

**Molekulargenetische Charakterisierung des pH-regulierten
Dimorphismus und der pH-abhängigen Genexpression
von *Candida albicans* und Entwicklung eines
Reportersystems für *Candida glabrata***

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

vorgelegt von

Abdelmalic El Barkani

aus Nador

Würzburg 2000

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. Goebel

Gutachter: Prof. Dr. M. Frosch

Gutachter: Prof. Dr. J. Hacker

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Erklärungen

Hiermit versichere ich, die vorliegende Dissertation selbstständig angefertigt und nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt zu haben.

Die Arbeit hat bisher in gleicher Form keinem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen.

Im Jahre 1996 habe ich den akademischen Grad eines Diplom-Biologen erworben.

Abdelmalic El Barkani

Würzburg, den 05.12.2000

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde im Institut für Hygiene und Mikrobiologie der Universität Würzburg angefertigt.

Mein besonderer Dank geht an Herrn Dr. Friedrich A. Mühlshlegel für die intensive Betreuung und die vielfältigen Anregungen und Diskussionen.

Dem Vorstand des Instituts für Hygiene und Mikrobiologie Herrn Prof. Dr. M. Frosch danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und seinem Interesse an dieser Arbeit.

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. J. Hacker vom Institut für molekulare Infektionsbiologie für seine Bereitschaft diese Arbeit als Gutachter zu betreuen.

Bedanken möchte ich mich ganz besonders bei Frau Stefanie Müksch und allen Kollegen und Kolleginnen der Arbeitsgruppe Dr. Mühlshlegel für ihre Hilfsbereitschaft und die vielen Anregungen bei dieser Arbeit.

Sehr herzlich möchte ich mich bei meiner Familie bedanken, die mich während meines gesamten Studiums und meiner Doktorarbeit sehr unterstützt hat.

Inhaltsverzeichnis

1 Zusammenfassung	1
2 Einleitung	3
2.1 <i>Candida</i> und Candidose	3
2.1.1 Pathogenitätsfaktoren	4
2.1.2 Diagnostik und Therapie	6
2.2 Molekularbiologische Methoden	8
2.3 Morphologische Flexibilität von <i>Candida albicans</i>	13
2.4 pH-regulierter Dimorphismus und pH-abhängige Genexpression	17
2.5 Zielsetzung dieser Arbeit	21
3 Ergebnisse	23
3.1 Phänotypische Charakteristika von <i>phr2Δ</i> -Revertanten	23
3.1.1 Wachstumsverhalten von <i>phr2Δ</i> -Revertanten	23
3.1.2 Filamentierungsverhalten der <i>phr2Δ</i> -Revertanten	25
3.1.3 Das Expressionmuster von <i>PHR1</i> in <i>phr2Δ</i> -Revertanten	27
3.2 Molekulargenetische Charakterisierung der <i>phr2Δ</i> -Revertanten	28
3.2.1 Isolierung und Sequenzierung der <i>PHR1</i> -Promotorallele einer <i>phr2Δ</i> -Revertante und einer <i>phr2Δ</i> -Mutante	28
3.2.2 Untersuchungen zum Einfluss der <i>PHR1</i> -Expression auf das Filamentierungsverhalten der <i>phr2Δ</i> -Revertanten	29
3.2.3 Der <i>RIM101</i> -Lokus von <i>phr2Δ</i> -Revertanten ist heterozygot	30
3.2.4 Isolierung und Sequenzierung der <i>RIM101</i> -Allele von <i>phr2Δ</i> -Revertanten	33
3.2.5 Auswirkung der Expression mutierter <i>RIM101</i> -Allele auf den Phänotyp von <i>C. albicans</i>	37
3.2.6 Einfluss von <i>RIM101-1426</i> auf die Expression von <i>RIM101</i>	40
3.2.7 Einfluss multipler <i>RIM101</i> -Kopien auf den Phänotyp von <i>C. albicans</i>	40

3.3 Wechselwirkung von <i>RIM101</i> mit Signaltransduktionskaskaden der Morphogenese	45
3.3.1 Wechselwirkung der <i>RIM101</i> -kontrollierten Filamentierung mit den zentralen Regulatoren des Dimorphismus <i>EFG1</i> und <i>CPH1</i>	45
3.3.2 <i>RIM101</i> -kontrollierte Genexpression ist unabhängig von <i>EFG1</i>	49
3.4 <i>lacZ</i> als Reporter für die Genexpression in <i>Candida glabrata</i>	50
3.4.1 Konstruktion von <i>C. glabrata</i> Shuttle-Vektoren	51
3.4.2 Konstruktion translationeller Fusionen zum <i>lacZ</i> -Reporter gen und Expression von β -Galaktosidase in <i>C. glabrata</i>	54
4 Diskussion	58
4.1 Charakterisierung von <i>Candida albicans phr2</i> Δ -Revertanten	58
4.1.1 Heterozygote dominant-aktive Mutation im <i>RIM101</i> -Lokus	58
4.2 <i>RIM101</i> ist vermutlich autoreguliert	59
4.3 Rim101p wird vermutlich durch Prozessierung aktiviert	60
4.4 Suppression des Temperatursignals durch Überexpression von <i>RIM101</i>	62
4.5 Wechselwirkung von <i>RIM101</i> mit <i>EFG1</i>	63
4.6 Das <i>lacZ</i> -Gen als Reportersystem für <i>Candida glabrata</i>	66
4.7 Ausblick	67
5 Material und Methoden	69
5.1 Geräte	69
5.2 Verbrauchsmaterial	70
5.3 Chemikalien, Reaktionskits und Enzyme	70
5.4 Lösungen und Puffer	71
5.5 Bakterienkulturen	74
5.5.1 <i>E. coli</i> -Stämme	74
5.5.2 Nährmedien	75
5.5.3 Kulturbedingungen	75
5.6 <i>Candida</i> -Stämme	76
5.6.1 <i>Candida albicans</i> -Stämme	76
5.6.2 <i>Candida glabrata</i> -Stämme	77
5.6.3 Nährmedien	77

5.6.4 Kulturbedingungen	79
5.7 Plasmide	79
5.7.1 Vektoren	79
5.7.2 Rekombinante Plasmide	80
5.8 Oligonukleotide	81
5.9 DNA-Präparation	83
5.9.1 Schnellmethode zur Plasmid-DNA-Isolierung	83
5.9.2 Mini-Präparation von Plasmid-DNA	84
5.9.3 Midi-Präparation von Plasmid-DNA	85
5.9.4 Präparation genomischer DNA aus <i>Candida</i>	85
5.9.5 Phenolextraktion und Ethanolfällung von DNA	87
5.9.6 Isolierung von DNA aus Agarosegelen	87
5.10 RNA-Präparation aus <i>C. albicans</i>	87
5.11 Gelelektrophorese	89
5.11.1 Agarose-Gelelektrophorese	89
5.11.2 Gelelektrophorese mit Formaldehydgelen	90
5.12 Klonierungsmethoden	90
5.12.1 Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen	90
5.12.2 Dephosphorylierung linearisierter Plasmidvektoren	90
5.12.3 Phosphorylierung von 5'-Hydroxylgruppen	91
5.12.4 Auffüllen überhängender 5'-DNA-Enden und Abbauen überhängender 3'-DNA-Enden	91
5.12.5 DNA-Ligation	92
5.13 Transformation von Bakterien	92
5.13.1 Chemische Transformation von <i>E. coli</i>	93
5.13.1.1 Herstellung kalziumchlorid-kompetenter Bakterien	93
5.13.1.2 Durchführung der Transformation	93
5.13.2 Elektroporation von Bakterien	94
5.13.2.1 Herstellung elektrokompeter Bakterien	94
5.13.2.2 Durchführung der Elektroporation	94
5.13.3 Ligation und Transformation mittels <i>TOPO TA Cloning® Kit</i>	95
5.14 Transformation von <i>Candida</i> spp.	96
5.14.1 Transformation anhand der Lithiumacetatmethode	96
5.14.2 Disruption von Genen in <i>C. albicans</i>	97

5.14.3 Selektion von <i>C. albicans</i> <i>ura3Δ</i> -Stämmen	98
5.15 automatisierte DNA-Sequenzierung	99
5.16 Sequenzanalysen	100
5.17 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	100
5.17.1 PCR mit der <i>AmpliTaq</i> [®] DNA-Polymerase	100
5.17.2 PCR mit der <i>PowerScript</i> DNA-Polymerase	102
5.18 DNA-und RNA-Hybridisierungen	104
5.18.1 Radioaktive Markierung spezifischer DNA-Sonden	104
5.18.2 Southern Blot	105
5.18.3 Northern Blot	106
5.18.4 DNA-DNA-Hybridisierung	106
5.18.5 RNA-DNA-Hybridisierung	106
5.19 Induktion der Keimschlauchbildung von <i>C. albicans</i>	106
5.19.1 Induktion der Keimschlauchbildung durch den pH-Wert	107
5.19.2 Induktion der Keimschlauchbildung durch die Temperatur	107
5.20 Isolierung von <i>phr2Δ</i> -Revertanten	108
5.21 Wachstumskurven	108
5.22 Detektion von β -Galaktosidase-Aktivität in <i>C. glabrata</i>	109
5.22.1 Qualitativer β -Galaktosidasetest in <i>C. glabrata</i>	109
5.22.2 Quantitativer β -Galaktosidasetest in <i>C. glabrata</i>	110
6 Literaturverzeichnis	111
7 Abstract	122
8 Anhang	124
Abkürzungen	
Lebenslauf	
Publikationen	

1 Zusammenfassung

Candida albicans ist in der Lage seine Zellmorphologie in Abhängigkeit von Umweltfaktoren zu verändern (Odds, 1988). Dieser morphologische Formenwechsel ist ein wesentlicher Pathogenitätsfaktor von *C. albicans*. Der pH-Wert gehört zu den wichtigen Umweltfaktoren, welche die Zellmorphologie von *C. albicans* beeinflussen. Bei sauren pH-Werten wächst *C. albicans* als unizellulärer Sprosspilz, während bei neutralen pH-Werten und einer Umgebungstemperatur von 37°C die filamentöse Form dominiert (Buffo *et al.*, 1984).

C. albicans reagiert auf unterschiedliche pH-Werte mit der differentiellen Expression bestimmter Gene. Zu diesen gehören die funktional homologen Gene *PHR1* und *PHR2*, deren Genprodukte an der Synthese der Pilzzellwand beteiligt sind. *PHR1* wird im neutralen Milieu induziert, während *PHR2* im sauren Milieu exprimiert wird. Die Deletion von *PHR1* oder *PHR2* führt zu pH-abhängigen Defekten des Wachstums, der Zellmorphologie und der Virulenz (Saporito-Irwin *et al.*, 1995; Mühlischlegel und Fonzi, 1997; De Bernardis *et al.*, 1998).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde anhand der Isolierung von *phr2Δ*-Revertanten der Zusammenhang der molekularen Regulation des morphologischen Formenwechsels und der pH-regulierten Expression von Genen, die eine wichtige Funktion bei der Zellwandsynthese besitzen, untersucht.

Die *phr2Δ*-Revertanten waren in der Lage bei einem pH-Wert von 4 zu wachsen und zu filamentieren. Das irreguläre Wachstum der Revertanten war auf eine konstitutive Expression des *PHR1*-Gens zurückzuführen. Dagegen spielte das bei sauren pH-Werten exprimierte *PHR1* keine Rolle für das atypische Filamentierungsverhalten der Revertanten.

Die molekulargenetische Untersuchung unabhängiger *phr2Δ*-Revertanten zeigte, dass eine heterozygote dominant-aktive Mutation im *RIM101*-Lokus für den Phänotyp der Revertanten verantwortlich war. *RIM101* ist demnach das Schlüsselement des pH-regulierten Dimorphismus. Diese Ergebnisse zeigten zudem, dass der in *Aspergillus nidulans* und anderen Pilzen beschriebene molekulare Mechanismus der pH-abhängigen Genexpression auch in *C. albicans* konserviert ist.

Die Expression multipler wildtypischer oder mutierter *RIM101*-Kopien führte zur Suppression des Temperatursignals, welches für das pH-abhängige filamentöse Wachstum notwendig ist. Demnach konvergieren die Umweltsignale pH-Wert und Temperatur auf gemeinsame Zielgene.

RIM101 von *C. albicans* scheint seine eigene Expression zu induzieren. Konstitutiv aktive *RIM101*-Allele verursachen eine starke Expression von *RIM101* bei pH 4. Im Wildtyp dagegen wird *RIM101* bei sauren pH-Werten nur schwach exprimiert.

Die Inaktivierung der MAP Kinase Kaskade und der cAMP-abhängigen Kaskade durch Deletion der beiden Gene *CPH1* und *EFG1* führt zur Blockade der morphologischen Flexibilität von *C. albicans* (Lo *et al.*, 1997). Mit Hilfe eines dominant-aktiven *RIM101*-Allels wurde eine mögliche Wechselwirkung von *RIM101* mit diesen Filamentierungskaskaden untersucht. Diese Untersuchungen ergaben, dass der pH-regulierte Dimorphismus von *EFG1* abhängig war. Dagegen war die pH-regulierte Genexpression unabhängig von *EFG1*.

C. albicans und *Candida glabrata* sind als opportunistische Krankheitserreger in der Lage diverse Gewebe und Organe zu besiedeln und zu infizieren. Das Überleben in den unterschiedlichen Wirtsnischen erfordert daher eine hohe Anpassungsfähigkeit. Auf unterschiedliche Umweltbedingungen reagiert *C. albicans*, wie oben beschrieben, mit der Expression bestimmter Gene, wie z. B. *PHR1*, *PHR2* und *RIM101*. Während die Genregulation in *C. albicans* in den letzten Jahren intensiv erforscht wurde, ist über die differentielle Genexpression in der klinisch zunehmend wichtigen Spezies *C. glabrata* kaum etwas bekannt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Etablierung eines geeigneten Reportersystems für *C. glabrata* angestrebt, welches zur Untersuchung der Genregulation und der Identifizierung differentiell exprimierter Gene eingesetzt werden kann. Das *lacZ*-Gen wurde als Reporter für die Genexpression in *C. glabrata* getestet. Die Resultate zeigten die Funktionalität des bakteriellen *lacZ*-Gens als Reporter für die Genexpression in *C. glabrata*. Zu dem wurden *C. glabrata* / *E. coli* Shuttle-Vektoren entwickelt, die für translationelle Genfusionen zum *lacZ* verwendet werden können.

2 Einleitung

2.1 *Candida* und Candidose

Von den weltweit bisher beschriebenen 300 000 Pilzarten gelten 200 als Krankheitserreger des Menschen (Kerridge, 1993). Während der letzten 20 Jahre war ein signifikanter Anstieg der Pilzinfektionen zu vermerken. Für diesen Anstieg sind vor allem opportunistische Krankheitserreger verantwortlich. Diese sind in der Lage bei immunsupprimierten Individuen schwerwiegende Krankheiten zu verursachen (Odds, 1988). Die bedeutendsten solcher Krankheitserreger sind *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*, und *Pneumocystis carinii*. Vor allem auf diese drei Pilzarten ist der merkliche Anstieg der Mykosen zurückzuführen (Kerridge, 1993).

C. albicans ist unter den Pilzen bei weitem der wichtigste opportunistische Krankheitserreger. *C. albicans* wird zu den Hefen (Sprosspilzen) gezählt. Die Sprosspilze gehören zur Klasse der Endomyceten, welche in die Abteilung Ascomycota eingeordnet wird (Hoog und Guarro, 1995). Zur Gattung *Candida* werden über 150 Spezies gerechnet, von denen ca. 20 Arten Infektionen verursachen können (Odds, 1988; Kwon-Chung and Bennett; 1992). Für ca. 50 % der *Candida*infektionen ist *C. albicans* verantwortlich (Viscoli *et al.*, 1999; Rennert *et al.*, 2000). Diese pathogene Hefe kommt als Kommensal im menschlichen Verdauungstrakt und auf Schleimhäuten vor. Eine Candidose kann sich bei immunsupprimierten Individuen, wie AIDS-, Krebs- oder transplantierte Patienten manifestieren. Zuckerkrankheit (Diabetes mellitus), längere Einnahme von Breitspektrum-Antibiotika oder lokale Milieuveränderungen im Gastrointestinaltrakt können ebenfalls eine *Candida*infektion begünstigen. Candidosen reichen von Infektionen der Schleimhäute (Soor, Vaginitis) bis hin zu lebensgefährlichen systemischen Infektionen. Letztere treten vor allem bei hospitalisierten und immunsupprimierten Patienten auf. Hierbei werden besonders die Niere und die Leber befallen (Odds, 1994; Walsh *et al.*, 1995;). Die Mortalitätsrate systemischer *Candida*infektion beträgt über 35 % (Viscoli *et al.*, 1999; Rennert *et al.*, 2000). Nach jüngeren Untersuchungen in Nordamerika ist *Candida* der vierthäufigste Keim, der aus Blutkulturen isoliert wird (Edmond *et al.*, 1999).

Parallel zur wachsenden Inzidenz an *Candida*-Infektionen ist seit einiger Zeit eine Änderung des Erregerspektrums festzustellen. Eine relative Zunahme, der durch non-*albicans* Spezies hervorgerufenen Infektionen, war in den letzten Jahren festzustellen. Vor allem *C. glabrata* ist hier zu nennen. 10-20 % aller durch *Candida*-Spezies verursachten Infektionen sind mittlerweile auf *C. glabrata* zurückzuführen. Damit ist *C. glabrata* nach *C. albicans* die zweithäufigste Ursache für Candidosen (Pfaller *et al.*, 1999). *C. glabrata* verursacht Infektionen der Schleimhäute, wie Vaginitis, und lebensgefährliche Systemmykosen bei immungeschwächten Patienten. Die Mortalitätsrate von *C. glabrata*-Infektionen ist höher als die von *C. albicans* (Viscoli *et al.*, 1999; Rennert *et al.*, 2000). Als nosokomialer Keim hat *C. glabrata* ebenfalls eine grosse klinische Bedeutung erlangt (Vazquez *et al.*, 1998). Zu dem entwickelt diese pathogene Hefe vermehrt Antimykotikaresistenzen, besonders gegenüber Fluconazol (Fidel *et al.*, 1999).

2.1.1 Pathogenitätsfaktoren

Die Pathogenese von *Candida* lässt sich in mehrere Infektionsstadien unterteilen. *Candida* kolonisiert bzw. adhärirt an mukosale Oberflächen und penetriert das Epithelium (Abb. 1). Nach der Invasion und Zerstörung des Epitheliums gelangt der Keim in die Blutbahn und wird disseminiert. Anschliessend erfolgt über Adhäsion und Penetration von Endothelzellen die Invasion in das Organewebe (Odds, 1994).

Zahlreiche an der Infektion beteiligte Pathogenitätsfaktoren von *C. albicans* sind bisher beschrieben worden. Hierzu zählt u. a. die Fähigkeit zum reversiblen Wechsel der Zellmorphologie (Dimorphismus). In Abhängigkeit von Umweltfaktoren der Wirtsnische kann *C. albicans* als Sprosspilz (Hefeform) oder als fadenartig wachsender Mikroorganismus (Hyphenpilz) vorkommen. *C. albicans*-Mutanten, die zur Hyphenbildung unfähig sind, weisen im Mausmodell eine stark eingeschränkte Virulenz auf (Lo *et al.*, 1997). Das Hyphenwachstum erhöht die Adhärenz von *C. albicans* an das Epithelium (Staab *et al.*, 1999). Ausserdem wird diese Erscheinungsform für die Penetration des Epitheliums und für die anschliessende Invasion verantwortlich gemacht (Brown und Gow, 1999).

- I) Kolonisierung des Epitheliums
- II) Penetration und Invasion von Epithelzellen
- III) Eindringen ins Blutkreislaufsystem und Dissemination
- IV) Adhäsion an Endothelzellen und Eindringen in das Organewebe

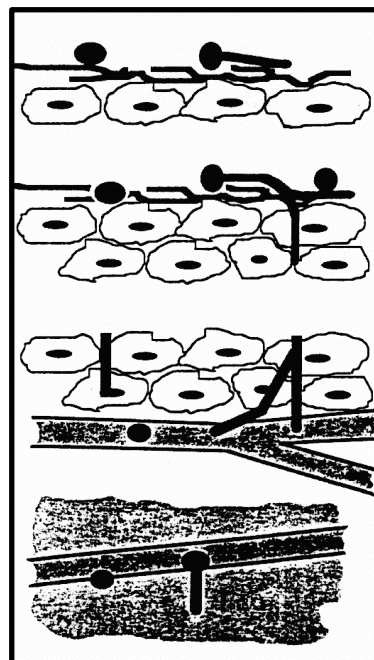


Abb. 1. Stadien der Infektion durch *Candida albicans* (nach Odds, 1994).

Ein weiteres Charakteristikum der morphologischen Gestaltsänderung von *C. albicans* ist das "phänotypische Switching" (Pérez-Martin *et al.*, 1999). Hierunter ist der Wechsel zwischen verschiedenen Kolonievarianten zu verstehen. Dies ist vermutlich auf DNA-Rekombinationsereignisse zurückzuführen, wodurch die Genexpression nachhaltig beeinflusst werden kann. Dieses Phänomen erfolgt mit erhöhter Frequenz unter Nährstoffmangelbedingungen und an Stellen der Infektion (Odds, 1997). Das "phänotypische Switching" dient zur Anpassung an verschiedene Wirtsnischen und vermutlich zum Schutz gegenüber dem menschlichen Abwehrmechanismus (Soll *et al.*, 1993).

Bisher sind in *C. albicans* mehrere hydrolytische Enzyme, wie Proteinasen und Lipasen identifiziert worden. Bei den zehn bisher klonierten Proteinasen handelt es sich um sezernierte Aspartyl-Proteinase (Saps), die *in vitro* differentiell exprimiert werden (Hube *et al.*, 1994, White und Agabian, 1995, Monod *et al.*, 1998). Die Proteinase sind in der Lage das menschliche Gewebe zu schädigen, und zerstören somit Wirtszellbarrieren während der Invasion (Colina *et al.*, 1996). Vermutlich spielen sie auch eine Rolle bei der Degradation von Wirtsproteinen für die Nährstoffbereitstellung (McDonald, 1984) und der Eliminierung von Immunglobulinen und Komplement-Molekülen des menschlichen Abwehrmechanismus (Kaminishi *et*

al., 1995). Die *in vivo* Expression mehrerer *SAP*-Gene weist daraufhin, dass manche während der initialen Phase der Infektion, wohingegen andere erst nach Dissemination von *C. albicans* in tiefere Organe, induziert werden (Schaller *et al.*, 1998; Staib *et al.*, 1999; Staib *et al.*, 2000,).

Weitere virulenzassoziierte Faktoren von *C. albicans* sind Adhäsine, bestimmte Oberflächenrezeptoren und Immunmodulatoren (Odds, 1994). Int1p, Hwp1p und die Proteine der Als-Familie wurden als wichtige Adhäsine beschrieben, die zur Pathogenität von *C. albicans* beitragen (Gale *et al.*, 1998, Staab *et al.*, 1999, Tsuchimori *et al.*, 2000 und Hoyer *et al.*, 1998).

Im Gegensatz zu *C. albicans*, sind bisher kaum Virulenzfaktoren von *C. glabrata* beschrieben worden. Die klinische Bedeutung von *C. glabrata* führte in den letzten Jahren zu einer intensiveren Erforschung dieser pathogenen Hefe. Erste Erfolge in der Virulenzforschung konnten daher verzeichnet werden. Die Fähigkeit zum filamentösem Wachstum und zum "phänotypischen Switching" von *C. glabrata* wurden kürzlich zum erstenmal beschrieben (Csank und Haynes, 2000; Lachke *et al.*, 2000). Mit dem "phänotypischen Switching" einher konnte eine verstärkte Expression eines hämolysin-ähnlichen Gens festgestellt werden. Hämolysin-ähnliche Gene wurden bisher in keine der weiteren *Candida*-Spezies identifiziert (Lachke *et al.*, 2000). Ein Lektin wurde neulich ebenfalls isoliert, welches für die Adhäsion von *C. glabrata* an Epithelzellen eine bedeutende Rolle spielt. Die Inaktivierung dieses Adhäsins durch Deletion des korrespondierenden Gens *EPA1*, vermindert die Anheftung an humanen Epithelzellen um 95 % (Cormack *et al.*, 1999). Zu dem konnten molekulare Mechanismen der Resistenzentwicklung von *C. glabrata* näher charakterisiert werden (Miyazaki *et al.*, 1998).

2.1.2 Diagnostik und Therapie

Die mikrobiologische Diagnostik von Candidosen beruht im wesentlichen auf der Blutkultur, Kultur und Mikroskopie weiterer Patientenproben und der Serologie. Die direkte Mikroskopie von primär sterilen Materialien, wie Liquor, Gewebeproben und Abstrichen ist eine einfache und sehr schnelle Diagnosemöglichkeit. Wird der Erreger im Blut nachgewiesen, so deutet dies auf eine systemische Infektion hin.

Indirekte Keimnachweismethoden, wie Antigennachweis und PCR werden als Alternative zur Identifizierung von *C. albicans* herangezogen.

Die Differenzierung von *C. albicans* von non-*albicans* Spezies und anderen Hefen geschieht durch Anzüchten auf Rice-Tween-Agar. Auf diesem Medium bildet *C. albicans* Chlamydosporen. Chlamydosporen sind dickwandige abgerundete, leblose Zellen, die bevorzugt an den Enden der Filamente gebildet werden (Odds, 1988). Es ist jedoch seit neuerem bekannt, dass die kürzlich beschriebene und mit *C. albicans* nahverwandte Spezies *Candida dubliniensis*, ebenfalls auf diesem Agar Chlamydosporen produziert und deshalb als *C. albicans* fehlklassifiziert worden ist (Sullivan und Coleman, 1998). Diese beiden Spezies können nach neuen Erkenntnissen auf Staib-Agar (*Guizotia abyssinica*-Kreatinin Agar), einem in der mikrobiologischen Diagnostik von *Cryptococcus neoformans* verwendeten Medium, differenziert werden. Auf Staib-Agar bildet *C. dubliniensis* aufgrund myzelialen Wachstums rauhe Kolonien bei reichlicher Chlamydosporenbildung, während *C. albicans* in Form glatter Kolonien und ohne Chlamydosporenbildung auf diesem Medium wächst (Staib *et al.*, 1987, Staib und Morschhäuser, 1999, Kurzai *et al.*, 2000).

In der Therapie von Candidosen werden verschiedene Antimykotika eingesetzt. Das Polyen Amphotericin B ist das potenteste Antimykotikum. Es bindet an die wichtige Plasmamembran-Komponente Ergosterol. Der Einsatz dieses Antimykotikums ist aufgrund zahlreicher Nebenwirkungen, wie z. B. Nierenversagen und akute allergische Reaktionen, deutlich eingeschränkt. Ein weiteres Antimykotikum, welches sich durch einen hohen Wirkungsgrad auszeichnet, ist das Flucytosin. Als synthetisch fluoriniertes Pyrimidinanalogon hemmt dieser Metabolit die RNA-Synthese. Nebenwirkungen treten bei dieser Therapie selten auf, jedoch entwickeln sich schnell Resistenzen gegenüber diesem Antimykotikum (Vanden Bossche *et al.*, 1998). Die am häufigsten bei Candidosen eingesetzten Antiinfektiva sind die Azole. Diese wirken fungistatisch und zeichnen sich durch eine relativ gute Verträglichkeit aus. Die Zielstruktur der Azole ist das Enzym Sterol-14 α -Demethylase, welches an der Ergosterol-Synthese beteiligt ist. Eine verstärkte Resistenzentwicklung ist in den letzten Jahren ebenfalls gegenüber dieser Antimykotikagruppe zu vermerken.

Verschiedene Mechanismen sind für die Resistenzentwicklung von *C. albicans* verantwortlich. Die vermehrte Expression von ABC- (*CDR1* und *CDR2*) und anderen Membran-Transporter Genen (*MDR1*) führen zu verstärktem Fluconazol-Efflux aus der Zelle. Dies verhindert eine Akkumulation des Antimykotikums in der Hefezelle (Vanden Bossche *et al.*, 1998). Zur Resistenzentwicklung vieler *Candida*-Stämme kommt es ebenfalls durch Mutationen in der Sterol-14 α -Demethylase, wodurch die Affinität des Enzyms zum Antimykotikum herabgesetzt wird. Ferner kann eine Überexpression des Gens *ERG11*, welches für die Sterol-14 α -Demethylase kodiert, zur Resistenz des Keimes führen (Sanglard *et al.*, 1998). Resistenzentwicklungen wurden ausser in *C. albicans* auch in einigen anderen *Candida*-Spezies, wie z. B. *C. glabrata*, *C. dubliniensis* und *Candida krusei* beobachtet.

Aufgrund dieser Resistenzproblematik sind eine Reihe von Medikamenten in der Entwicklung bzw. klinischen Erprobung. Zu den erfolgsversprechenden neuen Antimykotika gehören die Echinocandine und die Pneumocandine, welche das Enzym β -1,3-Glucan-Synthase hemmen. Dieses Enzym synthetisiert Glukan, welches ein wesentlicher Bestandteil der Zellwand des Pilzes ist. Das Antimykotikum Nikkomycine stört die Synthese von Chitin, welches ebenfalls ein wichtiger Baustein der Zellwand darstellt (Maertens und Boogaerts, 2000). Da die Zellwand essentiell für das Überleben der Hefen ist und eine pilzspezifische Struktur darstellt, sind diese Ansätze besonders attraktiv. Weitere Substanzen, die auf die Proteinbiosynthese inhibitorisch wirken sollen, sind ebenfalls in der Entwicklung. Hierzu zählt das Sordarin, welches durch Bindung an den Elongationsfaktor EF2 die Translation verhindert.

2.2 Molekulargenetische Methoden

Die molekulargenetische Untersuchung von *C. albicans* war aufgrund der diploiden und asexuellen Natur dieser pathogenen Hefe lange Zeit sehr eingeschränkt. Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass sexuelle Fortpflanzung von *C. albicans* induziert werden kann. Dies wurde durch Veränderung des *mating-type-like* (*MTL*) Locus, einem Gen-Cluster, welches dem *MAT*-Locus anderer Pilze homolog ist, erzielt (Hull *et al.*, 2000; Magee und Magee 2000).

Da eine heterozygote Mutation in der Regel rezessiv ist, müssen beide Allele des Gens deletiert werden, um den Phänotyp der Mutation zu exprimieren. Vor zwei Jahrzehnten wurden *C. albicans*-Mutanten durch Anwendung klassischer Methoden, wie UV-Bestrahlung oder der Behandlung mit mutagenen Chemikalien isoliert. Diese Methoden führten zur Isolierung zahlreicher Mutanten. Zu diesen zählen Mutanten mit Defekten in der Zellwand, der Zellmembran, den Mitochondrien oder der Zellmorphologie. Zahlreiche Nährstoffmangelmутanten und Klone mit Antimykotika-Resistenzen konnten ebenfalls isoliert werden (Pla *et al.*, 1996).

Die intensive Erforschung von *C. albicans* führte in den letzten Jahren zur Etablierung wichtiger molekulargenetischer Methoden, welche für die molekulare Charakterisierung dieses Krankheitserregers eingesetzt werden. In karyotypischen Untersuchungen konnten mittels Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE) acht Paar homologe Chromosomen und ca. 33 Mbp genomischer DNA in *C. albicans* identifiziert werden (Doi *et al.*, 1992). Anhand der PFGE und des Southern Blots wurden physikalische Genkartierungen erstellt (Magee *et al.*, 1988). Ferner wird die PFGE für die Differenzierung von *C. albicans* von anderen *Candida*-Spezies eingesetzt.

Die Etablierung von Transformationsprotokollen war für die genetische Manipulation von *C. albicans* von grosser Bedeutung (Gietz *et al.*, 1992). Mehrere *C. albicans*-Mangelmутanten wurden in den letzten Jahren konstruiert und werden nun als Wirtsstämme für autonom replizierende und integrative Plasmide eingesetzt (Fonzi und Irwin, 1993; Kelly *et al.*, 1987). Bei der integrativen Transformation wird über homologe Rekombination das Plasmid am gewünschten genomischen Lokus integriert. Diese Methode wird bevorzugt, wenn stabile Transformanten generiert oder bestimmte Gene disruptiert werden sollen. Die Transformation autonom replizierender Plasmide eignet sich dagegen für die Herstellung von Genbanken und deren *Screening*. Diese episomalen Plasmide basieren auf autonom replizierende Sequenzen (ARS). Drei solcher Sequenzen wurden bisher im Genom von *C. albicans* identifiziert. Die autoreplikative Transformation hat den Vorteil der hohen Transformationseffizienz (10^3 Transformanten/ μg DNA), jedoch sind Multimerisierungen und Rekombinationen solcher ARS-enthaltenden Vektoren mit dem Genom zu beobachten und erschweren dadurch molekulargenetische Analysen

(Pla *et al.*, 1996). Die Isolierung genetischer Elemente, wie Centromere, könnte zur Konstruktion stabilerer Plasmidvektoren für *C. albicans* führen.

Aufgrund der stets diploiden Natur von *C. albicans* und durch das Fehlen von geeigneten Selektionsmarkern war lange Zeit die Deletion klonierter *C. albicans* Gene nicht möglich. Funktionelle Studien wurden deshalb meist in *S. cerevisiae* durchgeführt. Fonzi und Irwin beschrieben 1993 die erste erfolgsversprechende Technik für die Konstruktion gezielter Gendeletionen in *C. albicans*. Diese heute sehr häufig angewandte Methode erfolgt mit Hilfe des "URA-blaster" (Fonzi und Irwin, 1993). Eine Kasette, die aus dem *URA3* und flankierenden Sequenzen des *hisG* von *Salmonella thyphimurium* besteht, welche ein Teil der Sequenzen des Zielgens ersetzen, und 5'- und 3'-Enden des Zielgens, wird in einem *ura3Δ*-Stamm transformiert. Die homologe Rekombination der 5'- und 3'-Enden des Zielgens in der Kasette mit Sequenzen des sich am nativen genomischen Locus befindenden Gens führt zu seiner Disruption. Durch spontane intrachromosomale Rekombination der homologen *hisG*-Sequenzen wird der *URA3*-Marker entfernt und der *ura3Δ*-Status wiederhergestellt. Eine nochmalige Transformation des gleichen DNA-Fragments bewirkt schliesslich die Inaktivierung des zweiten wildtypischen Allels. Eine weitere Methode der sequentiellen Gendisruption, basierend auf der induzierbaren enzymatischen Aktivität der Rekombinase und dem *URA3* als Selektionsmarker, wurde kürzlich mit Erfolg eingesetzt (Morschhäuser *et al.*, 1999).

Für die Isolierung von *C. albicans* Genen hat sich die Komplementation von *S. cerevisiae*- und *E. coli*-Mutanten bewährt (Liu *et al.*, 1994, Gillum *et al.*, 1984). Zahlreiche *C. albicans* Gene, die bedeutende Funktionen im Metabolismus, in Signaltransduktionswegen, im Zellzyklus, in der Antibiotika-Resistenz und in Sekretionsprozessen ausüben, konnten identifiziert und charakterisiert werden (Pla *et al.*, 1996). Durch Überexpression bestimmter Genprodukte von *C. albicans* in *S. cerevisiae* konnten u. a. Virulenzdeterminanten, die bei Adhäsion und Invasion von *C. albicans* eine Rolle spielen identifiziert werden (Gale *et al.*, 1998, Fu *et al.*, 1998). Trotz der bis dato mit Hilfe des Modellorganismus *S. cerevisiae* erzielten Erfolge in der molekularbiologischen Charakterisierung von *C. albicans* ist zu beachten, dass nicht alle *C. albicans* Eigenschaften in der Bäckerhefe analysiert werden können. Zum Beispiel haben bestimmte Gene von *S. cerevisiae* eine Funktion bei der

sexuellen Fortpflanzung dieser Hefe, wohingegen deren Homologe in *C. albicans* eine bedeutende Aufgabe in Filamentierungsprozessen besitzen.

Die Sequenzhomologie zwischen bestimmten *C. albicans* Genen und deren Gegenstücke von *S. cerevisiae* beträgt in der Regel 30 bis 60 %. In konservierten Bereichen kann die Homologie noch höher sein. Mehr als 90 % von über 200 *C. albicans* Genen, die in einem randomisierten Genomsequenzierprojekt partiell ansequenziert worden sind, zeigen eine signifikante Homologie zu ihrem entsprechenden Gegenstück in *S. cerevisiae*. Aufgrund dieser hohen DNA-Sequenzhomologie der beiden Spezies sind Hybridisierungsexperimente ein häufig benutztes Mittel zur Isolierung von *C. albicans* Genen (Pla *et al.*, 1996).

Weitere Methoden der Genisolierung sind immunologische *Screenings* und die Analyse von cDNA-Banken. Anhand dieser Methoden konnten Zellwandbestandteile, phasenspezifische Antigene, wichtige Faktoren der Hefe-Hyphen-Transition und des "phänotypischen Switchings" identifiziert werden (Pla *et al.*, 1996).

Regulierbare Promotoren sind ein wichtiges Mittel, um die Auswirkung der Expression bzw. Repression bestimmter Gene in einzelnen Zellen zu testen. In *C. albicans* sind bisher einige solcher Promotoren beschrieben worden. Vor allem die Charakterisierung von essentiellen Genen erfordert ihre regulierbare Expression mit Hilfe eines geeigneten Promotors (Leuker *et al.*, 1996 und Care *et al.*, 1999).

Zur Analyse und Charakterisierung differentiell exprimierter Gene ist der Einsatz von Reporter genen ein sehr nützliches Mittel. Reportergene kodieren meist für Enzyme, wie z. B. die β -Galaktosidase oder die Luziferase, deren Aktivität oder Expression leicht messbar ist. Weitere Reporter, wie z. B. das *green fluorescent protein* Gen (GFP), eignen sich u. a. zur Aufklärung der zellulären Lokalisation eines bestimmten Genprodukts. Die Analyse der Genregulation erfolgt mit Hilfe einer Fusion zwischen Promotorsequenzen des zu untersuchenden Gens und dem Reporter. Die Aktivität des Promotors unter verschiedenen Bedingungen kann anhand der Expression des Reportergens gemessen werden. Da *C. albicans* eine Abweichung vom universellen genetischen Code besitzt, ist der Einsatz heterologer Reportergene nur beschränkt möglich. *C. albicans* translatiert das CUG Codon in Serin anstatt in Leucin (Santos *et al.*, 1993). In den letzten Jahren sind viele Anstrengungen unternommen worden, die zur Entwicklung nützlicher Reportersysteme für *C. albicans* führten. Die heute für *C.*

albicans verfügbaren Reportergene sind sowohl modifizierte heterologe Gene (GFP), als auch heterologe, CUG-freie Gene (Luciferase-Gen von *Renilla reniformis*) und homologe Reportergene (*URA3* und *XOG1*) (Koloteva *et al.*, 1998).

Die rasche Entwicklung der *C. albicans*-Forschung in den letzten Jahren wird aufgrund der Etablierung neuer Technologien und des vor kurzem abgeschlossenen *Candida*-Genom-Projektes einen weiteren enormen Auftrieb erfahren.

Die Biologie der zweiten wichtigen *Candida*-Spezies *C. glabrata* zeigt einige interessante Unterschiede zur Biologie von *C. albicans*. *C. glabrata* besitzt im Gegensatz zu *C. albicans* ein haploides Genom. Desweiteren hat *C. glabrata* im Gegensatz zu *C. albicans* keine Abweichung im Gebrauch des universellen genetischen Codes (Fidel *et al.*, 1999). Diese beiden Eigenschaften vereinfachen merklich molekulargenetische Untersuchungen in dieser pathogenen Hefe. In den letzten Jahren sind eine ganze Reihe molekularbiologischer Methoden entwickelt worden, die zur näheren Untersuchung von *C. glabrata* eingesetzt werden können. Es wurden auxotrophe Stämme konstruiert, die für genetische Analysen verwendet werden können. Eine Anzahl wichtiger Plasmidvektoren wurden entwickelt. Diese Vektoren enthalten Centromer- (*CEN*) und autonome Replikationssequenzen (*ARS*) und kommen daher in Transformanten episomal und in gleichbleibender Anzahl vor. Diese Stabilität wird durch die Centromersequenz gewährleistet und ist für Untersuchungen der Genexpression äusserst wichtig (Zhou *et al.*, 1994; Kitada *et al.*, 1995; Kitada *et al.*, 1996). Ferner sind in *C. glabrata* einige regulierbare Promotoren beschrieben worden, mit denen die Auswirkung der Expression bzw. Repression bestimmter Gene in einzelnen Zellen getestet werden kann (Zhou und Thiele 1993; Thorvaldsen *et al.*, 1993). Die *signature-tagged mutagenesis* (STM) wurde kürzlich, um die Wirt-Pilzinteraktion zu untersuchen, erfolgreich in *C. glabrata* eingesetzt (Cormack *et al.*, 1999). Diese randomisierte Mutagenese ist aufgrund des haploiden Genoms und der unerwartet hohen nichthomologen Rekombinationsereignisse in *C. glabrata* ein geeignetes Mittel der Isolierung wichtiger Gene (Cormack *et al.*, 1999a).

