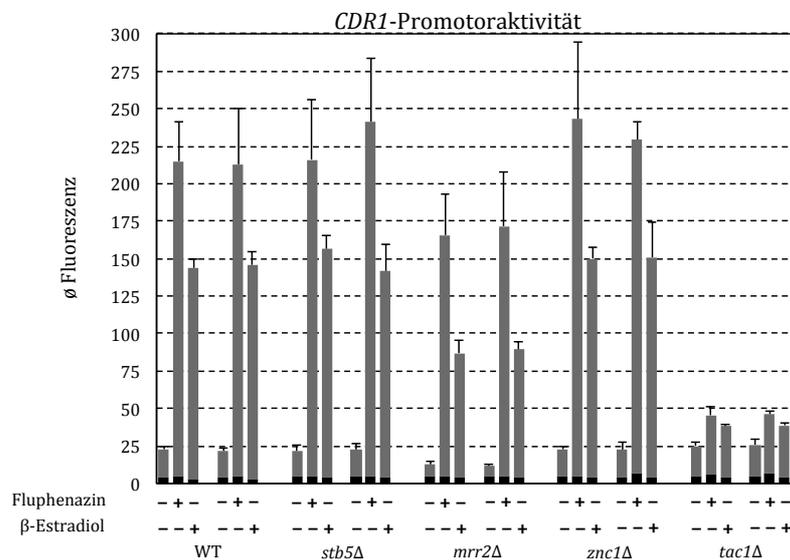


Abb. 15: Induzierbarkeit des CDR1-Promotors im Wildtyp und den Deletionsmutanten *stb5* Δ , *mrr2* Δ , *znc1* Δ und *tac1* Δ . Stämme mit einer P_{CDR1} -GFP-Reporterfusion in den entsprechenden genetischen Hintergründen wurden in Abwesenheit (-) oder Anwesenheit (+) von Fluphenazin bzw. β -Estradiol, wie im Abschnitt 2.7. beschrieben, angezchtet. Die Messung der durchschnittlichen Fluoreszenz der Zellen erfolgte mittels Durchflusszytometrie. Die Ergebnisse zweier unabhängig voneinander hergestellter Reporterstämmen sind jeweils nebeneinander dargestellt. Durchschnittswerte und Standardabweichungen stammen von drei verschiedenen Experimenten. Die Hintergrundfluoreszenz von sonst identischen Stämmen ohne GFP ist mithilfe der schwarzen Bereiche in jeder Säule dargestellt.

Das Diagramm in Abbildung 15 verdeutlicht erneut, dass der *CDR1*-Promotor über eine basale Aktivität verfügt. Das wird anhand der durchschnittlichen Fluoreszenz von ca. 25 im Wildtypstamm deutlich. Weder die basale Expression, noch die Induzierbarkeit des *CDR1*-Promotors veränderte sich durch die Deletion von *STB5* oder *ZNC1*. Eindeutig zu sehen ist aber, dass die Deletion von *MRR2* eine Reduktion der basalen *CDR1*-Promotoraktivität zur Folge hatte. Die durchschnittliche Fluoreszenz lag bei diesen Stämmen nur bei Werten von ca. 12. *MRR2* scheint demnach für die Regulation der basalen Expression von *CDR1* wichtig zu sein. Da der entsprechende Promotor aber noch über eine minimale Aktivität verfügte, spielen offenbar noch andere Faktoren bei der Regulierung eine Rolle. Auch die Induzierbarkeit des *CDR1*-Promotors in den *mrr2*-Mutanten war leicht reduziert, vermutlich bedingt durch die Reduktion der basalen Promotoraktivität. Denn verglichen mit der drastisch verminderten Induzierbarkeit in den *tac1*-Mutanten ist der Effekt in den *mrr2*-Mutanten vernachlässigbar. *TAC1* ist essentiell für die induzierte Expression von *CDR1*, was sowohl in Abbildung 15 ersichtlich ist, als auch schon von Coste *et al.*, 2004 gezeigt wurde. Gleiches gilt auch für die *CDR2*-Expression. Bei der basalen Promotoraktivität von *CDR1* spielt *TAC1* keine Rolle, da diese sich in der *tac1*-Mutante auf dem gleichen Level wie die des Wildtyps befindet.

3.5.4. *MRR2* und *TAC1* sind für die *CDR1*-Expression notwendig

TAC1 ist notwendig für das Anschalten der *CDR1*-Expression, wohingegen *MRR2* bei der Regulierung der basalen Expression dieser Effluxpumpe eine Rolle spielt. Beide verursachten im hyperaktiven Zustand eine Erhöhung der *CDR1*-Promotoraktivität, was eine gesteigerte Fluconazoltoleranz zur Folge hatte. Darum stellte sich die Frage, ob sie ihre jeweiligen Funktionen auch ohne den anderen ausüben können. Um dies zu beantworten, wurden in die Deletionsmutanten *mrr2* Δ und *tac1* Δ mit und ohne P_{CDR1} -GFP-Reporterfusion eine hyperaktive Version des jeweils anderen Transkriptionsfaktors eingebracht. Als hyperaktives *TAC1* wurde in diesem Fall ein *TAC1*-Allel mit einer natürlich vorkommenden *gain-of-function*-Mutation, die einen G980E-Austausch bewirkt, verwendet. Abbildung 16 veranschaulicht sowohl die *CDR1*-Promotoraktivität in Abhängigkeit der hyperaktiven und deletierten Transkriptionsfaktoren *TAC1* und *MRR2*, als auch deren Fluconazolresistenz in Abhängigkeit voneinander.

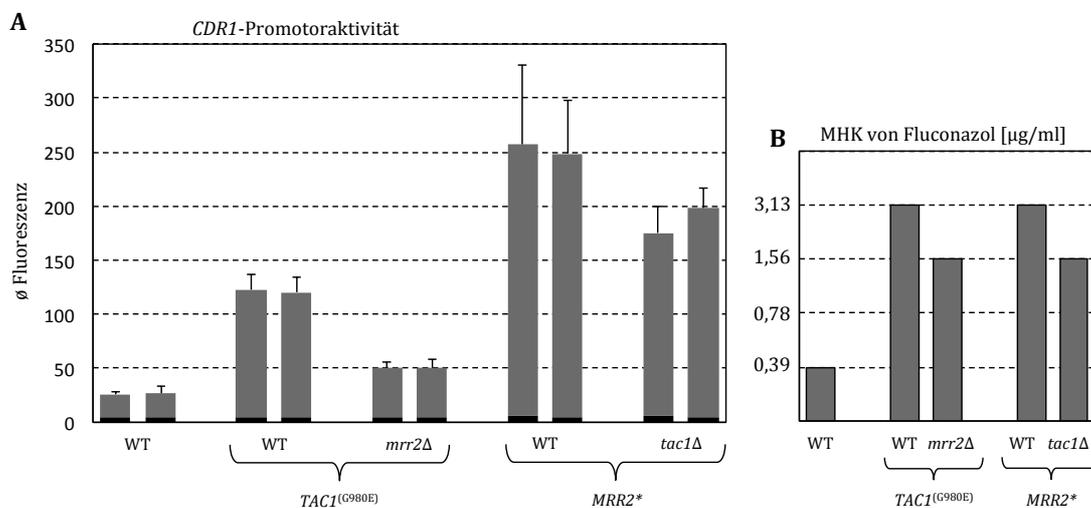


Abb. 16: Konstitutive Expression des *CDR1*-Promotors und Fluconazolresistenz in Abhängigkeit von *MRR2* und *TAC1*. (A): Die durchschnittliche Fluoreszenz der Stämme mit einer P_{CDR1} -GFP-Reporterfusion, in den entsprechenden genetischen Hintergründen, mit einem hyperaktiven *TAC1*-Allel (*TAC1*(G980E)) bzw. dem künstlich aktivierten *MRR2**, wurde per Durchflusszytometrie gemessen. Die Ergebnisse zweier unabhängig voneinander hergestellter Reporterstämme sind jeweils nebeneinander dargestellt. Durchschnittswerte und Standardabweichungen stammen von drei verschiedenen Experimenten. Die Hintergrundfluoreszenz von sonst identischen Stämmen ohne GFP ist mithilfe der schwarzen Bereiche in jeder Säule dargestellt. (B): MHK von Fluconazol [µg/ml] für den Wildtypstamm SC5314 und den Stämmen mit den angegebenen hyperaktiven Transkriptionsfaktoren unter der Kontrolle des *ADH1*-Promotors, in den entsprechenden genetischen Hintergründen. Die MHK-Tests wurden in SD-CSM-Medium durchgeführt. Unabhängig voneinander hergestellte Transformanten einer Serie verhielten sich identisch.

Abbildung 16 A zeigt, dass sowohl das hyperaktive *TAC1*, als auch das hyperaktive *MRR2** ohne Anwesenheit des jeweils anderen Transkriptionsfaktors, den *CDR1*-Promotor nicht mehr im vollen Umfang anschalten konnten. Die Fähigkeit zur Aktivierung des *CDR1*-Promotors eines hyperaktiven Tac1(G980E) reduzierte sich z. B. um mehr als die Hälfte, wenn *MRR2* deletiert war. Auch im umgekehrten Fall kam es zu einer Verminderung. Beim Fehlen von *TAC1* ist auch *MRR2** nicht mehr in der Lage, die *CDR1*-Expression wie gewohnt anzuschalten, auch wenn dieser Effekt nicht so drastisch war wie im umgedrehten Fall. Im Teil B der Abbildung 16 ist die Fähigkeit beider Transkriptionsfaktoren Fluconazolresistenz zu vermitteln in Abhängigkeit voneinander dargestellt. Aus diesem Diagramm wird deutlich, dass sowohl Tac1(G980E) als auch Mrr2* in der Lage waren, die Fluconazoltoleranz um das 4-fache zu erhöhen, verglichen mit dem Wildtyp, auch wenn der jeweils andere Transkriptionsfaktor deletiert ist. Dennoch waren die entsprechenden MHKs um die Hälfte vermindert (von 3,13 µg/ml auf 1,6 µg/ml). *TAC1* und *MRR2* funktionieren folglich auch ohne einander. Um jedoch die *CDR1*-Expression voll zu aktivieren und somit die *CDR1*-vermittelte Fluconazolresistenz im gewohnten Maße zu bewirken, sind beide Transkriptionsfaktoren notwendig bzw. von Vorteil. *CDR1* wird demnach von beiden Faktoren reguliert. Inwieweit jedoch eine indirekte oder sogar eine direkte Wechselwirkung zwischen beiden Transkriptionsfaktoren besteht, muss noch ermittelt werden.

4. Diskussion

Die Zunahme opportunistischer Infektionen durch pathogene Pilze verlangt immer mehr therapeutische Maßnahmen, was die Entwicklung von Resistenzen begünstigt. Die begrenzte Anzahl zur Verfügung stehender Antimykotika und die rasche Ausbreitung von Resistenzen gegen diese, macht es zwingend notwendig, die molekularen Ursachen der Resistenzmechanismen im Detail aufzuklären und auch neue Angriffsziele in der Pilzzelle zu finden, die sich durch ihre Einzigartigkeit als Zielstrukturen für neue Medikamente eignen. Zink-Cluster-Transkriptionsfaktoren existieren ausschließlich in Pilzen. Ihr DNA-Bindemotiv ist hochkonserviert und viele von ihnen stehen im Zusammenhang mit der Antwort auf Stresssignale und der *Multidrug*-Resistenz [MacPherson *et al.*, 2006]. Diese Regulatoren scheinen demnach essentiell für die Pathogenität von Pilzen zu sein, weshalb es erstrebenswert ist, die Mitglieder dieser Proteinfamilie zu charakterisieren.

4.1. Die artifizielle Aktivierung der Zink-Cluster-Transkriptionsfaktoren

Die Aktivität von Transkriptionsfaktoren wird auf vielfältige Weise reguliert. Meist sind bestimmte Konditionen notwendig, damit sie aktiviert werden und so die Transkription ihrer Zielgene stimulieren können. Diese sind jedoch oft nicht bekannt. Deshalb eignen sich Deletionsmutanten auch nur bedingt zur Analyse, da eventuelle Phänotypen auch meist nur unter diesen bestimmten Bedingungen offenbart werden können. Auch die Überexpression dieser Regulatoren, eine weitere gängige Methode zur funktionellen Analyse, hat ihre Schwachstellen. Für *C. albicans* gibt es z. B. keine Multikopie-Plasmide, wodurch maximal eine verstärkte Expression unter der Kontrolle eines starken Promotors möglich ist. Außerdem müssen viele Transkriptionsfaktoren aktiviert

werden, um ihre Aufgaben zu erfüllen. Das geschieht ebenfalls nur unter bestimmten meist unbekanntenen Bedingungen. Somit kann die bloße Überexpression von Transkriptionsfaktoren in einer Zelle, durch deren Inaktivität, ihre Funktionen trotzdem im Verborgenen lassen [Chua *et al.*, 2006]. In dieser Arbeit wurde deshalb eine Methode entwickelt, in der die Zink-Cluster-Transkriptionsfaktoren von *C. albicans* überexprimiert und künstlich aktiviert werden.

Deveaux und Marc zeigten bereits 2001, dass die Fusion der DNA-Bindedomäne (DBD) des *pleiotropic-drug-resistance*-Regulators Pdr1 aus *S. cerevisiae* mit der Gal4-Aktivierungsdomäne (AD) des gleichen Organismus zu einem funktionalen Protein führt. Dieses besitzt in der Hefe ein ähnliches Transkriptionsprofil wie ein Pdr1 mit natürlich vorkommenden *gain-of-function*-Mutationen und verursacht durch Überexpression des ABC-Transporters *PDR5* Multidrug-Resistenz. Sie postulierten schon damals, dass dies eine Methode sein könnte, die sowohl in *S. cerevisiae*, als auch in anderen pathogenen Pilzen für die Zink-Cluster-Transkriptionsfaktoren genomweit anwendbar wäre. In der Zwischenzeit wurden für *C. albicans* diverse *Knock-out*-Bibliotheken hergestellt und einige Mitglieder dieser Familie konnten so charakterisiert werden. Dennoch hat niemand versucht diese artifizielle Aktivierung, weder in *C. albicans* noch im Modellorganismus *S. cerevisiae*, zu etablieren und genomweit anzuwenden. Dies gelang in der vorliegenden Arbeit. Dabei erwies es sich jedoch als effektiver, den gesamten offenen Leserahmen der Zink-Cluster-Transkriptionsfaktoren mit der *GAL4*-AD von *S. cerevisiae* zu fusionieren.

Mrr1, Tac1 und Upc2 sind drei wichtige Regulatoren der *Multidrug*-Resistenz in *C. albicans*. Fusionsproteine aus deren DBD mit der Gal4-AD erzeugten im wildtypischen Hintergrund eine 2- bis 4-fach erhöhte Fluconazolresistenz, wohingegen die Hybridproteine aus der kompletten Mrr1-, Tac1- und Upc2-Sequenz und der Gal4-AD diese Resistenz um das 4- bis 32-fache erhöhten, was durchaus mit Werten vergleichbar ist, die von natürlich vorkommenden *gain-of-function*-Mutationen in diesen drei Regulatoren bewirkt werden. Es scheint demnach effektiver zu sein, die vollständigen Gene der Zink-Cluster-Transkriptionsfaktoren mit der *GAL4*-AD zu fusionieren, anstatt nur deren DBD. Ein möglicher Grund dafür könnte die notwendige Interaktion der restlichen Aminosäuren der Transkriptionsfaktoren mit anderen Proteinen sein, welche womöglich die Bindung an die Zielpromotoren begünstigt oder aber auch für die Rekrutierung akzessorischer Proteine notwendig ist [Schubert *et al.*, 2011b]. Da viele

Zink-Cluster-Transkriptionsfaktoren als Di- oder Multimere an ihre Zielpromotoren binden [MacPherson *et al.*, 2006], ist es ebenfalls denkbar, dass die restlichen Aminosäuren für die Dimerisierung unerlässlich sind. Die Zink-Cluster-Proteine besitzen eine Leucin-Zipper-ähnliche Dimerisierungsdomäne, die sich meist C-terminal von der DBD befindet. Diese Region ist oftmals für die Ausbildung einer hochkonservierten *coiled-coiled*-Struktur, die höchstwahrscheinlich für die Dimerisierung und für weitere Protein-Protein-Interaktionen notwendig ist, verantwortlich [MacPherson *et al.*, 2006]. Für *MRR1* und *UPC2* wurde auch gezeigt, dass das Anhängen eines C-terminalen Epitops zur Aktivierung dieser Zink-Cluster-Transkriptionsfaktoren führt, wodurch eine erhöhte Fluconazolresistenz bewirkt wird [Znaidi *et al.*, 2008; Schubert *et al.*, 2011b]. Durch diesen C-terminalen Anhang kommt es vermutlich zu Konformationsänderungen, die eventuell endogene Aktivierungsdomänen offenlegen oder aber auch inhibitorische Domänen verdecken. Um alle Vorteile dieser unabhängig voneinander durchgeführten Vorversuche zu vereinen, wurde in der vorliegenden Arbeit die Gal4-AD mit dem C-terminalen Ende der Zink-Cluster-Transkriptionsfaktoren von *C. albicans* fusioniert. Auf diese Weise ist es gelungen alle putativen Mitglieder dieser Proteinfamilie, mit einer Ausnahme, künstlich zu aktivieren. In einigen Fällen führte dies zu sofortigen morphologischen Veränderungen, was die Wirksamkeit der Methode nochmals bestätigte. Somit ist es wahrscheinlich, dass diese neue Methode auch geeignet ist, die Mitglieder dieser Proteinfamilie in anderen pathogenen Pilzen zu erforschen, um auch dort neue noch unbekannte Regulatoren der Virulenz und Resistenz zu entdecken. Einschränkend ist dem aber hinzuzufügen, dass die künstliche Hyperaktivierung der Transkriptionsfaktoren, genau wie deren Deletion, auch negative oder sogar letale Auswirkungen auf die Zelle haben könnte. Das würde auch die Tatsache erklären, weshalb für *ZCF29* keine korrekten Transformanten bzw. hyperaktiven Proteine nachweisbar waren. Die Expression eines hyperaktiven Transkriptionsfaktors, welcher sich negativ auf die Fitness auswirkt, begünstigt womöglich auch die Entstehung sekundärer Mutationen. Tatsächlich konnten solche Mutationen bei der Transformation mit dem artifiziell aktivierten *TAC1** in Zellen mit unterschiedlichem genetischen Hintergrund beobachtet werden. Die *TAC1-GAL4-AD*-Fusion war zwar im Genom der entsprechenden Transformanten vorhanden, dennoch führte sie nicht zu dem erwarteten Phänotyp. Die Sequenzierung einer *TAC1-GAL4-AD*-Fusion eines solchen

Stammes offenbarte das Fehlen von vier Nukleotiden in der *TAC1*-Sequenz, was eine Leserasterverschiebung zur Folge hat und vermutlich mit dem Funktionsverlust einherging. Die Möglichkeit der Entstehung solcher sekundärer Mutationen, wie sie für *TAC1* beobachtet werden konnten, darf auch bei zukünftigen Versuchen nicht außer Acht gelassen werden. Aus diesem Grund ist es auch für spätere Experimente zwingend notwendig, immer zwei unabhängig voneinander hergestellte Transformanten zu testen, um sicherzugehen, dass die entsprechenden Phänotypen nicht das Resultat unspezifischer Mutationen sind. Die Hyperaktivität von Transkriptionsfaktoren kann auch im Fall von natürlich vorkommenden *gain-of-function*-Mutationen unter nicht-selektiven Bedingungen Fitnessdefekte nach sich ziehen [Sasse *et al.*, 2012]. So konnten ebenfalls einige Stämme mit künstlich hyperaktiven Transkriptionsfaktoren mit einer verminderten Wachstumsrate beobachtet werden. Doch die Vorteile der Methode überwiegen eindeutig und machen diese Technik zu einem attraktiven komplementären Ansatz zur funktionellen Analyse dieser pilzspezifischen Proteinfamilie.

4.2. Die Bibliothek der artifiziell aktivierten Zink-Cluster-Transkriptionsfaktoren

Die *C. albicans*-Bibliothek der artifiziell aktivierten Zink-Cluster-Transkriptionsfaktoren liefert ein umfassendes Werkzeug zur Erforschung dieser Proteinfamilie. Besonders auffällig waren natürlich die morphologischen Veränderungen, die durch die Aktivierung einiger Regulatoren bewirkt wurden. Dazu gehörten Regulatoren des filamentösen Wachstums. Die Fähigkeit zur Hyphenbildung ist eine wichtige Virulenzeigenschaft von *C. albicans* und dient vor allem der Gewebeinfiltration. Mithilfe der künstlichen Aktivierung der Transkriptionsfaktoren konnten sowohl bekannte, als auch neue Regulatoren dieser Virulenzgene identifiziert werden. So ist z. B. Ume6 essentiell für die Aufrechterhaltung der gesamten Expression des filamentösen Wachstumsprogramms in *C. albicans* als Antwort auf hypheninduzierende Bedingungen (z.B. 37°C; Serum) [Banerjee *et al.*, 2008]. Unter nicht-induzierenden Bedingungen wird *UME6* nicht exprimiert. Genauer untersucht wurde dieser Transkriptionsfaktor, weil er in Transkriptionsprofilen, die unter hypheninduzierenden Bedingungen angefertigt wurden, hochreguliert war. Die *ume6*-Mutanten sind in ihrer Fähigkeit zum

filamentöses Wachstum stark eingeschränkt. Diese aktivierende Funktion auf das filamentöse Wachstumsprogramm, welches ansonsten unter der Kontrolle von negativen Regulatoren bzw. Repressoren steht [Kadosh and Johnson, 2005], wurde bei der künstlichen Aktivierung von Ume6 sofort sichtbar. *UME6** produzierte, auch unter nicht-induzierenden Bedingungen, obligatorisch Hyphen. Das wird an den stark gerunzelten Kolonien in Abbildung 6 (Seite 59) deutlich und wurde auch lichtmikroskopisch bestätigt (nicht gezeigt). Im Fall von *UME6* ist allerdings schon die Überexpression suffizient genug, um eine permanente Hyphenbildung zu induzieren [Carlisle *et al.*, 2009].

Der Zink-Cluster-Transkriptionsfaktor *AHR1* wurde ebenfalls durch eine Transkriptionsprofilanalyse unter hypheninduzierenden Bedingungen, und zwar die einer *ndt80*-Mutante, entdeckt. Dort war er signifikant herunter reguliert [Sellam *et al.*, 2010]. Askew *et al.*, 2011 zeigten, dass Ahr1 an Promotoren von Genen bindet, die an der Biofilmbildung beteiligt sind, einer weiteren wichtigen Virulenzeigenschaft von *C. albicans*. Die *ahr1*-Mutante hat einen Defekt bei der Biofilmbildung und bildet auch nicht mehr die für hypheninduzierende Bedingungen typischen stark gerunzelten Kolonien. Der Stamm mit dem künstlich aktiven *AHR1** bildete unter nicht-induzierenden Bedingungen immer stark gerunzelte Kolonien. Interessanter Weise zeigte dieser Stamm aber die für Hefezellen typische glatte Koloniemorphologie auf Spideragar, welcher eigentlich zur Hypheninduktion verwendet wird (Daten nicht gezeigt). Demnach führt sowohl die Deletion von *AHR1*, als auch die künstliche Aktivierung zu einer Fehlsteuerung hypheninduzierender Gene.

Viel wichtiger ist aber, dass mit dieser neuen Methode auch Morphogenese-Regulatoren entdeckt wurden, die zuvor noch nicht identifiziert werden konnten. Wie z. B. der *orf19.1604*, der im künstlich aktivierten Zustand, unter Nourseothricin-Selektionsdruck, immer zu stark gerunzelten Kolonien führte. Dieser Transkriptionsfaktor wird momentan in der AG Morschhäuser noch genauer erforscht. Es gibt aber einige Indizien, dass auch er essentielle Aufgaben im filamentösen Wachstumsprogramm von *C. albicans* besitzt.

Eine weitere wichtige Virulenzeigenschaft von Pathogenen ist es, sich die begrenzten Eisenvorräte der Umgebung verfügbar zu machen. Auch *C. albicans* besitzt eine komplexe Regulationsmaschinerie, die unter Eisenmangelbedingungen, wie sie üblicher

Weise im Wirt vorherrschen, agiert. Knight *et al.*, 2002 beobachteten, dass *C. albicans* unter Eisenmangelbedingungen Flavine produziert, sichtbar anhand gelb-grünlicher Überstände in entsprechenden Flüssigkulturen. Für den Zink-Cluster-Transkriptionsfaktor *SEF1* wurde kürzlich gezeigt, dass er unter solchen Bedingungen angeschaltet wird und bei der darauffolgenden Eisenaufnahme eine Rolle spielt. Wird *SEF1* wie in unserer Bibliothek permanent exprimiert und aktiviert, werden scheinbar dauerhaft die entsprechenden sonst nur unter Mangelbedingungen aktiven Gene angeschaltet. Zu diesen Genen zählen offensichtlich auch jene, die für die Flavinproduktion verantwortlich sind, da der Stamm mit dem hyperaktiven *SEF1** immer einen gelb-grünlichen Überstand produzierte. Ein ähnliches Phänomen wurde auch für die *tup1*-Mutante beobachtet [Knight *et al.*, 2002]. *TUP1* ist eigentlich ein Repressor filamentösen Wachstums, spielt aber auch bei der Regulation der Eisenreduktase *FRE10* eine Rolle. Flavine, die häufig in Form von Flavoproteinen in eukaryotischen Zellen vorkommen, dienen in Redox-Reaktionen oft als Elektronenüberträger. Um das Eisen(III) der Umgebung nutzen zu können, sind solche Reaktionen durch entsprechende Eisenreduktasen notwendig und könnten diese Flavinproduktion erklären. Somit ist ein komplexes Zusammenwirken von Tup1 und Sef1 durchaus vorstellbar, was aber noch zu beweisen wäre. Auch diesbezüglich sind weitere Studien in der AG Morschhäuser in Bearbeitung.

Im Verlauf dieser Arbeit wurden noch weitere morphologische Screenings durchgeführt. Untersuchungen der gesamten Bibliothek unter hypheninduzierenden Bedingungen, wie erhöhte Temperaturen (37°C), Spidermedium oder auch Lee's Medium ergaben ebenfalls viele morphologische Auffälligkeiten. Dies sind nur vorläufige Experimente gewesen. Es bedarf weiterer Studien, um detailliertere Aussagen treffen zu können. Des Weiteren wurden alle Stämme der Transkriptionsfaktor-Bibliothek auch bezüglich ihres Verhaltens unter oxidativem Stress untersucht. Im Zuge dessen wurden sie auf spezielle Agarplatten gestempelt. Diese enthielten unterschiedliche Konzentrationen von Wasserstoffperoxid, einem starken Oxidationsmittel oder auch Menadion, ein Superoxidgenerator. Auch in diesen Schnelltests konnten Transkriptionsfaktoren identifiziert werden, die zu einer erhöhten Toleranz gegenüber oxidativem Stress beitragen, was bekanntermaßen ebenfalls zu den Charakteristika von Pathogenen zählt. Weitere Experimente zur Erforschung neuer Regulatoren des Verhaltens unter

oxidativem Stress werden derzeit ebenfalls in der AG Morschhäuser durchgeführt. An dieser Stelle werden diese Ergebnisse nicht weiter diskutiert, da es sich bisher nur um vorläufige Erkenntnisse handelt. Außerdem legte sich der Fokus dieser Arbeit auf Regulatoren der *Multidrug*-Resistenz. Diesbezüglich wurden tiefergehende Untersuchungen durchgeführt, die im Folgenden diskutiert werden.