2.3 Morphologische Flexibilität von *Candida albicans*

C. albicans kann zwischen verschiedenen Wachstumsformen wechseln (Morphogenese). Hierzu zählen die Hefeformen und die Hyphen. Als Hefeform bezeichnet man die ovale unizelluläre Hefe aus der eine Tochterzelle sprosst und sich dann von der Mutterzelle abschnürt. Eine Hyphe besteht dagegen aus einem langgezogenen Keimschlauch. Die Zellkerne dieses Keimschlauchs werden durch Septen voneinander getrennt, wobei sich keine Konstriktionen an den Septen abzeichnen. Ein Geflecht aus Hyphen wird als Myzel bezeichnet. Der Wechsel zwischen diesen beiden Erscheinungsformen wird als Dimorphismus bezeichnet. *C. albicans* ist aber eher ein polymorpher bzw. pleomorpher Hefepilz, denn es kann auch sogenannte Pseudohyphen ausbilden. Die Pseudohyphen bestehen aus aneinandergereihten elongierten Zellen, die durch Einschnürungen voneinander getrennt sind.

Die Morphogenese von *C. albicans* wird durch eine Fülle verschiedener Umweltfaktoren beeinflusst (Ernst, 2000). Das filamentöse Wachstum wird z. B. durch Komponenten, die in humanen Wirtsnischen vorkommen, wie Serum, neutrale pH-Werte und höhere Temperaturen induziert. Allgemein wird angenommen, dass diese Parameter Stress-Situationen darstellen, auf die *C. albicans* mit filamentösem Wachstum reagiert (Brown und Gow, 1999). Im Gegensatz zur Vielzahl der bisher bekannten externen Signale, die auf den morphologischen Wechsel Einfluss nehmen, sind bisher keine Oberflächenrezeptoren bekannt, die für ihre Detektion in Frage kämen.

C. albicans ist in den verschiedenen Infektionsstadien unterschiedlichen Milieubedingungen ausgesetzt. Die Fähigkeit zur Anpassung an diesen unterschiedlichen Milieubedingungen ist daher für das Wachstum von *C. albicans* von immenser Bedeutung. Über die molekularen Mechanismen, die für die Adaptation verantwortlich sind, ist noch wenig bekannt. Filamentöses Wachstum von *C. albicans* ist während der Kolonisation der Gewebe dominierend, d. h. im Anfangsstadium der Infektion. Dagegen sind im kranken oder nekrotischem Gewebe zumeist Sporezellen vorhanden (Odds, 1988). Die stark hydrophobe Zelloberfläche der Hyphen, welche zu einer effizienteren Anheftung an Epithelzellen führt, und die

Expression hyphenspezifischer Adhäsine und Proteinasen scheint für Kolonisation und Invasion von *C. albicans* von grosser Bedeutung zu sein (Odds, 1994).

Es wurden bisher zwei Signaltransduktionswege beschrieben, welche die morphologische Flexibilität von *C. albicans* kontrollieren. Dies sind einerseits eine cAMP-abhängige Kaskade und andererseits die MAP-Kinase Kaskade (*mitogen-activated protein kinase*) (Abb. 2). Diese beiden Signaltransduktionskaskaden existieren ebenfalls in *S. cerevisiae*. Mehrere Komponenten dieser Signaltransduktionskaskaden von *C. albicans* konnten durch Komplementation in *S. cerevisiae* identifiziert werden. Zu diesen Komponenten gehören *EFG1* und *CPH1*. Diese kodieren für zwei wichtige Transkriptionsfaktoren, Efg1p und Cph1p, die jeweils am Ende einer der Kaskaden agieren. *EFG1* gehört zur cAMP-abhängigen Kaskade und ist ein Homolog des *PHD1* von *S. cerevisiae* (Stoldt *et al.*, 1997), während *CPH1* zur MAPK Kaskade zählt und homolog zu *STE12* von *S. cerevisiae* ist (Liu *et al.*, 1994).

Die cAMP-abhängige Kaskade scheint in *C. albicans* gegenüber dem MAP-Kinase Weg eine besondere Stellung einzunehmen. Inaktiviert man Komponenten des cAMP-abhängigen Weges, so kommt es unter den meisten hypheninduzierenden Bedingungen, inklusive Serum, zu keiner Hyphenbildung. Dagegen führt ein Ausschalten der MAP-Kinase Kaskade nur auf einigen Festmedien zur Blockade der Keimschlauchbildung. Mutanten bei denen die cAMP-abhängige Kaskade inaktiviert ist, sind zu dem stärker virulenzattenuiert als Mutanten mit Defekten in der MAP-Kinase Kaskade (Lo *et al.*, 1997). Eine durch cAMP aktivierte Proteinkinase A (Tpk2p) scheint in der cAMP-abhängigen Filamentierungskaskade oberhalb von Efg1p zu agieren. Efg1p besitzt eine putative Proteinkinase A-Phosphorylierungsstelle und wird vermutlich durch Tpk2p aktiviert. Mutiert man diese Phosphorylierungsstelle, so kommt es zu einer völligen Inaktivierung von Efg1p. Die Überexpression von Efg1p hebt den Filamentierungsdefekt der *tpk2Δ*-Mutanten auf (Sonneborn *et al.*, 2000). Oberhalb von Tpk2p ist die Interaktion des Enzyms Adenylatzyklase (Cdc35p) mit Ras-Proteinen für die Bildung von cAMP verantwortlich. Die Inaktivierung der Adenylatzyklase blockiert das filamentöse Wachstum von *C. albicans*. Wird exogenes cAMP dem Wachstumsmedium zugefügt, so wird dieser Defekt aufgehoben (Rocha *et al.*, 1999).

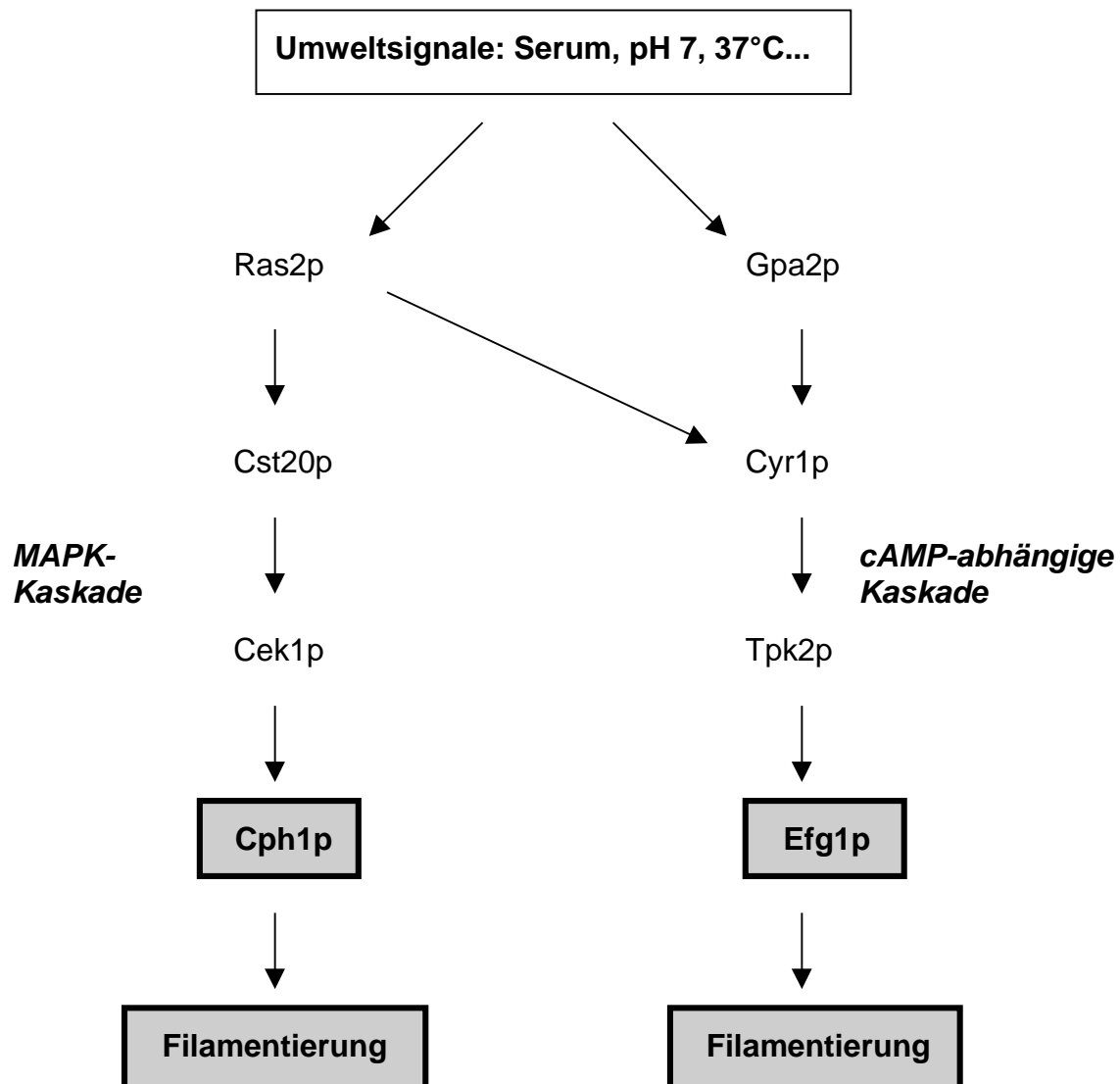


Abb. 2. Signaltransduktionswege, welche die morphologische Flexibilität von *C. albicans* kontrollieren.

Im Gegensatz zu *C. albicans*, nimmt die MAPK-Kaskade in *S. cerevisiae* eine besondere Stellung ein. Sie kontrolliert wichtige Prozesse, wie *Mating*, pseudohyphales Wachstum diploider Zellen und invasives Wachstum haploider Zellen. Ist diese Kaskade inaktiviert, so kommt es in allen dieser Prozesse zu Defekten. Mehrere Gene dieser Kaskade kodieren für Proteinkinasen und wurden in *C. albicans* ebenfalls identifiziert und charakterisiert (Liu *et al.*, 1994, Leberer *et al.*, 1996).

Das Ausschalten beider Signaltransduktionswege in *C. albicans*, durch Deletion von *EFG1* und *CPH1*, führt zu einer Verschärfung des Phänotyps im Vergleich zur

Inaktivierung nur eines dieser Gene. Die Doppelnullmutante zeigt eine komplette Blockade der Filamentausbildung und ist im Mausmodell nicht virulent (Lo *et al.*, 1997). Ob dieser Virulenzdefekt allein auf die Blockade im filamentösem Wachstum zurückzuführen ist, wurde bisher nicht geklärt. *EFG1* und *CPH1* kodieren für Transkriptionsfaktoren, die abgesehen von Filamentierung wahrscheinlich weitere Virulenzattribute regulieren. Diese Faktoren wären in einer *efg1Δ/cph1Δ*-Mutante nicht exprimiert. Das Efg1p übt Einfluss auf weitere morphogenetische Prozesse aus, wie "phänotypisches Switching", einem putativen Pathogenitätsfaktor, und der Chlamydosporenbildung (Sonneborn *et al.*, 1999 und 1999a, Stoldt *et al.*, 1997). Ausserdem wurden bereits mehrere virulenzassoziierte Gene identifiziert, wie z. B. *HWP1* und Gene der *ALS*-Genfamilie, die Efg1p-abhängig exprimiert werden. Diese Gene kodieren für Zelloberflächenproteine, die an der Wirt-Pilz-Interaktion beteiligt sind (Brown und Gow, 1999; Sharkey *et al.*, 1999).

Ein interessanter Aspekt ist die starke Homologie der beiden hier beschriebenen Signaltransduktionkaskaden in der pathogenen Hefe *C. albicans* und der apathogenen Hefe *S. cerevisiae*. Trotz der Konservierung besitzen die Signaltransduktionswege unterschiedliche Funktionen in diesen beiden Spezies. In *S. cerevisiae* regulieren diese Kaskaden die sexuelle Vermehrung und das pseudohyphale und invasive Wachstum. In *C. albicans* dagegen haben sie für die Morphogenese und Virulenz eine signifikante Bedeutung. Die unterschiedliche Funktion dieser Kaskaden in den beiden Spezies ist vermutlich auf die Präsenz unterschiedlicher *Target*moleküle in den beiden Hefearten zurückzuführen, die durch die wichtigen Transkriptionsfaktoren Ste12p und Phd1p in *S. cerevisiae* und deren *C. albicans*-Homologe Cph1p und Efg1p, reguliert werden.

In den letzten Jahren wurden weitere morphogenetisch relevante Gene, wie *INT1*, *ASH1*, *CRK1* und *CLN1*, in *C. albicans* identifiziert. Bisher konnten diese keinem der klassischen Transduktionskaskaden zugeordnet werden (Gale *et al.*, 1997; Brown und Gow, 1999). Diese Tatsache lässt vermuten, dass in *C. albicans* weitere Signaltransduktionswege existent sind, welche den Gestaltwechsel kontrollieren können. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass die *efg1Δ/cph1Δ*-Mutante unter mikroaerophilen Bedingungen filamentiert. Dies würde für das Vorhandensein einer weiteren Filamentierungskaskade sprechen (Sonneborn *et al.*, 1999).

Als Repressoren des filamentösen Wachstums sind bisher zwei Transkriptionsfaktoren, Tup1p und Rbf1p, beschrieben worden. Die Deletion ihrer Gene *TUP1* oder *RBF1* führt zu filamentösem Wachstum in allen hyphenreprimierenden Medien. Ihre Filamente entsprechen jedoch eher den Pseudohyphen als echten Hyphen (Braun und Johnson, 1997; Ishii *et al.*, 1997). Interessanterweise sind *tup1* Δ Mutanten trotz pseudohyphalem Wachstum nicht in der Lage in Endothelzellen einzudringen und sie zu beschädigen. Dies zeigt die Filamentierung für das Auslösen einer Infektion alleine nicht ausreichend ist. Die Ausbildung echter Hyphen ist dafür notwendig. Es ist anzunehmen, dass hyphenspezifische Faktoren benötigt werden, damit *C. albicans* Endothelzellen invadieren und zerstören kann (Phan *et al.*, 2000).

2.4 pH-regulierter Dimorphismus und pH-abhängige Genexpression

C. albicans reagiert auf eine Vielzahl von Umweltsignalen mit Änderungen der Zellmorphologie. Unter diesen Umwelteinflüssen kommt dem pH-Wert eine besondere Bedeutung zu. Die Fähigkeit zum Wachstum und zur Differenzierung unter verschiedenen pH-Bedingungen, erlaubt vermutlich *C. albicans* diverse Gewebe des Menschen zu besiedeln und zu infizieren (Buffo *et al.*, 1984; Evans *et al.*, 1974). Unter *in vitro* Bedingungen wächst *C. albicans* bei neutralen pH-Werten und Temperaturen um 37°C fast ausschliesslich als Hyphenpilz. Dagegen findet man bei sauren pH-Werten, unabhängig von der Temperatur, überwiegend unizelluläre Sprosspilze (Abb. 3). Dieses Charakteristikum wird als pH-regulierter Dimorphismus bezeichnet (Buffo *et al.*, 1984). Die molekularen Mechanismen, die hierfür verantwortlich sind, werden seit einigen Jahren intensiv erforscht.

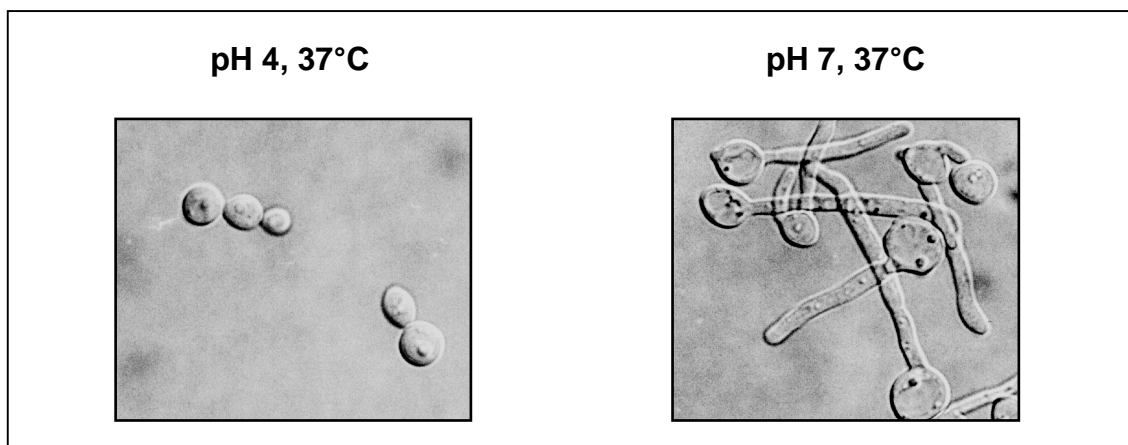


Abb. 3. pH-regulierter Dimorphismus von *C. albicans*.

C. albicans reagiert auf Unterschiede des pH-Wertes mit der differentiellen Expression mehrerer Gene. Unter diesen befinden sich u.a. die zueinander invers pH-regulierten Gene *PHR1* und *PHR2*. *PHR1* wird bei $\text{pH} > 5,5$ exprimiert, während *PHR2* nur bei $\text{pH} < 5,5$ detektiert werden kann. Diese Gene sind funktional homolog und kodieren für Glykoproteine, die über Glykosylphosphatidylinositol (GPI) in der Zelloberfläche verankert sind (Saporito-Irwin *et al.*, 1995; Mühlischlegel und Fonzi, 1997). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass diese Glykoproteine Glukanosyltransferasen darstellen, die an der Zellwandsynthese beteiligt sind. Sie katalysieren die Vernetzung zwischen den Zuckerpolymeren β -1,3-Glukan und β -1,6-Glukan (Fonzi, 1999; Mouyna *et al.*, 2000). Diese Glukane stellen essentielle Zuckerpolymerer der Pilzzellwand dar. Die Inaktivierung von *PHR1* bzw. *PHR2* resultiert in einem pH-abhängigen Wachstums- und Morphologiedefekt. Die Zellen sind bei restriktiven pH-Werten aufgebläht, amorph und haben Fehler in der Zellteilung (Saporito-Irwin *et al.*, 1995; Mühlischlegel und Fonzi, 1997). In diesen Mutanten wird bei restriktiven pH-Werten mehr Chitin in die Zellwand eingelagert, während der Anteil an β -1,6-Glukan abnimmt (Fonzi, 1999).

C. albicans ist während einer systemischen Infektion mit neutralen pH-Werten des Blutes konfrontiert. Bei vaginalen Infektionen dagegen ist diese pathogene Hefe sauren pH-Werten ausgesetzt. *PHR1*-Deletionsmutanten sind in systemischen Mausmodellen avirulent, da sie hier neutralen pH-Werten ausgesetzt sind. Dagegen sind diese Mutanten im vaginalen Infektionsmodell uneingeschränkt pathogen.

PHR2-Deletionmutanten verhalten sich in Tierexperimenten geradezu invers. Dies weist daraufhin, dass die differentielle pH-abhängige Expression von *PHR1* und *PHR2* vermutlich unter *in vitro* Bedingungen und im Wirtsorganismus identisch ist (De Bernardis *et al.*, 1998).

Mehrere *PHR*-Homologe sind bisher auch in anderen Hefen und weiteren *Candida*-Spezies identifiziert worden. Unter ihnen sind *GAS1* von *S. cerevisiae*, *CGG1*, *CGG2* und *CGG3* von *C. glabrata* und *CdPHR1* und *CdPHR2* von *C. dubliniensis* (Vai *et al.*, 1991; Weig *et al.*, 2000; Heinz *et al.*, 2000). Von diesen Genen unterliegen nur die *PHR*-Homologe, der *C. albicans* nah verwandten Spezies *C. dubliniensis*, einer pH-Regulation.

Die molekularen Mechanismen der pH-regulierten Genexpression wurden zuerst in dem apathogenen Ascomyzeten *Aspergillus nidulans* intensiv untersucht. Hier konnte gezeigt werden, dass ein Zinkfinger-Transkriptionsfaktor, welcher durch das Gen *pacC* kodiert wird, eine zentrale Rolle in der pH-regulierten Genexpression von *A. nidulans* einnimmt. Das Genprodukt PacC wird in einer inaktiven Form synthetisiert und bei alkalischen pH-Werten durch proteolytische Entfernung des Carboxy-Terminus aktiviert (Orejas *et al.*, 1995). Die C-Terminale Domäne ist für die pH-abhängige Aktivierung von PacC essentiell. Durch Konformationsänderung des Proteins bei alkalischen pH-Werten wird die proteolytische Schnittstelle zugänglich (Espeso *et al.*, 2000). Diese Proteolyse ist abhängig von sechs Genen, *palA*, *-B*, *-C*, *-F*, *-H* und *-I*. Die aktive Form von PacC induziert *alkalisch-exprimierte* Gene und reprimiert *sauer-exprimierte* Gene. Das PacC ist an einer Reihe wichtiger Prozesse, wie z. B. Konidienbildung, Pigmentierung, Penicillinsynthese und Wachstum bei alkalischen pH-Werten, beteiligt (Espeso *et al.*, 1993; Tilburn *et al.*, 1995).

Dieser regulatorische Mechanismus der pH-abhängigen Genexpression ist in vielen Pilzen konserviert. Es wurden bisher *pacC*- und *pal*-homologe Gene auch in *S. cerevisiae*, *Yarrowia lipolytica* und *C. albicans* gefunden. Die *pacC*-Homologe von *S. cerevisiae* und *Y. lipolytica*, *RIM101* und *YIRIM101*, werden ebenfalls unter alkalischen Bedingungen durch proteolytische Spaltung am C-Terminus aktiviert und kontrollieren die Expression mehrerer Gene. *RIM101* spielt eine wichtige Rolle bei der Sporulation, beim invasiven Wachstum haploider Zellen und dem Wachstum bei alkalischem pH von *S. cerevisiae* (Li und Mitchell, 1997; Su und Mitchell, 1993). *YIRIM101* von *Y. lipolytica* induziert bestimmte Gene bei alkalischem pH, während die Expression von Genen, die spezifisch bei sauren pH-Werten induziert werden,

unabhängig von *YIRIM101* erfolgt. Eine *Yirim101* Δ -Mutante besitzt deutliche Defekte beim *Mating* und bei der Sporulation (Lambert *et al.*, 1997).

Kürzlich konnte auch in *C. albicans* das zu *pacC* homologe Gen, *RIM101*, isoliert und charakterisiert werden (Ramon *et al.*, 1999). Rim101p von *C. albicans* besitzt entsprechend den anderen PacC-homologen Proteinen drei Zinkfingersequenzen der Cys₂-His₂-Klasse. Ausserhalb der Zinkfinger-Domäne nimmt die Sequenzhomologie dieser Transkriptionsfaktoren jedoch beträchtlich ab. Das *RIM101* von *C. albicans* wird bei neutralen bis alkalischen pH-Werten stark exprimiert, während seine Expression bei sauren pH-Werten deutlich schwächer ist. Deletionsmutanten von *C. albicans* *RIM101* zeigen mehrere interessante Phänotypen. In diesen Mutanten wird *PHR1* nicht exprimiert, während *PHR2* unabhängig vom pH-Wert induziert wird. Dies zeigt, dass die Expression von *PHR1* und die Repression von *PHR2* bei neutralem bzw. alkalischem pH-Wert von *RIM101* abhängig ist. Ein zweites Charakteristikum dieser Deletionsmutanten ist das Ausbleiben filamentösen Wachstums auf serumhaltige Festmedien und bei neutralen oder alkalischen pH-Werten. *RIM101* von *C. albicans* scheint daher eine signifikante Bedeutung in der pH-regulierten Genexpression und der Induktion der Filamentierung unter bestimmten Milieubedingungen zu besitzen. (Ramon *et al.*, 1999; Davis *et al.*, 2000). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass *RIM101* auch *in vivo* eine wesentliche Rolle spielt (Davis *et al.*, 2000a). *rim101* Δ -Mutanten zeigten im systemischen Infektionsmodell einen deutlichen Virulenzdefekt. Zu dem wurde festgestellt, dass *rim101* Δ -Mutanten auch *in vivo* einen Filamentierungsdefekt besitzen. (Davis *et al.*, 2000a).

Zwei *pal*-homologe Gene, *RIM8* und *RIM20*, wurden bisher ebenfalls in *C. albicans* identifiziert, welches auf die Existenz einer *pacC*-homologen Regulationskaskade in dieser pathogenen Hefe hindeutet. *RIM8* und *RIM20* von *C. albicans* besitzen starke Sequenzhomologien zu *palF* und *palA* von *A. nidulans*. Die Deletion von *RIM8* bzw. *RIM20* zeigt interessanterweise die gleichen Phänotypen wie die *rim101* Δ -Mutante (Porta *et al.*, 1999; Davis *et al.*, 2000). Dies und die Tatsache, dass *pacC*-, *palA*-, und *palF*-Mutanten identische Phänotypen in *A. nidulans* aufweisen, führt zu der Annahme, dass *RIM101*, *RIM8* und *RIM20* der selben Regulationskaskade angehören, und dass Rim101p einer ähnlichen Aktivierung wie PacC bedarf. Da *pal*-Gene für die proteolytische Aktivierung von PacC erforderlich sind, ist eine

Prozessierung von *C. albicans* Rim101p durch Rim8p, Rim20p und weiteren bisher unbekanntem Pal-homologen Genen sehr wahrscheinlich.

Die Expression von PacC-Derivaten, welche bestimmte C-Terminale Deletionen oder bestimmte Punktmutationen enthalten, supprimieren den Phänotyp von *pal*-Mutanten (Mingot *et al.*, 1999). Ähnliches konnte auch für das Rim101p von *S. cerevisiae* und für das *YIRim101* von *Y. lipolytica* gezeigt werden (Li und Mitchell, 1997; Lambert *et al.*, 1997). Dies deutet daraufhin, dass der Phänotyp von Mutationen, die in dieser Regulationskaskade oberhalb von *pacC*, *S. cerevisiae* *RIM101* oder *YIRIM101* liegen, auf das Fehlen der proteolytischen Spaltung von PacC, *S. cerevisiae* Rim101p oder *YIRim101p* zurückzuführen ist.

2.5 Zielsetzung dieser Arbeit

Eine weitergehende molekulargenetische Analyse von *C. albicans* *RIM101* könnte wichtige Aspekte der Biologie und Pathogenität dieses wichtigen opportunistischen Krankheitserregers darlegen. In der hier vorliegenden Arbeit wurden molekulargenetische Untersuchungen an *RIM101* durchgeführt, die zur Aufklärung der Mechanismen, welche den pH-regulierten Dimorphismus und die pH-abhängige Genexpression von *C. albicans* kontrollieren, führen sollten.

Mehrere Fragenstellungen wurden bearbeitet:

- a) Besteht ein molekularer Zusammenhang zwischen pH-abhängiger Filamentierung und pH-regulierter Genexpression? *RIM101* von *C. albicans* hat eine bedeutende Funktion in der pH-regulierten Genexpression und der Induktion der Filamentierung bei neutralem pH-Wert. *PHR1* und *PHR2* sind pH-regulierte Gene und ihre Expression wird von *RIM101* kontrolliert. Der pH-abhängige Filamentierungsdefekt der jeweiligen Mutante ist jedoch eher auf das Wachstums- und dem Morphologiedefekt zurückzuführen.
- b) Rim101p-homologe Proteine von *A. nidulans*, *S. cerevisiae* bzw. *Y. lipolytica* bedürfen zur Aktivierung einer proteolytischen Spaltung am C-Terminus. Unterliegt Rim101p ebenfalls einer Aktivierung durch Entfernen des C-Terminus?
- c) *RIM101* induziert filamentöses Wachstum bei neutralen pH-Werten. In *C. albicans* wurden bisher zwei Signaltransduktionskaskaden beschrieben, die für

Morphogenese und Pathogenität essentiell sind. Gibt es eine Interaktion von *RIM101* mit diesen Signaltransduktionskaskaden.

C. glabrata ist wie *C. albicans* ein opportunistischer Krankheitserreger, der in der Lage ist diverse Gewebe und Organe zu kolonisieren und zu infizieren (Pfaller *et al.*, 1999). Das Überleben in den unterschiedlichen Wirtsnischen erfordert daher eine hohe Anpassungsfähigkeit. Auf bestimmte Umweltbedingungen, wie pH-Wert oder Serum, reagiert *C. albicans*, wie oben bereits beschrieben, mit der differentiellen Expression bestimmter Gene, welche zum Überleben des Keimes beitragen. Die Genregulation in *C. albicans* wurde in den letzten Jahren intensiv erforscht, was zum näheren Verständnis der Biologie und Pathogenität dieses Keimes führte. Dagegen ist die differentielle Genexpression in der medizinisch zunehmend relevanten Spezies *C. glabrata* kaum etwas bekannt.

Zur Untersuchung der Genregulation bzw. Genexpression ist der Einsatz von Reporter Genen sehr nützlich. Ferner können anhand von Reporter-Genbanken differentiell exprimierte Gene identifiziert werden. Im Gegensatz zu *C. albicans* sind bisher für *C. glabrata* keine geeigneten Reportersysteme beschrieben worden.

Da *C. glabrata* im Gegensatz zu *C. albicans* keine Abweichung im Gebrauch des universellen genetischen Codes besitzt, ist heterologe Genexpression in dieser pathogenen Hefe möglich. Mehrere genetische Elemente von *S. cerevisiae*, wie z. B. Selektionsmarker (*URA3*), werden routinemässig in *C. glabrata* eingesetzt (Kitada *et al.*, 1995). Das *lacZ*-Gen von *E. coli*, welches für das Enzym β -Galaktosidase kodiert, wird ausgiebig als heterologes Reporter Gen sowohl in Prokaryonten, als auch in Eukaryonten eingesetzt. In dieser Arbeit wurde, mit dem Ziel der Etablierung eines geeigneten Reportersystems für *C. glabrata*, die Funktionalität und Induzierbarkeit der β -Galaktosidase in dieser pathogenen Hefe getestet. Zu dem sollten *C. glabrata* / *E. coli*-Shuttle Vektoren entwickelt werden, die für die Konstruktion translationeller Genfusionen zum *lacZ*-Gen verwendet werden können.

3 Ergebnisse

Candida albicans ist in der Lage, sowohl als Sprosspilz, als auch als Hyphenpilz zu wachsen. Diese morphologische Flexibilität wird durch Signale induziert, mit denen *C. albicans* im Wirt konfrontiert ist. Zu diesen Signalen gehören Serumbestandteile, ein pH-Wert von 7,4 und eine Temperatur von 37°C (Gow und Brown, 1999). Die Fähigkeit zum reversiblen Wechsel der Gestalt ist ein wesentlicher Pathogenitätsfaktor von *C. albicans* (Lo *et al.*, 1997).

Unter dem Begriff pH-regulierter Dimorphismus versteht man die Fähigkeit von *C. albicans*, in Abhängigkeit vom pH-Wert der Umgebung, seine Gestalt zu verändern. Bei einem neutralen pH-Wert und einer Temperatur von 37°C wächst *C. albicans* als Hyphenpilz. Im Gegensatz dazu wächst *C. albicans* bei sauren pH-Werten und unabhängig von der Temperatur als Sprosspilz (Buffo *et al.*, 1984). In Abhängigkeit von Veränderungen des pH-Wertes exprimiert *C. albicans* Gene, die an der Zellwandbiosynthese beteiligt sind. Zu diesen gehören das im sauren Milieu exprimierte *PHR2*-Gen und das im alkalischen Milieu induzierte *PHR1*-Gen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde der Zusammenhang der molekularen Regulation des morphologischen Formenwechsels und der pH-regulierten Expression von Genen, die eine wichtige Funktion bei der Zellwandsynthese besitzen, untersucht.

3.1 Phänotypische Charakteristika von *phr2Δ*-Revertanten

3.1.1 Wachstumsverhalten von *phr2Δ*-Revertanten

Das *PHR2*-Gen von *C. albicans* kodiert für ein Glykoprotein, welches durch ein GPI-Anker mit der Zellmembran verbunden ist und eine bedeutende Aufgabe in der Zellwandbiosynthese ausübt. Es handelt sich bei diesem Glykoprotein um eine Glukanosyltransferase, welche die Vernetzung zwischen den Zuckerpolymeren β -1,3-Glukan und β -1,6-Glukan katalysiert. Neben Chitin und Mannan sind die Glukane die wichtigsten Komponenten der Pilzzellwand. Das *PHR2*-Gen wird in Abhängigkeit des

pH-Wertes exprimiert. Es wird bei sauren pH-Werten stark exprimiert, wohingegen bei pH-Werten grösser als 6 im Northern-Blot kein *PHR2*-Transkript detektiert werden kann. Die Deletion dieses Gens führt zu Defekten im Wachstum, in der Zellmorphologie und der Virulenz, wenn diese Mutanten einem sauren pH-Wert ausgesetzt sind. *phr2Δ*-Mutanten sind nicht in der Lage bei pH 4 zu wachsen und bilden ausschliesslich aufgeblähte, amorphe Zellen (Mühlschlegel und Fonzi, 1997; De Bernardis *et al.*, 1998; Fonzi, 1999).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden spontane *C. albicans*-Mutanten isoliert, die den Wachstumsdefekt von *phr2Δ*-Mutanten bei einem pH-Wert von 4 supprimierten. Diese Stämme wurden mit einer Frequenz von $1,5 \times 10^{-7}$ bei Exposition gegenüber dem restriktiven pH-Wert von 4 isoliert (Abb. 4). Die mikroskopische Untersuchung der Revertanten ergab, dass der morphologische Defekt der *phr2Δ*-Zellen bei pH 4 supprimiert wurde. Anhand von Wachstumskurven konnte ferner festgestellt werden, dass das Wachstumsverhalten dieser Revertanten in YNB-Medium mit dem pH-Wert von 4 bei 30°C ebenfalls dem geeigneter Kontrollstämme entsprach (Abb. 5). Zwei solcher unabhängiger *phr2Δ*-Revertanten, CEM-1 und CEM-2, wurden daraufhin molekulargenetisch näher charakterisiert. Die *phr2Δ*-Revertanten CEM-1 und CEM-2 waren spontan aus den Stämmen CFM-4 (*phr2Δ ura3Δ*) beziehungsweise CFM-2 (*phr2Δ*) hervorgegangen.

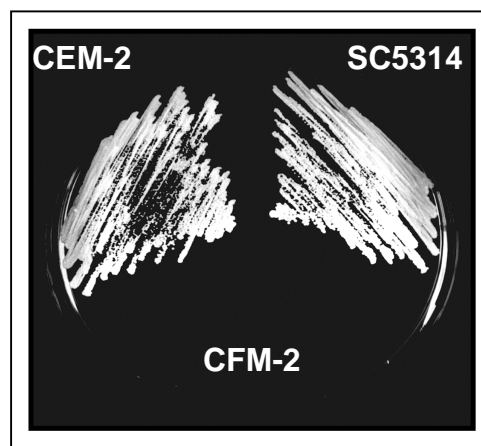


Abb. 4. Wachstum des Wildtyp-Stammes SC5314, der *phr2Δ*-Mutante CFM-2 und der *phr2Δ*-Revertante CEM-2 nach 48 h Inkubation auf YNB-Festmedium bei pH 4.

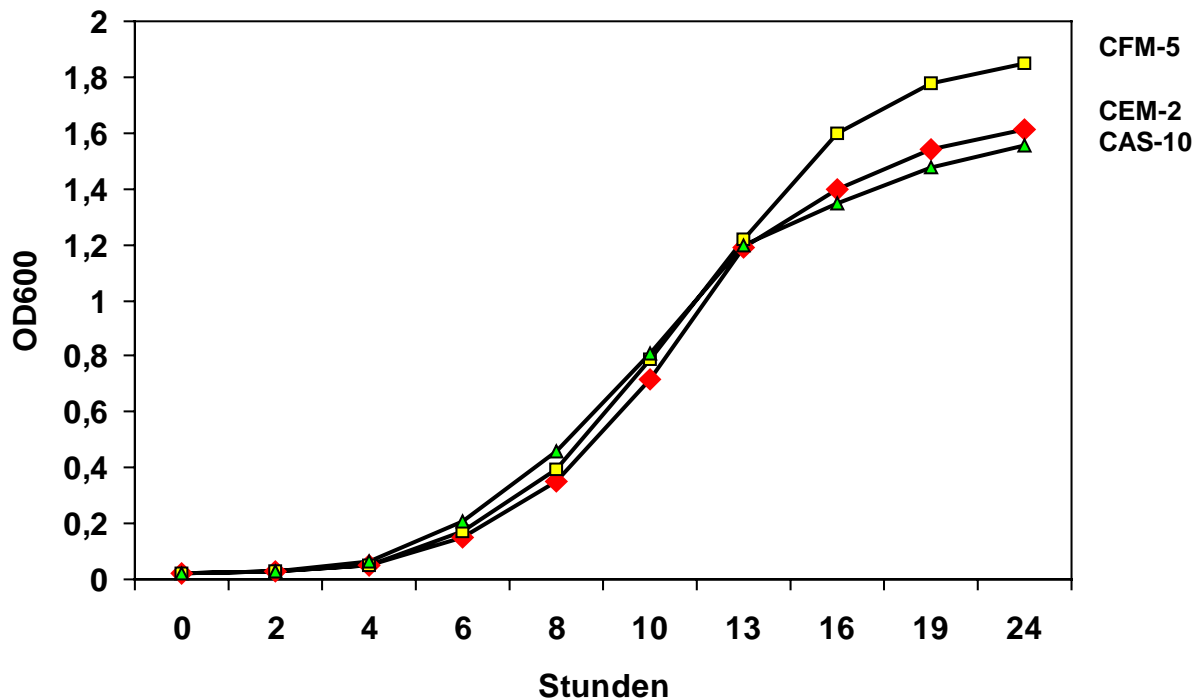


Abb. 5. Wachstumsverhalten von CEM-2. Diagramm zeigt das Wachstumsverhalten der Revertante CEM-2 (*phr2* Δ *ura3/URA3*) in YNB bei pH 4 und 30°C im Vergleich zu den Kontrollstämmen CFM-5 (*phr2* Δ *ura3/URA3* *TEFpr::PHR1*) und CAS10 (*ura3/URA3* *phr1/PHR1*). Das Ergebnis präsentiert den Mittelwert von drei unabhängigen Experimenten.

3.1.2 Filamentierungsverhalten der *phr2* Δ -Revertanten

C. albicans wächst bei neutralen pH-Werten und einer Umgebungstemperatur von 37°C filamentös, während unter sauren pH-Bedingungen unizelluläre Sprosspilze gebildet werden (Buffo *et al.*, 1984). Die *phr2* Δ -Mutante, welche bei einem pH-Wert von 4 nicht wachstumsfähig ist, bildet bei diesem restriktiven pH aufgeblähte, amorphe Zellen. Bei neutralen pH-Werten verhält sich die *phr2* Δ -Mutante jedoch entsprechend dem Wildtyp SC5314 (Mühlschlegel und Fonzi, 1997).