4.3. Neue Regulatoren der Fluconazolresistenz: *CTA4, STB5, MRR2 und ZNC1*

Die Fluconazoltoleranz der Stämme mit den künstlich aktivierten Transkriptionsfaktoren wurde mittels MHK-Bestimmungen für dieses Antimykotikum getestet. Dabei konnten 14 neue Regulatoren, neben *Mrr1*, *Tac1* und *Upc2*, identifiziert werden, die einen Einfluss auf die Fluconazolresistenz ausübten. Unter ihnen sind z. B. Transkriptionsfaktoren wie *AHR1*, der bekannt ist bei der Regulierung von Adhäsionsgenen mitzuwirken, oder *ZCF25*, der in dieser Bibliothek immer durch verstärktes filamentöses Wachstum in Flüssigmedium auffiel. Generell gilt, dass Regulatoren, die die Morphologie oder Zusammensetzung der Zelloberfläche von *C. albicans* beeinflussen, auch Auswirkungen auf Resistenzen gegen Medikamente haben können, deren Zielstrukturen oftmals genau jene Zelloberflächen darstellen. Sie müssen demnach nicht gezwungenermaßen essentiell für die Resistenzentwicklung in *C. albicans* sein, sondern wirken sich indirekt auf eine veränderte Fluconazoltoleranz aus. Die Transkriptionsfaktoren *CTA4*, *STB5*, *MRR2* und *ZNC1* sind in diesem Screening jedoch besonders aufgefallen. Sie vermittelten im künstlich aktivierten Zustand vergleichbar hohe Resistenzen, wie *MRR1*-, *TAC1*- oder *UPC2*-Allele mit natürlich vorkommenden *gain-of-function*-Mutationen.

CTA4 ist auf dem Chromosom 3 lokalisiert. Es befindet sich in einer 11 kb großen Cluster-Region, die noch zwei weitere Zink-Cluster-Transkriptionsfaktoren (*MRR1* und *ZCF35*) enthält. Schon früher konnte *CTA4* in Zusammenhang mit Fluconazolresistenz gebracht werden [Coste *et al.*, 2008]. *CTA4* war in der Lage, in einer *S. cerevisiae pdr1/3*-Mutante die Expression des *Multidrug*-Transporters *PDR5* anzuschalten und Fluconazolresistenz zu verursachen. *PDR1/3* sind entsprechende Zink-Cluster-

Transkriptionsfaktoren von *S. cerevisiae*, die die Expression der wichtigsten *Multidrug*-Transporter dieses Organismus regulieren. Das *C. albicans* *CTA4* vermittelte jedoch auch ohne *PDR5* eine erhöhte Fluconazolresistenz, was darauf schließen lässt, dass dieser Transkriptionsfaktor andere Gene reguliert, die Einfluss auf die Azoltoleranz besitzen. Anschließend von Coste *et al.*, 2008 durchgeführten Experimente konnten auch keinen Einfluss von *CTA4* auf die *CDR1/2*- bzw. *MDR1*-Expression in *C. albicans* offenbaren. Ebenso wenig war die *cta4*-Mutante hypersensitiv gegenüber Fluconazol. In der vorliegenden Arbeit konnten auch weder die Microarray-, noch die Northern-Blot-Analysen eine Hochregulierung von *CDR1/2* oder *MDR1* durch die künstliche Aktivierung von *CTA4* detektieren. Das Expressionslevel von *ERG11*, ein wichtiges Gen der Ergosterolbiosynthese, wurde durch *CTA4** ebenfalls nicht beeinflusst. Es muss folglich noch andere Mechanismen in *C. albicans* geben, die Auswirkungen auf die Fluconazolresistenz haben und von *CTA4* reguliert werden. *CTA4* ist weiterhin dafür bekannt, Gene zu induzieren, die beim Umgang mit nitrosativem Stress wichtig sind [Chirananand *et al.*, 2008]. Dazu gehört z. B. *YBH1*, welches für ein Flavohämoglobin mit Stickstoffmonoxid-Digoxigenase-Funktion kodiert. Unter nitrosativem Stress ist *CTA4* für die Induktion der *YBH1*-Transkription notwendig. Die *cta4*-Mutanten hingegen sind hypersensitiv gegenüber reaktiven Stickstoffspezies. *CTA4** im aktivierten Zustand führt auch laut unseren Microarray-Daten sowohl zu einer erhöhten Expression des Flavohämoglobingens *YBH1*, als auch zu einer verstärkten Transkription von *SEF1*, das mit der Produktion von Flavinen im Zusammenhang steht. Dies geht mit der Beobachtung konform, dass Stämme mit *CTA4** immer eine leichte orangene Färbung aufwiesen. Für die Funktion von *Cta4* als Stressregulator spricht ebenfalls die verstärkte Expression von *AOX2* und *GST2* im Stamm *CTA4**. *AOX2* kodiert für eine alternative Oxidase, die *C. albicans* dazu befähigt, unter oxidativem Stress alternative Wege des Elektronentransports bei der Zellatmung zu nutzen und so weniger reaktive Sauerstoffspezies entstehen zu lassen. Auch *GST2* ist für die Stressantwort notwendig. Es kodiert für eine Glutathion-S-Transferase. Mithilfe solcher Enzyme können z. B. schädliche Stickstoffverbindungen auf Glutathion transferiert und so aus der Zelle entfernt werden. Die Hochregulation beider Gene wurde in dieser Arbeit sowohl via Microarray-Analysen als auch durch Northern Hybridisierung offenbart und bestätigt die wichtige Funktion von *CTA4* bei der Antwort auf verschiedene Stresssignale. In dem Zusammenhang ist auch zu erwähnen, dass die Expression des putativen

Sulfittransporters *SSU1* ebenfalls von *CTA4* reguliert wird, was sowohl von Chiranand *et al.*, 2008, als auch in den hier vorliegenden Microarray-Daten gezeigt und bestätigt wurde (siehe Anhang: Übersicht der Microarray-Daten, Tabelle 6; Seite 101). *SSU1* gehört auch zu den unter nitrosativem Stress induzierten Genen. Die Behandlung mit Fluconazol ist für *C. albicans* ebenfalls ein Stresssignal, welches scheinbar unter normalen Umständen die *CTA4*-vermittelte Stressantwort nicht induzieren würde. Im hyperaktiven Zustand ist *CTA4** jedoch in der Lage, sein Stressbewältigungsprogramm anzuschalten und so wahrscheinlich eher auf indirektem Weg zu einer erhöhten Fluconazoltoleranz beizutragen. Für eine indirekte resistenzvermittelnde Wirkung spricht auch die Tatsache, dass weder die Deletion von *AOX2* noch von *GST2*, deren Expression in *CTA4** stark erhöht war, zum Verlust der Fluconazolresistenz führte.

STB5 liegt im *C.-albicans*-Genom auf Chromosom 1. Die Involvierung von *STB5* in der Resistenzentwicklung konnte in *C.-albicans*-verwandten Organismen bereits nachgewiesen werden. Akache and Turcotte, 2002; Akache *et al.*, 2004 zeigten, dass *STB5* aus *S. cerevisiae* an der Regulierung der Gene der ABC-Transporter *SNQ2*, *PDR16* und *PDR5*, wichtige *Multidrug*-Effluxpumpen der Hefe, beteiligt ist. *ScStb5* aktiviert die Transkription von *Multidrug*-Resistenzgenen, indem es an die PDREs (*pleiotropic drug response elements*) in deren Promotoren bindet. Diese PDREs werden auch von den Zink-Cluster-Transkriptionsfaktoren *Pdr1/3* erkannt und gebunden. Auf diesem Wege konnten sie auch eine Dimerisierung von *ScStb5* und *ScPdr1* demonstrieren. Diese Heterodimere binden an die genannten PDREs und steuern so die Transkription der *Multidrug*-Transporter. Kürzlich wurden Studien veröffentlicht, in denen die Rolle von *STB5* in *C. glabrata* beschrieben wurde [Noble *et al.*, 2013]. Dort führte die Überexpression von *CgSTB5* zu einer erhöhten Fluconazolsensitivität, wohingegen dessen Deletion keinen Einfluss auf die Fluconazoltoleranz hatte. In der fluconazolsensitiven *Cgpdr1*-Mutante reduzierte die Deletion von *CgSTB5* deren Azolempfindlichkeit. Die Überexpression verstärkte im Gegenzug dazu diese Sensitivität. Transkriptionsprofile von *Cgstb5*-Mutanten und *CgPDR1*-Überexpressionsstämmen zeigten eine reziproke Regulierung vieler Gene, inklusive *CgCDR1*. Daraus schlussfolgerten Noble *et al.*, 2013, dass *CgStb5* als transkriptionaler Repressor der ABC-Transportergene fungiert und als Gegenspieler von *CgPdr1* diese Gene reguliert. Für *STB5* in *C. albicans* kann ausgeschlossen werden, dass er als

Repressor von *CDR1* agiert. Zum einen, weil seine Deletion weder die Fluconazolresistenz, noch die *CDR1*-Promotoraktivität beeinflusste und zum anderen, weil seine künstliche Aktivierung zu einer erhöhten Fluconazolresistenz führte, was eher für aktivierende Eigenschaften spricht. Wie genau *CaSTB5* an der Resistenzentwicklung beteiligt ist, muss noch intensiver erforscht werden. In jedem Fall scheint *STB5* aber ein Regulator von Resistenzgenen in Hefezellen zu sein, dessen Funktion sich im Laufe der Evolution von *S. cerevisiae*, über *C. glabrata* bis hin zu *C. albicans* in unterschiedliche Richtungen entwickelte.

ZNC1 befindet sich in einer 13 kb großen Zink-Cluster-Region auf dem Chromosom 5, in der Nähe des *MTL*-Lokus (*mating type-like*). Dort befinden sich drei offene Leserahmen, die für eben solche Transkriptionsfaktoren mit diesem pilzspezifischen DNA-Bindemotiv kodieren. Sie wurden zuerst von Coste *et al.*, 2004 beschrieben und als *ZNC1*, *ZNC2* und *ZNC3* bezeichnet. Da nur die Deletion von *ZNC2* zum Verlust der Induzierbarkeit der *CDR1*- und *CDR2*-Promotoren führte, erforschten sie dessen Funktionen genauer und benannten ihn um in *TAC1* (*transcriptional activator of CDR genes*). Im Zuge dessen stellten sie fest, dass *TAC1* maßgeblich für die Aktivierung der *CDR2*-Expression verantwortlich ist. Später entdeckten sie in azolresistenten klinischen Isolaten *gain-of-function*-Mutationen in *TAC1*, die eine konstitutive Expression beider *CDR*-Gene zur Folge hatten und Fluconazolresistenz vermittelten [Coste *et al.*, 2006]. Auf die basale Expression von *CDR1* hat *TAC1* keinen Einfluss. In dieser Arbeit konnte nun ein weiterer Regulator dieser Zink-Cluster-Region, *ZNC1*, sowohl in Zusammenhang mit Azolresistenz, als auch mit einer Erhöhung der *CDR1*-Expression gebracht werden. Da weder die Deletion, noch die Überexpression von *ZNC1* dessen Involvierung in der Resistenzausbildung offenbarten, blieben seine Funktionen bisher unentdeckt. Ein künstlich aktiviertes *ZNC1** vermittelte hingegen eine erhöhte Fluconazolresistenz. Via Microarray-, Northern-Blot- und Reportergen-Analysen wurde in dieser Arbeit demonstriert, dass dies das Resultat einer erhöhten *CDR1*-Expression ist. Durch die Deletion von *CDR1* verliert der hyperaktive Regulator *ZNC1** seine resistenzvermittelnden Fähigkeiten vollständig. Anhand von *ZNC1* wird noch einmal deutlich, welche Vorteile die in dieser Arbeit etablierte Methode der künstlichen Aktivierung besitzt, da auf anderem Wege die Funktionen von *ZNC1* zu offenbaren weitaus komplizierter gewesen wäre. Die Zink-Cluster-Region auf der sich *ZNC1* und

TAC1 befinden, die Überschneidung des Funktionsspektrum beider Regulatoren, besonders im Hinblick auf die *CDR1*-vermittelte Fluconazolresistenz, scheint demnach von großer Bedeutung für die Entwicklung von Resistenzen und damit für das Pathogen *C. albicans* zu sein. Inwieweit *ZNC1* auch klinische Relevanz hat, bezogen auf das Vorkommen von natürlichen *gain-of-function*-Mutationen in diesem Gen, welches spezifisch *CDR1*, nicht aber *CDR2* hoch reguliert, wird momentan noch untersucht. Zum Zeitpunkt des Verfassens dieser Arbeit konnten jedoch noch keine klinischen Isolate gefunden werden, die entsprechende *gain-of-function*-Mutationen in *ZNC1* besitzen.

Die Fähigkeit von *C. albicans* einen Biofilm auszubilden spielt bei der *Multidrug*-Resistenz ebenfalls eine wichtige Rolle. Durch das Abschirmen von der Umgebung ist die Zellpopulation eines solchen Biofilms vor dem Einwirken von Medikamenten geschützt und damit resistent. Zu diesem Zweck exprimiert *C. albicans* z. B. verschiedene Adhäsine. Sein Genom enthält sogar eine ganze Genfamilie, die *ALS*-Familie, die für solche Glykoproteine mit wichtigen Funktionen bei der Adhärenz und Biofilmbildung kodieren. Da sowohl in den Microarray-Daten, als auch in den Northern Hybridisierungen eine erhöhte Expression von *ALS1* in den Stämmen *MRR2** und *ZNC1** festgestellt werden konnte, wurde ein Biofilm Assay, wie unter 2.8. beschrieben, durchgeführt. Da *ALS1* auch eines der Zielgene von Mrr1 ist [Schubert *et al.*, 2011a], fanden die Biofilm-Untersuchungen unter Einbezug von *MRR1** statt. Jedoch konnte mit der hier angewandten Methode kein Zusammenhang zwischen der künstlichen Aktivierung der entsprechenden Zink-Cluster-Transkriptionsfaktoren und einer verstärkten Fähigkeit zur Biofilmbildung festgestellt werden.

4.4. Mrr2 – ein wichtiger Regulator von CDR1

Die Überexpression von *Multidrug*-Effluxpumpen gehört zu den wichtigsten Resistenzmechanismen in *C. albicans*. Bisher konnten drei dieser Transporter identifiziert werden, zum einen die zwei sehr homologen ABC-Transporter Cdr1 und Cdr2 und zum anderen die zu den Major Facilitator gehörende Mdr1-Effluxpumpe. In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, dass die Expression und damit auch die Überexpression dieser Pumpen durch Zink-Cluster-Transkriptionsfaktoren reguliert

wird. Hierbei wurde *TAC1* als Masterregulator der *CDR*-Gene und *MRR1* als wichtigster Regulator für *MDR1* identifiziert [Coste *et al.*, 2004; Morschhäuser *et al.*, 2007]. Coste *et al.*, 2004 demonstrierten, dass *TAC1* maßgeblich für die Induzierbarkeit der Promotoren von *CDR1* und *CDR2* verantwortlich ist. Fehlt *TAC1* kann besonders *CDR2* nicht mehr exprimiert werden. *CDR1* verfügt über eine basale Expression. Dessen Transkripte sind folglich immer detektierbar. Durch die Deletion von *TAC1* reduziert sich die Induzierbarkeit der *CDR1*-Expression drastisch auf ein minimales Level, wohingegen das basale Expressionslevel unverändert bleibt. Demnach muss es noch weitere Regulatoren geben, die diese basale Aktivität steuern. Mit der in der vorliegenden Arbeit etablierten Methode der künstlichen Aktivierung von Zink-Cluster-Transkriptionsfaktoren konnte einer dieser Regulatoren identifiziert werden.

Zunächst fiel *MRR2* als einer der Zink-Cluster-Transkriptionsfaktoren auf, die im künstlich hyperaktiven Zustand einen 8-fachen Anstieg der Fluconazolresistenz, verglichen mit dem wildtypischen Ausgangsstamm SC5314, bewirkten. Darauf folgende Microarray-Analysen offenbarten einen Anstieg der *CDR1*-Expression, wie auch im Fall von *STB5** und *ZNC1**. Dieser Anstieg konnte in unabhängigen Northern Hybridisierungen, wie bereits besprochen für *ZNC1**, auch für *MRR2** bestätigt werden. *P_{CDR1}*-Reporterfusionen verifizierten die spezifische *CDR1*-Hochregulierung, vollkommen unabhängig von der *CDR2*-Expression. Die Deletion von *MRR2* führte interessanterweise zu einer Reduktion der basalen *CDR1*-Promotoraktivität. Dies erklärt auch den fluconazolsensitiven Phänotyp der *mrr2*-Mutante, wie es auch schon von Homann *et al.*, 2009 gezeigt wurde und sich in dieser Arbeit bestätigte. Denn auch die Deletion von *CDR1* hat eine Fluconazolhypersensitivität zur Folge. Der Verlust der wichtigsten *Multidrug*-Effluxpumpe von *C. albicans*, sei es durch Reduktion der basalen Expression oder durch vollständige Deletion, führt, wie auch schon früher demonstriert, zu einer Hypersensitivität gegen antimykotische Substanzen. Ohne *CDR1* war das hyperaktive *MRR2** nicht mehr in der Lage Fluconazolresistenz zu vermitteln. Es verlor vollständig seine Wirkung, was beweist, dass die hervorgerufene Resistenz Cdr1-vermittelt war. Die Induzierbarkeit des *CDR1*-Promotors, für die *TAC1* von entscheidender Bedeutung ist, wurde durch die *MRR2*-Deletion nur leicht geschwächt – ein weiteres Indiz dafür, dass *MRR2* eher ein Regulator der basalen Expression ist. Um zu klären, inwiefern *TAC1* und *MRR2* auch ohne einander eine Überexpression von *CDR1* und die damit verbundene Fluconazolresistenz bewirken können, erfolgte die Integration eines hyperaktiven Allels

des einen Regulators in die Deletionsmutanten des jeweils anderen Regulators. Im Fall von *TAC1* wurde hierfür ein Allel mit einer natürlich vorkommenden *gain-of-function*-Mutation gewählt (G980E). Dies geschah sowohl in Stämmen mit und ohne P_{CDR1} -GFP-Reporterfusionen, so dass anschließende MHK- und FACS-Analysen Aufschluss darüber geben konnten. Dabei offenbarte sich die Notwendigkeit beider Regulatoren für die Cdr1-vermittelte Fluconazolresistenz. Ein hyperaktives *TAC1*-Allel war ohne *MRR2* nicht mehr in der Lage den *CDR1*-Promotor in gewohnter Weise anzuschalten. Ebenso reduzierte sich die MHK von Fluconazol um eine Stufe. *Vice versa* verhielt es sich ähnlich. Auch der Verlust von *TAC1* reduzierte die *MRR2**-bedingte erhöhte MHK von Fluconazol. Die Reduktion der *CDR1*-Promotoraktivität war bei Abwesenheit von *TAC1* und Anwesenheit von *MRR2** nicht so drastisch wie im umgedrehten Fall. Zusammengefasst demonstrierten diese Versuche, dass ein hyperaktives Mrr2* unabhängig von Tac1 die *CDR1*-Überexpression und die damit verbundene Fluconazolresistenz bewirkte. Jedoch sind beide Transkriptionsfaktoren notwendig, damit *CDR1* in gewohntem Maße überexprimiert wird und Fluconazolresistenz vermitteln kann. Vermutlich interagieren sie aber mit unterschiedlichen Bereichen des *CDR1*-Promotors. Von einigen Wissenschaftlern wurde bereits gezeigt, dass es verschiedene *cis*-regulatorische Elemente in den Promotoren von *CDR1* und *CDR2* gibt. Von de Micheli *et al.*, 2002 wurde im Zuge dessen demonstriert, dass *CDR1* und *CDR2* ein gemeinsames *drug response element* (DRE) besitzen. Sie postulierten schon damals das Vorhandensein von gemeinsamen *trans*-regulatorischen Faktoren, die zur Aktivierung beider Gene beitragen. Coste *et al.*, 2004 bestätigten dies mit der Entdeckung von *TAC1* und zeigten, zumindest für *CDR2*, die Notwendigkeit des DREs, um Tac1-bedingt angeschaltet zu werden. *MRR2** aktivierte aber spezifisch die *CDR1*-Expression, weshalb dieser Transkriptionsfaktor wahrscheinlich mit einer anderen *CDR1*-Promotorregion interagiert. *CDR1*, als wichtigster *Multidrug*-Transporter von *C. albicans*, besitzt neben dem DRE noch weitere *cis*-regulatorische Elemente in seiner Promotorregion. Dazu gehören die *steroid response elemente* (SREs), die notwendig für die steroid-induzierte *CDR1*-Expression, z. B. durch β -Estradiol, sind [Karnani *et al.*, 2004] oder das *negative regulatory element* (NRE), welches im Zusammenhang mit der basalen Expression gebracht werden konnte [Gaur *et al.*, 2004]. Zwei Jahre zuvor, im Zusammenhang mit der Entdeckung der DREs, konnten de Micheli *et al.*, 2002 aber auch einen Bereich der *CDR1*-Promotorregion eingrenzen, der notwendig für dessen basale Aktivität ist und

nannten ihn *basal expression element* (BEE). Dieser Bereich befindet sich 960 bis 710 bp *upstream* des Startcodons im *CDR1*-Promotor. Diese Region enthält allerdings nur ein CGG-Triplett, welches oft von Zink-Cluster-Transkriptionsfaktoren erkannt und gebunden wird. Inwiefern Mrr2 an dieses postulierte BEE des *CDR1*-Promotors bindet oder durch anderweitige Interaktionen die basale Expression von *CDR1* reguliert, erfordert noch weitere Untersuchungen.

MRR2 und *ZNC1* regulierten beide spezifisch nur die *CDR1*-Expression. Dabei besaß *MRR2* allerdings einen weitaus größeren Einfluss auf diese, was in der vorliegenden Arbeit demonstriert wurde. Um zu überprüfen, ob beide Transkriptionsfaktoren auch eine klinische Relevanz besitzen, werden derzeit noch azolresistente klinische Isolate, soweit zur Verfügung stehend, mit spezifischer Überexpression von *CDR1*, untersucht. Wie bereits schon im Fall von *ZNC1* diskutiert, konnten bisher noch keine klinischen Isolate mit natürlich vorkommenden *gain-of-function*-Mutationen in diesen Regulatoren gefunden werden. In Kooperation mit anderen Wissenschaftlern, die Zugang zu weiteren klinischen Isolaten haben, wird diese Recherche fortgesetzt. Da solche Mutationen relativ häufig in Zink-Cluster-Transkriptionsfaktoren auftreten, besonders in denen die bei der Regulation von *Multidrug*-Resistenzgenen eine Rolle spielen, scheint es nur eine Frage der Zeit zu sein, bis solche in *ZNC1* oder aber *MRR2* identifiziert werden. Um diese Regulatoren noch weiter zu charakterisieren, ist es auch interessant zu wissen, ob und wenn wo und wie sie mit dem *CDR1*-Promotor interagieren. Ebenso wissenswert ist es, mögliche Interaktionen mit Tac1 zu erforschen, da alle drei Regulatoren die *CDR1*-Expression auf unterschiedliche Weise beeinflussen oder regulieren.

4.5. Abschließende Worte und Ausblick

Mit der Entdeckung neuer Resistenzregulatoren, wie *MRR2*, ist ein weiterer Schritt zum molekularen Verständnis bezüglich der Resistenzentwicklung von *C. albicans* gelungen. Die Aufklärung dieser Resistenzmechanismen ist von großer Bedeutung, da opportunistische Infektionen wie die Candidiasis oder Candidämie weiterhin auf dem Vormarsch sind. Die Untersuchungen der molekularen Ursachen, die hierbei die rasche Entwicklung solcher Resistenzen bedingen, sind somit zwingend notwendig, um auch Grundbausteine für die Entwicklung neuer Medikamente zu legen.

Die in dieser Arbeit hergestellte Bibliothek der artifiziell aktivierten Zink-Cluster-Transkriptionsfaktoren stellt ein sehr nützliches Instrument bei der Identifizierung neuer Regulatoren von verschiedensten biologischen Aspekten dar. Zukünftige detaillierte phänotypische Untersuchungen hinsichtlich des Verhaltens unter verschiedenen Stressbedingungen sollten neue Regulatoren offenbaren, welche z. B. für die Pathogenität von *C. albicans* notwendig sind. Damit bietet diese genomische Bibliothek die Basis für viele weitere Studien der funktionellen Charakterisierung der einzelnen Zink-Cluster-Transkriptionsfaktoren.

Außerdem sollte diese Strategie der artifiziellen Aktivierung der Zink-Cluster-Proteine, die hier für *C. albicans* angewendet wurde, auch in anderen Pilzen, die von medizinischem, landwirtschaftlichem oder biotechnologischem Interesse sind, anwendbar sein. Diese pilzspezifische Proteinfamilie reguliert auch in dem pathogenen Pilz *Aspergillus fumigatus* virulenz-assoziierte Eigenschaften [Liu *et al.*, 2010]. Außerdem spielen sie bei der Produktion von Sekundärmetaboliten, z. B. dem Aflatoxin, in filamentösen Pilzen, wie *A. flavus* und *A. parasiticus*, oder bei der Synthese von Flavinen in verschiedenen anderen Pilzen, eine Rolle [Woloshuk *et al.*, 1994]. Eine generell anwendbare Methode zur artifiziellen Aktivierung dieser Transkriptionsfaktoren bietet damit eine geeignete Technik, die viele neue Einblicke in die Regulationsmaschinerie wichtiger Prozesse, in verschiedenen biologisch relevanten Pilzen, liefern sollte.

Literaturverzeichnis

1. **Akache, B., MacPherson, S., Sylvain, M. A., and Turcotte, B.** 2004. Complex interplay among regulators of drug resistance genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* 279: 27855-27860
2. **Akache, B., and Turcotte, B.** 2002. New regulators of drug sensitivity in the family of yeast zinc cluster proteins. *J Biol Chem.* 277: 21254-21260
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. **Banerjee, M., Thompson, D. S., Lazzell, A., Carlisle, P. L., Pierce, C., Monteagudo, C., López-Ribot, J. L., and Kadosh, D.** 2008. *UME6*, a novel filament-specific regulator of *Candida albicans* hyphal extension and virulence. *Molecular biology of the cell.* 19: 1354-1365
5. **Berman, J., and Sudbery, P. E.** 2002. *Candida albicans*: a molecular revolution built on lessons from budding yeast. *Nature Reviews Genetics.* 3: 918-932
6. **Carlisle, P. L., Banerjee, M., Lazzell, A., Monteagudo, C., Lopez-Ribot, J. L., and Kadosh, D.** 2009. Expression levels of a filament-specific transcriptional regulator are sufficient to determine *Candida albicans* morphology and virulence. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106: 599-604
7. **Chapman, R. L.** 2003. *Candida* infections in the neonate. *Curr Opin Pediatr.* 15: 97-102
8. **Chen, C., Pande, K., French, S. D., Tuch, B. B., and Noble, S. M.** 2011. An Iron Homeostasis Regulatory Circuit with Reciprocal Roles in *Candida albicans* Commensalism and Pathogenesis. *Cell host & microbe.* 10: 118-135
9. **Chen, C. G., Yang, Y. L., Shih, H. I., Su, C. L., and Lo, H. J.** 2004. CaNdt80 is involved in drug resistance in *Candida albicans* by regulating *CDR1*. *Antimicrob Agents Chemother.* 48: 4505-4512
10. **Cheng, G., Yeater, K. M., and Hoyer, L. L.** 2006. Cellular and molecular biology of *Candida albicans* estrogen response. *Eukaryot Cell.* 5: 180-191
11. **Chiranand, W., McLeod, I., Zhou, H., Lynn, J. J., Vega, L. A., Myers, H., Yates, J. R. r., Lorenz, M. C., and Gustin, M. C.** 2008. *CTA4* transcription factor mediates induction of nitrosative stress response in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell.* 7: 268-278