Die *phr2Δ*-Revertanten, CEM-1 und CEM-2, zeigten im Vergleich zu SC5314 und zur *phr2Δ*-Mutante CFM-2 eine Veränderung in ihrem Filamentierungsverhalten (Abb. 6). Die Filamentierungsrate von CEM-1 und CEM-2 betrug sowohl bei pH 4 als auch bei pH 7 und 37°C 90-96 %. Im Gegensatz dazu war der Wildtyp-Stamm SC5314 nur bei pH 7 und 37°C in der Lage, zu 90 % zu filamentieren. Bei pH 4 und 37°C hingegen betrug die Filamentierungsrate von SC5314 nur 1 %. Als Testmedium wurden hier Medium199 und YNB verwendet. Die Fähigkeit der *phr2Δ*-Revertanten, CEM-1 und CEM-2, bei pH 4 und 37°C zu filamentieren war nicht nur auf Flüssigmedium beschränkt. Sie zeigten diese Fähigkeit ebenfalls auf Medium199- und YNB-Agarplatten.

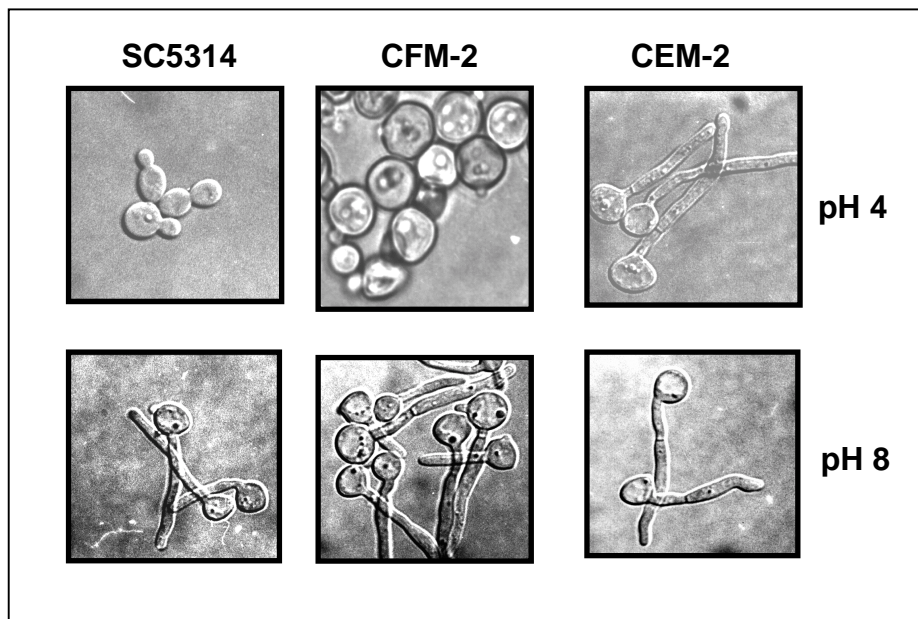


Abb. 6. Zellmorphologie von SC5314, CFM-2 und CEM-2. Übernachtskulturen der jeweiligen Stämme wurden in Medium199 pH 4 oder pH 8 angeimpft und 3 h bei 37°C inkubiert.

3.1.3 Das Expressionsmuster von *PHR1* in *phr2Δ*-Revertanten

PHR1 stellt ein weiteres pH-reguliertes Gen von *C. albicans* dar. Es wird verstärkt bei neutralen bis alkalischen pH-Werten exprimiert, während bei pH-Werten unter 5,5 im Northern-Blot kein Transkript detektiert werden kann. *PHR1* besitzt somit ein zu *PHR2* inverses Expressionsmuster. Entsprechend dem Expressionmuster von *PHR1* verursacht seine Deletion bei neutralen pH-Werten Defekte im Wachstum, in der Zellmorphologie und in der Virulenz (Saporito-Irwin *et al.*, 1995; De Bernardis *et al.*, 1998). Durch Komplementationsexperimente und funktionelle Studien konnte gezeigt werden, dass *PHR1* funktional homolog zu *PHR2* ist (Mühlschlegel und Fonzi, 1997; Fonzi, 1999).

Da *PHR1* und *PHR2* einander komplementieren können, wurde untersucht, ob ein verändertes *PHR1*-Expressionsmuster in den *phr2Δ*-Revertanten vorlag, welches für das irreguläre Wachstum bei pH 4 verantwortlich ist. Mit Hilfe von Northern-Blot-Hybridisierungen wurde festgestellt, dass *PHR1* in den *phr2Δ*-Revertanten, CEM-1 und CEM-2, keiner pH-Regulation unterlag, sondern konstitutiv exprimiert wurde. SC5314 und CFM-2 (*phr2Δ*) exprimierten *PHR1* dagegen nur bei alkalischem pH (Abb. 7). Somit könnte die Expression von *PHR1* für das atypische Wachstum der *phr2Δ*-Revertante bei saurem pH-Wert verantwortlich gewesen sein.

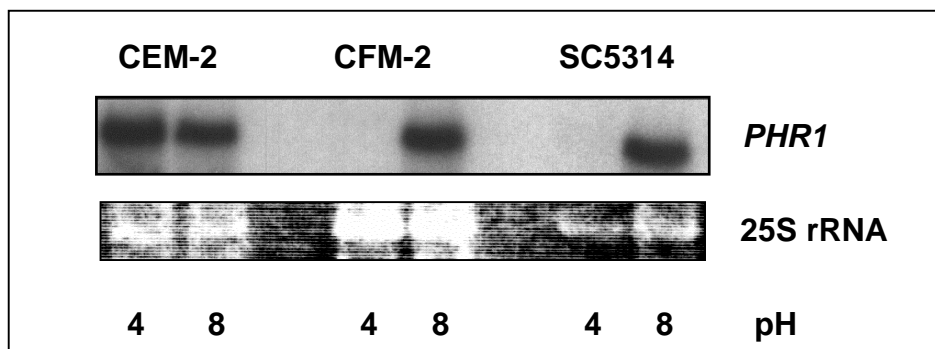


Abb. 7. *PHR1*-Expression in SC5314, CFM-2 und CEM-2 unter sauren bzw. alkalischen Bedingungen. RNA wurde nach Inkubation der angegebenen Stämme in Medium199 pH 4 und pH 8 isoliert. Oberes Feld zeigt ein Northern-Blot hybridisiert mit *PHR1*. Unteres Feld zeigt das korrespondierende Ethidiumbromid-Agarose Gel vor dem *Blotten*.

3.2 Molekulargenetische Charakterisierung der *phr2Δ*-Revertanten

3.2.1 Isolierung und Sequenzierung der *PHR1*-Promotorallele einer *phr2Δ*-Revertante und einer *phr2Δ*-Mutante

Zur molekulargenetischen Analyse der Revertanten wurde in einem ersten Schritt untersucht, ob die atypische, pH-unabhängige Expression von *PHR1* in den Revertanten auf eine Sequenzveränderung der *PHR1*-Promotorregion zurückzuführen ist. Die *PHR1*-Promotorallele einer *phr2*-Deletionsmutante (CFM-4) und der aus ihr entstandenen Revertante (CEM-1) wurden isoliert und sequenziert. Zur Differenzierung der Promotorallele eines Klons wurde die kodierende Sequenz eines Allels mit Hilfe einer 4,4 Kb *phr1Δ::hisG-URA3-hisG*-Kassette disruptiert. Die Disruptionskassette wurde durch einen *SacII/PvuII*-Verdau des Plasmids pSMS23 gewonnen (Saporito-Irwin *et al.*, 1995). Durch den Einsatz der *Primer* PI und ME15, die von der Promotorregion beziehungsweise dem *hisG*-Fragment abgeleitet wurden, konnte spezifisch das disruptierte Allel in der PCR amplifiziert werden. Das andere, nicht disruptierte Allel wurde mit Hilfe der *Primer* PI und ME13 amplifiziert. *Primer* ME13 wurde vom 3'-Ende des *PHR1*-Gens abgeleitet. Von jedem Allel wurden jeweils zwei von unabhängigen Klonen stammende PCR-Produkte beidsträngig sequenziert. Es wurden 900 bp der 5'-nicht-kodierenden Sequenz (-1 bis -900) der *PHR1*-Allele von CEM-1 und CFM-4 miteinander verglichen. Dieser Vergleich ergab keinerlei Differenzen der *PHR1*-Promotorsequenzen zwischen CEM-1 und CFM-4. Dieses Ergebnis zeigte, dass die irreguläre Expression von *PHR1* in den Revertanten vermutlich nicht auf eine Modifikation in regulatorischen Elementen des *PHR1*-Promotors zurückzuführen war.

3.2.2 Untersuchungen zum Einfluss der *PHR1*-Expression auf das Filamentierungsverhalten der *phr2Δ*-Revertanten.

Die konstitutive Expression von *PHR1* ist vermutlich für das Wachstum der *phr2Δ*-Revertanten bei pH 4 verantwortlich. Es wurde untersucht, ob *PHR1* ebenfalls für das filamentöse Wachstum der Revertanten bei pH 4 verantwortlich sein könnte.

Der *phr2Δ*-Stamm CFM-5 enthält eine *PHR1*-Kopie, welche konstitutiv vom *TEF1*-Promotor exprimiert wird (Mühlschlegel und Fonzi, 1997). Dieses in CFM-5 konstitutiv exprimierte *PHR1*-Gen, komplementiert den Wachstumsdefekt der *phr2*-Nullmutation bei pH 4. CFM-5 wurde nun auf Filamentierung bei pH 4 und 37°C getestet. Dieses Experiment zeigte, dass CFM-5 im Gegensatz zur Revertante CEM-2, bei diesem pH-Wert nicht in der Lage ist Hyphen auszubilden (Abb. 8a). Im Northern-Blot konnten bei diesen beiden Stämmen jedoch vergleichbare *PHR1*-mRNA-Mengen bei pH 4 detektiert werden (Abb. 8b). Dies deutete daraufhin, dass die Expression von *PHR1* bei pH 4 nicht für die Filamentierung der Revertanten verantwortlich war.

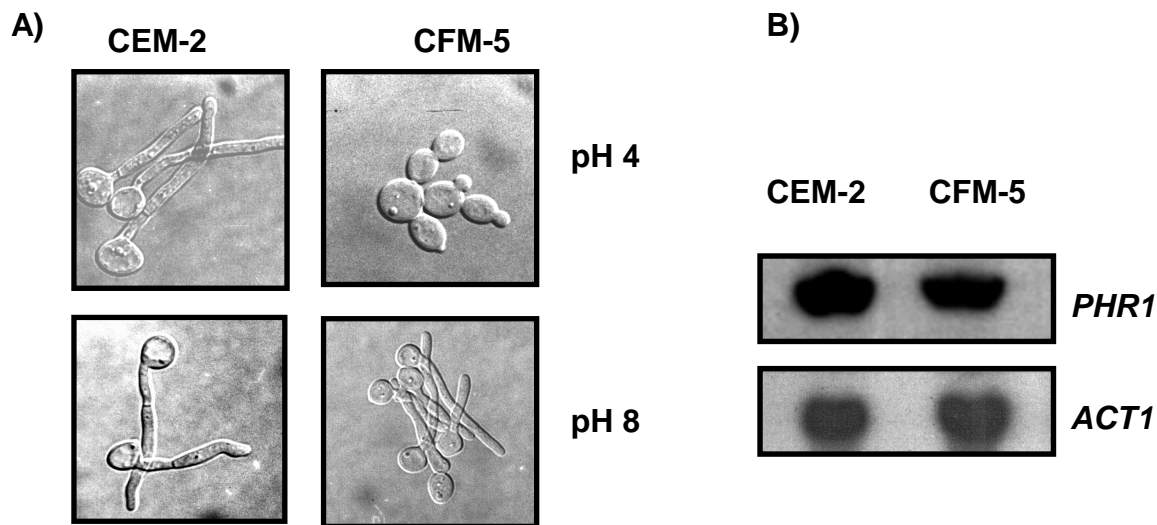


Abb. 8. A) Zellmorphologie von CEM-2 und CFM-5. Übernachtskulturen der jeweiligen Stämme wurden in Medium199 pH 4 oder pH 8 angeimpft und 3 h bei 37°C inkubiert. B) *PHR1*-Expression in CEM-2 und CFM-5. RNA wurde nach Inkubation der Stämme in Medium199 pH 4 isoliert. Oberes Feld zeigt ein Northern-Blot hybridisiert mit *PHR1*. Unteres Feld zeigt eine Kontrollhybridisierung mit *ACT1*.

3.2.3 Der *RIM101*-Lokus von *phr2Δ*-Revertanten ist heterozygot

Die oben beschriebenen Ergebnisse führten zu der Annahme, dass die Revertanten eine Mutation in einem anderen genomischen Locus als in *PHR1* enthielten. Es wurde die Vermutung aufgestellt, dass eine Mutation in einem putativen Regulatorgen, sowohl für das veränderte Expressionsmuster von *PHR1*, als auch für das irreguläre, pH-unabhängige filamentöse Wachstum der Revertanten verantwortlich sein könnte.

Das *RIM101*-Gen, welches für einen putativen Zinkfinger-Transkriptionsfaktor kodiert, wurde erst kürzlich identifiziert und spielt eine bedeutende Rolle in der pH-induzierten Filamentierung. Das *RIM101*-Gen ist für die Filamentierung bei neutralen pH-Werten notwendig. Es konnte ferner gezeigt werden, dass dieses Gen die pH-abhängige Expression von *PHR1* und *PHR2* kontrolliert. Bei neutralen pH-Werten induziert es *PHR1* und reprimiert *PHR2*. In *rim101Δ*-Mutanten wird *PHR1* nicht induziert, während *PHR2* konstitutiv exprimiert wird (Ramon *et al.*, 1999; Davis *et al.*, 2000).

Es wurde daraufhin die Hypothese aufgestellt, dass eine heterozygote, dominante Mutation in *RIM101* für die Phänotypen der *phr2Δ*-Revertanten verantwortlich sein könnte. Diese Hypothese wurde durch die zielgerichtete Deletion eines *RIM101*-Allels getestet. Im Falle der Disruption des vermutlich mutierten, dominanten Allels würden die phänotypischen Eigenschaften des Vorläuferstammes, nämlich kein Wachstum, keine *PHR1*-Expression und keine Filamentierung bei pH 4, wieder zum Vorschein kommen. Wird dagegen das nicht mutierte *RIM101*-Allel deletiert, so würde dies keine Auswirkung auf den Phänotyp der Revertanten haben.

Plasmid pARA3 wurde zur Deletion des einen oder des anderen *RIM101*-Allels von CEM-1 eingesetzt. pARA3 enthält eine 4,1 Kb *hisG-URA3-hisG*-Kassette, welche 1270 bp des ORF von *RIM101* ersetzt (Ramon *et al.*, 1999). Plasmid pARA3 wurde mit den Restriktionsenzymen *HindIII* und *SspBI* geschnitten, wodurch ein 5 Kb *RIM101*-Disruptionskonstrukt freigesetzt wurde. Das 5 Kb-Fragment wurde in CEM-1 transformiert. Uridin-prototrophe Transformanten wurden auf YNB-Agarplatten mit dem pH-Wert 7 selektioniert. Zwölf Transformanten wurden im Southern-Blot analysiert. Die genomische DNA wurde mit *BglII* verdaut und mit einem 2,9 Kb *RIM101*-Fragment hybridisiert. Alle Transformanten zeigten eine Disruption am gewünschten Locus. Vierzig Transformanten wurden daraufhin auf Wachstumsfähigkeit bei pH 4 überprüft.

Fünfundzwanzig dieser Transformanten wuchsen bei saurem pH-Wert ebenso gut wie bei neutralem pH-Wert. Die übrigen fünfzehn Klone dagegen konnten nur bei neutralem pH-Wert wachsen. Transformanten die sowohl bei pH 4, als auch bei pH 7 wachsen konnten, exprimierten weiterhin *PHR1* pH-unabhängig und filamentierten auch bei saurem pH-Wert. In Abbildung 9 sind solche Transformanten durch die Stämme CEM-5A und CEM-5B repräsentiert. Transformanten die nur bei pH 7 ein Wachstum zeigten, konnten das *PHR1* nur bei pH 7 induzieren und waren nur bei diesem pH-Wert befähigt zu filamentieren. Bei pH 4 bildeten, diese entsprechend einer normalen *phr2Δ*-Mutante, aufgeblähte, amorphe Zellen. Diese Transformanten sind in Abbildung 9 durch CEM-6A und CEM-6B repräsentiert. Diese Ergebnisse zeigten, dass durch die Deletion eines bestimmten *RIM101*-Allels, welches vermutlich modifiziert war, alle drei charakteristischen Phänotypen der Revertante aufgehoben werden konnten. Diese Tatsache bekräftigte die Hypothese, dass die Revertanten heterozygot im *RIM101*-Lokus waren, und dass das mutierte Allel dominant gegenüber dem wildtypischen Allel war.

A)

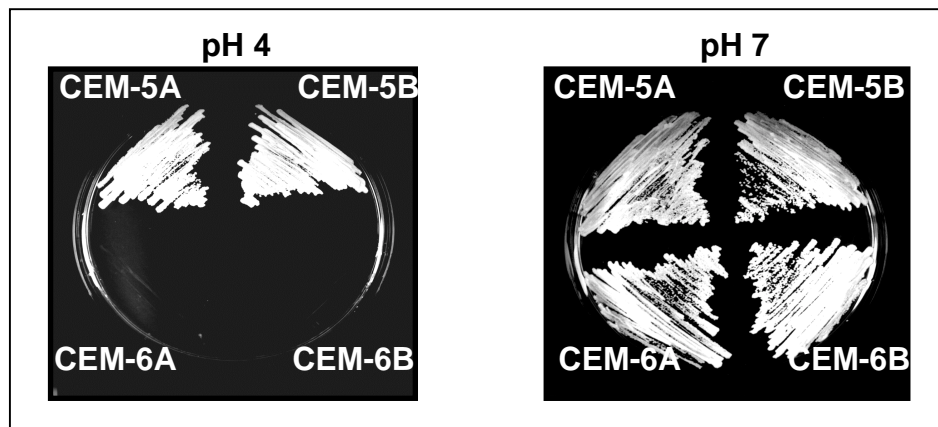


Abb. 9. Effekt der Disruption eines *RIM101*-Allels in CEM-1. A) Wachstum der angegebenen Stämme nach 48 h Inkubation auf YNB pH 4 und pH 7 bei 30°C.

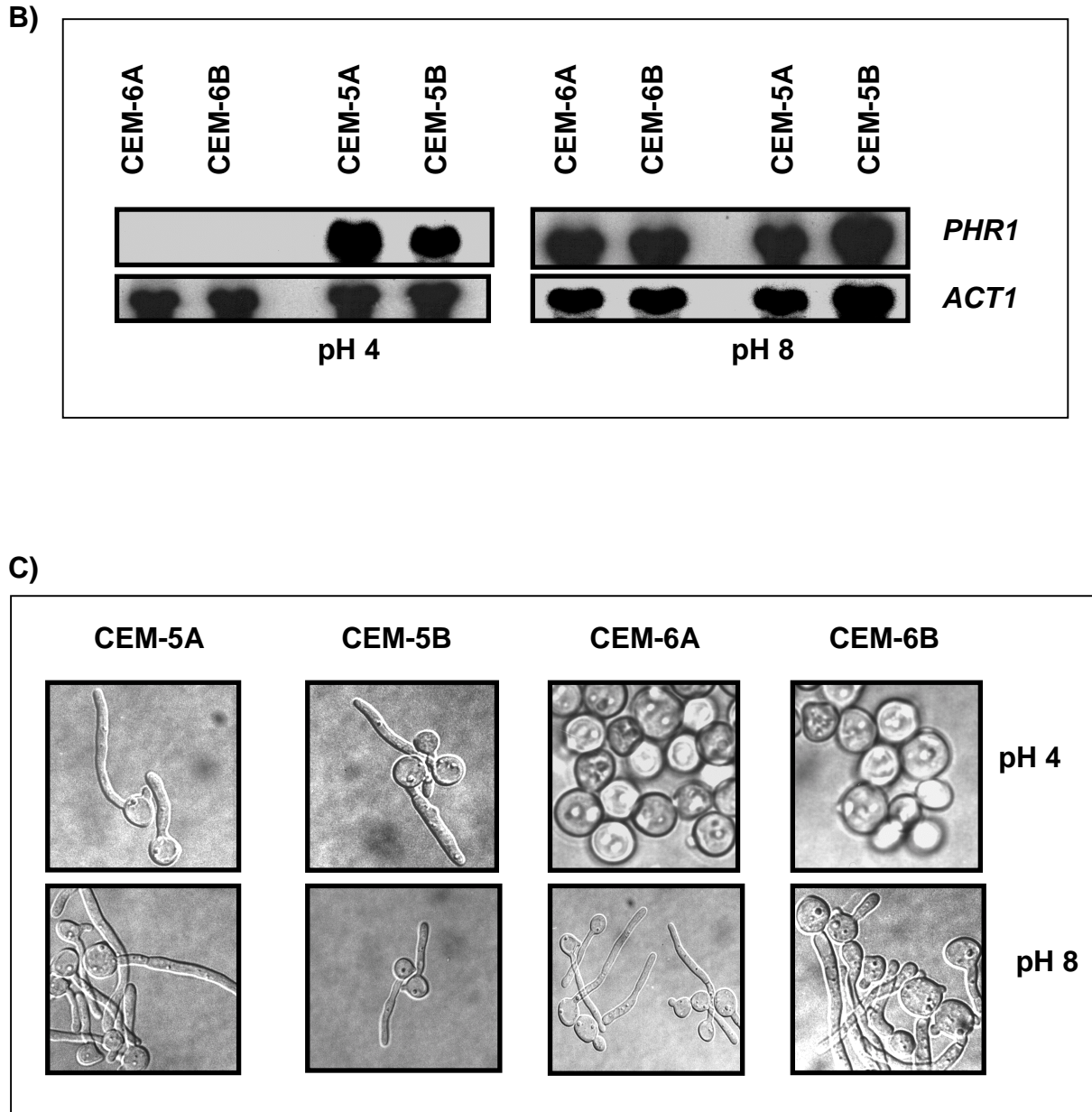


Abb. 9. B) *PHR1*-Expression in Abhängigkeit des pH-Wertes. RNA wurde nach Inkubation der angezeigten Stämme in Medium199 bei pH 4 und pH 8. Oberes Feld zeigt ein Northern-Blot hybridisiert mit *PHR1*. Unteres Feld zeigt eine Kontrollhybridisierung mit *ACT1*. C) Zellmorphologie der angegebenen Stämme. Übernachtskulturen der jeweiligen Stämme wurden in Medium199 pH 4 oder pH 8 angeimpft und 3 h bei 37°C inkubiert.

3.2.4 Isolierung und Sequenzierung der *RIM101*-Allele von *phr2Δ*-Revertanten

Da jeweils ein *RIM101*-Allel in CEM-5A, CEM-5B, CEM-6A und CEM-6B deletiert war, konnte das intakte Allel spezifisch isoliert und kloniert werden. Es wurde angenommen, dass CEM-5A und CEM-5B das intakte, eventuell mutierte *RIM101*-Allel besaßen, während CEM-6A und CEM-6B das intakte, wildtypische *RIM101*-Allel enthielten. Mit Hilfe der Primer PRR2-3 und PRR2-4 und 1 µg genomischer DNA von CEM-5A, CEM-5B, CEM-6A oder CEM-6B als Matrize wurden die beiden *RIM101*-Allele mittels PCR amplifiziert. Die Vervielfältigung wurde anhand eines initialen Denaturierungsschrittes bei 95°C für 3 min, gefolgt von 15 Zyklen, wobei jeder Zyklus aus 40 sec bei 95°C, 1 min bei 58°C und 2 min bei 72°C bestand, durchgeführt. Zum Schluss folgte ein 10 minütiger Schritt bei 72°C. Aus dieser PCR resultierten 2,9 Kb DNA-Fragmente, die das 1986 Bp ORF von *RIM101*, 753 Bp 5'- und 184 Bp 3'-nicht-kodierende Sequenz enthielten. Die PCR-Produkte wurden in den *TA-cloning* Vektor pCR2.1 kloniert. Die aus der Klonierung entstandenen Plasmide wurden als pCR16-1, pCR16-2, pCR31-1 und pCR31-2 bezeichnet. Die Plasmide pCR16-1 und pCR16-2 enthielten das intakte *RIM101*-Allel von CEM-5A bzw. von CEM-5B, während pCR31-1 und pCR31-2 das intakte *RIM101*-Allel von CEM-6A bzw. von CEM-6B führten. Die klonierten *RIM101*-Fragmente wurden daraufhin beidsträngig sequenziert. Die aus CEM-5A und CEM-5B isolierten Allele wiesen eine Punktmutation an der Position +1426 des offenen Leserasters von *RIM101* auf. Diese Mutation konvertierte das Kodon für Glutamin durch eine C zu T-Transition in ein TAA-Stopcodon. Dadurch wurde das vom wildtypischen Gen abgeleitete 661 Aminosäuren enthaltende Protein um 186 Aminosäuren verkürzt. Dagegen zeigten, die aus CEM-6A und CEM-6B gewonnenen *RIM101*-Allele eine dem wildtypischen Gen identische Sequenz (Abb. 10a). Aus diesen Ergebnissen liess sich schliessen, dass der Verlust der für die Revertante charakteristischen Eigenschaften der Stämme CEM-6A und CEM-6B auf die Disruption des mutierten *RIM101*-Allels zurückzuführen war.

A)

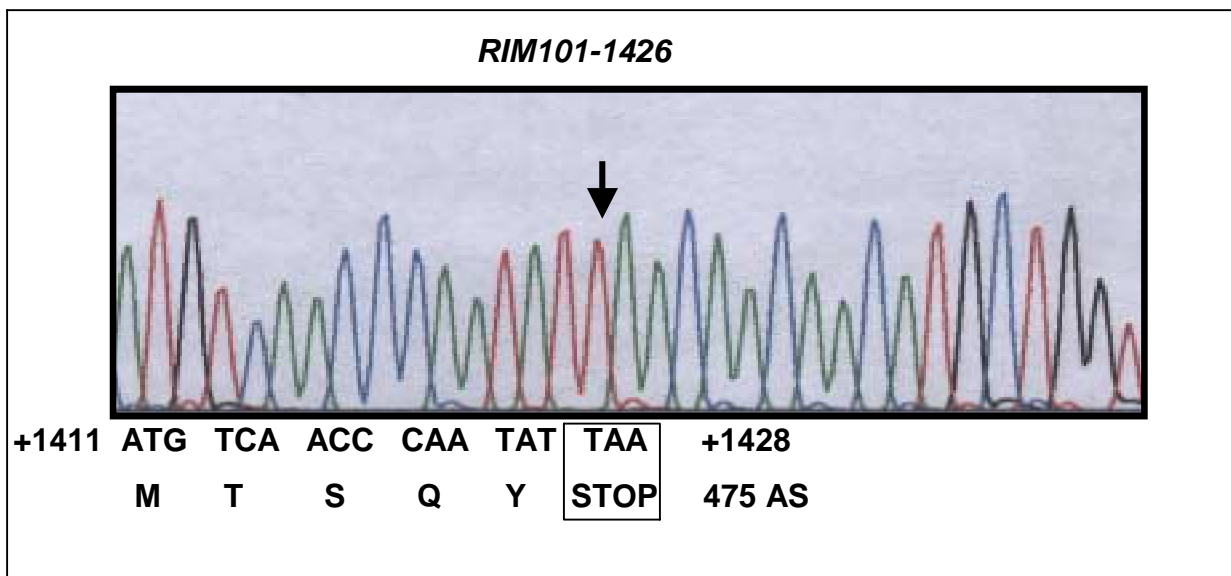
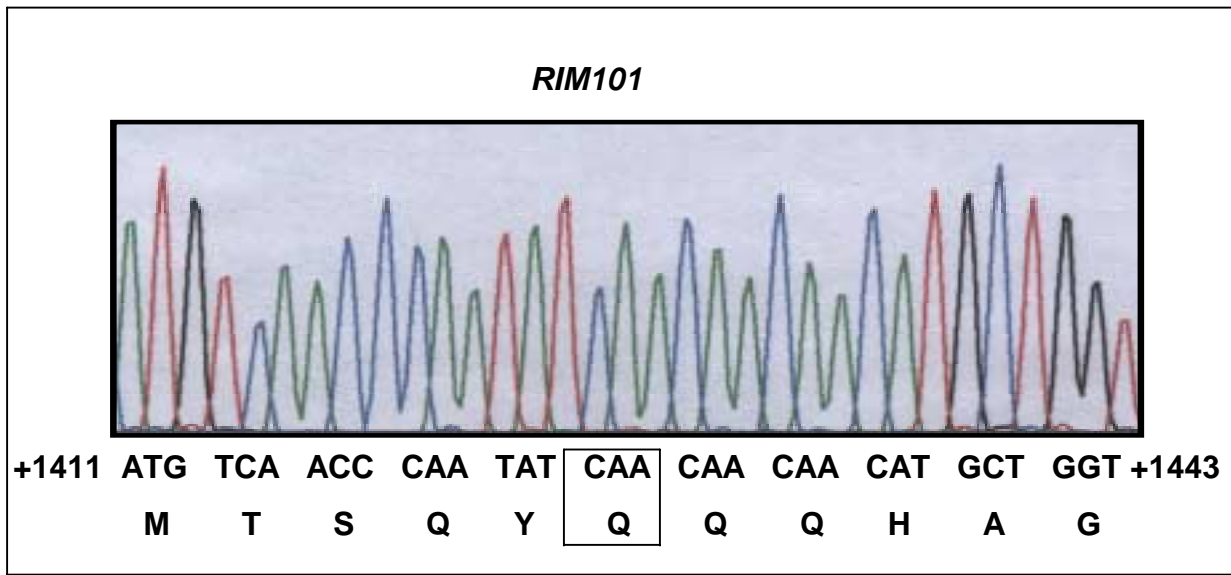


Abb. 10. A) Sequenzanalyse der *RIM101*-Allele von *phr2Δ*-Revertante CEM-1. Chromatographische Darstellung der Sequenz +1411 bis +1443 der Offenen Leseraster von *RIM101* ist dargestellt. Oberes Feld zeigt das wildtypische *RIM101*-Allel von CEM-1. Unteres Feld stellt die Sequenz des mutierten Allels dar. Punktmutation an der Position +1426, welche zum TAA-Stopcodon führt, ist angezeigt. Das mutierte *RIM101*-Allel kodiert für ein Protein mit 475 Aminosäuren (AS). Unterhalb der DNA-Sequenz ist die abgeleitete Aminosäuresequenz aufgeführt.

Die Sequenz von *RIM101* wurde ebenfalls in der zweiten *phr2Δ*-Revertante CEM-2 bestimmt. In einer PCR wurde genomische DNA von CEM-2 als *Template* und die Oligonukleotide PRR2-3 und PRR2-4 als *Primer* eingesetzt. Das aus der PCR resultierte 2,9 Kb DNA-Fragment bestand aus einem Gemisch beider *RIM101*-Allele. Die direkte Sequenzierung des PCR-Produktes mit dem Oligonukleotid PRR2-11 ergab an der Position +1751 des ORFs zwei sich überlappende chromatographische *Peaks*. Der eine *Peak* stand für das Nukleotid Cytosin, während das andere ein Adenin bezeichnete. Das Cytosin an dieser Position des ORFs entsprach der wildtypischen Sequenz. Das Adenin an der Stelle führte dagegen zu einer *Nonsense*-Mutation. Um zu bestätigen, dass tatsächlich ein Allel an Position +1751 mutiert war, wurde das PCR-Produkt in pCR2.1 kloniert und mehrere Klone davon sequenziert. Die Sequenzanalyse ergab für die Hälfte der Klone (repräsentiert durch pCR31-3) an der Position +1751 ein Cytosin, während die andere Hälfte (repräsentiert durch pCR16-3) an dieser Stelle ein Adenin besass. Das Adenin führte hier zu einem TAA-Stopcodon und somit zu einem vorzeitigen Ende des ORFs. Das Rim101-Protein wäre bei dieser Mutation um 78 Aminosäuren kürzer als das wildtypische Protein. Somit enthielten beide Revertanten, CEM-1 und CEM-2, in einem *RIM101*-Allel eine *Nonsense*-Mutation, die zu einer Trunkierung des Carboxy-Terminus des abgeleiteten Proteins führte.

Zehn weitere, aus dem Stamm CFM-2 entstandene unabhängige Revertanten wurden analysiert. Alle Revertanten, R1 bis R10, zeigten die gleichen Phänotypen wie CEM-1 und CEM-2, nämlich Wachstum bei pH 4, pH-unabhängige Expression von *PHR1* und Filamentierung bei pH 4 und 37°C. Beide *RIM101*-Allele jeder Revertante wurden mit Hilfe der PCR isoliert und kloniert. Die Sequenzanalyse von zehn Klonen jedes PCR-Produktes ergab, dass jede Revertante eine heterozygote Mutation in der Nähe des 3'-Endes im *RIM101*-Lokus besass, was zu einem frühzeitigen Stopcodon führt. Bei jeder Mutation handelte es sich um eine Substitutionsmutation, welche das kodierende Triplet in ein Stopcodon umwandelte. Die Revertanten 4 und 5 besaßen die *Nonsense*-Mutation an der gleichen Position, während alle weiteren Revertanten an unterschiedlichen Stellen von *RIM101* die Punktmutation aufwiesen (Abb. 10b.).

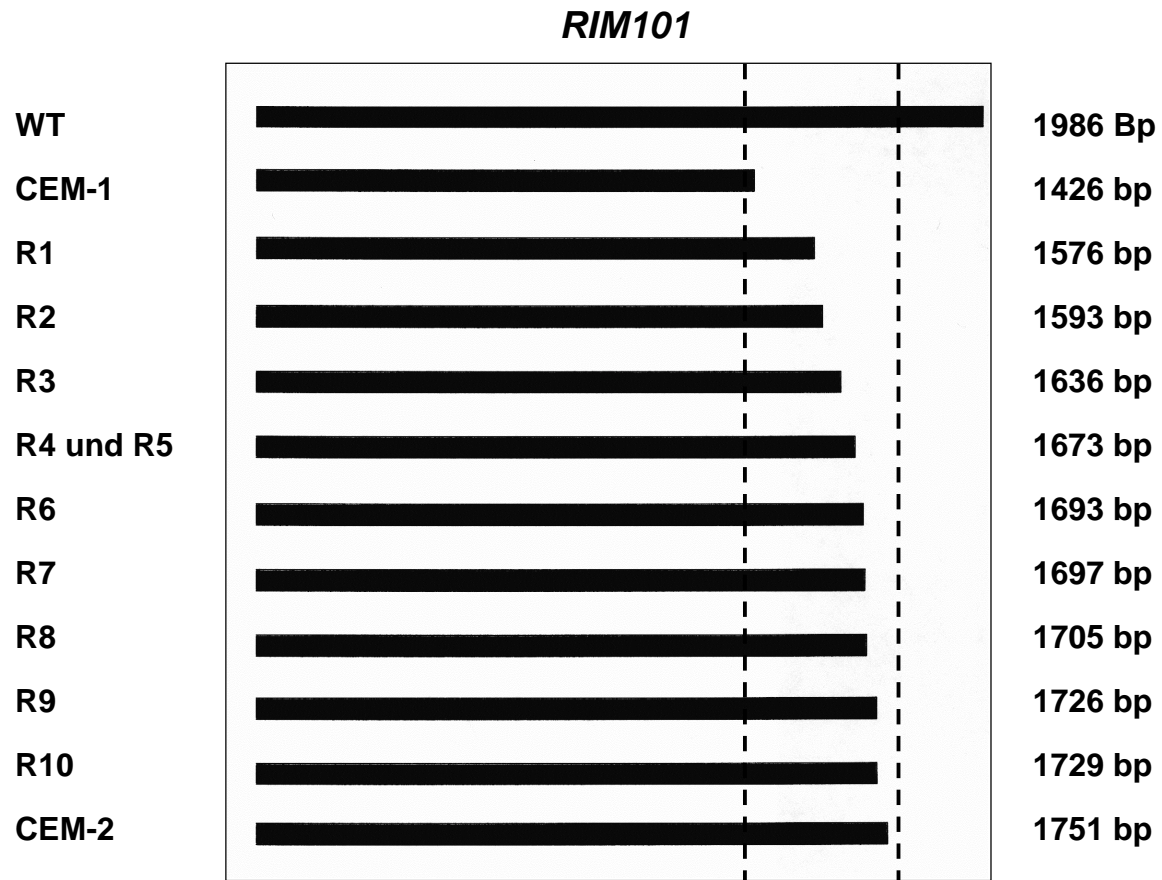


Abb. 10. B) Sequenzanalyse der *RIM101*-Allele von 10 weiteren unabhängigen *phr2Δ*-Revertanten (R1-R10). Jeweils ein *RIM101*-Allel der Revertanten ist mutiert. Position der zum Stopcodon führenden Punktmutation ist rechts angegeben. Mutiertes *RIM101*-Allel von CEM-1 und CEM-2 sind mit eingezeichnet. Schraffierte Linien umschliessen den DNA-Bereich in dem die Mutationen identifiziert wurden. WT repräsentiert das wildtypische *RIM101*-Allel der Revertanten.

3.2.5 Auswirkung der Expression mutierter *RIM101*-Allele auf den Phänotyp von *C. albicans*

Um zu untersuchen, ob die mutierten Allele von CEM-1 und CEM-2, bezeichnet als *RIM101-1426* bzw. *RIM101-1751*, für die Phänotypen der Revertanten verantwortlich waren, wurden diese in die *phr2Δ ura3Δ*-Doppelnullmutante CFM-4 transformiert. Hierfür wurde das Plasmid pSM2 konstruiert. Plasmid pSM2 enthielt ein 3,85-Kb *URA3*-Fragment, welches *blunt-end* in die *SmaI*-Schnittstelle von pBSK(+) kloniert wurde. Die 2,9-Kb *Inserts* der Plasmide pCR16-1, pCR16-3, pCR31-1 und pCR31-3 wurden durch ein *SpeI/XbaI*-Verdau freigesetzt und in die *XbaI*-Schnittstelle von Plasmid pSM2 kloniert. Die hieraus resultierten Plasmide pEM-16-1, pEM-16-3, pEM-31-1 und pEM-31-3 wurden mit *HpaI* linearisiert und in CFM-4 transformiert. Die zielgerichtete singuläre Integration der mutierten Allele am *URA3*-Lokus wurde durch Southern-Blot-Hybridisierung bestätigt. Jeweils zehn *RIM101-1426*- und zehn *RIM101-1751*-Transformanten wurden anschliessend näher untersucht. Repräsentative Transformanten CEM-16-1 und CEM-16-3, welche *RIM101-1426* bzw. *RIM101-1751* enthielten, sind in Abbildung 8 dargestellt. Wie die Revertanten CEM-1 und CEM-2 konnten diese Transformanten bei pH 4 wachsen (Abb. 11a). Zudem besaßen CEM-16-1 und CEM-16-3, genauso wie die Revertanten, die Fähigkeit, bei pH 4 das *PHR1*-Gen zu exprimieren und filamentös zu wachsen (Abb. 11b, 11c). Die Filamentierungsrate von CEM-16-1 und CEM-16-3 entsprach mit $89\% \pm 4\%$ in etwa der Filamentierungsrate der Revertanten. Die Transformation der aus CEM-1 und CEM-2 isolierten, wildtypischen *RIM101*-Allele in CFM-4 hatte dagegen in jeweils zehn untersuchten Transformanten keine Auswirkung auf den Phänotyp. Repräsentative Transformanten CEM-31-1 und CEM-31-3 sind in der Abbildung 11 dargestellt. Diese Ergebnisse zeigten, dass eine einzige Kopie des mutierten Allels die in der Revertante ausgeprägten Phänotypen verursachen konnte. Ferner wurde hier gezeigt, dass eine *RIM101-1426* - bzw. *RIM101-1751*-Kopie gegenüber den beiden wildtypischen *RIM101*-Allelen in CEM-16-1 und CEM-16-3 dominant war.

RIM101-1426 und das wildtypische *RIM101*-Allel von CEM-1 wurden ebenfalls in den *ura3Δ*-Stamm CAF3-1 transformiert. Auch hier zeigte die Transformante CAF3-1-16, welche das *RIM101-1426* enthielt, die Fähigkeit zur pH-unabhängigen Expression von

PHR1 und zur Filamentierung bei saurem pH-Wert. CAF3-1-31, welches mit dem wildtypischen Allel transformiert wurde, exprimierte weiterhin *PHR1* nur bei neutralem pH-Wert und filamentierte nicht bei sauren pH-Werten.

Da CAF3-1-16 das *PHR2*-Gen besitzt, konnte die Auswirkung der Mutation auf die Expression dieses Gens analysiert werden. In Wildtypzellen ist *PHR2* bei alkalischen Kulturbedingungen reprimiert, während es bei sauren pH-Werten exprimiert wird. In *rim101Δ*-Stämmen wird jedoch das *PHR2*-Gen konstitutiv exprimiert (Ramon *et al.*, 1999; Davis *et al.*, 2000). In Anwesenheit von *RIM101-1426* war *PHR2* sowohl bei saurem, als auch bei neutralem pH-Wert reprimiert. CAF3-1-16 zeigte keine Expression von *PHR2* bei pH 4, während CAF3-1-31 und SC5314 *PHR2* bei diesem sauren pH-Wert induzierten (Abb. 11d).

A)

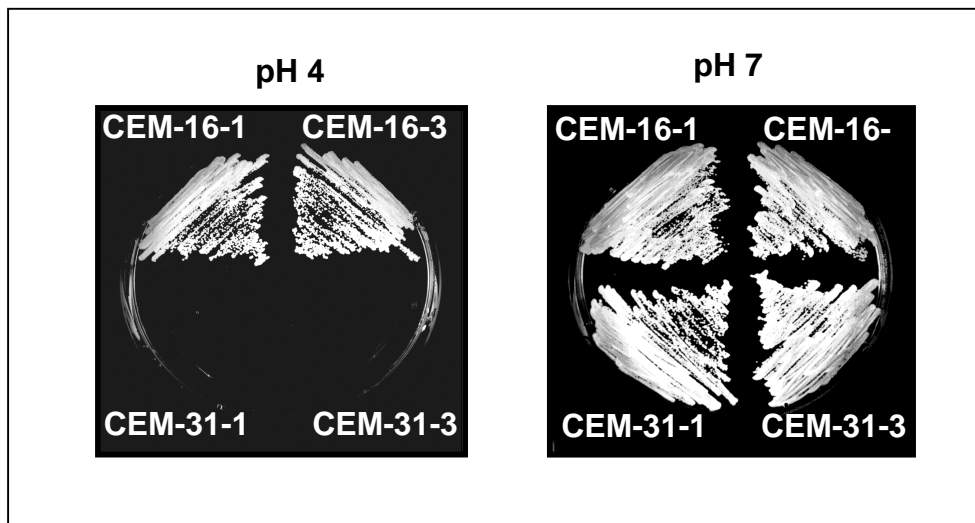
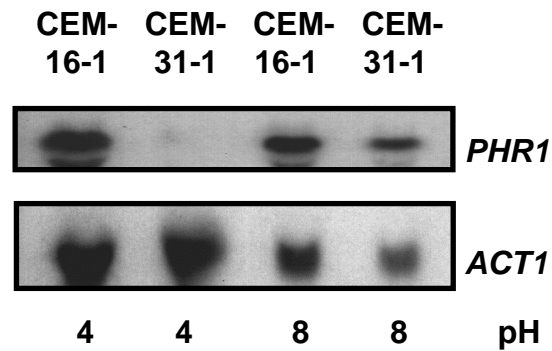
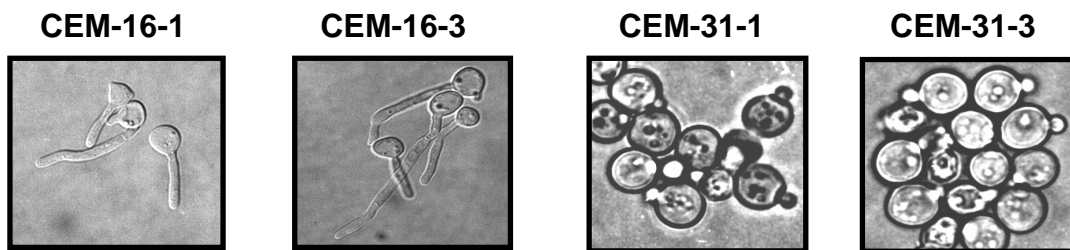


Abb. 11. Effekt mutierter Allele von *RIM101*. Transformation der mutierten Allele *RIM101-1426* und *RIM101-1751* in CFM-4 ergab die Stämme CEM-16-1 bzw. CEM-16-3. Transformation des wildtypischen Allels in CFM-4 brachte die Stämme CEM-31-1 bzw. CEM-31-3 hervor. A) Wachstum der Stämme auf YNB bei pH 4 oder pH 8 nach Inkubation bei 30°C für 48 h.

B)



C)



D)

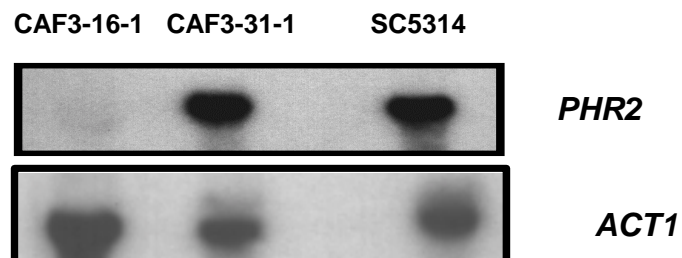


Abb. 11. B) *PHR1*-Expression der angegebenen Stämme in Abhängigkeit des pH-Wertes. Die RNA wurde nach Inkubation der Stämme in Medium199 pH 4 oder pH 8 pH isoliert. Der Northern-Blot wurde mit *PHR1* (oberes Feld) und zur Kontrolle mit *ACT1* (unteres Feld) hybridisiert. C) Morphologie der Zellen nach Überimpfen von Übernachtkulturen in Medium199 pH 4 und Inkubation bei 37°C für 3 h. D) Effekt von *RIM101-1426* auf die *PHR2*-Expression. RNA wurde aus CAF3-1-16, CAF3-1-31 und SC5314 nach Inkubation in Medium199 pH 4 isoliert. Der Northern-Blot wurde mit *PHR2* oder *ACT1* hybridisiert. CAF3-1-16 enthält *RIM101-1426*, CAF3-1-31 enthält Wildtyp-*RIM101* und SC5314 ist der *C. albicans*-Wildtypstamm.

3.2.6 Einfluss von *RIM101-1426* auf die Expression von *RIM101*

Die Expression von *RIM101* in *C. albicans* ist pH-abhängig. Unter alkalischen Bedingungen ist die Expression von *RIM101* um ein vielfaches höher, als unter sauren Bedingungen (Ramon *et al.*, 1999). Das Expressionsmuster von *RIM101* wurde in den Stämmen CEM-16-1 und CEM-31-1 untersucht. CEM-16-1 enthielt eine *RIM101-1426*-Kopie, welches am *URA3*-Lokus integriert war, und die beiden nativen wildtypischen *RIM101*-Allele. Dagegen enthielt der Stamm CEM-31-1 neben den beiden nativen *RIM101*-Allelen, eine wildtypische *RIM101*-Kopie am *URA3*-Lokus. Northern-Blot-Hybridisierungen zeigten, dass in CEM-16-1 das *RIM101*-Gen bei pH 4 und pH 8 gleichermaßen stark exprimiert wurde, während die Expression dieses Gens in CEM-31-1 bei pH 4 deutlich schwächer war, als bei pH 8 (Abb. 12).

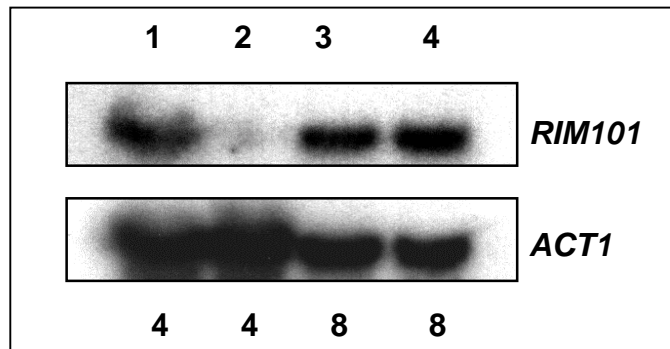


Abb. 12. Expression von *RIM101-1426* und Wildtyp *RIM101* in Abhängigkeit vom pH-Wert. RNA wurde aus CEM-16-1 (Spur 1 und 3) und CEM-31-1 (Spur 2 und 4) nach Inkubation in Medium199 pH 4 und pH 8 isoliert. Der Northern-Blot wurde mit *RIM101* oder *ACT1* hybridisiert. CEM-16-1 enthält *RIM101-1426* und CEM-31-1 enthält Wildtyp-*RIM101*.

3.2.7 Einfluss multipler *RIM101*-Kopien auf den Phänotyp von *C. albicans*

C. albicans-Wildtypzellen benötigen für die durch neutrale pH-Werte induzierte Filamentausbildung zusätzlich ein Temperatursignal von ca. 37°C. Eine optimale Filamentausbildung ist bei pH 7 zu beobachten, falls die Inkubationstemperatur 37°C

beträgt (Buffo *et al.*, 1984). Je niedriger die Temperatur, desto dominanter ist das Wachstum als Sprosspilz. Bei Temperaturen unter 34°C ist fast ausschliesslich die Hefeform präsent. Die *phr2Δ*-Revertanten CEM-1 und CEM-2 waren in der Lage, bei pH 4 relativ stark zu filamentieren. Voraussetzung hierfür, war jedoch eine Umgebungstemperatur von 37°C. Sank die Temperatur unter diesen Wert, so verminderte sich die Filamentierungsrate der Revertanten und die gebildeten Keimschläuche wurden deutlich kürzer.

Es wurde untersucht, ob mehrere *RIM101-1426*-Kopien dieses für die Filamentierung notwendige Temperatursignal supprimieren können. Die Revertante CEM-1 wurde mit dem Plasmid pEM16-1, welches ein *RIM101-1426*-Fragment enthält, transformiert. Die Integration des Plasmids in das Genom von CEM-1 wurde mittels Southern-Blot-Verfahren analysiert (Abb. 13a). Die genomische DNA mehrerer Transformanten wurde mit *PstI* geschnitten. Alle Transformanten ergaben nach der Hybridisierung der genomischen DNA mit einer 2,9 Kb *RIM101*-Sonde u. a. *PstI*-Banden bei 1 Kb und 8,2 Kb. Das 1 Kb-Signal stammt vom *RIM101-1426* des transformierten Plasmids pEM-16-1 und ist im Vorläuferstamm CEM-1 nicht vorhanden. Einige Transformanten zeigten eine zusätzliche Bande bei ca. 9 Kb, welche auf die Integration multipler Kopien von pEM-16-1 in das Genom von CEM-1 hindeutete. Die Intensität der 1 Kb-Bande war in diesen Transformanten um ein vielfaches stärker als in Stämmen, die nur eine Plasmidkopie aufgenommen hatten (Abb. 13b). Zwei Klone mit einer einzigen Plasmidkopie, repräsentiert durch CEM-7, und vier Klone mit multiplen Kopien, repräsentiert durch CEM-8, wurden daraufhin näher analysiert. Alle Transformanten filamentierten weiterhin pH-unabhängig bei 37°C. Bei einer Temperatur von 29°C vermochten interessanterweise nur diejenigen Klone zu filamentieren, die multiple *RIM101-1426*-Kopien besaßen (Abb. 13c). Die Filamentierungsrate von CEM-8 betrug bei dieser Temperatur über 70 %, bei CEM-7 dagegen unter 1 %. Bei 25°C war bei keiner dieser Transformanten Hyphenbildung zu beobachten. Die Filamentierung bei niedriger Temperatur konnte auch in CAF3-1-Stämmen, die mehrere Kopien von *RIM101-1426* enthielten, beobachtet werden. Dies wies darauf hin, dass dieser Phänotyp unabhängig von der Abwesenheit oder Präsenz von *PHR2* war.

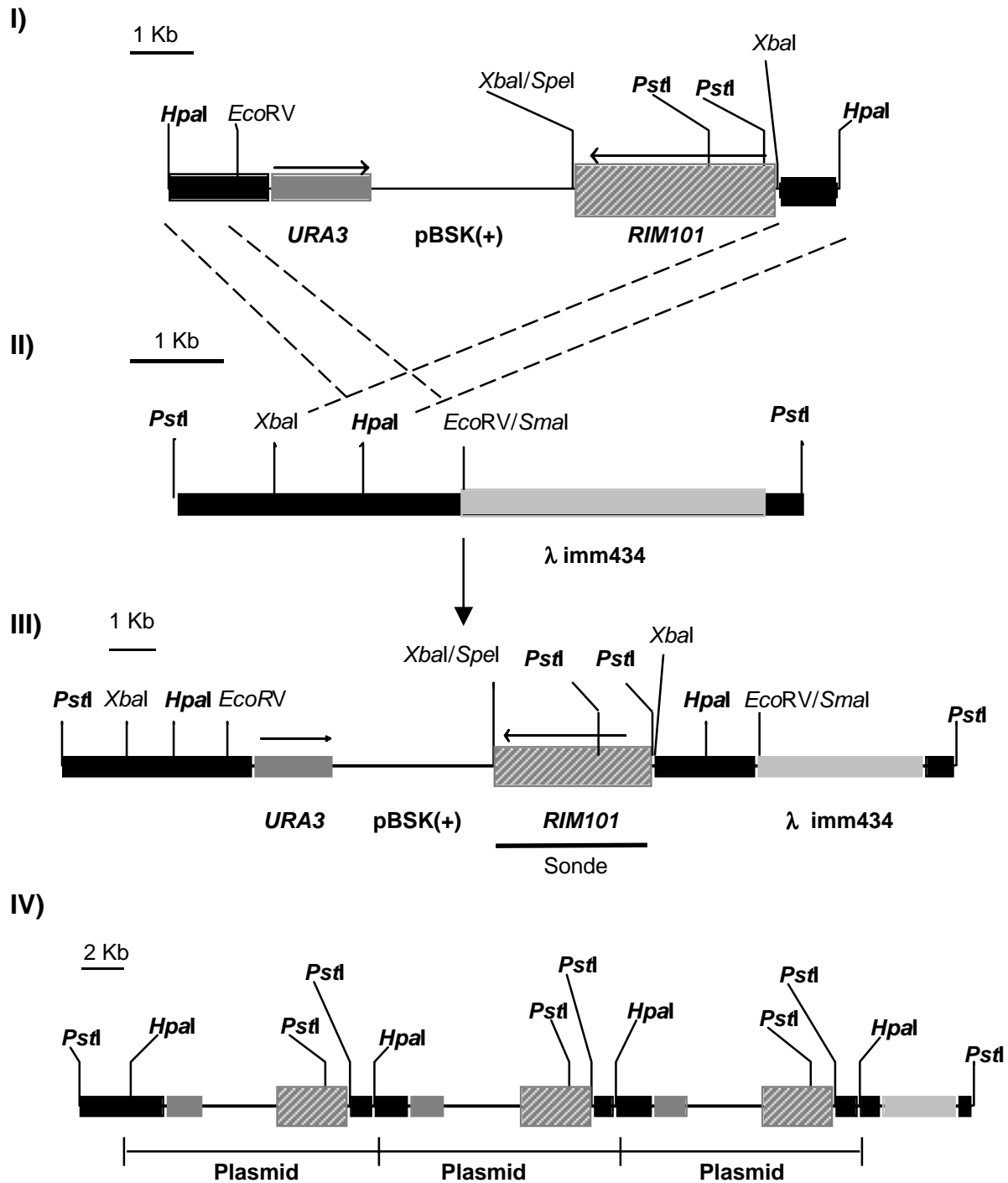


Abb. 13. A) Integrationsereignis von pEM-16-1 in CEM-1. I) Aufbau des mit *HpaI* linearisierten Plasmids pEM-16-1. II) Aufbau des genomischen Lokus des Vorläuferstammes CEM-1. III) Zeigt genetische Struktur nach Integration einer einzelnen Kopie von pEM-16-1 und IV) nach Integration von drei pEM16-1-Kopien in CEM-1. Nicht alle Enzymschnittstellen sind angegeben. Relevante Restriktionsschnittstellen sind fettgedruckt. Die Sonde, die im Southern-Blot eingesetzt wurde, ist in III) unter *RIM101* eingezeichnet.

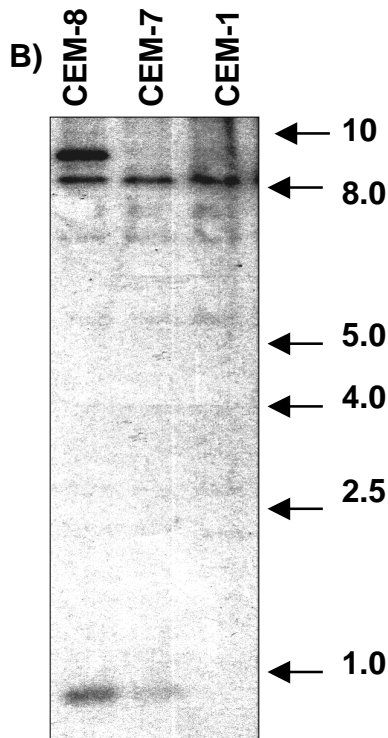
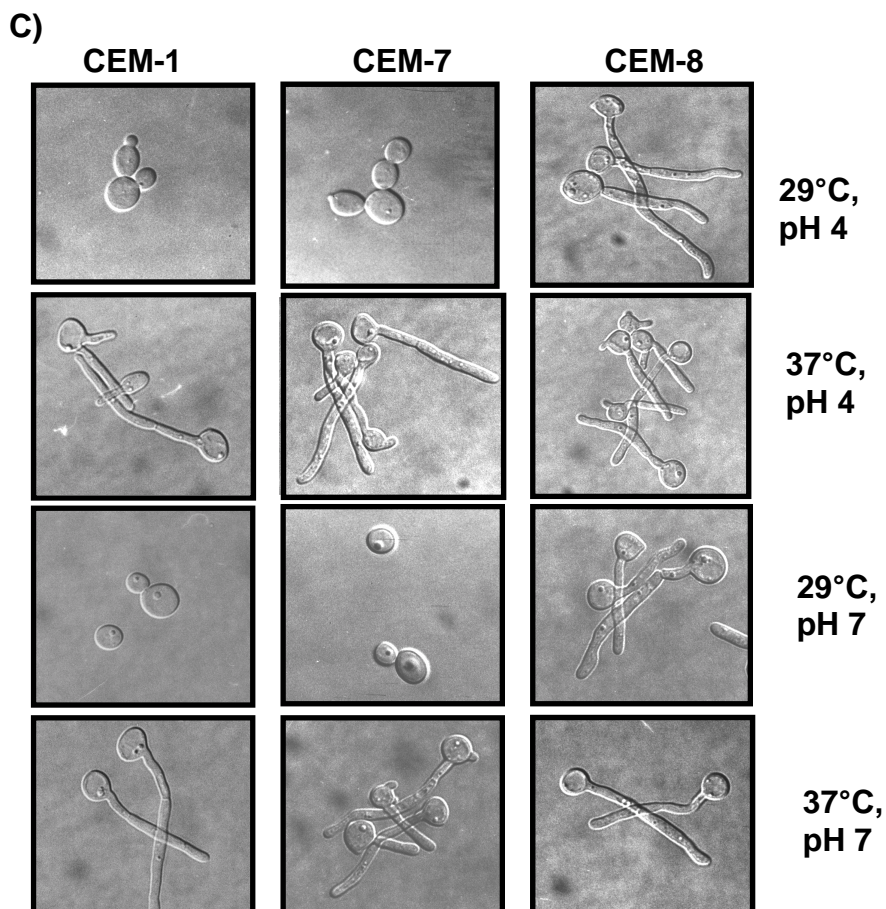


Abb. 13. B) Effekt multipler *RIM101-1426*-Kopien. A) Gleiche Mengen genomischer DNA von CEM-8 [*RIM101*/*(RIM101-1426)_n≥3*], CEM-7 (*RIM101*/*RIM101-1426*/*RIM101-1426*) und des Vorläuferstammes CEM-1 (*RIM101*/*RIM101-1426*) wurden mit *Pst*I verdaut. Der Southern-Blot wurde anschliessend mit einem 2,9 Kb *RIM101*-Fragment hybridisiert. 1 Kb-Signal in Spur 1 und 2 weist auf eine Integration des transformierten Plasmids pEM-16-1 ins Genom von CEM-1. Die starke Intensität der 1 Kb und die zusätzliche Bande bei ca. 9 Kb von CEM-8 deuten auf eine Tandemintegration des Plasmids pEM-16-1.



C) Morphologie von CEM-1, CEM-7 und CEM-8 nach Überimpfen von Übernachtskulturen in Medium199 pH 4 oder pH 7 und Inkubation bei 29°C oder 37°C für 3 h. Nur CEM-8, welcher multiple *RIM101-1426*-Kopien enthält vermag bei pH 4 und 29°C zu filamentieren.

Um die Anzahl der für die Suppression benötigten *RIM101*-Kopien näher zu bestimmen, wurde ein Stamm konstruiert, der nur zwei mutierte *RIM101*-Allele, aber kein wildtypisches Allel enthielt. Dieser Stamm, CEM-10, wurde durch Transformation von CEM-5U mit dem Plasmid pEM-16-1 geschaffen. Der *ura3Δ*-Stamm CEM-5U war ein Derivat des Uridin-prototrophen Stammes CEM-5A und wurde durch Selektion auf Uridin- und 5-Fluoroorotidinsäure-haltigen Platten isoliert. CEM-10 zeigte nur bei 37°C die Fähigkeit zu filamentieren. Die Analyse 11 weiterer CEM-10 analoger Klone, ergab das gleiche Ergebnis. Aus diesen Daten konnte die Schlussfolgerung gezogen werden, dass mehr als zwei Kopien von *RIM101-1426* erforderlich sind, um das nötige Temperatursignal für die Filamentierung zu supprimieren.

Weiterhin wurde getestet, ob multiple Kopien des wildtypischen *RIM101*-Gens ebenfalls eine Filamentierung bei niedrigeren Temperaturen induzieren können. Plasmid pEM31-1, welches das wildtypische *RIM101*-Allel aus der *phr2Δ*-Revertante CEM-1 enthielt, wurde in die Stämme CAF3-1 (*uraΔ PHR2/PHR2*) und CFM-4 (*uraΔ phr2Δ*) transformiert. Mit Hilfe des Southern-Blots wurden Transformanten identifiziert, die ein bzw. mehrere Plasmide in ihr Genom aufgenommen hatten. Alle CAF3-1- und CFM-4-Transformanten, welche multiple Kopien des wildtypischen Allels in das Genom integriert hatten, zeigten in Filamentierungsversuchen Hyphenbildung bei 29°C. Die Länge und die Menge der Hyphen repräsentativer Transformanten, CAF3-31-2 und CEM-31-2, unter diesen Bedingungen unterschied sich nicht signifikant von den Hyphen von CEM-8, welches mehrere *RIM101-1426* Kopien enthielt. Im Gegensatz zu CEM-8 erfolgte die Filamentierung von CAF3-31-2 und CEM-31-2 bei niedriger Temperatur nur bei pH 7 und nicht bei pH 4.

Als Kontrolle, dass diese Suppression nicht von Vektorsequenzen oder vom Selektionsmarker herrührte, wurde das Basisplasmid pSM2, welches kein *RIM101* bzw. *RIM101-1426* enthielt, in CAF3-1 und CEM-1 transformiert. Hyphenbildung von Transformanten mit mehreren pSM2-Kopien, bezeichnet als CAF3-pSM2 und CEM-1-pSM2, war auf 37°C beschränkt. In Anbetracht dieser Ergebnisse liess sich feststellen, dass sowohl multiple Kopien des wildtypischen, als auch des mutierten *RIM101*-Allels die für die Filamentierung erforderliche Umgebungstemperatur von 37°C partiell

supprimieren konnten. Die Suppression des Temperatursignals durch *RIM101* war im Gegensatz zu *RIM101-1426* auf neutrale pH-Werte beschränkt.

3.3 Wechselwirkung von *RIM101* mit Signaltransduktionskaskaden der Morphogenese

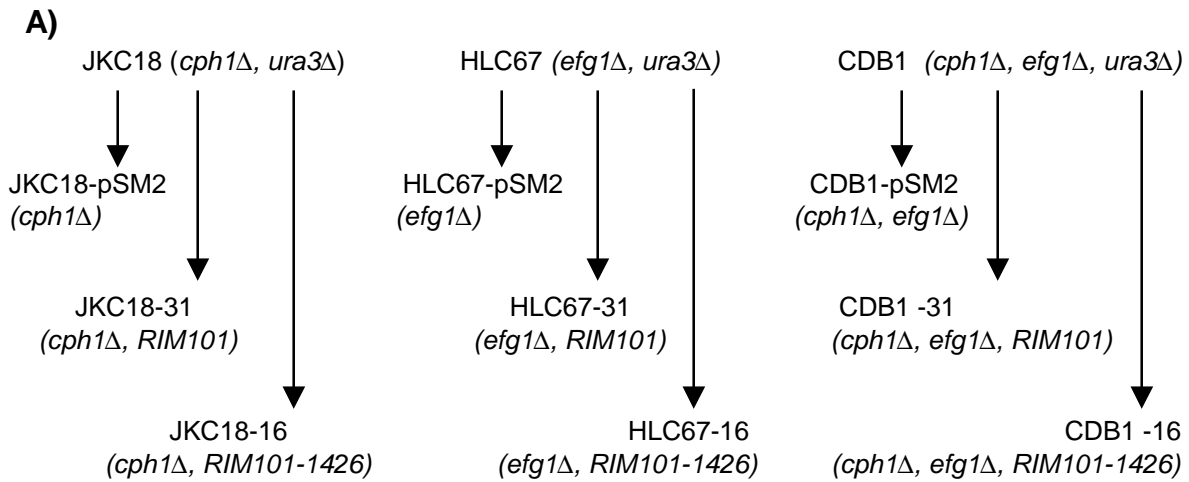
In *C. albicans* wurden bisher zwei Signaltransduktionswege beschrieben, die für die Morphogenese dieser pathogenen Hefe eine erhebliche Bedeutung haben. Dies sind einerseits eine cAMP-abhängige Kaskade und andererseits die MAP-Kinase Kaskade (*mitogen-activated protein kinase*). Die Gene *EFG1* und *CPH1* kodieren für zwei wichtige Transkriptionsfaktoren, Efg1p und Cph1p, die jeweils am Ende einer der Kaskaden agieren. Efg1p agiert am Terminus der cAMP-abhängigen Signaltransduktionkaskade, wohingegen Cph1p sich am Ende der MAP-Kinase Kaskade befindet (Stoldt *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 1994). Die Inaktivierung dieser Kaskaden durch Deletion von *EFG1* und *CPH1* verursacht einen Filamentierungsdefekt unter allen üblichen hypheninduzierenden Bedingungen, wie z. B. Serum, N-Acetylglucosamin, pH 7 und 37°C. Zu dem ist diese Doppelnulldmutante im Mausmodell nicht virulent (Lo *et al.*, 1997).

Da *RIM101* in *C. albicans* wichtige Prozesse kontrolliert, wie die pH-regulierte Genexpression und die pH-abhängige Filamentierung, war die Untersuchung einer möglichen Wechselwirkung zwischen *RIM101* und *EFG1* bzw. *RIM101* und *CPH1* von Interesse. Mit Hilfe des dominant-aktiven *RIM101*-Allels konnte dies analysiert werden.

3.3.1 Wechselwirkung der *RIM101*-kontrollierten Filamentierung mit den zentralen Regulatoren des Dimorphismus *EFG1* und *CPH1*

Die Stämme JKC18 (*cph1*Δ), HLC67 (*efg1*Δ) und CDB1 (*cph1*Δ *efg1*Δ) wurden mit den Plasmiden pEM-16-1, pEM-31-1 oder pSM2 transformiert (Abb. 14a). Plasmid pEM-16-1 enthielt *RIM101-1426*, während pEM-31-1 das wildtypische *RIM101*-Allel besass. Plasmid pSM2 stellte den Basisvektor dar, der keine *RIM101*-Sequenzen enthielt.

Transformanten, welche nur eine Plasmidkopie in ihr Genom aufgenommen hatten, konnten mittels Southern-Blot-Hybridisierung identifiziert werden. Die Zellmorphologie dieser Transformanten wurde nach Inkubation in Medium199 und YNB-Medium bei pH 4 und 37°C untersucht. Wie in Abbildung 14b und 14c dargestellt, zeigte nur der mit pEM-16-1 transformierte *cph1Δ*-Stamm, JKC18-16-1, die Fähigkeit bei pH 4 und 37°C in Flüssigmedium bzw. auf Festmedium zu filamentieren. Alle anderen Transformanten waren unter diesen Kulturbedingungen nicht in der Lage, Filamente auszubilden. Daraus liess sich schliessen, dass die von *RIM101-1426* induzierte Filamentierung durch eine *efg1Δ*-Mutation verhindert wurde. Dieses Ergebnis demonstrierte, dass die *RIM101-1426*-vermittelte Filamentierung von *EFG1*, aber nicht von *CPH1*, abhängig war.



B)

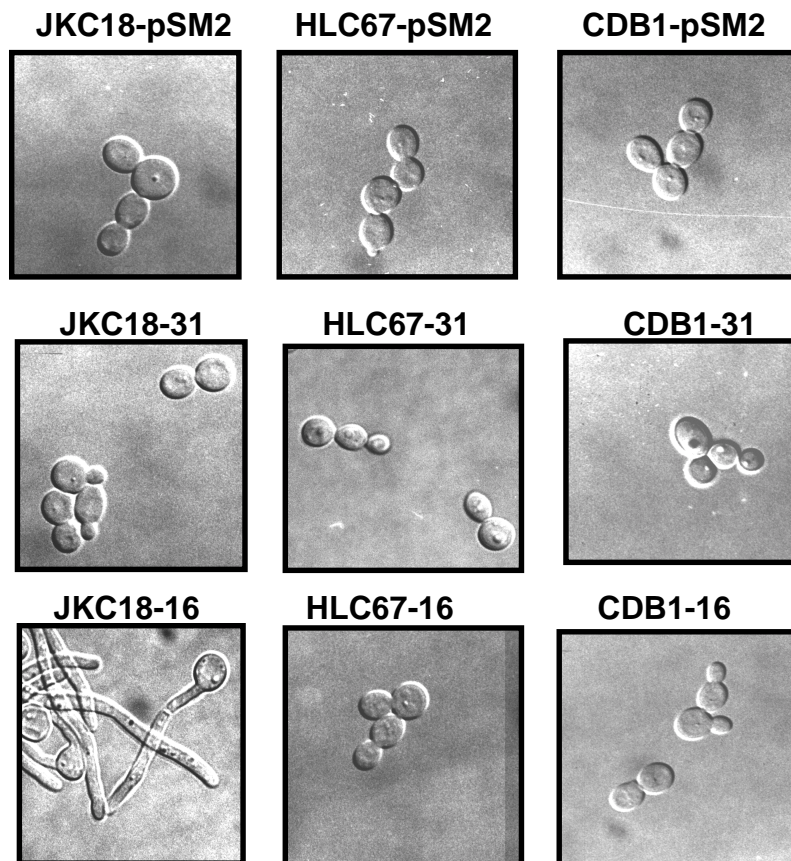


Abb. 14. Effekt von *RIM101-1426* in *efg1Δ*- und *cph1Δ*-Mutanten. A) Der relevante Genotyp angegebener Stämme ist in einem Flussdiagramm dargestellt. B) Zellmorphologie der Stämme nach Überimpfen von Übernachtskulturen in Medium199 pH 4 und Inkubation bei 37°C für 3 h.

C)

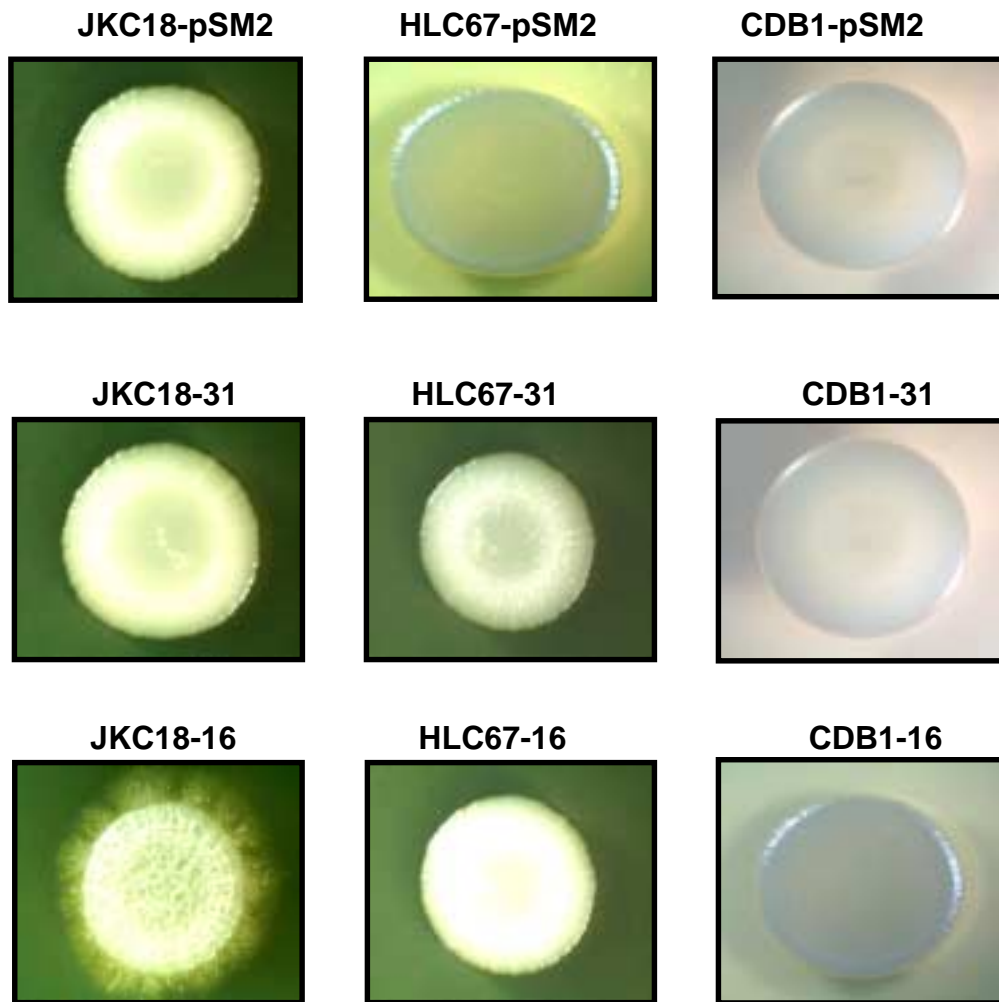


Abb. 14. C) Koloniemorphologie der aufgeführten Stämme nach sechs Tagen Inkubation auf Agarplatten mit Medium199 pH 4 bei 37°C.

3.3.2 *RIM101*-kontrollierte Genexpression ist unabhängig von *EFG1*

Die pH-regulierte Filamentierung von *C. albicans* ist *RIM101*-abhängig und benötigt *EFG1*. *RIM101* kontrolliert in *C. albicans* ausserdem die pH-regulierte Expression von *PHR1* und *PHR2*. *RIM101* induziert *PHR1* bei neutralen bis alkalischen pH-Werten, während *PHR2* unter diesen Bedingungen reprimiert wird. Inwiefern die pH-regulierte Genexpression ebenfalls von *EFG1* abhängig, konnte durch den Einsatz von *RIM101-1426* aufgeklärt werden. Das gegenüber dem wildtypischen Allel dominante und konstitutiv exprimierte *RIM101-1426* induzierte, wie oben gezeigt, *PHR1* und reprimierte *PHR2*, unabhängig vom herrschenden pH-Wert. Sollte die Induktion von *PHR1* bei pH 4 durch *RIM101-1426* von *EFG1* abhängig sein, so müsste die Expression von *PHR1* in den Stämmen HLC-16-1 (*efg1* Δ *RIM101-1426*) und CDB1-16-1 (*cph1* Δ *efg1* Δ *RIM101-1426*) bei saurem pH ausbleiben. Ist dagegen die *PHR1*-Expression unabhängig von *EFG1*, so wäre eine pH-unabhängige, konstitutive Expression von *PHR1* zu erwarten. Northern-Blot-Analysen zeigten, dass *PHR1* in den Stämmen HLC-16-1 und CDB1-16-1 bei pH 4 deutlich exprimiert wurde (Abb. 15). Zur Kontrolle wurde der Blot auch mit *HWP1* hybridisiert. *HWP1* kodiert für ein hyphenspezifisches Zellwandprotein und wird abhängig von *EFG1* exprimiert (Staab *et al.*, 1999; Sharkey *et al.*, 1999). Aus diesen Ergebnissen liess sich schliessen, dass die für den pH-regulierten Dimorphismus notwendige Wechselwirkung von *RIM101* und *EFG1*, für die pH-abhängige Genexpression in *C. albicans* nicht erforderlich war.

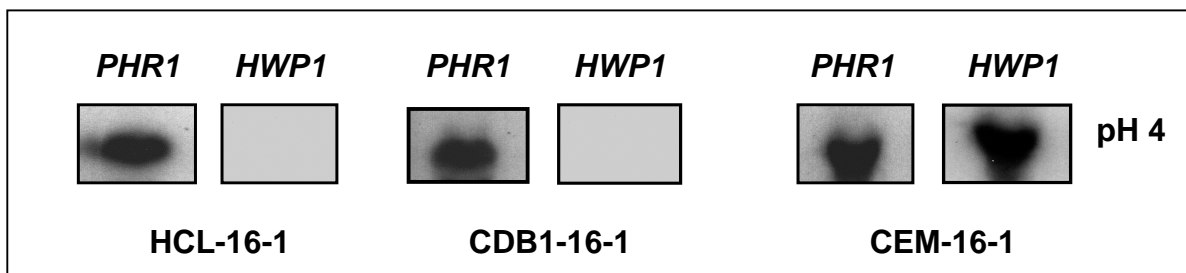


Abb. 15. Effekt von *EFG1* auf die *RIM101-1426*-kontrollierte Genexpression. RNA wurde aus HLC67-16-1 (*efg1* Δ *CPH1* *RIM101-1426*), CDB1-16-1 (*efg1* Δ *cph1* Δ *RIM101-1426*) und CEM-16-1 (*EFG1* *CPH1* *RIM101-1426*) nach Inkubation in Medium199 pH 4 isoliert. Northern-Blot wurde mit *PHR1* oder *HWP1* hybridisiert. *PHR1*-Expression ist unabhängig von *EFG1*.

3.4 *lacZ* als Reporter für die Genexpression in *Candida glabrata*

Die *Candida*-Spezies *C. albicans* und *C. glabrata* sind als opportunistische Krankheitserreger in der Lage, diverse Gewebe und Organe zu besiedeln und zu infizieren. Das Überleben in den unterschiedlichen Wirtsnischen erfordert daher eine hohe Anpassungsfähigkeit. Auf bestimmte Umweltbedingungen, wie pH-Wert oder Serum, reagiert *C. albicans*, wie oben bereits beschrieben, mit der differentiellen Expression bestimmter Gene, welche zum Überleben des Keimes beitragen. Die Genregulation in *C. albicans* wurde in den letzten Jahren intensiv erforscht, was zum näheren Verständnis der Biologie und Pathogenität dieses Keimes führte. Dagegen ist über die differentielle Genexpression in der klinisch zunehmend wichtigen Spezies *C. glabrata* kaum etwas bekannt. Die Untersuchung der regulierten Genexpression in *C. glabrata* könnte ebenfalls wichtige Aspekte der Biologie und Pathogenität dieser Hefe aufklären.

Da für die Untersuchung der Genregulation und der Identifizierung differentiell exprimierter Gene der Einsatz von Reportergenen sehr nützlich ist, wurde im Rahmen dieser Arbeit die Etablierung eines geeigneten Reportersystems für *C. glabrata* angestrebt. Das *lacZ*-Gen von *E. coli* kodiert für das Enzym β -Galaktosidase und wird als Reportergen in diversen Prokaryonten und Eukaryonten eingesetzt. In *C. albicans* ist der *lacZ*-Reporter aufgrund eines veränderten Codongebrauchs dieser Hefe nicht funktional. *C. albicans* übersetzt das CUG-Codon als Serin anstatt Leucin (Santos *et al.*, 1993). Im Gegensatz zu *C. albicans* wurde in *C. glabrata* die heterologe Genexpression mehrfach demonstriert (Zhou *et al.*, 1994; Kitada *et al.*, 1995; Macreadie *et al.*, 1994). Die Funktionalität und Induzierbarkeit des *lacZ*-Gens als Reporter für die Genexpression in *C. glabrata* wurde daraufhin getestet. Zudem sollten *C. glabrata* / *E. coli* Shuttle-Vektoren entwickelt werden, die für die Konstruktion translationeller Genfusionen zum *lacZ*-Gen verwendet werden können.