12. **Chua, G., Morris, Q. D., Sopko, R., Robinson, M. D., Ryan, O., Chan, E. T., Frey, B. J., Andrews, B. J., Boone, C., and Hughes, T. R.** 2006. Identifying transcription factor functions and targets by phenotypic activation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103: 12045-12050
13. **Cormack, B. P., Bertram, G., Egerton, M., Gow, N. A., Falkow, S., and Brown, A. J.** 1997. Yeast-enhanced green fluorescent protein (yEGFP): a reporter of gene expression in *Candida albicans*. *Microbiology.* 143: 303-311
14. **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
15. **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*. *Eukaryot Cell.* 3: 1639-1652
16. **Coste, A. T., Ramsdale, M., Ischer, F., and Sanglard, D.** 2008. Divergent functions of three *Candida albicans* zinc-cluster transcription factors (*CTA4*, *ASG1* and *CTF1*) complementing pleiotropic drug resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology.* 154: 1491-1501
17. **De Backer, M. D., Magee, P. T., and Pla, J.** 2000. Recent developments in molecular genetics of *Candida albicans*. *Annual Reviews in Microbiology.* 54: 463-498
18. **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
19. **Devaux, F., Marc, P., Bouchoux, C., Delaveau, T., Hikkel, I., Potier, M. C., and Jacq, C.** 2001. An artificial transcription activator mimics the genome-wide properties of the yeast Pdr1 transcription factor. *EMBO Rep.* 2: 493-498
20. **Ding, W. V., and Johnston, S. A.** 1997. The DNA binding and activation domains of Gal4p are sufficient for conveying its regulatory signals. *Mol Cell Biol.* 17: 2538-2549
21. **Dodgson, A. R., Dodgson, K. J., Pujol, C., Pfaller, M. A., and Soll, D. R.** 2004. Clade-specific flucytosine resistance is due to a single nucleotide change in the *FUR1* gene of *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother.* 48: 2223-2227
22. **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
23. **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. *Eukaryot Cell.* 7: 1180-1190
24. **Engelmann, E.** 1999. Sproßpilze. *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie* (Hrsg.: Hahn, H., Falke, D., Kauffman, S., Ullmann U.), Springer Verlag Berlin Heidelberg New Yoek. 701-710

25. **Fonzi, W. A., and Irwin, M. Y.** 1993. Isogenic strain construction and gene mapping in *Candida albicans*. *Genetics*. 134: 717-728
26. **Gaur, N. A., Puri, N., Karnani, N., Mukhopadhyay, G., Goswami, S. K., and Prasad, R.** 2004. Identification of a negative regulatory element which regulates basal transcription of a multidrug resistance gene *CDR1* of *Candida albicans*. *FEMS Yeast Res.* 4: 389-399
27. **Gauthier, C., Weber, S., Alarco, A. M., Alqawi, O., Daoud, R., Georges, E., and Raymond, M.** 2003. Functional similarities and differences between *Candida albicans* Cdr1p and Cdr2p transporters. *Antimicrob Agents Chemother.* 47: 1543-1554
28. **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
29. **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
30. **Gray, K. C., Palacios, D. S., Dailey, I., Endo, M. M., Uno, B. E., Wilcock, B. C., and Burke, M. D.** 2012. Amphotericin primarily kills yeast by simply binding ergosterol. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 109: 2234-2239
31. **Gulshan, K., and Moyer-Rowley, W. S.** 2007. Multidrug resistance in fungi. *Eukaryot Cell.* 6: 1933-1942
32. **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
33. **Hickman, M. A., Zeng, G., Forche, A., Hirakawa, M. P., Abbey, D., Harrison, B. D., Wang, Y. M., Su, C. H., Bennett, R. J., Wang, Y., and Berman, J.** 2013. The 'obligate diploid' *Candida albicans* forms mating-competent haploids. *Nature*.
34. **Hiller, D., Sanglard, D., and Morschhäuser, J.** 2006. Overexpression of the *MDR1* gene is sufficient to confer increased resistance to toxic compounds in *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother.* 50: 1365-1371
35. **Holzheimer, R. G., and Dralle, H.** 2002. Management of mycoses in surgical patients - review of the literature. *Eur J Med Res.* 7: 200-226
36. **Homann, O. R., Dea, J., Noble, S. M., and Johnson, A. D.** 2009. A phenotypic profile of the *Candida albicans* regulatory network. *PLoS Genet.* 5: e1000783

37. **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
38. **Kadosh, D., and Johnson, A. D.** 2005. Induction of the *Candida albicans* filamentous growth program by relief of transcriptional repression: a genome-wide analysis. *Mol Biol Cell.* 16: 2903-2912
39. **Karnani, N., Gaur, N. A., Jha, S., Puri, N., Krishnamurthy, S., Goswami, S. K., Mukhopadhyay, G., and Prasad, R.** 2004. SRE1 and SRE2 are two specific steroid-responsive modules of *Candida* drug resistance gene 1 (*CDR1*) promoter. *Yeast.* 21: 219-239
40. **Kelly, S. L., Lamb, D. C., Kelly, D. E., Manning, N. J., Loeffler, J., Hebart, H., Schumacher, U., and Einsele, H.** 1997. Resistance to fluconazole and cross-resistance to amphotericin B in *Candida albicans* from AIDS patients caused by defective sterol delta5,6-desaturation. *FEBS Lett.* 400: 80-82
41. **Knight, S. A., Lesuisse, E., Stearman, R., Klausner, R. D., and Dancis, A.** 2002. Reductive iron uptake by *Candida albicans*: role of copper, iron and the *TUP1* regulator. *Microbiology.* 148: 29-40
42. **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. *Journal of Bacteriology.* 179: 2331-2338
43. **Kullberg, B. J., and Oude, L. A. M.** 2002. Epidemiology of opportunistic invasive mycoses. *European journal of medical research.* 7: 183
44. **Kumamoto, C. A., and Vines, M. D.** 2005. Contributions of hyphae and hypha-co-regulated genes to *Candida albicans* virulence. *Cellular Microbiology.* 7: 1546-1554
45. **Lass-Flörl, C.** 2009. The changing face of epidemiology of invasive fungal disease in Europe. *Mycoses.* 52: 197-205
46. **Liu, H., Gravelat, F. N., Chiang, L. Y., Chen, D., Vanier, G., Ejzykowicz, D. E., Ibrahim, A. S., Nierman, W. C., Sheppard, D. C., and Filler, S. G.** 2010. *Aspergillus fumigatus* AcuM regulates both iron acquisition and gluconeogenesis. *Mol Microbiol.* 78: 1038-1054
47. **Liu, T. T., Znaidi, S., Barker, K. S., Xu, L., Homayouni, R., Saidane, S., Morschhauser, J., Nantel, A., Raymond, M., and Rogers, P. D.** 2007. Genome-wide expression and location analyses of the *Candida albicans* Tac1p regulon. *Eukaryot Cell.* 6: 2122-2138
48. **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
49. **MacPherson, S., Laroche, M., and Turcotte, B.** 2006. A fungal family of transcriptional regulators: the zinc cluster proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* 70: 583-604
50. **Marmorstein, R., Carey, M., Ptashne, M., and Harrison, S. C.** 1992. DNA recognition by *GAL 4*: structure of a protein-DNA complex. *Nature.* 356: 408-414

51. **Martin, G. S., Mannino, D. M., Eaton, S., and Moss, M.** 2003. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *New England Journal of Medicine*. 348: 1546-1554
52. **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
53. **Morschhäuser, J., Michel, S., and Hacker, J.** 1998. Expression of a chromosomally integrated, single-copy GFP gene in *Candida albicans*, and its use as a reporter of gene regulation. *Mol Gen Genet*. 257: 412-420
54. **Morschhäuser, J.** 2010. Regulation of multidrug resistance in pathogenic fungi. *Fungal Genetics and Biology*. 47: 94-106
55. **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 Pathogens*. 3: e164
56. **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. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 54: 999-1006
57. **Noble, J. A., Tsai, H. F., Suffis, S. D., Su, Q., Myers, T. G., and Bennett, J. E.** 2013. *STB5* Is a Negative Regulator of Azole Resistance in *Candida glabrata*. *Antimicrob Agents Chemother*. 57: 959-967
58. **Odds, F. C.** 1988. *Candida and candidosis: a review and bibliography*, (ed.), Bailliere Tindall,
59. **Odds, F. C.** 2000. Pathogenic fungi in the 21st century. *Trends in Microbiology*. 8: 200
60. **Odds, F. C., Brown, A. J. P., and Gow, N. A. R.** 2003. Antifungal agents: mechanisms of action. *Trends in Microbiology*. 11: 272-279
61. **Odds, F. C., Gow, N. A. R., and Brown, A. J. P.** 2006. Toward a molecular understanding of *Candida albicans* virulence. *Molecular principles of fungal pathogenesis*. ASM Press, Washington, DC. 305-319
62. **Perlin, D. S.** 2007. Resistance to echinocandin-class antifungal drugs. Drug resistance updates: reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy. 10: 121
63. **Polak, A., and Scholer, H. J.** 1975. Mode of action of 5-fluorocytosine and mechanisms of resistance. *Chemotherapy*. 21: 113-130
64. **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. *Current genetics*. 27: 320-329
65. **Reuß, O., Vik, Å., Kolter, R., and Morschhäuser, J.** 2004. The SAT1 flipper, an optimized tool for gene disruption in *Candida albicans*. *Gene*. 341: 119-127
66. **Ruhnke, M., Eigler, A., Tennagen, I., Geiseler, B., Engelmann, E., and Trautmann, M.** 1994. Emergence of fluconazole-resistant strains of *Candida albicans* in pa-

tients with recurrent oropharyngeal candidosis and human immunodeficiency virus infection. *J Clin Microbiol.* 32: 2092-2098

67. **Sandven, P.** 2000. Epidemiology of candidemia. *Revista Iberoamericana de Micologia.* 17: 73-81

68. **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.* 143: 405-416

69. **Sanglard, D., Kuchler, K., Ischer, F., Pagani, J. L., Monod, M., and Bille, J.** 1995. Mechanisms of resistance to azole antifungal agents in *Candida albicans* isolates from AIDS patients involve specific multidrug transporters. *Antimicrob Agents Chemother.* 39: 2378-2386

70. **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

71. **Sasse, C., Dunkel, N., Schafer, T., Schneider, S., Dierolf, F., Ohlsen, K., and Morschhäuser, J.** 2012. The stepwise acquisition of fluconazole resistance mutations causes a gradual loss of fitness in *Candida albicans*. *Mol Microbiol.* 86: 539-556

72. **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

73. **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

74. **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. *Eukaryot Cell.* 10: 1110-1121

75. **Schubert, S., Rogers, P. D., and 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: 4274-4280

76. **Schuetzer-Muehlbauer, M., Willinger, B., Krapf, G., Enzinger, S., Presterl, E., and Kuchler, K.** 2003. The *Candida albicans* Cdr2p ATP-binding cassette (ABC) transporter confers resistance to caspofungin. *Mol Microbiol.* 48: 225-235

77. **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*. *Eukaryot Cell.* 9: 634-644

78. **Shukla, S., Yadav, V., Mukhopadhyay, G., and Prasad, R.** 2011. Ncb2 is involved in activated transcription of *CDR1* in azole-resistant clinical isolates of *Candida albicans*. *Eukaryot Cell.* 10: 1357-1366

79. **Silver, P. M., Oliver, B. G., and White, T. C.** 2004. Role of *Candida albicans* transcription factor Upc2p in drug resistance and sterol metabolism. *Eukaryot Cell.* 3: 1391-1397

80. **Sobel, J. D.** 1985. Epidemiology and pathogenesis of recurrent vulvovaginal candidiasis. *Am J Obstet Gynecol.* 152: 924-935
81. **Sobel, J. D.** 2003. Management of patients with recurrent vulvovaginal candidiasis. *Drugs.* 63: 1059-1066
82. **Southern, E. M.** 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol.* 98: 503-517
83. **Staib, P., Morschhäuser, J., and Hacker, J.** 2000. Pilze: Erreger-Wirtsbeziehung, Allgemeine Pathogenese. *Klinische Infektiologie* (Hrsg.: Marre, R., Mertens, T., Trautmann, M., Vanek, E.), Urban & Fischer Verlag, München Jena. 28-33
84. **Sternberg, S.** 1994. The emerging fungal threat. *Science.* 266: 1632-1634
85. **Tsao, S., Rahkhoodae, F., and Raymond, M.** 2009. Relative contributions of the *Candida albicans* ABC transporters Cdr1p and Cdr2p to clinical azole resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 53: 1344-1352
86. **Vandeputte, P., Ischer, F., Sanglard, D., and Coste, A. T.** 2011. In vivo systematic analysis of *Candida albicans* Zn2-Cys6 transcription factors mutants for mice organ colonization. *PLoS One.* 6: e26962
87. **Wang, H., Song, W., Huang, G., Zhou, Z., Ding, Y., and Chen, J.** 2011. *Candida albicans* Zcf37, a zinc finger protein, is required for stabilization of the white state. *FEBS Lett.* 585: 797-802
88. **Whiteway, M., Bachewich, C., Heitman, J., Filler, S. G., Edwards, J. E., and Mitchell, A. P.** 2006. Signal transduction in the interactions of fungal pathogens and mammalian hosts. *Molecular principles of fungal pathogenesis.* 143-161
89. **Wirsching, S., Michel, S., and Morschhäuser, J.** 2000a. Targeted gene disruption in *Candida albicans* wild-type strains: the role of the *MDR1* gene in fluconazole resistance of clinical *Candida albicans* isolates. *Mol Microbiol.* 36: 856-865
90. **Wirsching, S., Michel, S., Köhler, G., and Morschhäuser, J.** 2000b. Activation of the multiple drug resistance gene *MDR1* in fluconazole-resistant, clinical *Candida albicans* strains is caused by mutations in a trans-regulatory factor. *Journal of Bacteriology.* 182: 400-404
91. **Woloshuk, C. P., Foutz, K. R., Brewer, J. F., Bhatnagar, D., Cleveland, T. E., and Payne, G. A.** 1994. Molecular characterization of *afIR*, a regulatory locus for aflatoxin biosynthesis. *Appl Environ Microbiol.* 60: 2408-2414
92. **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
93. **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. *Eukaryot Cell.* 7: 836-847
94. **Zordan, R. E., Miller, M. G., Galgoczy, D. J., Tuch, B. B., and Johnson, A. D.** 2007. Interlocking transcriptional feedback loops control white-opaque switching in *Candida albicans*. *PLoS Biology.* 5: e256

Anhang

1. Übersicht der Microarray-Daten

In der folgenden Tabelle sind alle offenen Leseraster aufgelistet, die in den Stämmen *CTA4**, *STB5**, *MRR2** und *ZNC1** mit den entsprechenden künstlich aktivierten Zink-Cluster-Transkriptionsfaktoren mindestens 2-fach hochreguliert sind. Die *fold-change*-Werte sind Mittelwerte dreier unabhängiger RNA-Isolierungen, von zwei unabhängig hergestellten Transformanten (2x vom A- und 1x vom B-Stamm) und berechneten sich durch den Vergleich mit der wildtypischen Expression im SC5314. Die Reihenfolge der ORFs richtet sich danach, welche Gene in allen vier, dann in drei, in zwei und zum Schluss nur in einem der Stämme hochreguliert waren. Angegeben ist jeweils die orf19-Nummer, wenn vorhanden der entsprechende Gen-Standardname, die *fold-change*-Werte und eine korrespondierende Annotation, die die putativen molekularen Funktionen bzw. andere wichtige Eigenschaften des jeweiligen ORFs beschreibt.