3.4.1 Konstruktion von *C. glabrata* Shuttle-Vektoren

Durch Modifikation von *S. cerevisiae*-Vektoren wurden Plasmide konstruiert, die in *C. glabrata* stabil episomal repliziert werden und nur in geringer Kopienzahl pro Zelle vorkommen.

Myers *et al.* (1986) konstruierten für *S. cerevisiae* drei Vektoren, Ylp356R, Ylp357R und Ylp358R, welche das *E. coli lacZ*-Gen beginnend mit dem achten Codon enthalten. Um die Konstruktion translationeller Fusionen zum *lacZ* zu ermöglichen, wurde die *Polylinker*-Region aus dem Plasmid pUC18 stromaufwärts des Reportergens kloniert. Die Plasmide Ylp356R, Ylp357R und Ylp358R unterscheiden sich hierbei nur durch eine Phasenkorrektur zwischen der *EcoRI*-Schnittstelle der *Polylinker*-Region und dem achten Codon des *lacZ*. Alle Plasmide enthalten als Selektionsmarker das *URA3* von *S. cerevisiae* (Myers *et al.*; 1986).

Um die *S. cerevisiae* Vektoren in *C. glabrata* einzusetzen wurde hier eine *C. glabrata* *CEN-ARS*-Kassette in diese Plasmide kloniert. *CEN-ARS*-Plasmide werden in *C. glabrata* episomal repliziert und bei der Zellteilung gleichmässig auf die Tochterzellen verteilt. Sie kommen auch unter nicht selektiven Bedingungen in gleichbleibender Anzahl von ein bis zwei Kopien pro Zelle vor (Kitada *et al.*, 1996). Diese Eigenschaften der *CEN-ARS*-Plasmide erlauben daher eine zuverlässige Analyse der regulierten Genexpression.

Unter Einsatz der Primer ME10 und ME11 und des Plasmids pCgACH3 (Kitada *et al.*, 1996) als *Template* wurde ein 0,9 Kb *CEN-ARS*-Fragment mittels PCR amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde in den TA-Cloning-Vektor pCR2.1 kloniert. Das hieraus resultierte Plasmid pEM11 wurde mit *Pst*I verdaut, wodurch die *CEN-ARS*-Sequenz freigesetzt wurde. Die *CEN-ARS*-Kassette wurde anschliessend in die *Pst*I-Schnittstelle von Ylp356R, Ylp357R und Ylp358R kloniert. Die daraus entstandenen Plasmide wurden als pEM12, pEM13 und pEM14 bezeichnet (Abb. 16). Diese Plasmidkonstrukte enthalten mehrere singuläre Restriktionsschnittstellen, die für translationelle Fusionen zum *lacZ*-Reportergen benutzt werden können (Abb. 17, Tabelle 1).

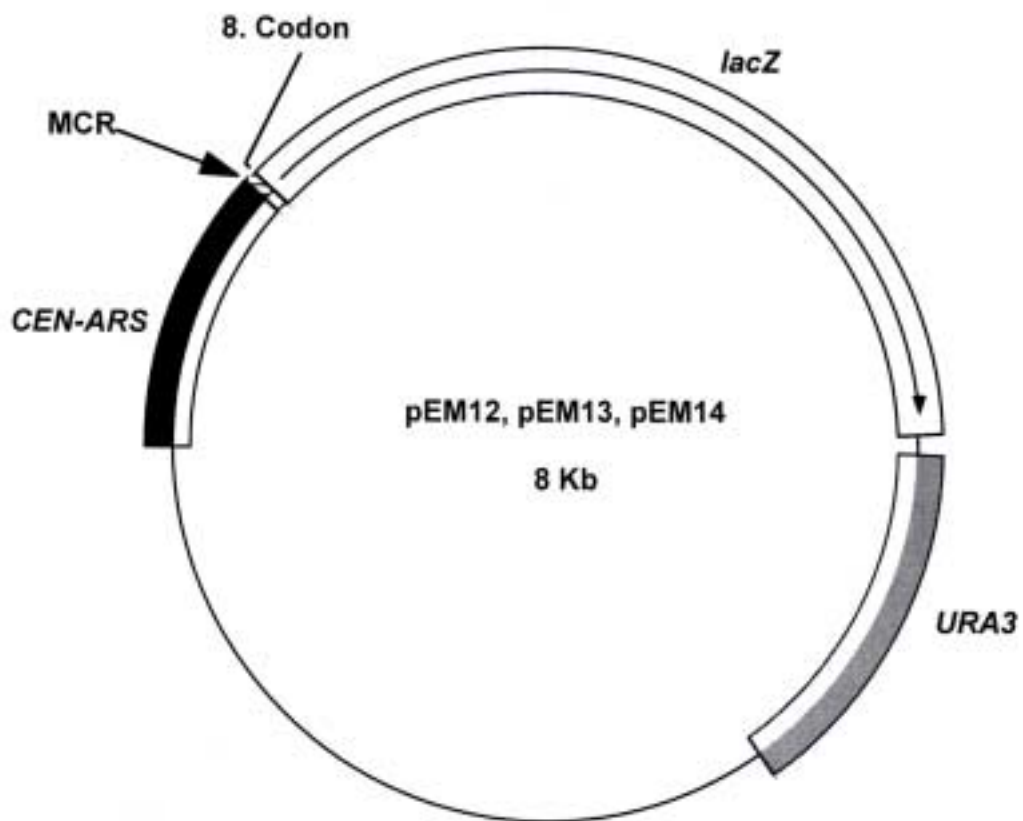


Abb. 16. Aufbau der *C. glabrata* Shuttle-Vektoren pEM12, pEM13 und pEM14. Alle Plasmide enthalten die CEN-ARS-Kassette von *C. glabrata*, die multiple Klonierungsregion (MCR) von pUC18, das *lacZ* von *E. coli* und das *URA3*-Gen von *S. cerevisiae* als Selektionsmarker.

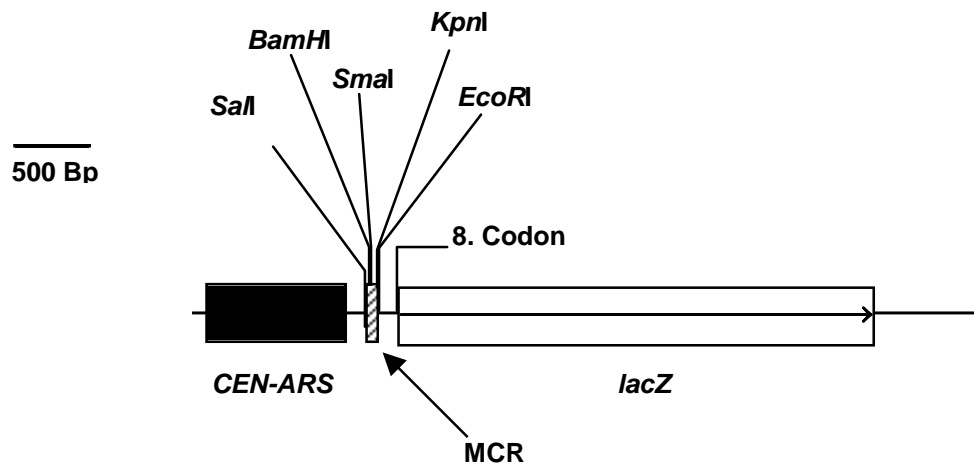


Abb. 17. Die multiple Klonierungsregion (MCR) der Plasmide pEM12, pEM13 und pEM14 ist im Detail gezeigt. Geninsertionen in die angegebenen singulären Restriktionsschnittstellen können zu translationellen Fusionen zum *lacZ* führen.

Tabelle 1: Sequenz der multiplen Klonierungsregion (MCR) der *C. glabrata* Vektoren

Vektoren	Sequenz und Leseraster der MCR
pEM12	5'-GT CGA CTC TAG AGG ATC CCC GGG TAC CGA GCT CGA ATT CCC AGC TTC GAT CCC -3'
pEM13	5'-GTC GAC TCT AGA GGA TCC CCG GGT ACC GAG CTC GAA TTC CCA GCT TGC GAT CCC -3'
pEM14	5'-G TCG ACT CTA GAG GAT CCC CGG GTA CCG AGC TCG AAT TCC CAG CTT GCT CCC -3'

5'- SalI* - XbaI - BamHI - SmaI - KpnI - SacI - EcoRI - 3'

Unterstrichene Restriktionsenzyme schneiden in den Plasmiden nur einmal. Fettgedruckte Codons kennzeichnen das 8. Codon des *E. coli lacZ*-Gens. *Klonierung in die *SalI*-Schnittstelle des Plasmids pEM12 führt zu einem TAG-Stopcodon in der *XbaI*-Schnittstelle der MCR.

3.4.2 Konstruktion translationeller Fusionen zum *lacZ*-Reporter gen und Expression von β -Galaktosidase in *C. glabrata*

Um die Funktionalität des *E. coli lacZ*-Gens in *C. glabrata* zu überprüfen, wurde eine translationelle Fusion zum *HIS3*-Gen von *C. glabrata* konstruiert. *HIS3* wird konstitutiv exprimiert und kodiert für das essentielle Enzym Imidazolglyzerolphosphat-Dehydratase (Kitada *et al.*, 1995). Das Plasmid pCgACH3 wurde mit *PvuII* und *XhoI* verdaut, wodurch ein 207 Bp Fragment, welches den Promotor und die ersten 14 Codons des *HIS3* enthielt, freigesetzt wurde. Dieses Fragment wurde anschliessend in die *SalI/SmaI*-Schnittstellen von pEM12, pEM13 und pEM14 kloniert. Die aus dieser Klonierung resultierten Plasmide wurden als pEM15, pEM16 und pEM17 bezeichnet. Durch Sequenzierung konnte eine *inframe* Fusion zwischen *HIS3* und *lacZ* in pEM15 festgestellt werden, während pEM16 und pEM17 keine *inframe* Fusionen enthielten. Um die Funktionalität des *lacZ*-Reporter gens zu testen, wurden pEM15, pEM16 und pEM17 in den Stamm *C. glabrata 2001TU* transformiert, und mit den repräsentativen Klonen CgpEM15, CgpEM16 und CgpEM17 ein qualitativer β -Galaktosidaseaktivitätstest auf X-Gal-Indikatorplatten durchgeführt. Alle Stämme zeigten keine β -Galaktosidaseaktivität auf diesen Agarplatten. In einem Filterassay zeigte CgpEM15, welcher die *HIS3-lacZ inframe* Fusion enthielt, enzymatische Aktivität, während CgpEM16 und CgpEM17 in diesem Test negativ waren (Abb. 18). Dieses Ergebnis demonstrierte, dass die Reporter genfusion exprimiert wurde und dass die β -Galaktosidase von *E. coli* in *C. glabrata* enzymatisch aktiv war.

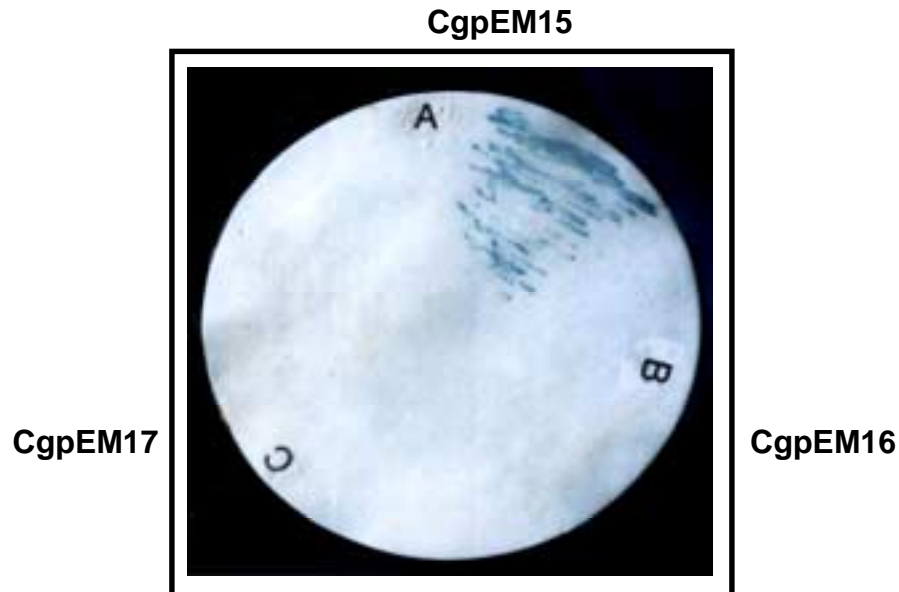


Abb. 18. Qualitativer β -Galaktosidasetest mit den Stämmen CgpEM15, CgpEM16 und CgpEM17. Die Stämme wurden auf Whatmanfilter ausgestrichen und auf YNB-Agarplatten über Nacht inkubiert. Die Zellen auf dem Filter wurden anschliessend schockgefroren und auf einen zweiten Filter plaziert, der zuvor in Z-Puffer+X-Gal getränkt war.

Induzierbare Promotoren sind ein wichtiges Mittel zur Untersuchung der Qualität bestimmter Reportergene. Mit Hilfe solcher Promotoren kann untersucht werden, ob ein Gen als Reporter für die Analyse von Induktion und Repression und zur Aufklärung von Mechanismen, welche Genaktivität regulieren, eingesetzt werden kann.

Um zu untersuchen, ob das bakterielle *lacZ* als Reporter für die Genexpression in *C. glabrata* eingesetzt werden kann, wurde dieses unter der Kontrolle eines regulierbaren Promotors gebracht. Das *MTII*-Gen von *C. glabrata* kodiert für ein Metallothionein und wird in Abhängigkeit der Cu^{2+} -Ionenkonzentration exprimiert (Mehra *et al.*, 1989). Ein 527 Bp-Fragment, das den Promotor und die ersten sieben Codons des *MTII*-Gens enthielt, wurde in der PCR mit Hilfe der *Primer* ME18 und ME19 und genomischer DNA von *C. glabrata* ATCC 2001 amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde anschliessend in pCR2.1 kloniert und aus diesem mittels *Bam*HI- und *Kpn*I-Verdau freigesetzt. Das aus

diesem Verdau hervorgegangene 521 Bp-Fragment wurde in die *Bam*HI und *Kpn*I-Restriktionsstellen von pEM13 kloniert, wodurch Plasmid pEM21 hervorging. Durch Sequenzierung konnte die *MTII-lacZ inframe* Fusion in pEM21 bestätigt werden. Die Plasmide pEM13 und pEM21 wurden daraufhin in *C. glabrata TU2001* transformiert. Die repräsentativen Transformanten CgpEM13 und CgpEM21 wurden anschliessend mit Hilfe des Filterassays auf β -Galaktosidaseaktivität getestet. CgpEM21 zeigte in Anwesenheit von 100 μ M CuSO₄ binnen weniger Minuten nach Exposition zum Substrat eine enzymatische Aktivität, während in CgpEM13, welches nur das promotorlose *lacZ*-Gen enthielt, keine β -Galaktosidaseaktivität detektiert werden konnte (Abb. 19). In Abwesenheit von CuSO₄ besass CgpEM21 auch nach längerer Exposition keine β -Galaktosidaseaktivität.



Abb. 19. Qualitativer β -Galaktosidasetest mit den Stämmen CgpEM21 und CgpEM13. Die Stämme wurden auf 100 μ M CuSO₄-enthaltende Agarplatten inkubiert.

In einem quantitativen β -Galaktosidaseaktivitätstest wurde die enzymatische Aktivität in Abhängigkeit unterschiedlicher CuSO_4 -Konzentration gemessen. Die β -Galaktosidaseaktivität stieg mit höherer CuSO_4 -Konzentration an (Abb. 20). Diese Daten korrelierten mit der von Mehra *et al.* (1989) beschriebenen kupfer-induzierten Synthese der *MTII*-mRNA, die mit Hilfe von Northern-Blot-Verfahren festgestellt wurde. Diese Resultate zeigten die Funktionalität der bakteriellen β -Galaktosidase als Reporter für die Genexpression in *C. glabrata*.

β -Galaktosidaseaktivität (Units)

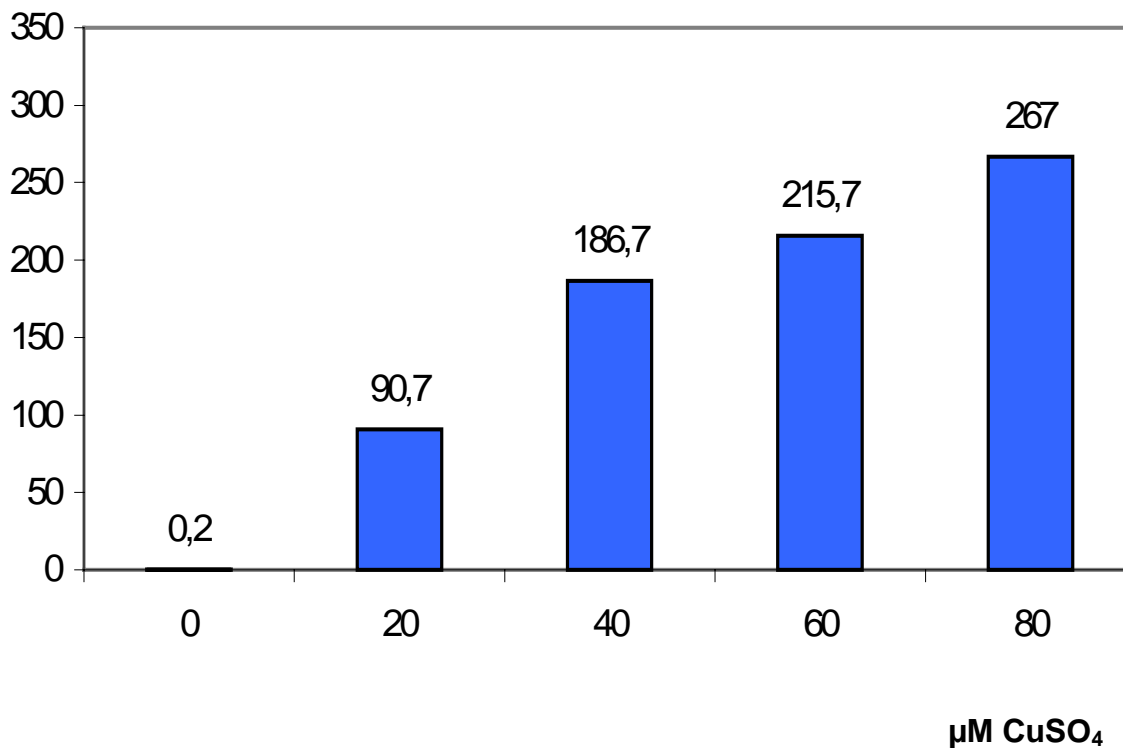


Abb. 20. Quantitativer β -Galactosidasetest. Stamm CgpEM21 wurde in YNB-Flüssigmedium mit fünf verschiedenen CuSO_4 -Konzentrationen (0, 20, 40, 60 und 80 μM) inkubiert. Die quantitative β -Galactosidaseaktivität wurde durch photometrische Messung der Hydrolyse des Substrats ONPG bestimmt (Guarente, 1983). Das Diagramm zeigt, dass die β -Galactosidaseaktivität in Abhängigkeit der CuSO_4 -Konzentration induziert wird. Diagramm zeigt den Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten.

4 Diskussion

4.1 Charakterisierung von *Candida albicans phr2Δ*-Revertanten

Im Rahmen dieser Arbeit wurden spontane Revertanten isoliert, die den Wachstumsdefekt und Morphologiedefekt von *phr2Δ*-Mutanten bei saurem pH-Wert supprimierten. Die Revertanten wurden mit einer Frequenz von $1,5 \times 10^{-7}$ bei Exposition gegenüber dem pH-Wert 4 isoliert. Das zu *PHR2* funktional homologe Gen *PHR1*, welches normalerweise bei pH-Werten unter 5.5 nicht transkribiert wird, wurde in diesen Revertanten auch bei pH 4 exprimiert. Die aberrante Expression von *PHR1* war für die Suppression des Wachstumsdefektes und Morphologiedefektes bei pH 4 verantwortlich. Sequenzveränderungen in der Promotorregion von *PHR1*, welche für das atypische Expressionsmuster dieses Gens hätten verantwortlich sein können, wurden nicht identifiziert. Der zweite wichtige Phänotyp der Revertanten war ihre Fähigkeit, bei sauren pH-Werten und einer Umgebungstemperatur von 37°C zu filamentieren. Die *phr2Δ*-Revertanten folgten somit nicht dem von Buffo *et al.* (1984) beschriebenen pH-regulierten Dimorphismus, wonach *C. albicans* nur bei neutralen pH-Werten und einer Umgebungstemperatur von 37°C filamentös wächst. Im Gegensatz zur Wachstumsfähigkeit bei pH 4 war *PHR1* für dieses atypische Filamentierungsverhalten der Revertanten nicht verantwortlich.

4.1.1 Heterozygote dominant-aktive Mutation im *RIM101*-Lokus

Die oben beschriebenen Beobachtungen führten zu der Annahme, dass vermutlich eine Mutation in einem anderen genomischen Lokus als in *PHR1* stattgefunden hat, welche für die phänotypischen Merkmale der Revertanten verantwortlich ist. Es wurde daraufhin die Hypothese aufgestellt, dass wahrscheinlich eine Mutation in dem putativen Regulatorgen *RIM101* aufgetreten ist. Dieses Gen spielt sowohl für die pH-induzierte Filamentierung, als auch für die pH-abhängige Genexpression eine bedeutende Rolle (Ramon *et al.*, 1999; Davis *et al.*, 2000). Mehrere Gründe führten zu der Vermutung, dass eine heterozygote, dominante Mutation in *RIM101* für beide Phänotypen verantwortlich sein könnte. Erstens, die Frequenz der Revertanten war viel höher als für eine homozygote, rezessive Mutation zu erwarten wäre. Zweitens, die UV-Behandlung der Revertanten resultierte in einer hochfrequenten

Rückmutation, die zur Wiederherstellung der Phänotypen des Vorläuferstammes führte (Mühlschlegel und Fonzi, nicht veröffentlichte Daten). Drittens, dominant-aktive Mutationen wurden bisher auch in den *RIM101*-homologen Genen *pacC* von *Aspergillus nidulans* und *YIRIM101* von *Yarrowia lipolytica* beschrieben. Diese Mutationen verursachen in diesen Spezies eine veränderte Genexpression (Tilburn *et al.*, 1995; Lambert *et al.*, 1997).

Die molekulargenetische Untersuchung unabhängiger *phr2Δ*-Revertanten zeigte, dass jede von ihnen tatsächlich eine heterozygote, dominant-aktive Mutation im *RIM101*-Lokus besitzt. Hierbei handelte es sich um Substitutionsmutationen, die in der Nähe des 3'-Endes lokalisiert waren. Sie führten im offenen Leseraster von *RIM101* zu einem frühzeitigen Stopcodon. Die mutierten *RIM101*-Allele der Revertanten kodierten für Genprodukte mit 475 bis 583 Aminosäuren, wohingegen das wildtypische *RIM101* für ein Protein mit 661 Aminosäuren kodiert. Die Genprodukte der mutierten *RIM101*-Allele enthielten somit im Vergleich zum Genprodukt des wildtypischen Gens carboxy-terminale Verkürzungen von 12 bis 28%. Die Expression der mutierten Allele *RIM101-1426* oder *RIM101-1751* in *C. albicans* führte zur konstitutiven Expression von *PHR1*, zur konstitutiven Repression von *PHR2* und zu filamentösem Wachstum bei pH 4 und 37°C. Diese Ergebnisse zeigten, dass *RIM101* sowohl für die pH-abhängige Genexpression, als auch für den pH-regulierten Dimorphismus das Schlüsselement darstellt.

4.2 *RIM101* ist vermutlich autoreguliert

Rim101p von *C. albicans* besitzt Sequenzhomologien zu den Zinkfinger-Transkriptionsfaktoren PacC von *A. nidulans*, Rim101p von *Saccharomyces cerevisiae* und YIRim101p von *Y. lipolytica*. Die grösste Sequenzhomologie zwischen *C. albicans* Rim101p und diesen Transkriptionsfaktoren liegt innerhalb der Zinkfingerdomäne (Ramon *et al.*, 1999). Diese Domäne besteht aus drei Zinkfingern der Klasse Cys₂-His₂, welche für die Bindung an die DNA verantwortlich sind (Espeso *et al.*, 1997). Der hohe Grad der Konservierung dieser Domäne lässt vermuten, dass diese Proteine die gleiche DNA-Bindungsstelle erkennen. Für PacC ist dieses DNA-Motif bereits gut charakterisiert und enthält die Konsensussequenz 5'-GCCAAG-3'. Diese Konsensussequenz kommt ebenfalls in der Promotorregion von *pacC* vor. Durch Bindung an dieser Sequenz ist PacC in der Lage seine eigene

Expression zu induzieren (Tilburn *et al.*, 1995; Espeso und Peñalva, 1996; Espeso *et al.*, 1997). Mehrere PacC-Bindungsstellen sind auch in der Promotorregion von *YIRIM101* vorhanden, was vermuten lässt, dass YIRim101p ebenfalls seine eigene Expression steuert (Lambert *et al.*, 1997). Zwei Beobachtungen deuten daraufhin, dass Rim101p von *C. albicans* ebenfalls autoreguliert ist. Erstens, das *RIM101* von *C. albicans* besitzt zwei PacC-Konsensussequenzen stromaufwärts des kodierenden Bereiches (Ramon *et al.*, 1999). Zweitens, konnte hier gezeigt werden, dass das konstitutiv aktive Rim101p-475, welches durch *RIM101-1426* kodiert wird, eine starke Transkription von *RIM101* bei pH 4 verursacht. Im Wildtyp dagegen wird *RIM101* bei sauren pH-Werten nur sehr schwach exprimiert.

4.3 Rim101p wird vermutlich durch Prozessierung aktiviert

Der Transkriptionsfaktor PacC von *A. nidulans* wird als 678 Aminosäuren enthaltendes Vorläuferprotein synthetisiert und bei alkalischen pH-Werten aktiviert. Die Aktivierung geschieht durch proteolytische Spaltung, welche ca. 90 Aminosäuren stromabwärts der Zinkfingerdomäne vorgenommen wird (Orejas *et al.*, 1995; Espeso *et al.*, 2000). Die aktive Form des PacC-Proteins wird somit durch Entfernung von ca. 60 % des Gesamtproteins hergestellt. Die aktive Form von Rim101p von *S. cerevisiae* entsteht ebenfalls durch proteolytische Entfernung des Carboxy-Terminus. Hierbei wird 10 % des inaktiven primären Translationsproduktes C-terminal abgespalten (Li und Mitchell, 1997). Espeso *et al.* (2000) konnten zeigen, dass der C-Terminus für die pH-abhängige Aktivierung von PacC notwendig ist, da dieser die Verfügbarkeit der proteolytischen Stelle kontrolliert. Bei alkalischen pH-Werten nimmt das PacC-Protein eine Konformation ein, welche die proteolytische Spaltung des Proteins erlaubt. Dagegen besitzt das Protein bei der Inkubation im sauren Milieu eine Konformation, die eine proteolytische Spaltung verhindert.

Das aktivierte PacC induziert bei alkalischen pH-Werten *alkalisch-exprimierte* Gene, während es *sauer-exprimierte* Gene reprimiert (Tilburn *et al.*, 1995). Mutationen, welche eine vorzeitige Termination und Verlust des C-Terminus von PacC verursachen, resultieren in einer proteolytischen Aktivierung, welche unabhängig des pH-Wertes ist (Mingot *et al.*, 1999). Solche Mutationen können eine konstitutive Expression *alkalisch-exprimierter* und eine konstitutive Repression *sauer-exprimierter* Gene verursachen (Tilburn *et al.*, 1995). Ähnliche Effekte verkürzter Allele des

RIM101 von *S. cerevisiae* und *YIRIM101* von *Y. lipolytica* wurden beobachtet (Li und Mitchell, 1997; Lambert *et al.*, 1997).

Die in der vorliegenden Arbeit aufgeführten Ergebnisse zeigen, dass Mutationen, welche zu einem frühzeitigen Stopcodon in *C. albicans RIM101* führen, die konstitutive Expression *alkalischexprimierter* Gene (*PHR1*) und die konstitutive Repression *sauerexprimierter* Gene (*PHR2*) verursachen. Dies deutet daraufhin, dass *RIM101* von *C. albicans* analog zu *pacC* von *A. nidulans* und *YIRIM101* von *Y. lipolytica* ist.

Die Proteolyse von PacC ist abhängig von den Genen, *paIA*, *-B*, *-C*, *-F*, *-H* und *-I*. Zwei *pal*-homologe Gene wurden bisher in *C. albicans* identifiziert. *RIM8* und *RIM20* besitzen signifikante Sequenzhomologien zu *palF* und *paIA* von *A. nidulans*. Mehrere Aspekte weisen daraufhin, dass *RIM101*, *RIM8* und *RIM20* der selben pH-Regulationskaskade angehören. Erstens, *rim101Δ*-, *rim8Δ* und *rim20Δ*-Mutanten besitzen *in vitro* die gleichen Phänotypen (Porta *et al.*, 1999; Davis *et al.*, 2000). Zweitens, *rim101Δ*- und *rim8Δ*-Mutanten zeigten in systemischen Infektionsmodellen und in *in situ*-Experimenten nahezu die gleichen Defekte (Davis *et al.*, 2000a). In dieser Regulationskaskade scheint das *RIM101* stromabwärts von *RIM8* und *RIM20* zu agieren und wird vermutlich von diesen prozessiert. Für diese Annahme spricht, dass Defekte der *rim8Δ*-Mutante und der *rim20Δ*-Mutante durch ein trunkiertes Rim101p komplementiert werden (Davis *et al.*, 2000; Davis *et al.*, 2000a).

Der putative zentrale Regulator *RIM101* kontrolliert neben der pH-abhängigen Expression bestimmter Gene das filamentöse Wachstum von *C. albicans* bei neutralen pH-Werten (Ramon *et al.*, 1999; Davis *et al.*, 2000). Die Fähigkeit von *RIM101-1426* und *RIM101-1751* die pH-abhängige Filamentierung von *C. albicans* zu supprimieren deutet daraufhin, dass die Aktivierung von Rim101p der limitierende Faktor für das filamentöse Wachstum bei sauren pH-Werten darstellt.

In einer von Davis *et al.* (2000) veröffentlichten Arbeit wurde durch *site*-spezifische Mutagenese eine *Nonsense*-Mutation nach dem 462. Codon des offenen Leserasters von *RIM101* eingeführt. Diese Mutation verursachte in *C. albicans* die konstitutive Expression von *PHR1*, wohingegen keine Filamentierung bei sauren pH-Werten zu beobachten war. *RIM101-1426*, welches für ein Protein mit 475 Aminosäuren kodiert (Rim101p-475), verursachte dagegen sowohl eine konstitutive Expression von *PHR1*, als auch filamentöses Wachstum bei sauren pH-Werten.

Allel-spezifische Variationen im Phänotyp wurden ebenfalls für PacC-Mutationen beschrieben (Tilburn *et al.*, 1995; Mingot *et al.*, 1999). Diese Ergebnisse führten zu der Annahme, dass zwischen Codon 462 und Codon 475 von *RIM101* eine für die Induktion der Filamentierung bei sauren pH-Werten essentielle Sequenz vorhanden ist. Die Analyse dieser Sequenz zeigte, dass in diesem Abschnitt kein bekanntes Motiv vorhanden ist, welches Aufschluss über die Funktion dieses Sequenzbereiches hätte geben können. Die Ursache für diesen entscheidenden Unterschied im Phänotyp von Rim101p-462 und Rim101p-475 könnte auf mehrere Gründe zurückzuführen sein. Erstens, die Aminosäuresequenz 462 bis 475 von Rim101p könnte durch Aktivierung bestimmter Zielgene einen direkten Effekt auf das filamentöse Wachstum bei pH 4 haben. Zweitens, dieser Sequenzbereich könnte für die Einnahme einer spezifischen Proteinkonformation, welche für die Aktivierung von Stromabwärtskomponenten erforderlich ist, essentiell sein. Drittens, Zinkfinger-Transkriptionsfaktoren sind oftmals erst nach Bildung von Homo- bzw Heterodimeren in der Lage bestimmte Gene zu aktivieren oder zu reprimieren (Lodish *et al.*, 1995). Die Sequenz zwischen Codon 462 und Codon 475 könnte für die Bildung solcher Dimere notwendig sein.

Im Gegensatz zur Filamentierung verursacht sowohl Rim101p-462, als auch Rim101p-475 eine konstitutive Expression von *PHR1*. Dies zeigt, dass stromabwärts von Codon 462 liegende Sequenzen für die pH-abhängige Genexpression nicht von Bedeutung sind.

4.4 Suppression des Temperatursignals durch Überexpression von *RIM101*

C. albicans wächst normalerweise bei neutralem pH-Wert und einer Temperatur von 37°C als Hyphenpilz. Eine Verminderung der Temperatur unter 34°C verursacht das Wachstum in der Hefeform (Buffo *et al.*, 1984). Hier konnte festgestellt werden, dass multiple *RIM101*-Kopien als Suppressor dieses Temperatursignals wirken. Die Präsenz von vier oder mehr Kopien des wildtypischen oder mutierten *RIM101*-Allels erlaubten eine extensive Filamentierung auch bei Temperaturen unter 30°C. Die Suppression des Temperatursignals durch *RIM101* war im Gegensatz zur Suppression durch *RIM101-1426* auf neutrale pH-Werte beschränkt. Die Umgehung dieses notwendigen Temperatursignals könnte ein direkter Effekt sein, wenn die Stabilität von Rim101p oder seine proteolytische Aktivierung normalerweise bei

Temperaturen unter 34°C limitierend ist. Alternativ könnten höhere Rim101p-Mengen die temperaturabhängige Expression von Komponenten, die in dieser Regulationskaskade stromabwärts eine Rolle spielen, supprimieren und somit zu filamentösem Wachstum bei niedriger Temperatur führen.

Wie oben bereits beschrieben, erfordert die durch neutrale pH-Werte induzierte Filamentierung eine Umgebungstemperatur von 37°C. Die Suppression dieses Temperatursignals durch multiple *RIM101*-Kopien zeigt, dass die beiden Umweltsignale pH-Wert und Temperatur zumindest partiell auf die Expression der selben Gene wirken können. Die Integration beider Umweltsignale könnte für die Etablierung einer Infektion und dem Überleben von *C. albicans* im oder ausserhalb des Wirtsorganismus von Bedeutung sein.

4.5 Wechselwirkung von *RIM101* mit *EFG1*

In *C. albicans* wurden bisher zwei Signaltransduktionswege beschrieben, welche für die Morphogenese dieser pathogenen Hefe eine erhebliche Bedeutung haben. Die Transkriptionsfaktoren Efg1p und Cph1p stellen zwei wichtige Komponenten dar, die jeweils am Ende der cAMP-abhängigen Signaltransduktionkaskade bzw. der MAP-Kinase Kaskade agieren (Stoldt *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 1994). Das Ausschalten dieser Kaskaden durch Deletion von *EFG1* und *CPH1* verursacht unter allen üblichen hypheninduzierenden Bedingungen eine Blockade der Filamentierung (Lo *et al.*, 1997).

Hier wurde untersucht, ob eine Wechselwirkung von *RIM101* mit diesen wichtigen Signaltransduktionswegen besteht. Es konnte festgestellt werden, dass die *RIM101*-induzierte Filamentierung abhängig von *EFG1*, aber nicht von *CPH1* ist. Im Gegensatz zur *cph1*-Deletion verhinderte eine *efg1*-Deletion das Auslösen filamentösem Wachstums durch *RIM101-1426* bei einem pH-Wert von 4. Anhand dieses Ergebnisses lässt sich jedoch keine Aussage über die Art der Interaktion zwischen *RIM101* und *EFG1* machen. *RIM101* und *EFG1* könnten parallel oder in einer gemeinsamen Regulationskaskade agieren. Wenn *RIM101* und *EFG1* der selben Kaskade angehören, so sollte *EFG1* stromabwärts von *RIM101* fungieren. Sonneborn *et al.* (2000) konnten zeigen, dass *EFG1* in der cAMP-abhängigen Kaskade stromabwärts von *TPK2* liegt. Dieses Gen kodiert für eine Untereinheit einer cAMP-abhängigen Proteinkinase. Das Rim101p von *S. cerevisiae* enthält eine

signifikante Erkennungssequenz für solche Proteinkinasen (Su und Mitchell., 1993). Diese spezifische Erkennungssequenz ist zwar in Rim101p von *C. albicans* nicht enthalten, jedoch existieren in diesem Protein zwei andere Sequenzen, welche potentielle Phosphorylierungsstellen für cAMP-abhängige Proteinkinasen darstellen. Diese Sequenzen befinden sich an den Positionen 236-239 und 290-293 der Aminosäuresequenz. Dies könnte eine mögliche regulatorische Verbindung zwischen *TPK2*, *RIM101* und *EFG1* darstellen.

Im Gegensatz zur *RIM101*-induzierten Filamentierung hatte die *efg1*-Nullmutation keinen Einfluss auf die *RIM101-1426*-induzierte Expression von *PHR1*. Dies bedeutet, dass im Gegensatz zum pH-regulierten Dimorphismus die pH-abhängige Genexpression unabhängig von *EFG1* ist.

Die hier und durch andere präsentierten Daten zeigen, dass *RIM101* der entscheidende Regulator des pH-regulierten Dimorphismus und der pH-abhängigen Expression von *PHR1* und *PHR2* ist (Abb. 21). Ferner ist aus den hier präsentierten Daten zu schliessen, dass die *RIM101*-kontrollierte Expression von *PHR1* und *PHR2* und die *RIM101*-induzierte Filamentierung voneinander unabhängige Prozesse darstellen. *PHR1* und *PHR2* üben somit keinen direkten Effekt auf die Hefe-Hyph-Transition von *C. albicans* aus. Der Einfluss dieser Gene auf die morphologische Flexibilität von *C. albicans* ist eher indirekt, da sie an der Bildung einer intakten Pilzzellwand beteiligt sind (Fonzi, 1999; Mouyna *et al.*, 2000), welche für die Integrität und Stabilität von *C. albicans* unter den verschiedenen Wachstumsformen essentiell ist (Chaffin *et al.*, 1998).