Tab. 6: ORFs, die in den Stämmen *CTA4, *STB5**, *MRR2** und *ZNC1**, bezogen auf den Wildtyp SC5314, mindestens 2-fach hochreguliert sind.**

| orf19-Nr. | Gen | fold change | | | | Annotation |
|--------------|-------------|--------------|--------------|--------------|--------------|---|
| | | <i>CTA4*</i> | <i>STB5*</i> | <i>MRR2*</i> | <i>ZNC1*</i> | |
| orf19.4773 | <i>AOX2</i> | 266,57 | 240,10 | 6,39 | 6,16 | Alternative Oxidase; wichtig bei oxidativem Stress |
| orf19.2693 | <i>GST2</i> | 38,08 | 7,24 | 4,48 | 4,52 | Gluthation-S-Transferase; hochreguliert in Fluconazol-exponierten Zellen |
| orf19.7042 | | 22,72 | 8,70 | 4,54 | 25,88 | hochreguliert in azolresistenten, <i>MDR1</i> überexprimierenden Stämmen |
| orf19.344 | | 19,73 | 17,06 | 77,97 | 61,27 | hochreguliert nach Fluphenazin-Behandlung und in azolresistenten Stämmen mit hochregulierten <i>CDR1</i> und <i>CDR2</i> , eventuell Tac1 reguliert |
| orf19.7111.1 | <i>SOD3</i> | 18,89 | 12,63 | 19,58 | 24,05 | Mangan-enthaltene, zytosolische Superoxiddismutase, in der stationären Phase exprimiert |
| orf19.5777 | | 4,50 | 6,78 | 2,79 | 9,03 | induziert während Biofilmproduktion |
| orf19.5741 | <i>ALS1</i> | 3,84 | 4,56 | 7,13 | 21,92 | Adhäsion, ALS-Familie, Zelloberflächen Glykoprotein; wichtig bei der Biofilmproduktion und Virulenz |

| orf19-Nr. | Gen | fold change | | | | Annotation |
|--------------------------|---------------|-------------|--------|-------|-------|---|
| | | CTA4* | STB5* | MRR2* | ZNC1* | |
| orf19.1027 | <i>PDR16</i> | 3,80 | 2,67 | 3,00 | 3,60 | Phosphatityl-Inositol-Transferprotein; korreliert mit <i>CDR1/CDR2</i> Überexpression und Azolresistenz |
| orf19.4370 | | 6,40 | 6,79 | 4,11 | | induziert bei nitrosativem und oxidativem Stress |
| orf19.3707 | <i>YHB1</i> | 2,29 | 2,32 | 2,24 | | Stickstoffmonoxid-Dioxygenase, Flavohämoglobin |
| orf19.7009 | | 2,15 | 460,92 | 2,85 | | Rolle in zellulären, metabolischen Prozessen |
| orf19.1149 | <i>MRF1</i> | 13,74 | 3,78 | | 15,25 | putatives mitochondriales Protein; Stressantwort |
| orf19.3646 | <i>CTR1</i> | 5,85 | 2,97 | | 3,59 | Kupfertransporter |
| orf19.4569 | | 4,94 | 3,95 | | 2,19 | Funktion unbekannt |
| orf19.6139 | <i>FRE7</i> | 4,62 | 5,99 | | 4,63 | kupferregulierte Kupferreduktase |
| orf19.851 | | 3,03 | 3,29 | | 2,85 | Funktion unbekannt |
| orf19.7539 | <i>INO2</i> | 2,47 | 2,97 | | 2,07 | reguliert vermutlich Gene der Phosphatidylcholin- und -Inositol-Biosynthese |
| orf19.2496 | <i>ATO2</i> | 2,35 | | 4,32 | 2,04 | putatives pilzspezifisches Transmembranprotein; Funktion unbekannt |
| orf19.6000 | <i>CDR1</i> | | 3,48 | 4,19 | 4,41 | ABC-Transporter; <i>Multidrug</i> -Resistenz |
| orf19.4573 | <i>ZCF26</i> | | 2,24 | 2,16 | 2,35 | Zink-Cluster-Transkriptionsfaktor; Funktion unbekannt |
| orf19.3998 | | | 2,21 | 2,27 | 2,19 | Funktion unbekannt |
| orf19.1120 | <i>FAV2</i> | 31,03 | 4,93 | | | Adhäsion-ähnliches Protein; reguliert von Nrg1, Rfg1, Tup1 |
| orf19.7091 | | 10,15 | 2,02 | | | Funktion unbekannt |
| orf19.164 | | 8,38 | 3,29 | | | Funktion unbekannt |
| orf19.2046 | <i>POT1-2</i> | 7,12 | 6,86 | | | putative Peroxisomal-3-Ketoacyl-CoA-Thiolase |
| orf19.4150 | | 5,57 | 3,76 | | | putatives Glutaredoxin; induziert bei nitrosativem Stress |
| orf19.3364 | | 5,09 | 4,67 | | | Funktion unbekannt |
| orf19.1240 | | 4,36 | 8,99 | | | Funktion unbekannt |
| orf19.3415 | <i>PTK2</i> | 3,58 | 2,33 | | | putative Proteinkinase des Polyaminimports |
| orf19.2601 | <i>HEM1</i> | 3,45 | 2,58 | | | putative 5-Aminolevulinate-Synthase |
| orf19.1718 | <i>ZCF8</i> | 3,12 | 2,11 | | | Zink-Cluster-Transkriptionsfaktor; notwendig für Adhärenz von Hefezellen auf Silikonsubstrat |
| orf19.4570 | | 2,81 | 2,68 | | | Funktion unbekannt |
| orf19.272 | <i>FAA21</i> | 2,71 | 6,74 | | | putative Acyl-CoA-Synthetase |
| orf19.508 | <i>QDR1</i> | 2,53 | 2,33 | | | putativer Transporter; Resistenz |
| orf19.3516 | | 2,24 | 2,49 | | | Funktion unbekannt |
| orf19.5808 | | 2,06 | 3,64 | | | Funktion unbekannt |
| orf19.1430 orf19.5290 | | 41,57 | | | 12,96 | Funktion unbekannt |
| orf19.6586 | | 10,76 | | | 2,60 | Funktion unbekannt; im reifen Biofilm induziert |
| orf19.7214 | | 9,45 | | | 2,69 | putative Glucan-1,3-β-Glucosidase |
| orf19.2177 | | 5,33 | | | 2,46 | Funktion unbekannt |
| orf19.1327 | <i>RBT1</i> | 4,93 | | | 2,56 | Zellwandprotein |
| orf19.5059 | <i>GCS1</i> | 4,42 | | | 2,21 | γ-Glutamylcysteine-Synthetase |

| orf19-Nr. | Gen | fold change | | | | Annotation |
|------------|--------------|---------------|---------------|---------------|---------------|--|
| | | <i>CTA4</i> * | <i>STB5</i> * | <i>MRR2</i> * | <i>ZNC1</i> * | |
| orf19.7166 | | 3,19 | | | 32,83 | Funktion unbekannt |
| orf19.4133 | | 2,76 | | | 2,24 | Funktion unbekannt |
| orf19.7344 | | 2,76 | | | 2,92 | Funktion unbekannt |
| orf19.23 | <i>RTA3</i> | 2,66 | | | 82,45 | putatives Membranprotein; Funktion unbekannt |
| orf19.4234 | | 2,63 | | | 2,07 | Funktion unbekannt |
| orf19.5759 | <i>SNQ2</i> | 2,59 | | | 3,05 | ABC-Transporter;PDR-Familie |
| orf19.5295 | | 2,55 | | | 2,34 | Funktion unbekannt |
| orf19.996 | | 2,41 | | | 6,24 | Funktion unbekannt |
| orf19.3644 | | 2,10 | | | 3,09 | Funktion unbekannt |
| orf19.5785 | | 25,04 | | 4,57 | | Funktion unbekannt |
| orf19.4662 | <i>RLM1</i> | 5,69 | | 2,34 | | notwendig für Resistenz bei Zellwandstörung; reguliert Caspofungin Induktion von <i>PGA13</i> |
| orf19.4574 | | 2,36 | | 3,85 | | Funktion unbekannt |
| orf19.7595 | | 2,31 | | 2,86 | | Funktion unbekannt |
| orf19.3733 | <i>IDP2</i> | | 21,17 | 2,68 | | Isocitrat-Dehydrogenase |
| orf19.4122 | | | 9,04 | 3,02 | | Funktion unbekannt |
| orf19.6577 | <i>FLU1</i> | | 4,03 | 4,32 | | Major Facilitator Superfamilie; Multidrug-Effluxpumpe |
| orf19.2652 | <i>TEF4</i> | | 2,93 | 2,98 | | Funktion unbekannt |
| orf19.6318 | | | 2,84 | 3,38 | | Funktion unbekannt |
| orf19.6984 | | | 2,25 | 2,58 | | Funktion unbekannt |
| orf19.1783 | <i>YOR1</i> | | 44,72 | | 3,09 | ATPase-Aktivität |
| orf19.5217 | <i>TES1</i> | | 23,17 | | 2,40 | putative Acyl-CoA-Thioesterase |
| orf19.7204 | | | 12,63 | | 4,41 | Funktion unbekannt |
| orf19.6007 | | | 12,55 | | 2,96 | Funktion unbekannt |
| orf19.1069 | <i>RPN4</i> | | 10,02 | | 3,74 | Transkriptionsfaktor mit Cys ₂ -His ₂ Zinkfinger-Motif; putativer Regulator von Proteasomgenen |
| orf19.7513 | <i>ALK2</i> | | 9,98 | | 18,58 | N-Alkane induzierbares Cytochrom P450 |
| orf19.2244 | | | 6,07 | | 3,88 | Funktion unbekannt |
| orf19.1586 | <i>FGR22</i> | | 3,51 | | 2,25 | Phosphatidylinositol-spezifische Phospholipase C-Aktivität |
| orf19.5797 | <i>PLC2</i> | | | | | |
| orf19.4056 | | | 3,23 | | 2,49 | Transkriptionsfaktor; involviert in Kontrolle der Biofilmbildung |
| orf19.6781 | <i>ZFU2</i> | | | 2,57 | 3,75 | Transkriptionsfaktor; reguliert Adhärenz von Hefezellen |
| orf19.3120 | | 214,44 | | | | putativer PDR-Subfamilie ABC-Transporter; ATPase-Aktivität |
| orf19.7313 | <i>SSU1</i> | 50,24 | | | | Sulfit-Transporter |
| orf19.7495 | | 36,34 | | | | Funktion unbekannt |
| orf19.7148 | <i>TPO2</i> | 31,64 | | | | putativer Polyamin-Transporter |
| orf19.1816 | <i>ALS3</i> | 19,72 | | | | ALS-Familie; Adhäsion |
| orf19.5069 | | 18,48 | | | | Funktion unbekannt |
| orf19.3639 | | 15,66 | | | | Funktion unbekannt |

| orf19-Nr. | Gen | fold change | | | | Annotation |
|------------|--------------|---------------|---------------|---------------|---------------|--|
| | | <i>CTA4</i> * | <i>STB5</i> * | <i>MRR2</i> * | <i>ZNC1</i> * | |
| orf19.6209 | | 14,38 | | | | Monocarboxylate-Transmembran-Transporter-Aktivität |
| orf19.5635 | <i>PGA7</i> | 12,72 | | | | Vorstufe von Hyphen-Oberflächen-Antigen; Funktion unbekannt |
| orf19.4816 | | 12,16 | | | | Funktion unbekannt |
| orf19.5636 | <i>RBT5</i> | 12,04 | | | | GPI-verankertes Zellwandprotein; involviert in Hämoglobinabbau |
| orf19.1830 | | 10,55 | | | | Funktion unbekannt |
| orf19.1395 | | 8,81 | | | | Funktion unbekannt |
| orf19.5940 | <i>ZCF32</i> | 8,55 | | | | Zink-Cluster-Transkriptionsfaktor; Funktion unbekannt |
| orf19.7077 | | 8,51 | | | | putative Eisenreduktase |
| orf19.4680 | | 8,26 | | | | possile Protease |
| orf19.5634 | <i>FRP1</i> | 8,15 | | | | Eisenreduktase |
| orf19.2947 | <i>SNZ1</i> | 7,85 | | | | Stationäre-Phase-Protein |
| orf19.4287 | | 7,45 | | | | Funktion unbekannt |
| orf19.2607 | | 6,18 | | | | Funktion unbekannt |
| orf19.3234 | <i>OYE22</i> | 6,04 | | | | putative NADPH-Dehydrogenase |
| orf19.7374 | <i>CTA4</i> | 5,88 | | | | Zink-Cluster-Transkriptionsfaktor; Funktionen bei der Antwort auf nitrosativem Stress |
| orf19.5585 | <i>SAP5</i> | 5,82 | | | | sekretierte Aspartyl-Proteinase |
| orf19.4720 | <i>CTR2</i> | 5,78 | | | | putativer Kupfertransporter |
| orf19.4817 | <i>RAM2</i> | 5,76 | | | | Geranylgeranyl- und Farnesyltransferase |
| orf19.2968 | | 5,69 | | | | Funktion unbekannt |
| orf19.4743 | <i>AFG1</i> | 5,09 | | | | Funktion unbekannt |
| orf19.2886 | <i>CEK1</i> | 5,09 | | | | Proteinkinase der ERK-Familie; MAP-Kinase-Aktivität |
| orf19.946 | <i>MET14</i> | 5,09 | | | | putative Adenylylsulfatkinase |
| orf19.1861 | | 4,98 | | | | Funktion unbekannt |
| orf19.1464 | <i>BMT5</i> | 4,92 | | | | putative β -Mannosyltransferase |
| orf19.6980 | | 4,70 | | | | Funktion unbekannt |
| orf19.2281 | | 4,50 | | | | Funktion unbekannt |
| orf19.3753 | <i>SEF1</i> | 4,26 | | | | Zink-Cluster-Transkriptionsfaktor; reguliert Eisenaufnahme, aktiv unter Eisenmangelbedingungen |
| orf19.4980 | <i>HSP70</i> | 4,17 | | | | Hitzeschock-Protein 70, Chaperon |
| orf19.3508 | | 4,05 | | | | Funktion unbekannt |
| orf19.3615 | | 4,04 | | | | Funktion unbekannt |
| orf19.970 | | 4,03 | | | | Funktion unbekannt |
| orf19.4757 | <i>NAR1</i> | 3,99 | | | | putatives zytosolisches Eisen-Sulfur-Bindeprotein |
| orf19.2862 | <i>RIB1</i> | 3,65 | | | | putative GTP-Cyclohydrolase II |
| orf19.7225 | | 3,63 | | | | Funktion unbekannt |
| orf19.21 | | 3,58 | | | | Funktion unbekannt |
| orf19.1719 | <i>SGA1</i> | 3,46 | | | | putative Glucoamylase |