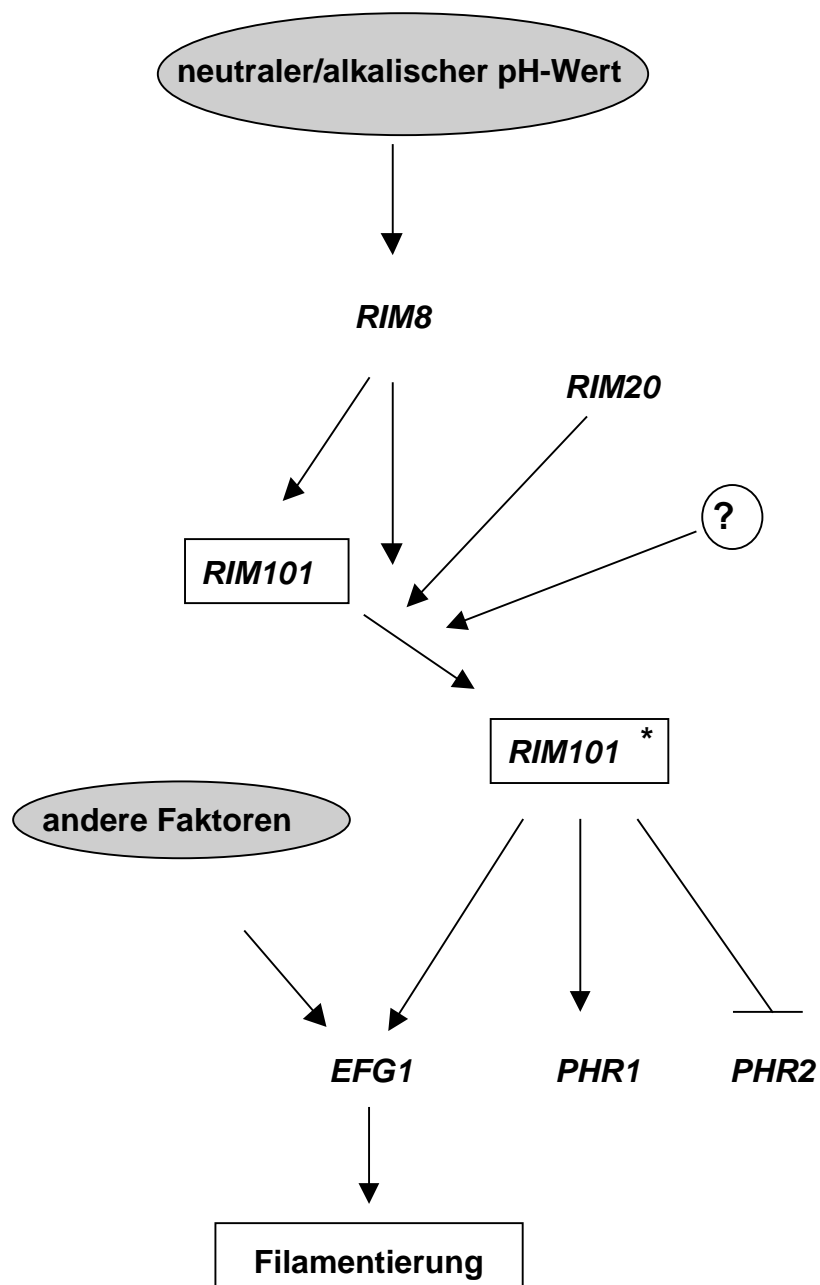


Abb. 21. Das Modell zeigt eine putative pH-Regulationskaskade in *C. albicans*. Neutraler oder alkalischer pH-Wert induziert die Aktivierung von *RIM101* über eine Signalkaskade, welche u. a. *RIM8* und *RIM20* enthält. Die aktive Form *RIM101*^{*} reguliert die Expression von *PHR1* und *PHR2* und kontrolliert den pH-regulierten Dimorphismus in Abhängigkeit von *EFG1*.

rim101Δ-Mutanten sind im Gegensatz zum Wildtyp nicht in der Lage, auf serumhaltigen Festmedien oder bei pH 7 und 37°C zu filamentieren (Ramon *et al.*, 1999). *C. albicans* ist im menschlichem Blut solchen Milieubedingungen ausgesetzt. Kürzlich konnte tatsächlich gezeigt werden, dass *RIM101* auch *in vivo* eine bedeutende Rolle einnimmt (Davis *et al.*, 2000a). *rim101Δ*-Mutanten zeigten im systemischen Infektionsmodell einen deutlichen Virulenzdefekt. Ferner wurde festgestellt, dass diese Mutanten auch *in vivo* einen Filamentierungsdefekt besitzen. Bemerkenswert ist zudem die Beobachtung, dass solche Mutanten in *in situ*-Experimenten im Vergleich zum Wildtyp nur eine geringfügige Schädigung von Endothelzellen verursachen konnten (Davis *et al.*, 2000a). Dies könnte auf eine schwächere Expression bestimmter Enzyme, wie z. B. Proteinasen, zurückzuführen sein. Diese Vermutung wird durch zwei Tatsachen bekräftigt. Erstens, die Deletion von *SAP2*, welches für die sezernierte Aspartyl-Proteinase Sap2 kodiert, führt zu einem ähnlichen Defekt in der Zerstörung von Endothelzellen (Ibrahim *et al.*, 1998). Zweitens, die *RIM101*-homologen Gene *pacC* von *A. nidulans* und *YIRIM101* von *Y. lipolytica* regulieren die Expression einiger Proteinasen (Tilburn *et al.*, 1995; Lambert *et al.*, 1997). In *C. albicans* sind bisher mehrere sekretierte Proteinase beschrieben, welche von der *SAP*-Genfamilie kodiert werden. Einige dieser Proteinase scheinen zumindest partiell in Abhängigkeit des pH-Wertes exprimiert zu werden (Hube *et al.*, 1994, White und Agabian, 1995, Monod *et al.*, 1998).

Interessanterweise kommt es bei der Infektion saurer Wirtsnischen zu einer starken Filamentierung von *C. albicans* (De Bernardis *et al.*, 1998). Dies deutet daraufhin, dass in sauren Wirtsnischen Rim101p für die morphologische Flexibilität entweder keine Bedeutung hat, oder dass alternative Umweltsignale die Aktivierung von Rim101p auslösen. Vaginale Infektionsversuche mit *rim101Δ*-Mutanten könnten zur Aufklärung dieser Fragestellung beitragen.

4.6 Das *lacZ*-Gen als Reportersystem für *Candida glabrata*

Das Überleben in den unterschiedlichen Wirtsnischen verlangt von *C. albicans* ein hohes Maß an Anpassungsvermögen. Die differentielle Expression bestimmter Gene, wie z. B. *RIM101*, *PHR1*, *PHR2*, welche für das Überleben unter verschiedenen Milieubedingungen notwendig ist, wurde in *C. albicans* in den letzten

Jahren intensiv untersucht, was zum näheren Verständnis der Biologie und Pathogenität dieses Keimes führte. *Candida glabrata* ist wie *C. albicans* ein opportunistischer Krankheitserreger, der in der Lage ist diverse Gewebe und Organe zu kolonisieren und zu infizieren (Pfaller *et al.*, 1999). Die differentielle Genexpression in dieser klinisch zunehmend wichtigen Spezies wurde im Vergleich zu *C. albicans* bisher kaum untersucht.

Zur Untersuchung der Genregulation bzw. Genexpression ist der Einsatz von Reporter Genen sehr nützlich. Ferner können anhand von Reporter-Genbanken differentielle exprimierte Gene identifiziert werden. Für *C. albicans* wurden in den letzten Jahren mehrere Reportersysteme entwickelt, welche für die Analyse differentielle exprimierter Gene eingesetzt werden können (Leuker *et al.*, 1992; Myers *et al.*, 1995; Cormack *et al.*, 1997; Morschhäuser *et al.*, 1998; Morschhäuser *et al.*, 1999). Im Gegensatz zu *C. albicans* sind bisher für *C. glabrata* keine geeigneten Reportersysteme beschrieben worden. Das *E. coli lacZ*-Gen wurde hier als Reporter für die Genexpression in *C. glabrata* untersucht. Anhand verschiedener Genfusionen konnte die Funktionalität und Induzierbarkeit dieses Reporters in *C. glabrata* gezeigt werden. Zu dem wurden *C. glabrata* / *E. coli Shuttle*-Vektoren entwickelt, welche für die Konstruktion translationeller Genfusionen zum *lacZ*-Gen verwendet werden können.

4.7 Ausblick

Das *RIM101*-Gen hat sowohl für die Biologie, als auch für die Pathogenität von *C. albicans* eine besondere Bedeutung. In Zukunft wird es von Interesse sein, Gene zu identifizieren, welche *RIM101*-abhängig reguliert werden. Mit Hilfe moderner Methoden wie 2D-Gelelektrophorese, RT-PCR, *Microarray*technologien oder *in vivo* Expressionstechnologien (IVET) könnten solche Gene identifiziert und charakterisiert werden. Hierfür wäre der Einsatz von *C. albicans*-Stämmen, die ein oder mehrere dominant-aktive *RIM101*-Gene enthalten sehr nützlich. Potentielle Virulenzdeterminanten könnten dadurch identifiziert werden und neue Erkenntnisse über die Regulation bereits bekannter Pathogenitätsfaktoren gewonnen werden.

Die Zelloberfläche von *C. albicans* stellt eine für die Pilz-Wirt-Interaktion wichtige Struktur dar. Das *RIM101* kontrolliert ausser der Expression von *PHR1* und *PHR2*, auch die Expression von *PRA1* (Davis *et al.*, 2000). Dieses Gen kodiert für ein in der

Zelloberfläche lokalisiertes, pH-reguliertes Antigen. Die Deletion dieses Gens, das vermutlich bei der Pilz-Wirt-Interaktion eine Rolle spielt, führt zu Defekten in der Morphologie (Sentandreu *et al.*, 1998). Womöglich ist *RIM101* an der Genregulation weiterer Zelloberflächenproteine beteiligt, welche wichtige Funktionen in der Wirt-Pilz-Wechselwirkung haben könnten. Von Interesse ist daher die Isolierung wichtiger Zelloberflächenkomponenten oder von Genen die an der Zellwandsynthese beteiligt sind. Die Identifizierung und Charakterisierung solcher Komponenten könnte erstens, zum besseren Verständnis der Pilz-Wirt-Interaktion und zweitens, zur Erschließung möglicher Antimykotika-Zielstrukturen führen.

Um weitere Kenntnisse über die Biologie und Pathogenität der klinisch zunehmend wichtigen Spezies *C. glabrata* zu gewinnen, ist es notwendig Gene zu identifizieren, welche für das Überleben im Wirtsorganismus und für die Virulenz dieses Keimes eine wichtige Rolle spielen. Mit Hilfe des hier entwickelten Reportersystems kann in Zukunft die Regulation bestimmter Gene von *C. glabrata* untersucht werden. Ferner können zur Identifizierung differentiell exprimierter Gene von *C. glabrata* Reportergerbanken erstellt und analysiert werden.

5 Material und Methoden

5.1 Geräte

Brutschränke	KB 500 (Heraeus, Hanau)
Elektrophoresekammern	DNA Subcell™ (BioRad, München) Agagel Maxi (Biometra, Göttingen)
Elektroporationsgeräte	Gene Pulser™ (BioRad, München) Pulse Controller™ (BioRad, München)
Gel-Dokumentationssystem	MidiDoc (Herolab, Wiesloch)
Hybridisierungsöfen	Hybaid (Biometra, Göttingen)
Kühlschränke	Liebherr
Metallblock-Thermostat	Typ 2099/DA (Liebisch, Bielefeld)
Mikroskope	Aristoplan und DMRB (Leica, Bensheim) Dialux 22 HY-100/8 (Leitz, Wetzlar)
Schüttelinkubatoren	G24 und G76 (New Brunswick Scientific, Edison, New Jersey, USA)
Sequenzierapparatur	ABI Prism™ Sequencer 377 (Perkin Elmer, Weiterstadt)
Spannungsgeräte	Electrophoresis Power Supply E431 (Consort, Turnhout, Belgien) Power Supply 200/2.0 (BioRad, München)
<i>Speed Vac®Plus</i>	SC110A (Savant, New York)
Spektralphotometer	U-2000 (Hitachi, San Jose, CA, USA)
Szintillationszähler	Tri-Carb 2100 TR (Canberra-Packard, Dreieich)
<i>Thermocycler</i>	T3 (Biometra, Göttingen)
<i>UV Crosslinker</i>	Stratalinker® 1800 (Stratagene Europe, Amsterdam, Niederlande)
Vortexer	REAX 2000 (Heidolph, Kehlheim)
Waagen	Feinwaage R160P und PT120 (Sartorius, Göttingen)
Wasserbäder	verschiedene Hersteller
Zentrifugen	EBA12/12R und MikroRapid/K (Hettich, Tuttlingen) Biofuge <i>Pico</i> (Heraeus, Hanau)

Omnifuge2.0 RS (Heraeus, Hanau)

Kühlzentrifuge RC-5B (Sorvall Heraeus, Hanau)

5.2 Verbrauchsmaterial

Blottingpapier (Hartenstein, Würzburg)

Bottle-Top-Filter (Hartenstein, Würzburg)

Deckgläser (Hartenstein, Würzburg)

dicke und dünne Rundfilter Ø 82 mm (Schleicher & Schuell, Dassel)

Einmal-Filterhalter FP (Schleicher & Schuell, Dassel)

Elektroporationsküvetten, 0,2 cm (Eurogentec, Seraing, Belgien)

Falcon-Röhrchen 10 ml (Becton-Dickinson, Heidelberg)

Nylonmembran HybondN (Amersham Pharmacia, Freiburg)

Objektträger (Hartenstein, Würzburg)

Reaktionsgefäße 0,5 ml, 1,5 ml, 2,0 ml (Sarstedt, Nümbrecht)

RNase-freie Reaktionsgefäße 1,5 ml (Ambion, Austin, USA)

Röntgenfilm Hyperfilm™-MP (Amersham Pharmacia, Freiburg)

Spritzen und Kanülen (Becton-Dickinson, Heidelberg)

Petrischalen (Sarstedt, Nümbrecht)

Zentrifugengefäße 15 ml und 50 ml (Greiner Labortechnik, Frickenhausen)

5.3 Chemikalien, Medien, Reaktionskits und Enzyme

Die verwendeten Chemikalien, Medien, Reaktionskits und Enzyme wurden von den folgenden Firmen bezogen.

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

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

5.4 Lösungen und Puffer

50 mM CuSO₄-Lösung

Denaturierungspuffer (pH 12,0)

1,5 M NaCl

0,5 M NaOH

DNA-Auftragspuffer

1 % Bromphenolblau

1 % Xylencyanol

0,5 M EDTA

add. Glycerin

1 M DTT-Stammlösung

3,09 g DTT (Dithiothreitol)

in 20 ml 0,01 M NaAc pH 5,2

5-FOA (5-Flouoorotidinsäure)

Stammlösung 50 mg/ml,

Arbeitskonzentration 1 mg/ml

Hybridisierungspuffer (MONOD)

7 % SDS

0,5 M NaH₂PO₄, pH 7,4

1 mM EDTA

(Vor Gebrauch auf 65°C erwärmen.)

Hybridisierungs-Waschpuffer

2 x SSC

0,1 % SDS

(Vor Gebrauch auf 65°C erwärmen.)

0,5 M Kaliumphosphat-Lösung pH 7,5

aus K₂HPO₄ und KH₂PO₄ zusammengesetzt

10 x Lithiumacetat

1 M Lithiumacetat, pH 7,5

10 x MOPS

41,8 g MOPS

51 mM NaAc

107,5 mM NaOH

10 mM EDTA

pH 7, add. 1 l DEPC-H₂O

(Alle Stocklösungen werden in DEPC-H₂O angesetzt)

Neutralisationspuffer

1,5 M NaCl

1 M Tris

Mit HCl auf pH 8 einstellen.

ONPG (O-Nitrophenyl-β-D-galaktosid)

4 mg/ml-Stocklösung

in 0,1 M Kaliumphosphat, pH 7,5 gelöst und bei -20°C gelagert.

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

50 % Glycerin

0,01 % Bromphenolblau

in DEPC-H₂O

RNA-Premix

100 µl 10 x MOPS

175 µl Formaldehyd 37%

500 µl Formamid

SOC-Medium

20 g Bacto Tryptone (2 %)

5 g Bacto Yeast Extract (0,5 %)

0,58 g NaCl (10mM)

0,19 g KCl (2,5mM)

2,03 g MgCl₂ · 6 H₂O (10mM)

2,46 g MgSO₄ · 7 H₂O (10mM)

3,96 g Glucose (20mM)

add. 1 l H₂O

20 x SSC

3 M NaCl

0,5 M Natriumcitrat

pH 7 einstellen

10x TE-Puffer

10 mM Tris-HCl pH 8,0

1 mM EDTA

10 x TAE

48,5 g Tris

27,2 g Natriumacetat-3 H₂O

0,38 g EDTA-Na₂

pH 8 mit Essigsäure einstellen, add. 1l

Tryptophan

Stammlösung 100 mg/ml,

Arbeitskonzentration 40 µg/ml

Uridin

Stammlösung 100 mg/ml,

Arbeitskonzentration 25 µg/ml

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

20 mg/ml- und 400 mg/ml-Stocklösung

in Dimethylformamid gelöst und bei -20°C unter Lichtausschluss gelagert.

10 x Z-Puffer

16,1 g Na₂HPO₄-7 H₂O

5,5 g NaH₂PO₄-H₂O

0,75 g KCl

0,246 g MgSO₄-7 H₂O

2,7 ml 2-Mercaptoethanol

add. 1 l H₂O

5.5 Bakterienkulturen

5.5.1 *E. coli*-Stämme

DH5α (Hanahan, 1983)

F⁻ *endA1 hsdR17*(r_k⁻, m_k⁻) *supE44 thi-1 λ⁻ recA1 gyrA relA1 Δ(lacIZYA-argF)*U169
*deoR*Φ80*lacZΔM15*

TOP10 (Invitrogen)

F⁻ *mcrA* *endA1* $\Delta(mrr\text{-}hsdRMS\text{-}mcrBC)$ $\Phi80d\text{lacZ}\Delta M15$ ΔlacX74 *recA1* *deoR*
arabD139 $\Delta(\text{ara-leu})7697$ *galU* *galK* *rpsL* (Str^R) *endA1* *nupG*

XL1-Blue MRF' (Stratagene)

$\Delta(mcrA)$ 183 $\Delta(mcrBC\text{-}hsdSMR\text{-}mrr)$ 173 *endA1* *supE44* *thi-1* *recA1* *gyrA96* *relA1* *lac*
[F' *proAB lacI^qZ* $\Delta M15$ Tn5(Kan^R)]

5.5.2 Nährmedien**LB-Medium**

1 % Bacto-Trypton

0,5 % Hefeextrakt

1 % NaCl

LB-Agar

LB-Medium mit 1,5 % Agar

5.5.3 Kulturbedingungen

E. coli wird auf LB-Agar oder in LB-Medium angereichert. Die Inkubationen finden bei 37°C im Schüttler statt. Bei rekombinanten Bakterienstämmen mit einem Ampicillin-Resistenzgen werden zur Selektion 100 µg/ml des Antibiotikums dem Medium zugesetzt.

5.6 *Candida*-Stämme

5.6.1 *Candida albicans*-Stämme

Stamm	Genetische Eigenschaften	Referenz
SC5314	Wildtyp	Gillum <i>et al.</i> , 1984
CAF3-1	<i>ura3Δ</i>	Fonzi and Irwin 1993
CAS10	<i>ura3/URA3 phr1/PHR1</i>	Saporito-Irwin <i>et al.</i> ; 1995
CFM-2	<i>phr2Δ</i>	Mühlschlegel und Fonzi 1997
CFM-4	<i>phr2Δ ura3Δ</i>	Mühlschlegel und Fonzi 1997
CFM-5	<i>phr2Δ (pBSK-TEF1pr::PHR1-URA3)</i>	Mühlschlegel und Fonzi 1997
CEM-1	<i>RIM101-1426/RIM101 phr2Δ ura3Δ</i>	diese Arbeit
CEM-2	<i>RIM101-1751/RIM101 phr2Δ</i>	diese Arbeit
CEM1-pSMS23	<i>RIM101-1426/RIM101 phr2Δ ura3Δ (pBSK+-phr1Δ::hisG-URA3)</i>	diese Arbeit
CEM-5	<i>RIM101-1426/rim101 phr2Δ</i>	diese Arbeit
CEM-5U	<i>RIM101-1426/rim101 phr2Δ ura3Δ</i>	diese Arbeit
CEM-6	<i>rim101-1426/RIM101 phr2Δ</i>	diese Arbeit
CEM-7	<i>(pBSK+-RIM101-1426-URA3) RIM101-1426/RIM101 phr2Δ</i>	diese Arbeit
CEM-8	<i>(pBSK+-RIM101-1426-URA3)_{n>2} RIM101-1426/RIM101 phr2Δ</i>	diese Arbeit
CEM-10	<i>(pBSK+-RIM101-1426-URA3) RIM101-1426/rim101 phr2Δ</i>	diese Arbeit
CEM-16-1	<i>(pBSK+-RIM101-1426-URA3) RIM101/RIM101 phr2Δ</i>	diese Arbeit
CEM-31-1	<i>(pBSK+-RIM101-URA3) RIM101/RIM101 phr2Δ</i>	diese Arbeit
CEM-31-2	<i>(pBSK+-RIM101-URA3)_{n>2} RIM101/RIM101 phr2Δ</i>	diese Arbeit
CEM-16-3	<i>(pBSK+-RIM101-1751-URA3) RIM101/RIM101 phr2Δ</i>	diese Arbeit
CAF3-16-1	<i>(pBSK+-RIM101-1426-URA3) RIM101/RIM101</i>	diese Arbeit
CAF3-31-1	<i>(pBSK+-RIM101-URA3) RIM101/RIM101</i>	diese Arbeit
CAF3-31-2	<i>(pBSK+-RIM101-URA3)_{n>2} RIM101/RIM101</i>	diese Arbeit
CAF3-pSM2	<i>ura3Δ (pBSK+-URA3)_{n>2}</i>	diese Arbeit
CEM-1-pSM2	<i>RIM101-1426/RIM101 phr2Δ ura3Δ (pBSK+-URA3)_{n>2}</i>	diese Arbeit
JKC18	<i>cph1Δ ura3Δ</i>	Liu <i>et al.</i> , 1994
JKC18-pSM2	<i>cph1Δ (pBSK+-URA3)</i>	diese Arbeit
JKC18-16	<i>cph1Δ (pBSK+-RIM101-1426-URA3) RIM101/RIM101</i>	diese Arbeit
JKC18-31	<i>cph1Δ (pBSK+-RIM101-URA3) RIM101/RIM101</i>	diese Arbeit
HLC67	<i>efg1Δ ura3Δ</i>	Lo <i>et al.</i> , 1997
HLC67-pSM2	<i>efg1Δ (pBSK+-URA3) RIM101/RIM101</i>	diese Arbeit
HLC67-16	<i>efg1Δ (pBSK+-RIM101-1426-URA3) RIM101/RIM101</i>	diese Arbeit
HLC67-31	<i>efg1Δ (pBSK+-RIM101-URA3) RIM101/RIM101</i>	diese Arbeit
CDB1	<i>cph1Δ efg1Δ ura3Δ</i>	D. Bockmühl, Lo <i>et al.</i> , 1997
CDB1-pSM2	<i>cph1Δ efg1Δ (pBSK+-URA3) RIM101/RIM101</i>	diese Arbeit
CDB1-16	<i>cph1Δ efg1Δ (pBSK+-RIM101-1426-URA3) RIM101/RIM101</i>	diese Arbeit
CDB1-31	<i>cph1Δ efg1Δ (pBSK+-RIM101-URA3) RIM101/RIM101</i>	diese Arbeit

5.6.2 *Candida glabrata*-Stämme

Stamm	Genetische Eigenschaften	Referenz
ATCC 2001	Wildtyp	ATCC
2001 TU	<i>trpΔ uraΔ</i>	Kitada <i>et al.</i> , 1995
CgpEM12	(<i>pUC18-MCS1-lacZORF-CEN-ARS-URA3</i>) <i>trpΔ</i>	diese Arbeit
CgpEM13	(<i>pUC18-MCS2-lacZORF-CEN-ARS-URA3</i>) <i>trpΔ</i>	diese Arbeit
CgpEM14	(<i>pUC18-MCS3-lacZORF-CEN-ARS-URA3</i>) <i>trpΔ</i>	diese Arbeit
CgpEM15	(<i>pUC18-MCS1-HIS3pr::lacZORF-CEN-ARS-URA3</i>) <i>trpΔ</i>	diese Arbeit
CgpEM16	(<i>pUC18-MCS2-HIS3pr::lacZORF-CEN-ARS-URA3</i>) <i>trpΔ</i>	diese Arbeit
CgpEM17	(<i>pUC18-MCS3-HIS3pr::lacZORF-CEN-ARS-URA3</i>) <i>trpΔ</i>	diese Arbeit
CgpEM21	(<i>pUC18-MCS2-MTIIpr::lacZORF-CEN-ARS-URA3</i>) <i>trpΔ</i>	diese Arbeit

(MCS bezeichnet die multiple Klonierungsregion von pUC18. MCS1, MCS2 und MCS3 unterscheiden sich in ihrem Leseraster zum achten *lacZ*-Codon, welches gleich auf die multiple Klonierungsregion folgt. *lacZORF* steht für das *lacZ*-Gen beginnend mit dem achten Codon plus 3'-nichtkodierende Sequenz)

5.6.3 Nährmedien

YPD-Medium

2 % Glucose

2 % Pepton

1 % Hefeextrakt

YPD-Medium pH 4 oder pH 7

A) 20 g Pepton

10 g Hefeextrakt

add. 200 ml H₂O

Autoklavieren

B) 20 g Glucose

35,7 g HEPES

add. 800 ml H₂O

pH-Wert einstellen und sterilfiltrieren

A) und B) zusammengeben

YPD-Agar

YPD-Medium mit 1,5 % Agar

YNB-Medium pH 4 oder pH 7

- A) 20 g Glucose
5 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
35,7 g HEPES
add. 900 ml H_2O
pH-Wert einstellen und sterilfiltrieren
- B) 1,7 g YNB (Yeast nitrogen base)
add. 100 ml H_2O
sterilfiltrieren
- A) und B) zusammengeben

YNB-Agar

YNB-Medium mit 1,5 % Agar

Medium 199 pH 4 bis 8

9,8 g M199
35,7 g HEPES
add. 1 l H_2O
pH-Wert einstellen, sterilfiltrieren

Medium 199-Agar

Medium 199 mit 1,5 % Agar

5.6.4 Kulturbedingungen

Candida wird auf YPD-Agar durch Inkubation bei 30°C für ein bis zwei Tage angereichert. Zur Selektion bestimmter Transformanten wird *Candida* auf YNB-agar (Mangelmedium) angezüchtet. Zur Anreicherung von *ura3Δ*- bzw. *trpΔ*-Stämmen auf YNB-agar oder in YNB-Medium wird dem Medium 25 µg/ml Uridin bzw. 40 µg/ml Tryptophan zugesetzt. Bei der Kultivierung von *C. glabrata ura3Δ*-Stämmen wird mit 20 µg/ml Uracil supplementiert.

5.7 Plasmide

5.7.1 Vektoren

pBluescript®II SK(+) (von Stratagene)

Derivat des pUC19; f1 ori, ColE1 ori, *lacZ*, multiple Klonierungsregion flankiert von T3- und T7-RNA-Promotoren, Amp^R

pCR®2.1-TOPO (von Invitrogen)

linearisierter Vektor mit 3'-Thymidin-Überhängen zur Klonierung von PCR-Produkten; f1 ori, ColE1 ori, *lacZ*, multiple Klonierungsregion flankiert vom T7-RNA-Promotor, Amp^R, Kan^R

5.7.2 Rekombinante Plasmide

Plasmide	Vektoren	Funktionelle Bereiche	Referenz
pCgACH3	pUC19	<i>CEN-ARS-HIS3</i>	Kitada <i>et al.</i> , 1996
pEM11	pCR [®] 2.1	<i>CEN-ARS</i>	diese Arbeit
YIp356R	pUC18	<i>MCS1:lacZORF-URA3</i>	Myers <i>et al.</i> , 1986
YIp357R	pUC18	<i>MCS2:lacZORF-URA3</i>	Myers <i>et al.</i> , 1986
YIp358R	pUC18	<i>MCS3:lacZORF-URA3</i>	Myers <i>et al.</i> , 1986
pEM12	YIp356R	<i>MCS1:lacZORF-CEN-ARS-URA3</i>	diese Arbeit
pEM13	YIp357R	<i>MCS2:lacZORF-CEN-ARS-URA3</i>	diese Arbeit
pEM14	YIp358R	<i>MCS3:lacZORF-CEN-ARS-URA3</i>	diese Arbeit
pEM15	pEM12	<i>MCS1:HIS3pr::lacZORF-CEN-ARS-URA3</i>	diese Arbeit
pEM16	pEM13	<i>MCS2:HIS3pr::lacZORF-CEN-ARS-URA3</i>	diese Arbeit
pEM17	pEM14	<i>MCS3:HIS3pr::lacZORF-CEN-ARS-URA3</i>	diese Arbeit
pEM18	pCR [®] 2.1	<i>MTII-Promotor</i>	diese Arbeit
pEM21	pEM13	<i>MCS2:MTIIpr::lacZORF-CEN-ARS-URA3</i>	diese Arbeit
pFM5	pBSK(+)	<i>TEF1pr-URA3</i>	Mühlschlegel und Fonzi, 1997
pSMS23	pBSK(+)	<i>phr1Δ::hisG-URA3-hisG</i>	Saporito-Irwin <i>et al.</i> , 1995
pSMS43	pBSK(+)	<i>TEF1pr::PHR1-URA3</i>	Saporito-Irwin <i>et al.</i> , 1995
pARA3	pUC18	<i>rim101Δ::hisG-URA3-hisG</i>	Ramon <i>et al.</i> , 1999
pCR-16-1	pCR [®] 2.1	<i>RIM101-1426</i>	diese Arbeit
pCR-16-3	pCR [®] 2.1	<i>RIM101-1751</i>	diese Arbeit
pCR-31	pCR [®] 2.1	<i>RIM101</i>	diese Arbeit
pSM2	pBSK(+)	<i>URA3</i>	diese Arbeit
pSM4	pBSK(+)	<i>URA3-RIM101-1426</i>	diese Arbeit
pEM-16-1	pSM2	<i>URA3-RIM101-1426</i>	diese Arbeit
pEM-16-3	pSM2	<i>URA3-RIM101-1751</i>	diese Arbeit
pEM-31	pSM2	<i>URA3-RIM101</i>	diese Arbeit

5.8 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden von ARK Scientific, Darmstadt bezogen.

Primer abgeleitet von den flankierenden Sequenzen der multiplen Klonierungsregion des Vektors pCR[®]2.1-TOPO. *Primer* wurden benutzt für die Sequenzierung von klonierten DNA-Fragmenten.

M13 reverse: 5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'

T7: 5'-ATATACGACTCACTATAGGG-3'

Primer für die Amplifizierung von *CEN-ARS* aus Plasmid pCgACH3.

ME10: 5'-TTGACGTCTCTAGAAATACATAGTGAAT-3'

ME11: 5'-AACTGCAGAGCTTGATCATTTTGACCCCA-3'

Unterstrichen sind die zusätzlich in die *Primer* eingefügten *Pst*I-Schnittstellen.

Primer für die Sequenzierung der multiplen Klonierungsregion von pEM12, pEM13, pEM14.

P12-13-14: 5'-GTCGACTCTAGAGGATCCC-3'

Primer für die Amplifizierung der Promotorregion des *MTII*-Gens aus genomischer DNA von *C. glabrata*.

ME18: 5'-GACTCGGATCCGAGAAGTC-3'

ME19: 5'-AAGGTACCGACTTGTTCAGGCATTTTCG-3'

Unterstrichen ist die zusätzlich in den Primer ME19 eingefügte *Kpn*I-Schnittstelle.

Primer für die Amplifizierung des intakten *PHR1*-Allels aus CEM-1-pSMS23

PI: 5'-CAGGATGCTACTATGTAG-3'

ME13: 5'-TATTGATTGAAGCACTGC-3'

Primer für die Amplifizierung des disruptierten *PHR1*-Allels aus CEM-1-pSMS23

PI: 5'-CAGGATGCTACTATGTAG-3'

ME15: 5'-TCATGATGTATTTTCGATTC-3'

Primer für die Amplifizierung des *RIM101*-Gens von *C. albicans* aus genomischer DNA.

PRR2-3: 5'-ACGACCTTATATGCGTAATCC-3'

PRR2-4: 5'-GAACCATGTAAATAGAGAACGG-3'

Primer für die Sequenzierung des *RIM101*-Gens von *C. albicans*.

PRR2-5: 5'-GCATTTAGTAGGTAGTGTG-3'

PRR2-6: 5'-GTCAAGCTCGTCTTCTGAAG-3'

PRR2-7: 5'-CATTCATCCCGTAACATAC-3'

PRR2-8: 5'-CAGCTTCATAGATGTTACC-3'

PRR2-9: 5'-CTTCAGAAGACGAGCTTGAC-3'

PRR2-10: 5'-CACACTACCTACTAAATGC-3'

PRR2-11: 5'-CCTCAACAGCAACACCCAC-3'

PRR2-12: 5'-CTTCAAATCTTGAGGTCTC-3'

PRR2-13: 5'-GAAAGGTCCTTTCAAGTG-3'

PRR2-14: 5'-GGCTGCAGATTGAGAAGTG-3'

PRR2-15: 5'-GATGAAAGCCGGCACTGAG-3'

Primer für die Amplifizierung und Ansequenzierung des *HWP1*-Gens von *C. albicans*.

HWP1-1: 5'-ATGAGATTATCAACTGCTCAA-3'

HWP1-2: 5'-TTAGATCAAGAATGCAGCAAT-3'

Primer für die Amplifizierung des *ACT1*-Gens aus genomischer DNA von *C. albicans*.

OK1: 5'-TGTTTTCCCATCCCTCGT-3'

OK2: 5'-TTCGTCGTATTCTTGTTT -3'

5.9 DNA-Präparation

5.9.1 Schnellmethode zur Plasmid-DNA-Isolierung

Lösung 1

50 mM Glukose

25 mM Tris-HCl, pH 8

10 mM EDTA

Lösung 2

0,2 M NaOH

1 % SDS

Lösung 3

29,45 g Kaliumacetat

add. 88,5 ml H₂O

11,5 ml Essigsäure

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

In 3 ml LB-Medium wird eine Einzelkolonie eines plasmidtragenden *E. coli*-Stammes angeimpft. Die Kultur wächst über Nacht unter Selektionsdruck (z.B. durch Zugabe von Ampicillin) bei 37°C im Schüttelbad. 1,5 ml der Übernachtskultur werden bei 14000 rpm für 1 min abzentrifugiert und das Zellpellet in 100 µl Lösung 1 aufgenommen und gevortext. Nach Zugabe von 200 µl Zell-Lysis-Puffer (Lösung 2) wird die Suspension solange gemischt bis sie sich aufklart und anschliessend für 5 min auf Eis inkubiert. Darrauffolgend wird 150 µl Neutralisations-Puffer (Lösung 3) hinzugefügt und durch mehrmaliges Schwenken gemischt und anschliessend wieder auf Eis für 5 min inkubiert. Danach wird für 3 min bei 14000 rpm abzentrifugiert und 400 µl des Überstandes, der die Plasmid-DNA enthält, in neue Caps dekantiert. Anschliessend wird dieser Überstand zur Fällung der DNA mit dem 2,5-fachen Volumen 100 %igem Ethanol versetzt, 30 min bei -20°C gefällt und 15 min bei 4°C zentrifugiert. Das Sediment wird mit 70 %igem Ethanol gewaschen, in der *Speed vac*

oder bei 37°C getrocknet und in 30 µl H₂O (30 µg RNase/ml) aufgenommen. Die Menge und Qualität der Plasmid-DNA werden auf ein Agarosegel überprüft.

5.9.2 Mini-Präparation von Plasmid-DNA

Die Reinheit und Menge, der aus der Schnellmethode gewonnenen Plasmid-DNA, ist für präparatives Arbeiten und Sequenzierungen oft nicht ausreichend, so dass hier eine Präparationsmethode verwendet wird, bei der die DNA über spezielle Silicagel-Anionenaustauschersäulen aufgereinigt wird. Diese Präparation wird mit dem Plasmid-DNA-Isolierungskit *QIAprep Spin Miniprep* von Qiagen durchgeführt.

P1 (Resuspendierungspuffer)

50 mM Tris-HCl, pH 8

10 mM EDTA

100 µg/ml RNase

P2 (Lysepuffer)

200 mM NaOH

1 % SDS

N3 (Neutralisierungspuffer)

3 M Kaliumacetat, pH 5,5

PE (Waschpuffer)

1 M NaCl

50 mM MOPS, pH 7

15 % Ethanol

1,5 ml einer Übernachtskultur werden 1 min abzentrifugiert. Das Pellet wird in 250 µl P1 resuspendiert. Nach Zugabe von 250 µl P2 wird die Suspension kurz geschwenkt und 350 µl N3 hinzugegeben. Nach nochmaligem Schwenken bildet sich ein Niederschlag, der durch 10 minütiges zentrifugieren bei 14000 rpm sedimentiert wird. 800 µl des Überstandes werden in eine Silicagel-Anionenaustauschersäule pipettiert

und 1 min bei 14000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wird verworfen und 750 µl PE auf die in der Säule verbliebene Plasmid-DNA gegeben. Wiedermals wird für 1 min zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Durch nochmaliges 1 minütiges zentrifugieren wird noch verbliebene Flüssigkeit entfernt. Um die DNA zu eluieren, wird 50 µl H₂O in die Säule pipettiert und anschliessend für 1 min zentrifugiert. 1-5 ml einer Übernachtskultur werden entsprechend behandelt. Nach den Angaben des Herstellers beträgt die maximale DNA-Ausbeute 20 µg.

5.9.3 Midi-Präparation von Plasmid-DNA

Zur Präparation grösserer Mengen reiner DNA wird der QIAGEN Plasmid-DNA-Isolierungskit von Qiagen verwendet. Dieser *Kit* beruht ebenfalls wie der *Mini-kit* auf der Silicagel-Anionenaustauschersäuletechnik. Der *Kit* enthält folgende Lösungen P1 (Resuspendierungspuffer), P2 (Lysepuffer), P3 (Neutralisierungspuffer), QBT (Äquilibrierungspuffer), QC (Waschpuffer), QF (Elutionspuffer). Nach den Angaben des Herstellers beträgt die maximale DNA-Ausbeute 100 µg.

5.9.4 Präparation genomischer DNA aus *Candida*-Spezies

Folgende Lösungen sind für die DNA-Präparation erforderlich:

2M Sorbitol

Zymolase-Lösung

0,04 % Zymolase 20T (ICN Biomedicals)

1 M Sorbitol

50 mM K₃PO₄, pH 7,5

10 mM DTT

Lösung 1

50 mM EDTA

0,2 % SDS

Phenol/Chloroform (1:1)

70 und 100 %iges Ethanol

Der *Candida*-Stamm wird über Nacht in 15 ml YPD-Medium bei 30°C angezogen. Die Übernachtskultur wird bei 4000 rpm für 3 min abzentrifugiert und das Pellet in 1 ml 1 M Sorbitol aufgenommen. Nun werden die Zellen für 3 min bei 8000 rpm abzentrifugiert, in 800 µl Zymolase-Lösung resuspendiert und bei 37°C für 1,5 h geschüttelt. Durch die Zymolase wird die Zellwand abgedaut. Die Zymolase unterbricht die Zuckerpolymere der Zellwand durch Hydrolyse an der β -1,3-Glukanbindungen. Anschliessend wird die Zellsuspension bei 8000 rpm für 1 min abzentrifugiert und das Zellpellet in 1 ml 1M Sorbitol gewaschen. Nach nochmaligem Abzentrifugieren (8000 rpm, 1 min) wird das Pellet in 800 µl Lösung 1 aufgenommen und durch Vortexen vollständig gelöst. 1 ml Phenol/Chloroform (1:1) werden zugesetzt und unter Schütteln für 1 h bei 37°C inkubiert. Anschliessend wird für 3 min bei 14000 rpm abzentrifugiert und 800 µl der wässrigen Phase in ein neues Reaktionsgefäss überführt. Es folgt eine erneute Extraktion mit 1 ml Phenol/Chloroform (1:1) für 30 min bei 37°C im Schüttler. Nach 3 minütigem Abzentrifugieren bei 14000 rpm werden 400 µl der wässrigen Phase mit 1 ml eiskalten 100 %igem Ethanol versetzt und die DNA bei -20°C für 15 min gefällt. Es folgt ein 10 minütiger Zentrifugationsschritt bei 4°C und 14000 rpm. Die DNA wird dann mit 1 ml 70 %igem Ethanol gewaschen, abzentrifugiert und bei 37°C getrocknet. Die genomische DNA wird in 100 µl H₂O (30 µg RNase/ml) aufgenommen und die Menge und Qualität auf ein Agarosegel überprüft.

5.9.5 Phenolextraktion und Ethanol-fällung von DNA

Bei der Phenolextraktion und Ethanol-fällung werden Substanzen wie z.B. Proteine (Enzyme), Oligonukleotide und Puffer, die nachfolgende Reaktionen beeinträchtigen könnten, aus einem DNA-haltigen Reaktionsansatz entfernt.

Das Ausgangsvolumen wird mit H₂O auf 100 oder 200 µl aufgefüllt und mit dem gleichen Volumen Phenol-Chloroform (1:1) versetzt, gemischt und zur Phasentrennung 3 min bei 14000 rpm zentrifugiert. Die sich oben befindende wässrige, DNA-enhaltende, Phase wird abgenommen und mit einem zehntel Volumen 3 M NaAc, pH 5,2 und 2,5-fachen Volumen 100 %igem Ethanol gemischt. Anschliessend wird für 30 min bei -20°C gefällt und 15 min bei 4°C zentrifugiert. Das Pelett wird mit 70 %igem Ethanol gewaschen, in der *Speed vac* oder bei 37°C getrocknet und in H₂O aufgenommen.

5.9.6 Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Diese Methode dient der Aufreinigung bestimmter PCR- oder DNA-Spaltprodukte, um sie für Klonierungen, Sequenzierungen oder als Sonde für Hybridisierungen einzusetzen.

Zur Extraktion solcher DNA-Fragmente aus Agarosegelen wird der *QIAquick Gel Extraction kit* von Qiagen verwendet. Dieses Verfahren basiert auf der selektiven Bindung der DNA an Silikagel-Membranen in Gegenwart hoher Salzkonzentrationen. Bezüglich der Zusammensetzung der Lösungen werden vom Hersteller keine Angaben gemacht.

5.10 RNA-Präparation aus *C. albicans*

Folgende Lösungen sind für die RNA-Präparation erforderlich:

DEPC-H₂O

0,1 % DEPC (Diethylpyrokarbonat)

TES-Puffer

10 mM Tris-HCl, pH 7,5

10 mM EDTA, pH 8

0,5 % SDS

in DEPC-H₂O

saures Phenol (Roth, Karlsruhe)

Phenol/Chloroform (1:1)

70 und 100 %iges Ethanol

3M NaAc, pH 5,2

in DEPC-H₂O

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

Die Zellzahl pro ml einer 10 ml Übernachtskultur wird mit Hilfe der Zählkammer ermittelt und $4,5 \times 10^8$ Zellen in 100 ml M199 bei dem gewünschten pH-Wert angezüchtet. Die Inkubationstemperatur beträgt in der Regel 37°C, wobei die Inkubationszeit (1-3 h) vom zu untersuchenden Transkript abhängt. Die Kulturen werden für 5 min bei 4°C und 4000 rpm abzentrifugiert und das Pellet in 1 ml DEPC-H₂O resuspendiert. Nach einminütigem zentrifugieren bei 14000 rpm werden die Zellen in 600 µl TES aufgenommen und mit 600 µl saurem Phenol durch Vortexen vermischt. Anschliessend wird 1 h unter gelegentlichem Vortexen bei 65°C inkubiert. Das Eppendorfcap mit der zu isolierenden RNA wird für 10 sec in Ethanol/Trockeneis eingetaucht und 5 min bei 14000 rpm zentrifugiert. 600 µl der wässrigen Phase, welche die RNA enthält, wird mit 600 µl saurem Phenol versetzt,

gründlich gevortext und nochmals für 10 sec in Ethanol/Trockeneis getaucht und 5 min bei 14000 rpm zentrifugiert. Anschliessend werden 550 µl der wässrigen Phase mit 550 µl Phenol/Chloroform (1:1) versetzt, 2 min durch Schwenken vermischt und 1 min bei 14000 rpm zentrifugiert. Nun werden 500 µl der wässrigen Phase abgenommen und in 500 µl Phenol/Chloroform (1:1) überführt, nochmals 2 min durch Schwenken vermischt und 1 min bei 14000 rpm zentrifugiert. Für die RNA-Fällung werden 400 µl der wässrigen Phase in 1 ml eiskaltem 100 %igem Ethanol und 40 µl 3M Na-Acetat (pH 5,2) pipettiert und 1 h bei -20°C inkubiert. Anschliessend wird die RNA bei 4°C und 14000 rpm für 15 min abzentrifugiert und das Pellet mit 400 µl eiskaltem 70 %igem Ethanol gewaschen. Das Pellet wird bei 37°C luftgetrocknet und in 100 µl DEPC-H₂O aufgenommen. Die RNA wird bis zum Gebrauch bei -80°C gelagert. Die Quantität und Qualität der RNA kann mittels denaturierender Agarose-Gelelektrophorese überprüft werden.

5.11 Gelelektrophorese

5.11.1 Agarose-Gelelektrophorese

Diese Methode dient der Auftrennung und der Feststellung der Grösse von DNA-Fragmenten. Die Agarose-Gelkonzentration ist in Abhängigkeit der Grösse der zu erwartenden DNA-Fragmente zu wählen. In der Regel arbeitet man mit Agarose-Gelen einer Konzentration von 0,7-1,5 % Agarose. Je größer die zu erwartenden DNA-Fragmente sind, desto niedriger in seiner Prozentigkeit ist das Gel anzusetzen. Als Gelpuffer und Laufpuffer wird 1x TAE verwendet. Die jeweilige Agarosemenge wird in Gelpuffer durch Erhitzen in der Mikrowelle gelöst und nach Abkühlen auf ca. 50°C in horizontale Gelträger gegossen. Die zu analysierende DNA wird vor dem Auftragen mit dem Blaumarker (GEBS) versetzt. Als DNA-Grössenstandard werden je nach Grösse der DNA-Fragmente *Hind*III-geschnittene λ-DNA, die 1-kb-DNA-Ladder oder die *Smart-Ladder* verwendet. Die Elektrophorese erfolgt bei 25-150 V. Um die DNA-Banden sichtbar zu machen, wird das Gel für 10-15 min in eine Ethidiumbromid-Lösung gelegt und anschliessend unter UV-Licht (302 nm) betrachtet. Aufgrund der konstanten Menge an DNA-Grössenmarker, lässt sich die Menge der zu analysierenden DNA-Fragmente abschätzen.

5.11.2 Gelelektrophorese mit Formaldehydgelen

Die Auftrennung von RNA geschieht in einem Formaldehydgel. 10 µg RNA werden mit 15 µl *Premix*-Lösung (10x MOPS, Formaldehyd 37 %, Formamid; Verhältnis 1:1,75:5) und 3 µl RNA-Auftragspuffer versetzt. Nach 5minütiger Denaturierung bei 65°C werden die Proben in einem 1 %igen Agarosegel aufgetrennt. Das Agarosegel enthält 0,66 % Formaldehyd und 1x MOPS. Die Agarose wird in DEPC-H₂O aufgeköcht und erst nach Abkühlen auf ca. 50°C Formaldehyd und 10x MOPS hinzugefügt. Die Elektrophorese erfolgt in 1x MOPS (Laufpuffer) bei 60-80 V.

5.12 Klonierungsmethoden

5.12.1 Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Alle Enzyme werden in den vom Hersteller (NEB) beigelegten Puffern eingesetzt. Zur analytischen Spaltung von DNA inkubiert man 1-2 Stunden 1 µg DNA mit 1-2 *Units* Enzym in einem Volumen von 20 µl. In der Regel beträgt die Inkubationstemperatur 37°C. Zur Spaltung chromosomaler DNA werden 2-3 µg mit 30-50 *Units* Enzym für mehrere Stunden oder über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Reaktion beendet man durch Phenolextraktion des Restriktionsenzym oder durch Zugabe von DNA-Auftragspuffer. Es ist darauf zu achten, dass nur 1 µl Enzym pro 10 µl-Ansatz eingesetzt wird, damit das Glycerin im Enzympuffer nicht inhibitorisch auf die Reaktion wirkt.

5.12.2 Dephosphorylierung linearisierter Plasmidvektoren

Bei der Dephosphorylierung entfernen spezielle Enzyme an den 5'-Enden der linearisierten DNA-Fragmente die Phosphatgruppen. Um die Selbstligation eines nur mit einem Restriktionsenzym geschnittenen Vektors zu vermeiden, ist eine Dephosphorylierung seiner 5'-Enden notwendig.

Der geschnittene Vektor wird phenolextrahiert, mit Ethanol gefällt und das Pellet im Vakuum-Konzentrator getrocknet. Anschließend wird das Pellet in 17 µl H₂O

aufgenommen. Danach erfolgt die Behandlung mit 2 μ l 10x Dephosphorylierungspuffer und 1U Phosphatase (Shrimp-Phosphatase, Boehringer Mannheim). Dieser Ansatz wird für 30 min bei 37°C inkubiert, anschliessend phenolextrahiert und das Pellet in 20 μ l H₂O aufgenommen. 1-5 μ l der DNA werden auf ein Agarosegel auf Menge und Qualität überprüft.

5.12.3 Phosphorylierung von 5'-Hydroxylgruppen

Mit Hilfe der T4-Polynukleotidkinase (PNK) werden Phosphatgruppen von ATP auf die freien 5'-Hydroxylgruppen der DNA übertragen. Die Reaktion wird in 1x T4-DNA-Ligase-Puffer durchgeführt, der 1 mM ATP enthält. Nach Zusatz von 1 μ l (10 U/ μ l) PNK wird der Ansatz für 30 min bei 37°C inkubiert. Die Inaktivierung des Enzyms erfolgt durch 20minütiges Erhitzen bei 65°C.

5.12.4 Auffüllen überhängender 5'-DNA-Enden und Abbauen überhängender 3'-DNA-Enden

Für bestimmte Klonierungen ist es notwendig, die bei einem Restriktionsverdau entstandenen kohäsiven Enden eines DNA-Fragments in glatte Enden zu überführen. Die einzelsträngigen DNA-Abschnitte werden mit Hilfe der 5'→3'-Polymerase-Aktivität der T4-DNA-Polymerase (Klenow-Fragment) aufgefüllt. Um die durch einen Restriktionsverdau entstandenen kohäsiven Enden mit 3'-Überhang in glatte Enden zu überführen, werden die einzelsträngigen DNA-Abschnitte mit Hilfe der 3'→5'-Exonuklease-Aktivität der T4-DNA-Polymerase entfernt. Die Reaktion erfolgt in Gegenwart aller dNTPs (jeweilige Endkonzentration 0,1 mM) und BSA (50 μ g/ml) im 1x T4-DNA-Polymerase-Puffer (NEB) oder einem geeigneten Restriktionspuffer durch Zusatz von 1 μ l (3 U/ μ l) Enzym für 20 min bei 12°C. Die Inaktivierung des Enzyms wird durch 10minütiges Erhitzen bei 75°C erreicht.

5.12.5 DNA-Ligation

Bei der DNA-Ligation werden zwei unterschiedliche DNA-Fragmente, durch das Enzym T4-DNA-Ligase in Anwesenheit von ATP miteinander verknüpft. Ein Ansatz aus linearisiertem Vektor und zu inserierendem Fragment wird mit Hilfe der T4-DNA-Ligase zu einem geschlossenen Plasmid verbunden. Das Insert sollte dabei im Überschuß vorhanden sein, um die Wahrscheinlichkeit der Vektorselbstligation zu vermindern. Die Vektorselbstligation lässt sich auch durch Dephosphorylieren der 5'-Enden des Plasmids vermeiden. Wird der Vektor mit zwei unterschiedlichen Enzymen linearisiert, ist in der Regel aufgrund der nichtkompatiblen Enden eine Religation ebenfalls nicht möglich. Das Insert besitzt phosphorylierte 5'-Enden, die mit den 3'-Enden des Vektors verbunden werden können. Vektor und Insert besitzen im Ligationsansatz in der Regel ein molares Verhältnis von 1:1 oder 1:3. Das Ligationsvolumen beträgt 20 µl und enthält außer Vektor und Insert 2µl 10x T4-Ligasepuffer (NEB), 1U T4-DNA-Ligase (NEB) und H₂O. Es empfiehlt sich ein Kontroll-Ligationsansatz, welches kein Insert enthält, mitlaufen zu lassen. Die Ligationsansätze werden über Nacht bei 14°C im Wasserbad inkubiert. Danach sollte bald die Ligation transformiert oder bei 20°C eingefroren werden.

5.13 Transformation von Bakterien

Bei der Transformation wird ein bestimmtes Plasmid in das Cytoplasma eines Bakterienstammes übertragen und kann sich dort selbstständig replizieren. Nach der Transformation enthält das Bakterium zusätzliche genetische Information, die von der Plasmid-DNA kodiert wird. Das Plasmid enthält bestimmte genetische Eigenschaften, wie zum Beispiel Antibiotikaresistenzgene oder andere Gene, die dem Wirtstamm ein Wachstumsvorteil ermöglichen. Eine Transformation wird in der Regel durchgeführt, um ein bestimmtes Plasmid zu amplifizieren, da z.B. für die Sequenzierung oder für einen Restriktionsverdau genügend Plasmid benötigt wird.

5.13.1 Chemische Transformation von *E. coli*

5.13.1.1 Herstellung Kalziumchlorid-kompetenter Bakterien

(Hanahan, 1991)

Lösung

50 mM CaCl₂

15 % Glyzerin

2 ml einer *E. coli*-Übernachtskultur wird in 100 ml LB-Medium gegeben und bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8 geschüttelt. Anschliessend werden die Zellen für 15 min auf Eis inkubiert und in der Sigma-Zentrifuge für 10 min bei 4°C und 4000 rpm abzentrifugiert. Das Pellet wird in 40 ml eiskalter, 50 mM CaCl₂ / 15 % Glyzerin-Lösung resuspendiert und 15 min auf Eis inkubiert. Die Zellen werden nochmals in der Sigma-Zentrifuge für 10 min bei 4°C und 4000 rpm abzentrifugiert. Das Zellpellet wird schliesslich in 4 ml eiskalter, 50 mM CaCl₂ / 15 % Glyzerin-Lösung aufgenommen, auf Eis für 30 min belassen und in 200 µl Aliquots überführt. Die kompetenten Zellen werden bei –80°C gelagert.

5.13.1.2 Durchführung der Transformation

Die kompetenten Bakterien werden auf Eis aufgetaut und die zu transformierende DNA dazu gegeben. Der Ansatz wird für 30 min auf Eis inkubiert. Darauf folgend werden die Zellen für 90 Sekunden bei 42°C einem Temperaturschock ausgesetzt und sofort für 2 min auf Eis gestellt. Es wird nun 1 ml SOC- oder LB-Medium zu den Bakterien pipettiert und eine Stunde bei 37°C geschüttelt. Anschliessend wird der Transformationsansatz auf antibiotika-haltigem LB-Agar ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

5.13.2 Elektroporation von Bakterien

Die Elektroporation ist eine Methode der Transformation von Bakterien. Die Zellen werden dabei einem elektrischen Schock ausgesetzt, der kurzzeitig Löcher in der Bakterien-Membran verursacht (Böttger, 1988). Die Transformationseffizienz bei der Elektroporation ist sehr hoch (bis 10^{10} cfu/ μ g DNA).

5.13.2.1 Herstellung elektrokompetenter Bakterien

Lösung

10 % Glycerin

10 ml einer *E. coli*-Übernachtskultur wird in 690 ml LB-Medium gegeben und bei 37°C, bis eine OD₆₀₀ von 0,6 erreicht ist, geschüttelt. Die Zellen werden anschliessend für 15 min auf Eis abgekühlt und 15 min bei 4°C und 4000 rpm abzentrifugiert. Das Pellet wird in 500 ml eiskaltem 20 %iges Glycerin resuspendiert. Die Zellen werden nochmals 15 min bei 4°C und 4000 rpm abzentrifugiert. Die Wasch- und Zentrifugationsschritte werden dreimal wiederholt und dabei das Volumen auf 200, 20 und 1,75 ml reduziert. Die Bakterien werden dann in 40 μ l Aliquots überführt, in flüssigem Stickstoff kurz eingetaucht und bis zum Gebrauch bei –80°C gelagert.

5.13.2.2 Durchführung der Elektroporation

(Calvin *et al.*; 1988)

Die kompetenten Zellen werden auf Eis aufgetaut und 1 μ l eines Ligationsansatzes dazu gegeben. Falls der gesamte Ligationsansatz für die Transformation benutzt werden soll, so wird dieser durch Ethanol gefällt. Hierdurch werden Salze aus dem Ansatz entfernen. Der Transformationsansatz wird 5 min auf Eis inkubiert und anschliessend in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette (0,2 cm) pipettiert. Die Elektroporation findet mit folgenden Einstellungen statt: 400 Ω , 25 μ F, 2,5 kV/cm, wobei die Zeitkonstante etwa zwischen 8,6 und 9,2 liegt. Die elektroporierten

Bakterien werden sofort in 1 ml SOC-Medium überführt und 1 h bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Der Elektroporationsansatz wird in geeigneten Portionen auf antibiotika-haltigem LB-Agar ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

5.13.3 Ligation und Transformation mittels *TOPO TA Cloning[®] Kit* (Invitrogen)

PCR-Produkte die durch die *Taq*-DNA-Polymerase amplifiziert werden enthalten ein 5'-Überhang, welcher aus einem einzigen Adenosin (A) besteht. Für die Klonierung solcher PCR-Produkte ist ein Vektor erforderlich, welcher an den 3'-Enden ein Thymidin (T)-Überhang besitzt. pCR[®]2.1-TOPO ist ein linearisierter Vektor mit 3'-Thymidin-Überhängen, der für die Klonierung von PCR-Produkten eingesetzt werden kann. An diesem Vektor ist zusätzlich die Topoisomerase I, welche Ligationsaktivität besitzt, kovalent gebunden. Die Ligationsreaktion von Vektor (10 ng) und PCR-Produkt (5-80 ng) ist sehr effizient und nach 5 min bei Raumtemperatur abgeschlossen. Die Reaktion wird durch 2 µl 6x *TOPO Cloning[®] Stop Solution* gestoppt. Es folgt die Zugabe von 2 µl des Reaktionsansatzes zu einem Aliquot chemisch kompetenter TOP10-Zellen (Invitrogen). Anschliessend wird der Ansatz für 30 min auf Eis inkubiert. Der Transformationsansatz wird einem Temperaturschock bei 42°C für 30 sec unterzogen und sofort auf Eis gestellt. Dann wird 250 µl SOC-Medium hinzugefügt und die Zellen für 30 min bei 37°C geschüttelt. 50-100 µl der Probe wird auf LB-Selektivplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Um eine Blau-Weiss-Selektion durchzuführen, werden die Platten zuvor mit 40 µl X-Gal (5-Bromo-4-chlor-3-indolyl-β-galaktosid) aus einer 400 mg/ml-Stammlösung ausgestrichen sein.

5.14. Transformation von *Candida* spp.

Gängige Methoden der Transformation von *Candida* spp. ist die Lithiumacetat-, die Sphäroblasten-Methode und die Elektroporation.

5.14.1 Transformation anhand der Lithiumacetat-Methode

(Gietz *et al.*, 1992)

Eine häufig angewandte Strategie zur Transformation von *Candida* ist die Lithiumacetat-Methode. Hierbei werden die Zellen durch Li-Ac und Polyethylenglykol (PEG) kompetent gemacht. Die Transformationseffizienz wird durch Einzelstrang-DNA (ss-DNA) von Lachspermien, welche als *Carrier* für die zu transformierende Nukleinsäure dient, deutlich erhöht.

Eine Einzelkolonie des zu transformierenden *Candida*-Stammes wird in 10 ml YPD-Medium angeimpft und über Nacht bei 25-30°C angezchtet. Mit Hilfe der Zählkammer wird die Zellzahl/ml ermittelt und 1×10^8 Zellen in 50 ml YPD überführt (2×10^6 Zellen/ml). Die Kultur wird bei 30°C bis zu einer Zelldichte von etwa 1×10^7 Zellen/ml angereichert. Die Zellen werden dann bei 4000 rpm für 4 min abzentrifugiert und mit 500 µl H₂O gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation (10000 rpm, 1 min) wird das Pellet in 500 µl 1x TE / 1x Li-Ac aufgenommen, die Zellzahl bestimmt und durch Verdünnen oder Aufkonzentrieren auf 2×10^9 Zellen/ml eingestellt.

Der Transformationsansatz wird wie folgt zusammengestellt:

Zellsuspension	50 µl
zu transformierende DNA	1 µg (10-20 µl)
Lachsperm DNA	10 µl (vorher durch 5minütiges Erhitzen denaturiert)
1x TE / 1x Li-Acetat / 40 % PEG	300 µl

(Soll die DNA bei der Transformation in das Chromosom integriert werden, so wird diese vorher linearisiert werden)

Der Transformationsansatz wird für 30 min bei 30°C unter Schütteln inkubiert, 3 min bei 42°C einem Hitzeschock unterzogen und anschliessend für 1 min bei 4000 rpm abzentrifugiert. Das Zellpellet wird mit 200 µl H₂O gewaschen, abzentrifugiert (4000 rpm, 1 min) und wieder in 200 µl H₂O resuspendiert. Die Zellen werden dann auf geeignete Selektivplatten ausplattiert und für 3 bis 4 Tage bei 30°C bebrütet.

5.14.2 Disruption von Genen in *C. albicans*

(Fonzi and Irwin, 1993)

Aufgrund des diploiden Genoms von *C. albicans* müssen für die vollständige Inaktivierung eines Gens beide Allele disruptiert werden. Die häufig angewandte Technik erfolgt mit Hilfe des "*URA-blaster*". Diese Technik wurde zuerst von Alani *et al.* (1987) für *Saccharomyces cerevisiae* beschrieben und 1993 von Fonzi und Irwin modifiziert und in *C. albicans* angewandt.

In einem Plasmidkonstrukt ersetzt eine Kopie des *URA3*-Gens, welches von direkten *repeats* des *Salmonella thyphimurium hisG* (Alani *et al.*, 1987) flankiert ist, ein Teil des klonierten Zielgens, das disruptiert werden soll. Die Disruptionskassette, bestehend aus der 5'- und 3'-Region des Zielgens, getrennt durch das *hisG-URA3-hisG* Fragment, wird aus dem Plasmid enzymatisch herausgeschnitten und 5-10 µg dieser DNA in einem *C. albicans* Uri⁻-Stamm transformiert. Die Transformation wird nach dem oben beschriebenen Verfahren durchgeführt (5.14.1). Die Integration am Ziellokus erfolgt durch homologe Rekombination. Uri⁺ Transformanten werden auf geeigneten Selektivplatten gewonnen. Positive Klone können im Southern-Blot überprüft werden. Von solchen Transformanten werden Uri⁻-Derivate mit Hilfe von 5-Fluoroorotidinsäure (5-FOA) selektioniert (siehe 5.14.3). Der Verlust des *URA3*-Gens solcher Derivate geschieht durch intrachromosomale Rekombination der angrenzenden *repeats*. Um das zweite Allel des Zielgens zu deletieren wird die Transformation wiederholt. Der resultierende Stamm ist dann *URA3/ura3*, in dem beide Kopien des Zielgens durch eine Insertion unterbrochen sind.

5.14.3 Selektion von *C. albicans ura3Δ*-Stämmen

Die Isolierung von Stämmen, die einen bestimmten genetischen Marker verloren haben, ist oft wünschenswert. Die mediane Frequenz der Rekombination direkter *repeats*, welches zu einem Verlust des *URA3*-Gens führt, beträgt je nach Ort des genomischen Lokus zwischen 10^{-4} - 10^{-7} . Die Selektion von *S. cerevisiae* und *C. albicans ura3Δ*-Stämmen wird mit Hilfe des Pyrimidin-Analogen 5-Fluoroorotidinsäure (5-FOA) durchgeführt. 5-FOA wird vom *URA3*-Genprodukt, der Orotidin-5'-Monophosphatdecarboxylase, in eine für *S. cerevisiae* und *C. albicans* toxische Substanz umgesetzt. Diese Toxizität beruht wahrscheinlich auf die Konversion von 5-FOA in 5-Fluoro-Uridin-5'-Monophosphat. *ura3*-Mutanten zeigen dagegen auf 5-FOA-haltigem Medium, in Gegenwart von Uridin, normales Wachstum. Diese Strategie zur positiven Selektion von *ura3Δ*-Klonen wurde von Boecker *et al.* (1984) für *S. cerevisiae* beschrieben. Die Methode wurde von Fonzi und Irwin 1993 modifiziert und zur Selektion von *C. albicans ura3Δ*-Mutanten eingesetzt.

5-FOA-Medium

YNB-Agar

1 mg/ml 5-Fluoroorotidinsäure

25 µg/ml Uridin

(Stocklösungen von 5-FOA und Uridin werden angesetzt und bei 4°C gelagert.)

Vor der Selektion werden die Stämme auf YPD-agar ausgestrichen und für 48 h bei 30°C inkubiert. Einzelkolonien werden von der Platte genommen und in H₂O suspendiert. Suspensionen mit unterschiedlicher Zellzahl (10^4 bis 10^7 Zellen) werden auf 5-FOA-Medium verteilt und für 4-6 Tage bei 30°C inkubiert. Klone werden auf Verlust des *URA3*-Gens durch Replikaplattieren auf YNB-Agar mit Uridin und ohne Uridin überprüft. Positive Klone werden anschliessend im Southern-Blot kontrolliert.

5.15 automatisierte DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung erfolgt mit dem automatischen Sequenziergerät ABI Prism™ Sequencer 377 (Perkin Elmer) nach der Kettenabbruch- oder Didesoxy-Methode (Sanger *et al.*, 1977). Die DNA wird denaturiert und zur Initiation der DNA-Synthese durch die *Taq*-DNA-Polymerase, ein *Primer* an den komplementären Einzelstrang angelagert. Um den Kettenabbruch bei der Synthese zu erzielen, werden dem Reaktionsansatz ausser den vier Desoxynukleosidtriphosphaten (dNTPs), geringe Mengen der 2',3'-Didesoxynukleosidtriphosphate (ddNTPs) zugefügt, die jeweils mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind. Die ddNTPs werden von der Polymerase ebenfalls als Substrate verwendet, ermöglichen aber aufgrund des Fehlens einer Hydroxylgruppe am 3'-Ende keine Kettenverlängerung. Somit wird die DNA-Synthese, nach dem Einbau eines ddNTPs, an einer beliebigen Position gestoppt, und es entsteht eine Mischung partiell doppelsträngiger DNA-Moleküle, die alle das 5'-Ende besitzen, aber am Ende in der Länge variieren und basenspezifisch terminiert sind.

Sequenzieransatz

0,4 µg Plasmid-DNA oder

0,1 µg PCR-Produkt

10 pmol Primer

2 µl Sequenzier-Mix

ad 10µl dH₂O

Die *Taq Cycle*-DNA-Sequenzierung gliedert sich in folgende Schritte

- Denaturierung
10 sec bei 96°C
- *Primer*-Hybridisierung
5 sec bei der Temperatur entsprechend der *Primer*sequenz (2+4-Regel-5)
- DNA-Synthese mit gleichzeitiger Markierung und Termination
4 min bei 60°C

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

5.16 Sequenzanalysen

Die ermittelten DNA- und Aminosäuresequenzen wurden mit der *Lasergene*-Sequenzanalyse-Software (Dnastar, Madison, USA) analysiert. Sequenzvergleiche erfolgten mit der Clustal V-Methode des MegAlign-Programms (Higgins und Sharp, 1989). Sequenzen von *HWP1* und *RIM101* von *C. albicans* wurden via Internet von der Netzseite *Candida albicans Information* (<http://alces.med.umn.edu/candida.html>) entnommen. Die Sequenzen der *C. glabrata*-Gene *MTII* und *HIS3* wurden vom Server des National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) entnommen.

5.17 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

5.17.1 PCR mit der *AmpliTaq*[®] DNA-Polymerase

Die Polymerase-Kettenreaktion dient zur Amplifizierung von linearen DNA-Fragmenten. Die vervielfältigten DNA-Fragmente können für Klonierung, Sequenzierung und als Hybridisierungs sonden verwendet werden. Die Reaktion eignet sich auch, um nach bekannten DNA-Stücken in unbekanntem DNA-Pools zu suchen, so wird sie zum Beispiel beim *Screening* oder der Suche nach bekannten Genen in unbekanntem Genomen angewandt. Die PCR ist eine temperaturgesteuerte DNA-Amplifizierung. Ausgehend von zwei *Primern*, deren 3'-OH-Enden auf der DNA aufeinander zuweisen, synthetisiert die thermostabile DNA-Polymerase (*AmpliTaq*) aus *Thermus aquaticus* den komplementären Strang des *Templates*.

Die Reaktion findet im *Thermocycler* statt und läuft in drei Schritten, bei drei unterschiedlichen Temperaturen, ab. Diese Schritte werden zyklisch wiederholt. Zwei weitere Schritte, die nicht zyklisch wiederholt werden, finden jeweils am Anfang bzw. am Ende der PCR statt.

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

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

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

Kettenverlängerung : Die temperaturstabile DNA-*Taq*-Polymerase verlängert die durch die *Primer*bindung entstandenen doppelsträngigen Bereiche von den 3'-OH Enden der *Primer* ausgehend, komplementär zum *Template*strang. Die dabei gebildeten Doppelstränge dienen als *Template* für die nächste Reaktionsfolge. Die Temperatur ist gegeben durch die optimale Aktivität der *Taq*-Polymerase bei 72°C. Die Zeit ergibt sich aus der Länge des zu bildenden DNA-Fragments.

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

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

10x PCR-Puffer

500 mM KCl

100 mM Tris-HCl, pH 8,3

25 mM MgCl₂

10x Nukleotid-Mix

jeweils 2 mM dATP, dGTP, dCTP und dTTP

AmpliTaq[®] DNA-Polymerase (5 U/ml)

Primer (0,2 mM)

PCR-Reaktionsansatz :	DNA	1 µl (200-500 ng)
	<i>Primer 1</i>	1 µl (50 pmol)
	<i>Primer 2</i>	1 µl (50 pmol)
	10x PCR-Puffer	10 µl
	MgCl ₂	6 µl (1,5 mM)
	dNTP's	4 µl (200 µM)
	<u>Taq-Polymerase</u>	<u>0,4 µl (5 U/µl)</u>
		ad. 100 µl H ₂ O

(Bei der *Colony*-PCR wird anstatt präparierter DNA eine Einzelkolonie des Bakterienstammes dem Reaktionsansatz zugefügt.)

<u>Beispiel für ein PCR -Programm :</u>	94°C	120 s	
	94°C	20 s] 15-45x
	50°C	30 s	
	72°C	90 s	
	72°C	180 s	

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

5.17.2 PCR mit der *PowerScript* DNA-Polymerase

Die *PowerScript* DNA-Polymerase hat den Vorteil der geringeren Fehlerrate gegenüber der DNA-*Taq*-Polymerase. Die niedrige Fehlerrate ist auf die 3'-5' *proof*

reading Aktivität der *PowerScript* DNA-Polymerase zurückzuführen. Die Verwendung der *PowerScript* DNA-Polymerase wird bevorzugt, um offene Leseraster bzw. Reportergene zu amplifizieren, die für funktionale Studien benutzt werden sollen.

10x PCR-Puffer

500 mM *Opti Perform*-KOH, pH 9,2

160 mM (NH₄)₂SO₄

0,1 % Tween-20

5x Enhancer

50 mM MgCl₂

10x Nukleotid-Mix

jeweils 2 mM dATP, dGTP, dCTP und dTTP

PowerScript DNA-Polymerase (5 U/ml)

Primer (0,2 mM)

Jeder Ansatz wird nach folgendem Schema angesetzt:

DNA	10-20 ng
<i>Primer 1</i>	2 µl (2 µM)
<i>Primer 2</i>	2 µl (2 µM)
10x PCR-Puffer	10 µl
<i>5x Enhancer</i>	20 µl
MgCl ₂	4 µl (2 mM)
dNTP's	4 µl (je 200 µM)
<i>PowerScript</i> DNA-Polymerase	0,2 µl (1 U)

ad. 100 µl H₂O

5.18 DNA-und RNA-Hybridisierungen

Hybridisierungsreaktionen erfolgen aufgrund der Basenpaarungswechselwirkungen zwischen zwei einzelsträngigen Nukleinsäureketten, wenn sie komplementäre Nukleotidsequenzen aufweisen (DNA-DNA, RNA-RNA, DNA-RNA). Durch die hohe Sensitivität und Selektivität der Hybridisierung ist es möglich, mit DNA-Sonden komplementäre Sequenzen nachzuweisen, deren Konzentration nur ein Molekül pro Zelle beträgt. Zur Identifizierung spezifischer Nukleinsäure-Fragmente wurden Methoden entwickelt, bei denen eine Hybridisierung erfolgt, nachdem die DNA oder RNA aus den Zellen isoliert und aufgereinigt worden ist (Southern-Blot oder Northern-Blot (Southern, 1975)).

5.18.1 Radioaktive Markierung spezifischer DNA-Sonden

Die radioaktive Markierung spezifischer DNA-Sonden erfolgt mit dem *Prime-It[®] Random Primer Labeling Kit* von Stratagene.

Folgende Lösungen aus dem *Kit* werden verwendet:

Random 9-primers

Randomisierte Oligodeoxyribonukleotide (27 OD U/ml)

5x dCTP-Puffer

0,1 mM dATP

0,1 mM dGTP

0,1 mM dTTP

Exo(-) Klenow 5 U/ml

Stop-Mix

0,5 M EDTA, pH 8

25 ng linearisierte DNA werden in 24 µl H₂O aufgenommen und mit 10 µl *random oligonucleotide primers* versetzt und 5 min bei 95°C erhitzt. Anschliessend wird die

DNA sofort auf Eis abgekühlt. 10 µl 5x dCTP-Puffer, 5 µl [α -³²P]dCTP (10µCi/µl) und 1 µl Klenow-Fragment werden zugegeben und der Reaktionsansatz 30 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wird anschliessend mit 2 µl Stop-Mix arretiert.

Um die Sonde aufzureinigen, wird der Reaktionsansatz mit dem *QIAquick Nucleotide Removal kit* von Qiagen behandelt. Durch diese Behandlung werden alle Oligonukleotide bis zu einer Grösse von 10 Basen, Enzyme, Salze und nicht eingebauten Nukleotide beseitigt. Dieses Prinzip basiert auf der selektiven Bindung der DNA an Silikagel-Membranen. Die vom Hersteller angegebene maximale Bindungskapazität pro Säulchen beträgt 10 µg DNA und es können Fragmente der Grösse 100 Bp-10 Kb aufgereinigt werden. Im *Kit* sind die Lösungen PN, PE (Waschpuffer), EB (Elutionspuffer) enthalten. Bezüglich der Zusammensetzung der Lösungen werden vom Hersteller, ausser für EB (Tris-HCl, pH 8,5), keine Angaben gemacht.

Nach der Aufreinigung wird ein Aliquot der markierten DNA im Szintillationszähler gemessen, um den Einbau der [α -³²P]dCTPs zu kontrollieren.

5.18.2 Southern Blot

(Southern, 1975)

Die genomische DNA wird mit Restriktionsenzymen vollständig geschnitten und elektrophoretisch in einem 0,8 %igen Agarosegel aufgetrennt. Durch zweimal 15minütiges inkubieren in 1,5 M NaCl / 0,5 M NaOH (Denaturierungspuffer) wird die DNA denaturiert. Anschliessend erfolgt eine Neutralisation durch zweimal 15minütiges inkubieren in 1,5 M NaCl / 1 M Tris-HCl (pH 8) (Neutralisationspuffer). Der Kapillartransfer der DNA aus dem Agarosegel auf eine Nylonmembran erfolgt über Nacht. Hierfür wird eine Glasplatte auf einer mit 20x SSC gefüllte Wanne gelegt und mit einem Whatman-Papier so bedeckt, daß die Enden des Papiers in die Flüssigkeit der Wanne eintauchen. Ein der Grösse des Gels entsprechendes Stück Whatman-Papier und das Gel werden luftblasenfrei aufgelegt. Es folgt nun die Nylonmembran, die ebenfalls luftblasenfrei aufgelegt wird. Auf die Membran wird ein Whatman-Papier sowie 5-10 cm Papierhandtücher aufgelegt und mit einer zweiten Glasplatte beschwert. Nach dem Transfer wird die Membran luftgetrocknet und die DNA durch UV-Vernetzung (100 mJ) auf die Membran fixiert.

5.18.3 Northern Blot

Die RNA wird mittels denaturierendem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Der Kapillartransfer der RNA aus dem Agarosegel auf eine Nylonmembran erfolgt mit 20x SSC über Nacht. Beim Northern-Blot werden Denaturierungs- und Neutralisationsschritte nicht durchgeführt. Nach dem Transfer wird die Membran luftgetrocknet und die RNA durch UV-Vernetzung (100 mJ) auf die Membran fixiert.

5.18.4 DNA-DNA-Hybridisierung

Die auf die Nylonmembran durch UV-Vernetzung fixierte DNA wird für 30 min bei 65°C mit 20 ml MONOD-Puffer im Hybridisierungssofen inkubiert. Hierbei werden freie Stellen der Membran abgesättigt. Anschliessend wird diese Lösung durch 20 ml frischen MONOD-Puffer ersetzt. Die radioaktiv-markierte DNA-Sonde (ca. 5×10^6 cpm/ml) wird für 5 min bei 95°C denaturiert und zur Membran hinzugegeben und über Nacht bei 65°C im Hybridisierungssofen inkubiert. Die Membran wird dann zweimal 30 min mit 2 % SSC / 0,1 % SDS (Waschpuffer) bei 65°C behandelt. Auf die Membran wird anschliessend ein Röntgenfilm Hyperfilm™-MP (Amersham Pharmacia, Freiburg) gelegt und für einige Zeit in einer lichtundurchlässigen Kassette bei -20°C exponiert.

5.18.5 RNA-DNA-Hybridisierung

Die Durchführung der RNA-DNA-Hybridisierung geschieht analog der DNA-DNA-Hybridisierung.

5.19 Induktion der Keimschlauchbildung von *C. albicans*

C. albicans reagiert in Abhängigkeit bestimmter Milieubedingungen mit der Bildung von Keimschläuchen. Hierbei kommt es nicht zu einer normalen Zellteilung der Sprosszelle. Die durch Knospung gebildete Tochterzelle trennt sich nicht von der

Mutterzelle, sondern bildet einen keimschlauchartigen Fortsatz. Dieser Keimschlauch ist in der Lage sich zu verzweigen. Ein solches Zellgebilde wird als Hyphe bezeichnet. Ein Geflecht von Hyphen bezeichnet man als Myzel.

5.19.1 Induktion der Keimschlauchbildung durch den pH-Wert

C. albicans kann in Abhängigkeit des im Medium herrschenden pH-Wert seine Zellmorphologie ändern. Dieses Phänomen wird als pH-regulierter Dimorphismus bezeichnet (Buffo *et al.*, 1984). Bei einem neutralen pH-Wert von 7 und einer Inkubationstemperatur von 37°C liegt *C. albicans* fast ausschliesslich in der filamentösen Form (ca. 90%) vor. Wird der pH-Wert oder die Inkubationstemperatur gesenkt, so nimmt die Anzahl der keimschlauchbildenden Zellen ab. Bei einem sauren pH-Wert von 4 sind fast ausschliesslich sprossende Zellen vorhanden.

Bei der Induktion der Keimschlauchbildung durch den pH-Wert werden 100 µl einer 5 ml-Übernachtskultur, die in Medium 199 bei 28°C und pH 4 inkubiert wurde, in 5 ml frisches Medium 199, pH 4, 5, 6 oder 7 angeimpft. Die Kultur wird dann bei 37°C für 3 h geschüttelt. Die Zellen können dann bei einer Objektivvergrößerung von 40x mittels Mikroskop inspiziert und der prozentuale Anteil der keimschlauchbildenden Zellen ermittelt werden.

5.19.2 Induktion der Keimschlauchbildung durch die Temperatur

Bei der Induktion der Keimschlauchbildung durch die Inkubationstemperatur werden 100 µl einer 5 ml-Übernachtskultur, die in Medium 199 bei 28°C und pH 7 inkubiert wurde, in 5 ml frisches Medium 199, pH-Wert 7 angeimpft. Die Kultur wird dann bei 28°C bis 37°C für 3 h geschüttelt. Der prozentuale Anteil der keimschlauchbildenden Zellen kann nun mikroskopisch mit Hilfe des 40xObjektiv ermittelt werden.