| orf19-Nr. | Gen | fold change | | | | Annotation |
|------------|---------------|--------------|--------------|--------------|--------------|---|
| | | <i>CTA4*</i> | <i>STB5*</i> | <i>MRR2*</i> | <i>ZNC1*</i> | |
| orf19.1057 | | 3,41 | | | | Funktion unbekannt |
| orf19.3131 | <i>OYE32</i> | 3,40 | | | | NAD(P)H Oxidoreduktase |
| orf19.6387 | <i>HSP104</i> | 3,26 | | | | Hitzeschock-Protein, Chaperon |
| orf19.3340 | <i>SOD2</i> | 3,25 | | | | Superoxiddismutase |
| orf19.6920 | | 3,25 | | | | Funktion unbekannt |
| orf19.2948 | <i>SNO1</i> | 3,24 | | | | möglicher Weise im Pyridoxine Metabolismus involviert |
| orf19.3190 | <i>HAL9</i> | 3,20 | | | | Zink-Cluster-Transkriptionsfaktor |
| orf19.2977 | <i>MIA40</i> | 3,08 | | | | möglicher Weise Bestandteil der mitochondrialen Importmaschinerie |
| orf19.3661 | | 2,99 | | | | putatives Deubiquitinierungsenzym |
| orf19.3556 | | 2,96 | | | | Funktion unbekannt |
| orf19.6478 | <i>YCF1</i> | 2,96 | | | | putativer Glutathion-S-Konjugat-Transporter |
| orf19.3783 | | 2,94 | | | | Funktion unbekannt |
| orf19.4507 | | 2,94 | | | | Funktion unbekannt |
| orf19.1573 | | 2,87 | | | | Funktion unbekannt |
| orf19.1742 | <i>HEM3</i> | 2,86 | | | | Hydroxymethylbilansynthase; Hämbiosynthese |
| orf19.5542 | <i>SAP6</i> | 2,78 | | | | sekretierte Aspartyl-Proteinase |
| orf19.22 | | 2,77 | | | | Funktion unbekannt |
| orf19.1058 | | 2,72 | | | | Funktion unbekannt |
| orf19.1282 | <i>CKS1</i> | 2,71 | | | | Funktion unbekannt |
| orf19.428 | | 2,70 | | | | putative Serin-/Threoninkinase |
| orf19.2825 | | 2,66 | | | | putatives zytosolisches Eisen-Sulfur-Bindeprotein |
| orf19.240 | | 2,64 | | | | möglicher Weise am Proteinimport in die mitochondriale Matrix beteiligt |
| orf19.5716 | <i>SAP4</i> | 2,63 | | | | sekretierte Aspartyl-Proteinase |
| orf19.3706 | | 2,63 | | | | Funktion unbekannt |
| orf19.4951 | | 2,62 | | | | Funktion unbekannt |
| orf19.6816 | | 2,59 | | | | Funktion unbekannt |
| orf19.1153 | <i>GAD1</i> | 2,58 | | | | putative Glutamatdecarboxylase |
| orf19.6440 | | 2,54 | | | | Funktion unbekannt |
| orf19.3448 | | 2,53 | | | | Funktion unbekannt |
| orf19.5228 | <i>RIB3</i> | 2,52 | | | | 3,4-Dihydroxy-2-Butanon-4-Phosphat-Synthase; Riboflavinbiosynthese |
| orf19.6059 | <i>TTR1</i> | 2,52 | | | | Glutathionreductase |
| orf19.968 | <i>PGA14</i> | 2,51 | | | | Funktion unbekannt, vermutlich mit GPI-Anker |
| orf19.2952 | <i>EXG2</i> | 2,49 | | | | Zellwandprotein mit GPI-Anker |
| orf19.1727 | <i>PMC1</i> | 2,49 | | | | Vakuoläre Calcium-P-Typ ATPase |
| orf19.1847 | <i>ARO10</i> | 2,49 | | | | aromatische Decarboxylase; Biosynthese aromatischer Aminosäuren |
| orf19.7551 | <i>ALO1</i> | 2,48 | | | | D-Arabinono-1,4-Lacton-Oxidase; Schutz vor oxidativem Stress |

| orf19-Nr. | Gen | fold change | | | | Annotation |
|------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|---|
| | | <i>CTA4*</i> | <i>STB5*</i> | <i>MRR2*</i> | <i>ZNC1*</i> | |
| orf19.1804 | | 2,43 | | | | Funktion unbekannt |
| orf19.308 | | 2,43 | | | | Funktion unbekannt |
| orf19.3803 | <i>MNN22</i> | 2,42 | | | | putative Golgi- α -1,2-Mannosyltransferase |
| orf19.2671 | | 2,42 | | | | Funktion unbekannt |
| orf19.5239 | | 2,41 | | | | Funktion unbekannt |
| orf19.1281 | | 2,36 | | | | Funktion unbekannt |
| orf19.5286 | <i>YCP4</i> | 2,33 | | | | putatives Flavodoxin |
| orf19.915 | | 2,32 | | | | Funktion unbekannt |
| orf19.417 | | 2,32 | | | | Funktion unbekannt |
| orf19.1434 | | 2,29 | | | | Funktion unbekannt |
| orf19.4328 | <i>CCC2</i> | 2,28 | | | | Kupfer-transportierende P-Typ ATPase des Golgi |
| orf19.7213 | | 2,23 | | | | putative ATP-abhängige RNA-Helicase |
| orf19.6941 | | 2,23 | | | | im späten Biofilm induziert |
| orf19.909 | <i>STP4</i> | 2,19 | | | | Zink-Finger-Transkriptionfaktor |
| orf19.4610 | | 2,18 | | | | Funktion unbekannt |
| orf19.517 | <i>HAP31</i> | 2,16 | | | | Transkriptionsfaktor, putativ involviert in <i>CYC1</i> -Regulation |
| orf19.5572 | | 2,10 | | | | Funktion unbekannt |
| orf19.5688 | | 2,10 | | | | Funktion unbekannt |
| orf19.3518 | | 2,07 | | | | Funktion unbekannt |
| orf19.815 | <i>DCK1</i> | 2,06 | | | | putativer Guaninnukleotid-Austausch-Faktor |
| orf19.3231 | <i>CDC27</i> | 2,04 | | | | putative Ubiquitin-Proteinligase |
| orf19.505 | <i>SRV2</i> | 2,04 | | | | Adenylat-Cyclase-assoziiertes Protein; reguliert die Adenylat-Cyclase-Aktivität |
| orf19.7554 | | | 114,03 | | | putativer Drug-Transporter |
| orf19.4121 | | | 108,81 | | | Funktion unbekannt |
| orf19.4612 | | | 102,35 | | | Funktion unbekannt |
| orf19.5169 | | | 74,70 | | | Funktion unbekannt |
| orf19.4833 | <i>MLS1</i> | | 72,93 | | | Malatsynthese |
| orf19.1867 | | | 58,17 | | | putative Malatpermease |
| orf19.6992 | | | 32,04 | | | putativer Drug-Transporter |
| orf19.2681 | <i>RBT7</i> | | 26,21 | | | Ähnlichkeit zur Rnase T2 |
| orf19.4899 | <i>GCA1</i> | | 20,94 | | | Glucoamylase |
| orf19.999 | <i>GCA2</i> | | 17,76 | | | Glucoamylase |
| orf19.473 | <i>TPO4</i> | | 16,54 | | | putativer Drug-Transporter/ Sperimidintransporter |
| orf19.1325 | <i>ECM38</i> | | 15,98 | | | putative γ -Glutamyltransferase |
| orf19.4128 | | | 14,98 | | | Funktion unbekannt |
| orf19.5102 | <i>PLB5</i> | | 14,93 | | | putative Phospholipase mit GPI-Anker |
| orf19.1523 | <i>FMO1</i> | | 14,91 | | | putative Oxidoreduktase |
| orf19.3839 | <i>SAP10</i> | | 11,55 | | | sekretierte Aspartyl-Proteinase |

| orf19-Nr. | Gen | fold change | | | | Annotation |
|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--|
| | | <i>CTA4*</i> | <i>STB5*</i> | <i>MRR2*</i> | <i>ZNC1*</i> | |
| orf19.2686 | | | 8,21 | | | Funktion unbekannt |
| orf19.3418 | | | 7,92 | | | Funktion unbekannt |
| orf19.2048 | | | 7,53 | | | Funktion unbekannt |
| orf19.3483 | | | 7,40 | | | putative Phosphatidyl-Glycerol-Phospholipase C |
| orf19.4901 | | | 7,02 | | | Funktion unbekannt |
| orf19.1048 | | | 6,42 | | | Aldo-keto Reduktase |
| orf19.780 | | | 6,38 | | | Urea-Amidolyase |
| orf19.5765 | | | 6,08 | | | Funktion unbekannt |
| orf19.3606 | | | 5,86 | | | Funktion unbekannt |
| orf19.3605 | <i>PEX17</i> | | 5,75 | | | Putatives Peroxin; Funktion unbekannt |
| orf19.1737 | | | 5,74 | | | Funktion unbekannt |
| orf19.5723 | <i>POX1</i> | | 5,01 | | | putative Acyl-CoA Oxidase |
| orf19.3308 | <i>STB5</i> | | 4,80 | | | Zink-Cluster-Transkriptionsfaktor |
| orf19.86 | | | 4,36 | | | putative Glutathion-Peroxidase |
| orf19.532 | <i>RBR2</i> | | 4,25 | | | Zellwandprotein |
| orf19.7010 | | | 4,23 | | | Funktion unbekannt |
| orf19.1369 | | | 4,19 | | | Funktion unbekannt |
| orf19.3330.3 | <i>POX18</i> | | 4,11 | | | Funktion unbekannt |
| orf19.847 | <i>YIM1</i> | | 4,08 | | | Endopeptidase-Aktivität |
| orf19.4609 | | | 4,01 | | | putative Dienelactonhydrolase |
| orf19.4735 | | | 3,94 | | | Funktion unbekannt |
| orf19.3734 | <i>GEF2</i> | | 3,79 | | | Chloridkanal; Membranpotential |
| orf19.5070 | | | 3,69 | | | Funktion unbekannt |
| orf19.1509 | <i>ROD1</i> | | 3,52 | | | Funktion unbekannt |
| orf19.7553 | | | 3,47 | | | Funktion unbekannt |
| orf19.1237 | <i>ARO9</i> | | 3,46 | | | aromatische Transaminase; Biosynthese aromat. Alkohole |
| orf19.2396 | <i>IFR2</i> | | 3,38 | | | Zink-bindende Dehydrogenase |
| orf19.2247 | | | 3,32 | | | Funktion unbekannt |
| orf19.3292 | | | 3,30 | | | Funktion unbekannt |
| orf19.4779 | | | 3,29 | | | putativer <i>Drug</i> -Transporter |
| orf19.6263 | | | 3,24 | | | putativer Membrantransporter der Monocarboxylat-Porter Familie (MCP) |
| orf19.3578 | | | 3,21 | | | Funktion unbekannt |
| orf19.2006.1 | <i>COX17</i> | | 3,19 | | | putatives Kupfer-Metallochaperon |
| orf19.732 | | | 3,16 | | | Funktion unbekannt |
| orf19.4698 | <i>PTC8</i> | | 3,13 | | | putative Serin-/Threoninphosphatase Typ2C |
| orf19.6306 | | | 3,07 | | | Trimethylaminobutyraldehyd-Dehydrogenase |
| orf19.3392 | <i>DOG1</i> | | 3,06 | | | putative 2-Deoxyglucose-6-Phosphatase |
| orf19.4498 | | | 2,93 | | | Funktion unbekannt |

| orf19-Nr. | Gen | fold change | | | | Annotation |
|--------------|--------------|-------------|-------|-------|-------|--|
| | | CTA4* | STB5* | MRR2* | ZNC1* | |
| orf19.1417 | | | 2,88 | | | Funktion unbekannt |
| orf19.6877 | <i>PNG2</i> | | 2,86 | | | putative Peptid:N-Glycanase |
| orf19.6837 | <i>FMA1</i> | | 2,80 | | | Funktion unbekannt |
| orf19.6639 | | | 2,73 | | | Funktion unbekannt |
| orf19.2508 | <i>PRM9</i> | | 2,72 | | | Funktion unbekannt |
| orf19.1704 | <i>FOX3</i> | | 2,70 | | | putative, peroxisomale 3-Oxoacyl-CoA-Thiolase |
| orf19.1340 | | | 2,66 | | | putative Aldosereduktase |
| orf19.3577.1 | | | 2,64 | | | Funktion unbekannt |
| orf19.3053 | | | 2,64 | | | Protein in exponentieller und stationärer Phase nachweisbar; Funktion unbekannt |
| orf19.7350 | <i>RCT1</i> | | 2,61 | | | Fluconazol-induzierte Expression, Funktion unbekannt |
| orf19.5804 | <i>HYU1</i> | | 2,50 | | | Funktion unbekannt |
| orf19.4948 | | | 2,48 | | | Funktion unbekannt |
| orf19.543 | <i>FUM11</i> | | 2,46 | | | Fumarathydratase |
| orf19.3365 | <i>DAO2</i> | | 2,44 | | | putative D-Aminosäure-Oxidase |
| orf19.4175 | <i>TOK1</i> | | 2,38 | | | Kaliumkanal |
| orf19.6773 | <i>ECM29</i> | | 2,38 | | | Funktion unbekannt |
| orf19.1576 | | | 2,36 | | | Funktion unbekannt |
| orf19.1391 | | | 2,34 | | | Funktion unbekannt |
| orf19.4474 | | | 2,34 | | | Funktion unbekannt |
| orf19.2104 | | | 2,32 | | | Funktion unbekannt |
| orf19.6838 | | | 2,29 | | | Funktion unbekannt |
| orf19.6126 | <i>KGD2</i> | | 2,26 | | | putative Dihydrolipoamide S-Succinyltransferase |
| orf19.1496 | | | 2,26 | | | putativer Zink-Finger-Transkriptionsfaktor |
| orf19.1736 | | | 2,23 | | | Funktion unbekannt |
| orf19.2341 | <i>HNT1</i> | | 2,15 | | | Funktion unbekannt |
| orf19.4445 | | | 2,13 | | | Funktion unbekannt |
| orf19.1412 | | | 2,11 | | | Funktion unbekannt |
| orf19.2710 | | | 2,10 | | | Funktion unbekannt |
| orf19.1121 | | | 2,09 | | | Funktion unbekannt |
| orf19.2229 | | | 2,07 | | | Funktion unbekannt |
| orf19.2446 | | | 2,06 | | | Funktion unbekannt |
| orf19.1341 | <i>PRR2</i> | | 2,03 | | | putative Serine/Threonin-Proteinkinase |
| orf19.1228 | <i>HAP2</i> | | 2,01 | | | CCAAT-Binding-Faktor, reguliert unter Eisenmangelbedingungen die Induktion von <i>FRP1</i> |
| orf19.6182 | <i>ZCF34</i> | | | 5,84 | | Zink-Cluster-Transkriptionsfaktor |
| orf19.4756 | | | | 3,65 | | Funktion unbekannt |
| orf19.1631 | <i>ERG6</i> | | | 3,46 | | δ(24)-Sterol-C-Methyltransferase; Ergosterolbiosynthese |

| orf19-Nr. | Gen | fold change | | | | Annotation |
|------------|---------------|-------------|-------|-------|--------|--|
| | | CTA4* | STB5* | MRR2* | ZNC1* | |
| orf19.3040 | <i>EHT1</i> | | | 2,46 | | Funktion unbekannt |
| orf19.3672 | <i>GAL10</i> | | | 2,39 | | UDP-Glucose-4-Epimerase; Galactoseabbau |
| orf19.7466 | <i>ACC1</i> | | | 2,01 | | putative Acetyl-Co-A Carboxylase |
| orf19.4476 | | | | | 561,18 | Funktion unbekannt |
| orf19.320 | | | | | 64,48 | Funktion unbekannt |
| orf19.4477 | | | | | 41,32 | Aldo-keto-Reduktase |
| orf19.4490 | <i>RPL17B</i> | | | | 31,58 | ribosomales Protein L17 |
| orf19.6869 | | | | | 30,67 | Funktion unbekannt |
| orf19.2175 | | | | | 25,11 | putative mitochondrialer Zelltod-Effektor |
| orf19.4898 | | | | | 16,19 | Funktion unbekannt |
| orf19.5037 | <i>HRQ2</i> | | | | 12,98 | Funktion unbekannt |
| orf19.6627 | | | | | 12,37 | Funktion unbekannt |
| orf19.6947 | <i>GTT11</i> | | | | 10,97 | Gluthation-S-Transferase; ER-lokalisiert |
| orf19.1652 | <i>POX1-3</i> | | | | 9,16 | putative Acyl-CoA Oxidase |
| orf19.359 | <i>GTT12</i> | | | | 8,85 | Funktion unbekannt |
| orf19.3817 | | | | | 8,13 | Funktion unbekannt |
| orf19.2176 | <i>IFM3</i> | | | | 7,42 | Funktion unbekannt |
| orf19.6420 | <i>PGA13</i> | | | | 5,60 | Zellwandprotein mit GPI-Anker |
| orf19.4589 | | | | | 5,39 | Funktion unbekannt |
| orf19.5862 | <i>AFP99</i> | | | | 5,32 | Funktion unbekannt |
| orf19.4670 | <i>CAS5</i> | | | | 4,67 | Zink-Finger-Transkriptionsfaktor; Antwort auf Zellwandschädigung |
| orf19.319 | | | | | 4,51 | Funktion unbekannt |
| orf19.6147 | | | | | 4,10 | Funktion unbekannt |
| orf19.6445 | <i>ECI1</i> | | | | 3,94 | Funktion unbekannt |
| orf19.94 | | | | | 3,92 | Funktion unbekannt |
| orf19.4309 | <i>GRP2</i> | | | | 3,91 | Methylglyoxal-Reduktase |
| orf19.1461 | | | | | 3,79 | Funktion unbekannt |
| orf19.6026 | <i>ERG2</i> | | | | 3,74 | C-8 Sterol-Isomerase; Ergosterolbiosynthese |
| orf19.7305 | | | | | 3,73 | Funktion unbekannt |
| orf19.2905 | | | | | 3,48 | Funktion unbekannt |
| orf19.1290 | <i>XKS1</i> | | | | 3,45 | putative Xylulokinase |
| orf19.4478 | | | | | 3,34 | Funktion unbekannt |
| orf19.4231 | <i>PTH2</i> | | | | 3,27 | putatives cAMP-unabhängiges regulatorisches Protein, Funktion unbekannt |
| orf19.5839 | <i>PDR17</i> | | | | 3,23 | pilzspezifisches Protein; Rolle bei Fluconazolsensitivität; Funktion unbekannt |
| orf19.7376 | | | | | 3,19 | Funktion unbekannt |
| orf19.7596 | | | | | 3,17 | Funktion unbekannt |

| orf19-Nr. | Gen | fold change | | | | Annotation |
|-------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--|
| | | <i>CTA4*</i> | <i>STB5*</i> | <i>MRR2*</i> | <i>ZNC1*</i> | |
| orf19.2544 | | | | | 3,13 | Funktion unbekannt |
| orf19.2829 | | | | | 2,88 | Funktion unbekannt |
| orf19.856 | <i>IFK2</i> | | | | 2,87 | putative Thiol-spezifische Monooxygenase |
| orf19.3104 | <i>YDC1</i> | | | | 2,74 | Protein mit Mob2p-abhängiger Hyphenregulation; Funktion unbekannt |
| orf19.2568 | <i>IFU5</i> | | | | 2,67 | putatives Membranprotein; Funktion unbekannt |
| orf19.1668 | | | | | 2,65 | Funktion unbekannt |
| orf19.2962 | | | | | 2,54 | Funktion unbekannt |
| orf19.1439 | <i>IPK1</i> | | | | 2,54 | Funktion unbekannt |
| orf19.4789 | | | | | 2,51 | Funktion unbekannt |
| orf19.6351 | | | | | 2,49 | Funktion unbekannt |
| orf19.93 | | | | | 2,42 | putatives mitochondriales Intermembranprotein; Funktion unbekannt |
| orf19.7472 | <i>IFF4</i> | | | | 2,41 | putatives Adhäsion-ähnliches Oberflächenprotein; Funktion unbekannt |
| orf19.310 orf19.6958 | <i>ECM18</i> | | | | 2,32 | putatives mitochondriales Protein; Zellwandbiogenese; Funktion unbekannt |
| orf19.4531 | | | | | 2,31 | putativer PDR-Subfamilie ABC-Transporter; ATPase-Aktivität |
| orf19.7306 | | | | | 2,28 | Aldo-keto-Reduktase |
| orf19.2021 | <i>HGT8</i> | | | | 2,28 | High-affinity Glucosetransporter; Major Facilitator Superfamilie |
| orf19.5992 | <i>WOR2</i> | | | | 2,25 | Zink-Cluster-Transkriptionsfaktor; Regulator des white-opaque-switchings |
| orf19.5257 | <i>LCB4</i> | | | | 2,20 | putative Sphingosinkinase |
| orf19.6066 | | | | | 2,19 | Funktion unbekannt |
| orf19.3187 | <i>ZNC1</i> | | | | 2,19 | Zink-Cluster-Transkriptionsfaktor |
| orf19.7043 | | | | | 2,15 | Funktion unbekannt |
| orf19.1973 | <i>HAP5</i> | | | | 2,13 | Komponente des CCAAT-Binding-Transkriptionsfaktors |
| orf19.3669 | <i>SHA3</i> | | | | 2,11 | putative Serin-/Threoninkinase; Glucosetransport |
| orf19.6348 | | | | | 2,07 | Funktion unbekannt |
| orf19.279 | | | | | 2,06 | Funktion unbekannt |
| orf19.1267 | | | | | 2,04 | Funktion unbekannt |
| orf19.4323 | | | | | 2,02 | Funktion unbekannt |
| orf19.1499 | <i>CTF1</i> | | | | 2,01 | Zink-Cluster-Transkriptionsfaktor |

2. Danksagung

Zunächst einmal möchte ich mich besonders bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Joachim Morschhäuser bedanken, natürlich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, aber vor allem für das tolle Projekt an dem ich arbeiten durfte. Außerdem bin ich sehr dankbar für die Förderung und Unterstützung während meiner Doktorarbeit. Besonders hervorheben möchte ich dabei, dass es jeder Zeit möglich war, mit offenen Fragen, Problemen oder zum Diskutieren der Ergebnisse an seine Tür zu klopfen und somit immer neue Anreize und Denkanstöße zum Erfüllen der Aufgaben dieser Dissertation zu bekommen. Weiterhin bin ich dankbar dafür, durch Prof. Dr. Joachim Morschhäuser ein Teil des ersten internationalen Graduierten Kollegs mit dem afrikanischen Kontinent, dem IRTG 1522, gewesen zu sein. Die damit verbundenen Besuche in Südafrika, der so ermöglichte wissenschaftliche Austausch mit Studenten des afrikanischen Kontinents und die gewonnenen Einblicke in andere Bereiche der Infektionsforschung waren eine lebensbereichernde Erfahrung, sowohl im wissenschaftlichen als auch im persönlichen Sinne. Ein großer Dank gilt aber auch dem Vertrauen in mich bei der »11th ASM Conference on Candida and Candidiasis« meine wissenschaftlichen Ergebnisse präsentieren zu dürfen und für die damit verbundene tolle Erfahrung, aber natürlich auch für die finanzielle Unterstützung.

Bedanken möchte ich mich auch bei Prof. Dr. Axel Rethwilm, zum einen für die Erstellung des Zweitgutachtens und zum anderen für das Ins-Leben-Rufen des IRTG 1522, den damit verbundenen Kursen, Symposien, Retreats, Sommer Schools und natürlich den Reisen nach Südafrika. Ich bedanke mich außerdem bei Prof. Dr. Frank Brombacher, meinem dritten Betreuer, für die hilfreichen wissenschaftlichen Gespräche während unserer Symposien.

Ein großer Dank geht auch an die Graduate School of Life Science für die vielen, tollen wissenschaftlichen als auch fächerübergreifenden Kurse und die damit verbundenen Förderungen unserer Fähigkeiten auch außerhalb des Labors. Ebenso danke für die ermöglichten Einblicke in die Welt nach der Doktorarbeit durch das Einladen von verschiedenen Firmen im Rahmen der *Career Luncheons*, bei denen man in angenehmer

Atmosphäre und auf Augenhöhe mit potentiellen zukünftigen Arbeitgebern diskutieren konnte. Außerdem möchte ich mich für die finanzielle Unterstützung durch einen GSLS *Travel Fellowship*, bei meiner Reise nach San Francisco zur »11th ASM Conference on Candida and Candidiasis«, bedanken. Mein Dank gilt auch der Frauenförderung der Universität Würzburg, die mich im Rahmen des Qualifikationsprogramms für Wissenschaftlerinnen an der Universität Würzburg während der Abschlussphase meiner Promotion finanziell förderte.

Ein weiterer Dank gilt natürlich auch meinen Kollegen in der AG Morschhäuser, besonders Dr. Bernardo Ramirez-Zavala, der mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand und immer Zeit zum Probleme wälzen hatte. Danke auch an Nico Dunkel, meinem Freund und Kollegen, mit dem ich schon zu Studiumszeiten interessante Gespräche führen durfte. Ich danke dir und auch Lisa für die unvergessliche Zeit in Kalifornien und Nevada. Natürlich auch ein Dankeschön an Christa Albert, die mir besonders im letzten Jahr meiner Promotion immer mentale Unterstützung bot. Auch danke an Tina Schüll und Sabrina Schneider, Tina für ihre stetige Hilfsbereitschaft und gute Laune und Frau Schneider für die tolle Einarbeitung in die molekularbiologischen Arbeitsweisen und ihre tolle Labororganisation. Und natürlich auch ein Dank an Sabrina Schubert, sowohl auf wissenschaftlicher als auch persönlicher Seite.

Zum Schluss möchte ich mich noch von ganzem Herzen bei meiner Familie bedanken, besonders bei meinen Eltern, die mich immer unterstützt haben, für mich da waren und ohne die diese ganze Ausbildung, allein schon aus finanzieller Sicht, gar nicht möglich gewesen wäre. Meiner Mutter danke ich außerdem für das gründliche Korrekturlesen dieser Arbeit. Und schließlich möchte ich mich bei meinem Ehemann Jens aus vollem Herzen bedanken. Danke für deine Unterstützung in jeglicher Hinsicht, danke, dass du immer für mich da warst und bist, danke für deine Geduld und auch danke für das Korrekturlesen, aber am meisten Danke für deine Liebe und Kraft!

3. Lebenslauf