5.20 Isolierung von *phr2Δ*-Revertanten

Stämme CFM-4 (*phr2Δ ura3Δ*) und CFM-2 (*phr2Δ*) wurden bis zur stationären Phase in YPD pH 7 bei 30°C angezüchtet und in sterilem H₂O gewaschen. 10⁸ Zellen wurden anschliessend auf jede von fünf YNB pH 4-Agarplatten verteilt und für 3 Tage bei 30°C inkubiert. YNB pH 4-Agarplatten für CFM-4 enthielten, da dieser Stamm *ura3Δ* ist, 25 µg Uridin pro ml. Kolonien, die bei diesem restriktiven pH wuchsen wurden mit einer mittleren Frequenz von 1,5 x 10⁻⁷ gewonnen.

5.21 Wachstumskurven

Die Erstellung von Wachstumskurven erlaubt die Untersuchung des Wachstumsverhaltens von Mikroorganismen. Mit dem Vergleich der Wachstumskurven verschiedener Stämme einer Spezies kann eventuell der Einfluss spezifischer Gene auf das Wachstumsverhalten geschlossen werden.

Die zu untersuchenden Stämme werden auf YPD-Agar ausgestrichen und für 48 h bei 30°C angezüchtet. Eine Einzelkolonie wird in 10 ml Flüssigmedium (YPD, YNB oder Medium 199) angeimpft und über Nacht bei 30°C inkubiert. 2,5x10⁷ Zellen der Übernachtskultur werden in 50 ml Flüssigmedium (YPD, YNB oder Medium 199) überführt (5x10⁵/ml) und unter bestimmten Bedingungen (z. B. pH, Temperatur) bis zum Erreichen der stationären Phase inkubiert. Die OD₆₀₀ wird nach jeder Stunde spektrophotometrisch ermittelt. Zusätzlich oder alternativ wird stündlich die Zellzahl mit Hilfe der Zählkammer bestimmt. Dieses Experiment wird insgesamt dreimal durchgeführt und der Mittelwert aus den drei individuellen Wachstumskurven gebildet. Der 10er Logarithmus der OD₆₀₀ bzw. der Zellzahl (Y-Achse) wird gegen die Zeit (X-Achse) in einem Diagramm aufgezeichnet. Die Generationszeiten der Stämme während der logarithmischen Phase (exponentielle Phase) wird ermittelt und miteinander verglichen. Anhand der Wachstumskurve kann ferner der Verlauf der *lag*-Phase festgestellt werden und bei welcher OD₆₀₀ oder Zellzahl/ml ein bestimmter Stamm in die stationäre Phase übergeht.

5.22 Detektion von β -Galaktosidase-Aktivität in *C. glabrata*

Die Untersuchung der Genexpression in einem bestimmten Organismus oder eines spezifischen Gens erfolgt meist mit Hilfe geeigneter Reportersysteme. Das für die β -Galaktosidase kodierende *lacZ*-Gen von *E. coli* wird in vielen Prokaryonten und Eukaryonten als Reporter gen verwendet. Die β -Galaktosidase spaltet in der Regel das Disaccharid Laktose in Glukose und Galaktose. Die Fähigkeit der β -Galaktosidase auch chromogene Verbindungen wie X-Gal (5-Bromo-4-chlor-3-indolyl- β -galaktosid) und ONPG (O-Nitrophenyl- β -D-galaktosid) zu spalten, wird zur Detektion der Aktivität des Enzyms benutzt. Bei der Spaltung von X-Gal entsteht 5-Bromo-4-chlor-indigo, welches die Kolonien blau erscheinen lässt. Wird ONPG durch die β -Galaktosidase umgesetzt so färbt sich das Kulturmedium gelb. Die Intensität der Gelbfärbung ist proportional zur Expression der β -Galaktosidase.

5.22.1 Qualitativer β -Galaktosidasetest in *C. glabrata*

Für die qualitative Detektion der β -Galaktosidase-Aktivität in *C. glabrata* wird der zu untersuchende Stamm auf ein Whatman Filter (Whatman # 50, \varnothing 82 mm, Schleicher & Schuell) ausgestrichen und über Nacht auf YNB-Agar bei 30°C inkubiert. Befindet sich das β -Galaktosidase-Gen (*lacZ*) unter der Kontrolle eines induzierbaren Promotors, so wird der Stamm unter den Promotor induzierenden und reprimierenden Bedingungen angezüchtet. Zum Beispiel werden im Falle der *MTII:lacZ*-Fusion die Zellen auf 100 μ M CuSO₄-haltigen und CuSO₄-freien YNB-Agar angezogen. Der Filter wird anschliessend für 1 min in flüssigem Stickstoff gehalten, wodurch die Hefe-Zellwand permeabilisiert wird. Ein weiterer Whatman Filter (Whatman # 2, \varnothing 82 mm) wird für 30 min in 2,5 ml 1x Z-Puffer, welches 0,032 % X-Gal enthält, inkubiert. Anschliessend wird der die Zellen enthaltende Filter auf den zweiten Filter luftblasenfrei gelegt und bei 30°C bis zur Blaufärbung belassen. Stark positive Klone zeigen eine Blaufärbung schon nach wenigen Minuten.

5.22.2 Quantitativer β -Galaktosidasetest in *C. glabrata*

(Guarante, 1983)

Die Quantitative Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität kann durch spektrophotometrische Messung der Hydrolyse von ONPG erfolgen. ONPG wird durch die β -Galaktosidase in zwei Produkte gespalten, Galaktose und Ortho-Nitrophenol. Das Ortho-Nitrophenol-Produkt ist gelb und kann durch seine Absorption bei 420 nm detektiert werden. Die Menge des produzierten Ortho-Nitrophenols ist proportional zur Menge des exprimierten Enzyms.

Eine Einzelkolonie des zu untersuchenden *C. glabrata*-Stamms wird in 10 ml YNB-Medium angeimpft und über Nacht bei 30°C inkubiert. 100 μ l der Übernachtskultur werden in 10 ml frisches YNB-Medium versetzt und bis $OD_{600} = 1,0$ geschüttelt. Soll die Aktivität eines induzierbaren Promoters ermittelt werden, so müssen die Zellen in Medien mit und ohne stimulierendes Agens inkubiert werden. Die Zellen werden dann für 5 min bei 2500 rpm abzentrifugiert und in 10 ml 10x Z-Buffer resuspendiert und auf Eis gestellt. Die OD_{600} wird ermittelt und anschliessend 100 μ l Zellen mit 900 μ l 10x Z-Puffer versetzt. Zur Permeabilisierung der Zellen werden ein Tropfen 0,1 % SDS und zwei Tropfen Chloroform mit einer Pasteur-Pipette zur Suspension hinzugefügt und gevortext. Anschliessend wird bei 30°C für 15 min equilibriert. 200 μ l ONPG (4 mg/ml) werden zu den Proben pipettiert, kurz gevortext und bei 30°C inkubiert. Sobald das Medium sich gelb verfärbt wird die Reaktion durch mit 0,5 ml 1 M Na_2CO_3 gestoppt und die Zeit notiert. Die Zellsuspension wird für 5 min bei 2500 rpm abzentrifugiert und die OD_{420} und OD_{550} ermittelt. Mit folgender Gleichung kann nun die Enzymmenge in Units berechnet werden:

$$U = \frac{1000 \times [(OD_{420}) - (1,75 \times OD_{550})]}{(t) \times (v) \times (OD_{600})}$$

t	=	Zeit
v	=	Volumen der Kultur in ml
OD_{600}	=	Zelldichte am Anfang des Experimentes
OD_{420}	=	Kombination aus Absorption von Ortho-Nitrophenol und Lichtstreuung durch Zelltrümmer
OD_{550}	=	Lichtstreuung durch Zelltrümmer

6 Literaturverzeichnis

- Boeke, J. P., LaCroute, F. & Fink, G. R. (1984)** A positive selection for mutants lacking orotidine-5'-phosphate decarboxylase activity in yeast: fluoro-orotic acid resistance. *Mol. Gen. Genet.* **197**, 345-346.
- Böttger, E. C. (1988)** High-efficiency generation of plasmid cDNA libraries using electro-transformation. *BioTechniques* **6**, 878-880.
- Brown, A. J. P. & Gow, N. A. R. (1999)** Regulatory network controlling *Candida albicans* morphogenesis. *Trends Microbiol.* **7**, 333-338
- Buffo, J., Herman, M. A. & Soll, D. R. (1984)** A characterization of pH-regulated dimorphism in *Candida albicans*. *Mycopathologia* **85**, 21-30.
- Calvin, N. M. & Hanawalt, P. C. (1988)** High-efficiency transformation of bacterial cells by electroporation. *J. Bacteriol.* **170**, 2796-2801.
- Care, R. S., Trevethick, J., Binley, K. M. & Sudbery, P. E. (1999)** The *MET3* promoter: a new tool for *Candida albicans* molecular genetics. *Mol. Microbiol.* **34**, 792-798.
- Chaffin, W. L., Lopez-Ribot, J. L., Casanova, M., Gozalbo, D., Martinez, J. P. & (1998)** Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: Identification, function, and expression. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**, 130-150.
- Colina, A. R., Aumont, F., Deslauriers, N., Belhumeur, P. & de Repentigny, L. (1996)** Evidence for degradation of gastrointestinal mucin by *Candida albicans* secretory aspartyl proteinase. *Infect. Immun.* **64**, 4514-4519.
- Cormack, B. P., Bertram, G., Gow, N. A., Falkow, S. & Brown, A. (1997)** Yeast-enhanced green fluorescent protein (yEGFP) a reporter of gene expression in *Candida albicans*. *Microbiology* **143**, 303-311.
- Cormack, B. P., Ghori, N. & Falkow, S. (1999).** An adhesin of the yeast pathogen *Candida glabrata* mediating adherence to human epithelial cells. *Science* **285**, 578-582.
- Cormack, B. P. & Falkow, S. (1999a)** Efficient homologous and illegitimate recombination in the opportunistic yeast pathogen *Candida glabrata*. *Genetics* **151**, 979-987.
- Csank, C. & Haynes, K. (2000)** *Candida glabrata* displays pseudohyphal growth. *FEMS Microbiol. Lett.* **189**, 115-120.

- Davis, D., Wilson, R. B. & Mitchell, A. P. (2000)** *RIM101*-dependent and independent pathways govern pH responses in *Candida albicans*. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 971-978.
- Davis, D., Edwards, Jr. J. E., Mitchell, A. P. & Ibrahim, A. S. (2000a)** *Candida albicans RIM101* pH response pathway is required for host-pathogen interactions. *Infect. Immun.* **68**, 5953-5959.
- De Bernardis, F., Mühlischlegel, F. A., Cassone, A. & Fonzi, W. A. (1998)** The pH of the host niche controls gene expression in and virulence of *Candida albicans*. *Infect. Immun.* **66**, 3317-3325.
- Doi, M., Homma, M., Chindamporn, A. & Tanaka, K. (1992)** Estimation of chromosome number and size by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) in medically important *Candida* species. *J. Gen. Microbiol.* **138**, 2243-2251.
- Edmond, M. B., Wallace, S. E., McClish, D. K., Pfaller, M. A., Jones, R. N. & Wenzel, R. P. (1999)** Nosocomial blood stream infections in United States Hospitals: A three-year analysis. *Clin. Infect. Dis.* **29**, 239-244.
- Ernst, J. A. (2000)** Transcription factors in *Candida albicans* - environmental control of morphogenesis. *Microbiology* **146**, 1763-1774.
- Espeso, E. A., Tilburn, J., Arst Jr., H. N. & Peñalva, M. A. (1993)** pH regulation is a major determinant in expression of a fungal penicillin biosynthetic gene. *EMBO J.* **12**, 3947-3956.
- Espeso, E. A. & Peñalva, M. A. (1996)** Three binding sites for the *Aspergillus nidulans* PacC zinc finger transcription factor are necessary and sufficient for regulation by ambient pH of the isopenicillin N synthase gene promoter. *J. Biol. Chem.* **271**, 28825-28830.
- Espeso, E. A., Tilburn, J., Sanchez-Pulido, L., Brown, C. V., Valencia, A., Arst Jr., H. N. & Peñalva, M. A. (1997)** Specific DNA recognition by the *Aspergillus nidulans* three zinc finger transcription factor PacC. *J. Mol. Biol.* **274**, 466-480.
- Espeso, E. A., Roncal, T., Díez, E., Rainbow, L., Bignell, E., Álvaro, J., Suárez, T., Denison, S. H., Tilburn, J., Arst Jr, H. N. & Peñalva, M. A. (2000)** On how a transcription factor can avoid its proteolytic activation in the absence of signal transduction. *EMBO J.* **19**, 719-728.
- Evans, E. G., Odds, F. C., Richardson, M. D. & Holland, K. T. (1974)** Optimum conditions for initiation of filamentation in *Candida albicans*. *Can. J. Microbiol.* **21**, 338-342.

- Fidel, P. L., Vazquez, J. A. & Sobel, J. D. (1999)** *Candida glabrata*: Review of epidemiology, pathogenesis, and clinical disease with comparison to *C. albicans*. *Clin. Microbiol. Rev.* **12**, 80-96.
- Fonzi, W. A. (1999)** *PHR1* and *PHR2* of *Candida albicans* encode putative glycosidases required for proper cross-linking of β -1,3- and β -1,6-glucans. *J. Bacteriol.* **181**, 7070-7079.
- Fonzi, W. A. & Irwin, M. Y. (1993)** Isogenic Strain construction and gene mapping in *Candida albicans*. *Genetics* **134**, 717-728.
- Fu, Y., Rieg, G., Fonzi, W. A., Belanger, P. H., Edwards JR., J. E. & Filler, S. G. (1998)** Expression of the *Candida albicans* gene *ALS1* in *Saccharomyces cerevisiae* induces adherence to endothelial and epithelial cells. *Infect. Immun.* **66**, 1783-1786.
- Gale, C. A., Bendel, C. M., McClellan, M., Hauser, M., Becker, J. M., Berman, J. & Hostetter, M. (1998)** Linkage of adhesion, filamentous growth, and virulence in *Candida albicans* to a single gene *INT1*. *Science* **279**, 1355-1358.
- Gietz, D., Jean, A. S., Woods, R. A. & Schiestl, R. H. (1992)** Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucleic. Acids. Res.* **20**, 1425.
- Gillum, A. M., Tsay, E. Y. H. & Kirsch, D. R. (1984)** Isolation of the *Candida albicans* gene for orotidine-5'-phosphate decarboxylase by complementation of *Saccharomyces cerevisiae ura3* and *E. coli pyrF* mutations. *Mol. Gen. Genet.* **198**, 179-182.
- Guarente, L. (1983)** Yeast promoters and *lacZ* fusions designed to study expression of cloned genes in yeast. *Meth. Enzymol.* **101**, 181-191.
- Hanahan, D. (1983)** Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**, 557-580.
- Hanahan, D., Jessee, J. & Bloom, F. R. (1991)** Plasmid transformation of *Escherichia coli* and other bacteria. *Methods Enzymol.* **201**, 63-113.
- Heinz, W. J., Kurzai, O., Brackhage, A. A., Fonzi, W. A., Korting, H. C., Frosch, M. & Mühlischlegel, F. A. (2000)** Molecular responses to changes in the environmental pH are conserved between the fungal pathogens *Candida dubliniensis* and *Candida albicans*. *Int. J. Med. Microbiol.* **290**, 231-238.
- Higgins, D. G. & Sharp, P. M. (1989)** Fast and sensitive multiple sequence alignments on a microcomputer. *Comput. Appl. Biosci.* **5**, 151-153.
- Hoog, G. S. & Guarro, J. (1995)** Atlas of clinical fungi.

- Hoyer, L. L., Payne, T. L. & Hecht, J. E. (1998)** Identification of *Candida albicans* ALS2 and ALS4 and localization of Als proteins to the fungal cell surface. *J. Bacteriol.* **180**, 5334-5343.
- Hube, B., Monod, M., Schofield, D. A., Brown, A. J. P. & Gow, N. A. R. (1994)** Expression of seven members of the gene family encoding secretory aspartyl proteinases in *Candida albicans*. *Mol. Microbiol.* **14**, 87-99.
- Hull, C. M., Raisner, R. M. & Johnson, A. D. (2000)** Evidence for mating of the "asexual" yeast *Candida albicans* in a mammalian host. *Science* **289**, 307-310.
- Ibrahim, A. S.; Filler, S. G., Sanglard, D., Edwards, Jr, J. E. & Hube, B. (1998)** Secreted aspartyl proteinases and interactions of *Candida albicans* with human endothelial cells. *Infect. Immun.* **66**, 3003-3005.
- Ishii, N., Yamamoto, M., Yoshihara, F., Arisawa, M. & Aoki, Y. (1997)** Biochemical and genetic characterization of Rbf1p, a putative transcription factor of *Candida albicans*. *Microbiology* **143**, 429-435.
- Kaminishi, H., Miyaguchi, H., Tamaki, T., Suenaga, N., Hisamatsu, M., Mihashi, I., et al. (1995)** Degradation of humoral host defense by *Candida albicans* proteinase. *Infect. Immun.* **63**, 984-988.
- Kelly, R., Miller, S. M., Kurtz, M. B. & Kirsch, D. R. (1987)** Directed mutagenesis in *Candida albicans*: one-step gene disruption to isolate ura3 mutants. *Mol. Cell. Biol.* **7**, 199-208.
- Kerridge, D. (1993)** Fungal dimorphism: a sideways look, pp. 3-10. In: Vanden Bossche, H., Odds, F. C. & Kerridge, D. (eds) *Dimorphic fungi in biology and medicine*. Plenum Press, New York.
- Kitada, K., Yamaguchi, E. & Arisawa, M. (1995)** Cloning of the *Candida glabrata* TRP1 and HIS3 genes, and construction of their disruptant strains by sequential integrative transformation. *Gene* **165**, 203-206.
- Kitada, K., Yamaguchi, E. & Arisawa, M. (1996)** Isolation of a *Candida glabrata* centromere and its use in construction of plasmid vectors. *Gene* **175**, 105-108.
- Koloteva, N., Hughes, J. M. X. & MacCarthy, J. E. G. (1998)** Reporter genes and their use in studying yeast gene expression, pp. 142-159. In: Brown, A. J. P. & Tuite, M. F. (eds) *Methods in Microbiology, Yeast Gene Analysis*. Academic Press, UK **26**, 142-159.

- Kurzai, O., Korting, H. C., Harmsen, D., Bautsch, W., Molitor, M., Frosch, M. & Mühlischlegel, F. A. (2000)** Molecular and phenotypic identification of the yeast pathogen *Candida dubliniensis*. *J. Mol. Med.* in Druck.
- Kwon-Chung; K. J. & Bennett, J. E. (1992)** Medical Mycology. Lea & Febiger, Philadelphia, USA.
- Lachke, S. A., Srikantha, T., Tsai, L. K., Daniels, K. & Soll, D. R. (2000)** Phenotypic Switching in *Candida glabrata* involves phase-specific Regulation of the metallothionein gene *MT-II* and the newly discovered hemolysin gene *HLP*. *Infect. Immun.* **68**, 884-895.
- Lambert, M., Blanchin-Roland, S., Le Louedec, F., Lépingle, A. & Gaillardin, C. (1997)** Genetic analysis of regulatory mutants affecting synthesis of extracellular proteinases in the yeast *Yarrowia lipolytica*: Identification of a *RIM101/pacC* homolog. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 3966-3976.
- Leberer, E., Marcus, D., Broadbent, I. D., Clark, K. L., Dignard, D., Ziegelbauer, K., Schmidt, A., Gow, N. A. R., Brown, A. J. P. & Thomas, D. Y. (1996)** Signal transduction through homologs of the Ste20p and Ste7p protein kinases can trigger hyphal formation in the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 13217-13222.
- Leuker, C. E., Sonneborn, A., Delbrück, S. & Ernst, J. F., (1997)** Sequence and promoter regulation of the *PCK1* gene encoding phosphoenolpyruvate carboxykinase of the fungal pathogen *Candida albicans*. *Gene* **192**, 235-240.
- Leuker, C. E., Hahn, A. M. & Ernst, J. F. (1992)** β -Galactosidase of *Kluyveromyces lactis* (Lac4p) as a reporter of gene expression in *Candida albicans* and *C. tropicalis*. *Mol. Gen. Genet.* **235**, 235-241.
- Li, W. & Mitchell, A. P. (1997)** Proteolytic activation of Rimp1p, a positive regulator of yeast sporulation and invasive growth. *Genetics* **145**, 63-73.
- Liu, H., Köhler, J. & Fink, G. R. (1994)** Suppression of hyphal formation in *Candida albicans* by Mutation of a *STE12* homolog. *Science* **266**, 1723-1726.
- Lo, H. J., Köhler, J. R., DiDomenico, B., Loebenberg, D., Cacciapuoti, A. & Fink, G. R. (1997)** Nonfilamentous *Candida albicans* mutants are avirulent. *Cell* **90**, 939-949.
- Lodish, H., Baltimore, D., Berk, A., Zipursky, S. L., Matsudaira, P. & Darnell, J. (1995)** Molecular Cell Biology. Chapter 11, Eucaryotic transcription factors pp. 442-452. Scientific American Books, New York.

- Macreadie, I. G., Castelli, L. A., Mehra, R. K., Thorvaldsen, J. L. & Winge, D. R. (1994)** Heterologous gene expression and protein secretion from *C. glabrata*. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **19**, 265-269.
- Maertens, J. A. & Boogaerts, M. A. (2000)** Fungal cell wall inhibitors: emphasis on clinical aspects. *Curr. Pharm. Des.* **6**, 225-239
- Magee, B. B., Koltin, Y., Gorman, J. A. & Magee, P. T. (1988)** Assignment of cloned genes to the seven electrophoretically separated *Candida albicans* chromosomes. *Mol. Cell. Biol.* **8**, 4721-4726.
- Magee, B. B. & Magee, P. T. (2000)** Induction of mating in *Candida albicans* by construction of *MTL α* and *MTL α* Strains. *Science* **289**, 310-313.
- McDonald, F. (1984)** Secretion of inducible proteinase by pathogenic *Candida* species. *J. Med. Vet. Mycol.* **22**, 79-82.
- Mingot, J. M., Tilburn, J., Diez, E., Bignell, E., Orejas, M., Widdick, D. A., Sarkar, S., Brown, C. V., Caddick, M. X., Espeso, E. A., Arst, Jr, H. N. & Peñalva, M. A. (1999)** Specificity determinants of proteolytic processing of *Aspergillus nidulans* PacC transcription factor are remote from the processing site, and processing occurs in yeast if pH is bypassed. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 1390-1400.
- Miyazaki, H., Miyazaki, Y., Geber, A., Parkinson, T., Hitchcock, C., Falconer, D. J., Ward, D. J., Mardsen, K. & Bennett, J. E. (1998)** Fluconazole resistance associated with drug efflux and increased transcription of a drug transporter gene, *PDH1*, in *Candida glabrata*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**, 1695-1701.
- Monod, M., Hube, B., Hess, D. & Sanglard, D. (1998)** Differential regulation of *SAP8* and *SAP9*, which encode two members of the secreted aspartyl proteinase family in *Candida albicans*. *Microbiology* **144**, 2731-2737.
- Morschhäuser, J., Michel, S., Hacker, J. (1998)** Expression of a chromosomally integrated, single-copy GFP gene in *Candida albicans*, and its use as a reporter of gene regulation. *Mol. Gen. Genet.* **257**, 412-420.
- Morschhäuser, J., Michel, S., Staib, P. (1999)** Sequential gene disruption in *Candida albicans* by FLP-mediated site-specific recombination. *Mol. Microbiol.* **32**, 547-556.
- Mouyna, I., Fontaine, T., Vai, M., Monod, M., Fonzi, W. A., Diaquin, M., Popolo, L., Hartland, R. P. & Latgé, J. P. (2000)** Glycosylphosphatidylinositol-anchored glucanoyltransferases play an active role in the biosynthesis of the fungal cell wall. *J. Biol. Chem.* **275**, 14882-14889.

- Mühlschlegel, F. A. & Fonzi, W. A. (1997)** *PHR2* of *Candida albicans* encodes a functional homolog of the pH-regulated gene *PHR1* with an inverted pattern of pH-dependent expression. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 5960-5967.
- Myers, K. K., Sypherd, P. S. & Fonzi, W. A. (1995)** Use of *URA3* as a reporter of gene expression in *Candida albicans*. *Curr. Genet.* **27**, 243-248.
- Odds, F. C. (1988)** *Candida* and Candidosis. Baillière Tindall, London, England.
- Odds, F. C. (1994)** *Candida* Species and virulence. *ASM news* **60**, 313-318.
- Odds, F.C. (1997)** Switch of phenotype as an escape mechanism of the intruder. *Mycoses* **40**, 9-12.
- Orejas, M., Espeso, E. A., Tilburn, J., Sarkar, S., Arst Jr., H. N. & Peñalva, M. A. (1995)** Activation of the *Aspergillus* PacC transcription factor in response to alkaline ambient pH requires proteolysis of the carboxy-terminal moiety. *Genes Dev.* **9**, 1622-1632.
- Pérez-Martin, J., Uria, J. A. & Johnson, D. A. (1999)** Phenotypic switching in *Candida albicans* is controlled by a *SIR2* gene. *EMBO J.* **18**, 2580-2592.
- Phan, Q. T., Belanger, P. H. & Filler, S. G. (2000)** Role of hyphal formation in interaction of *Candida albicans* with endothelial cells. *Infect. Immun.* **68**, 3485-3490.
- Pfaller, M. A., Jones, R. N., Messer, S. A., Edmond, M. B., Wenzel, R. P. & the SCOPE Participant Group (1998)** National surveillance of nosocomial blood stream infection due to species of *Candida* other than *Candida albicans*: frequency of occurrence and antifungal susceptibility in the SCOPE Program. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **30**, 121-129.
- Pfaller, M. A., Messer, S. A., Hollis, R. J., Jones, R. N., Doern, G. V., Brandt, M. E. & Hajjeh, R.A. (1999)** Trends in species distribution and susceptibility to fluconazol among blood stream isolates of *Candida* species in the United States. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **33**, 217-222
- Pla, J., Gil, C., Monteoliva, L., Navarro-Garcia, F., Sanchez, M. & Nombela, C (1996)** Understanding *Candida albicans* at the molecular level. *Yeast* **12**, 1677-1702.
- Porta, A., Ramon, A. M. & Fonzi, W. A. (1999)** *PRR1*, the homolog of the *Aspergillus nidulans* *palf*, controls pH-dependent gene expression and filamentation in *Candida albicans*. *J. Bacteriol.* **181**, 7516-7523.
- Ramon, A. M., Porta, A. & Fonzi, W.A. (1999)** Effect of environmental pH on morphological development of *Candida albicans* is mediated via the PacC-related transcription factor encoded by *PRR2*. *J. Bacteriol.* **181**, 7524-7530.

- Rennert, G., Rennert, H. S., Pitlik, S., Finkelstein, R. & Kitzes-Cohen, R. (2000)** Epidemiology of Candidemia - a nationwide survey in Israel. *Infection* **28**, 26-29.
- Rocha, C. R. C., Harcus, D., Thomas, D. Y. & Leberer, E. (1999)** Molecular characterization of the gene *CDC35* encoding the Adenylate cyclase of *Candida albicans*. European research conference: *Human fungal pathogen, fungal dimorphism and disease* (Granada, Spain).
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. (1977)** DNA sequencing with chain-termination inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463-5467.
- Sanglard, D., Ischer, F., Koymans, L. & Bille, J. (1998)** Amino acid substitutions in the cytochrome P-450 lanosterol 14 α -demethylase (CYP51A1) from azole-resistant *Candida albicans* clinical isolates contribute to resistance to azole antifungal agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**, 241-253.
- Santos, M. A. S., Keith, G. & Tuite, M. F. (1993)** Non-standard translational events in *Candida albicans* mediated by an unusual seryl-tRNA with a 5'-CAG-3' (leucine) anticodon. *EMBO J.* **12**, 607-616.
- Saporito-Irwin, S. M., Birse, C. E., Sypherd, P. S. & Fonzi, W. A. (1995)** *PHR1*, a pH-regulated gene of *Candida albicans*, is required for morphogenesis. *Mol. Cell. Biol.* **15**, 601-613.
- Schaller, M., Korting, H. C., Schäfer, W., Sanglard, D. & Hube, B. (1998)** Investigations on the regulation of secreted aspartyl proteases in a model of oral candidosis *in vivo*. *Mycoses* **41**, 69-73.
- Sentandreu, M., Elorza, M. V., Sentandreu, R. & Fonzi, W. A. (1998)** Cloning and characterization of *PRA1*, a gene encoding a novel pH-regulated antigen of *Candida albicans*. *J. Bacteriol.* **180**, 282-289.
- Sharkey, L. L., McNemar, M. D., Saporito-Irwin, S. M., Sypherd, P. S. & Fonzi, W. A. (1999)** *HWP1* functions in the morphological development of *Candida albicans* downstream of *EFG1*, *TUP1*, and *RBF1*. *J. Bacteriol.* **181**, 5273-5279.
- Soll, D. R., Morrow, B. & Srikantha, T. (1993)** High-frequency phenotypic switching in *Candida albicans*. *Trends Genet.* **9**, 61-65.
- Sonneborn, A., Tebarth, B. & Ernst, J. F. (1999)** Control of White-Opaque phenotypic switching in *C. albicans* by the Efg1p morphogenetic regulator. *Infect. Immun.* **67**, 4655-4660.

- Sonneborn, A., Bockmühl, D. P. & Ernst, J. F. (1999)** Chlamyospore formation in *Candida albicans* requires the Efg1p morphogenetic regulator. *Infect. Immun.* **67**, 5514-5517.
- Sonneborn, A., Bockmühl, D. P., Gerads, M., Kurpanek, K., Sanglard, D. & Ernst, J. (2000)** Protein kinase A encoded by *TPK2* regulates dimorphism of *Candida albicans*. *Mol. Microbiol.* **35**, 386-396.
- Southern, E. M. (1975)** Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**, 503-517.
- Staab, J. F., Bradway, S. D., Fidel, P.L. & Sundstrom, P. (1999)** Adhesive and mammalian transglutaminase substrate properties of *Candida albicans* Hwp1. *Science* **283**, 1535-1538.
- Staub, F., Seibold, M., Antweiler, E., Fröhlich, B., Weber, S. & Blisse, A. (1987)** The brown colour effect (BCE) of *Cryptococcus neoformans* in the diagnosis, control and epidemiology of *C. neoformans* infections in AIDS patients. *Zentralbl. Bakteriolog. Microbiol. Hyg. [A]* **266**, 167-177.
- Staub, P. & Morschhäuser, J. (1999)** Chlamyospore formation on Staub agar as a species-specific characteristic of *Candida dubliniensis*. *Mycoses* **42**, 521-524.
- Staub, P., Kretschmar, M., Nichterlein, T., Köhler, G., Michel, S., Hof, H., Hacker, J. & Morschhäuser, J. (1999)** Host-induced, stage-specific virulence gene activation in *Candida albicans* during infection. *Mol. Microbiol.* **32**, 533-546.
- Staub, P., Kretschmar, M., Nichterlein, T., Hof, H. & Morschhäuser, J. (2000)** Differential activation of a *Candida albicans* virulence gene family during infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **97**, 6102-6107.
- Stoldt, V. R., Sonneborn, A., Leuker, C. & Ernst, J. F. (1997)** Efg1p, an essential regulator of morphogenesis of the human pathogen *Candida albicans*, is a member of a conserved class of bHLH proteins regulating morphogenetic processes in fungi. *EMBO J.* **16**, 1982-1991.
- Su, S. S. Y. & Mitchell, A. P. (1993)** Molecular characterization of the yeast meiotic regulatory gene *RIM1*. *Nucl. Acids Res.* **21**, 3789-3797.
- Sullivan, D. J. & Coleman, D. (1998)** *Candida dubliniensis*: characteristics and identification. *J. Clin. Microbiol.* **36**, 329-334.
- Thorvaldsen, J. L., Sewell, A. K., McCowen, C. L., & Winge, D. R. (1993)** Regulation of metallothionein genes by *ACE1* and *AMT1* transcription factors. *J. Biol. Chem.* **268**, 12512-12518.

- Tilburn, J., Sarkar, S., Widdick, D. A., Espeso, E. A., Orejas, M., Mungroo, J., Peñalva, M. A. & Arst Jr., H. N. (1995)** The *Aspergillus* PacC zinc finger transcription factor mediates regulation of both acid- and alkaline expressed genes by ambient pH. *EMBO J.* **14**, 779-790.
- Tsuchimori, N., Sharkey, L. L., Fonzi, W. A., French, S. W., Edwards, JR., J. E. & Filler, S. G. (2000)** Reduced virulence of *HWP1*-deficient mutants of *Candida albicans* and their interaction with host cells. *Infect. Immun.* **68**, 1997-2002.
- Vai, M., Gatti, E., Lacana, E., Popolo, L. & Alberghina, L., (1991)** Isolation and deduced amino acid sequence of the gene encoding gp115, a yeast glycopospholipid-anchored protein containing a serine-rich region. *J. Biol. Chem.* **266**, 12242-12248.
- Vanden Bossche, H., Dromer, F., Improvisi, I., Lozano-Chiu, M., Rex, J. H. & Sanglard, D. (1998)** Antifungal drug resistance in pathogenic fungi. *Med. Mycology* **36**, 119-128.
- Vazquez, J. A., Dembry, L. M., Sanchez, V., Vazquez, M. A., Sobel, J. D., Dmuchowski, C. & Zervos, M. J. (1998)** Nosocomial *Candida glabrata* colonization: an epidemiologic study. *J. Clin. Microbiol.* **36**, 421-426.
- Viscoli, C., Girmenia, C., Marinus, A., Collette, L., Martino, P., Vandercam, B., Doyen, C., Lebeau, B., Spence, D., Krcmery, V., De Pauw, B. & Meunier, F. (1999)** Candidemia in cancer patients: a prospective, multicenter surveillance study by the invasive fungal infection group (IFIG) of the european organization for research and treatment of cancer (EORTC). *Clin. Infect. Dis.* **28**, 1071-1079.
- Walsh, T. J., Whitcomb, P. O., Revankar, S. G. & Pizzo, P. A. (1995)** Successful treatment of hepatosplenic candidiasis through repeated cycles of chemotherapy and neutropenia. *Cancer* **76**, 2357-2362.
- Weig, M., Haynes, K., Rogers, T. R., Kurzai, O., Frosch, M. & Mühlischlegel, F. A. (2000)** A *GAS1* like family in the pathogenic fungus *Candida glabrata* is involved in cell wall assembly. *Zur Publikation eingereicht.*
- White, T. & Agabian, N. (1995)** *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases: Isoenzyme pattern is determined by cell type, and levels are determined by environmental factors. *J. Bacteriol.* **177**, 5215-5221.
- Zhou, P. & Thiele, D. J. (1993)** Rapid transcriptional autoregulation of a yeast metalloregulatory transcription factor is essential for high-level copper detoxification. *Genes Dev.* **7**, 1824-1835.

Zhou, P., Szczyпка, M. S., Young, R., Thiele, D. J. (1994) A system for gene cloning and manipulation in the yeast *Candida glabrata*. *Gene* **142**, 135-140.

7 Abstract

Morphological development of the fungal pathogen *C. albicans* is profoundly affected by environmental signals. This morphological flexibility is considered an essential factor for pathogenicity of *C. albicans*. One of the important signals that regulates morphology of *C. albicans* is the ambient pH. Acidic pH restricts growth to the yeast form, whereas neutral pH permits development of the filamentous form. Superimposed on the pH restriction is a temperature requirement of approximately 37°C for filamentation.

C. albicans responds to changes in environmental pH by differential expression of several genes including *PHR1* and *PHR2*. *PHR2* is an acid expressed gene that is not expressed at detectable levels above pH 6.5. Mutants lacking *PHR2* are unable to grow at acidic pH and exhibit morphological defects. *PHR1* is an alkaline expressed gene with the inverse pattern of expression. *PHR1* and *PHR2* encode functionally homologous proteins involved in cell wall biosynthesis, which is pivotal in determining cell shape changes during morphogenesis.

The role of pH in development was investigated in this work by selecting revertants of *phr2*Δ mutants that had gained the ability to grow at acid pH. The extragenic suppressors in two independent revertants were identified as nonsense mutations in the pH response regulator *RIM101* that resulted in a carboxy-terminal truncation of the open reading frame. These dominant active alleles conferred the ability to filament at acidic pH, to express *PHR1*, an alkaline expressed gene, at acidic pH and to repress the acid expressed gene *PHR2*. This indicates that *RIM101* is a key regulator of the pH-dependent dimorphism in *C. albicans*. Furthermore these results suggest that the molecular mechanisms which control pH-dependent gene expression in *Aspergillus nidulans* and other fungi are also conserved in *C. albicans*. It was also observed that both the wild type and mutant alleles could act as multicopy suppressors of the temperature restriction on filamentation, allowing extensive filamentation at 29°C. This observation suggests that two environmental signals, pH and temperature, converge on common molecular targets.

The ability of the activated alleles to promote filamentation was dependent upon the developmental regulator *EFG1*. The results suggest that *RIM101* is responsible for the pH-dependence of hyphal development.

C. albicans and *C. glabrata* are opportunistic pathogens which are able to colonize and infect many tissues and organs. This indicates that these organisms are well adapted for survival within the diverse environmental niches of the human host. *C. albicans* responds to different environmental signals, as described above, with the expression of certain genes, e.g. *PHR1*, *PHR2* and *RIM101*. In contrast to *C. albicans* the gene regulation in the emerging pathogen *C. glabrata* is poorly understood.

In order to develop a reporter system allowing studies on regulated gene expression in *C. glabrata* the functionality of the *E. coli lacZ* gene as a reporter of gene expression in *C. glabrata* was investigated. *C. glabrata* shuttle vectors suitable for the construction of translational fusions of a gene of interest to the *E. coli lacZ* reporter were generated. By fusing different promoters to the *lacZ* gene it could be shown that the *E. coli lacZ* gene provides a sensitive and inducible reporter displaying β -galactosidase activity in *C. glabrata*.

8 Anhang

Abkürzungen

A	Adenin
A.	<i>Aspergillus</i>
Abb.	Abbildung
AMP	Adenosinmonophosphat
Amp	Ampicillin
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	Adenosintriphosphat
AS	Aminosäure
Bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
C.	<i>Candida</i>
ca.	circa
C-Terminus	Carboxy-Terminus
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	Desoxyguanintriphosphat
DMF	N,N'-Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
g	gramm
G	Guanin

GFP	<i>green fluorescent protein</i>
h	Stunde
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)Piperazin.N'2 Ethansulfonsäure
K	Kilo-
Kb	Kilobasenpaare
LB	Luria Bertani
l	Liter
m	Milli-
M	Molar
min	Minute
μ	Mikro
MCR	multiple Klonierungsregion
MCS	<i>multiple cloning site</i>
min	Minute
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
n	Nano-
N-Terminus	Aminoterminus
OD	Optische Dichte
ONPG	O-Nitrophenyl-β-D-galaktosid
ORF	Offenes Leseraster (<i>open reading frame</i>)
p	Pico-
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
pH	negativer dekadischer Lygarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PNK	Polynukleotidkinase
pr	Promotor
<i>Primer</i>	Oligonukleotid
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur

S.	<i>Saccharomyces</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
ssDNA	Einzelstrang-DNA
STM	<i>signature-tagged-mutagenesis</i>
t	Zeit
T	Thymidin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TE	Tris-HCL-EDTA-Puffer
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	<i>Unit</i> (Enzymeinheit)
ÜNK	Übernachtkultur
UV	Ultraviolett
V	Volt
Y.	<i>Yarrowia</i>
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-D-Galaktosid
z. B.	zum Beispiel

Lebenslauf

Name: Abdelmalic El Barkani
Geburtstag: 14. Dezember 1968
Geburtsort: Nador/Marokko
Familienstand: ledig

Schulausbildung:

1975 - 1976 Grundschule in Nador/Marokko
1976 - 1979 Grundschule an der Aakerfährstrasse in Duisburg
1979 - 1988 Gymnasium an der Pappenstrasse in Duisburg
Schulabschluss: allgemeine Hochschulreife

Hochschulausbildung:

1988 - 1989 Studium der Chemie an der Gesamthochschule Duisburg
1989 - 1996 Studium der Biologie an der Justus-Liebig-Universität
Giessen
1995 Diplomprüfung
1995 - 1996 Diplomarbeit am Institut für Medizinische Mikrobiologie
und Infektionsimmunologie der Universität Giessen
Thema der Diplomarbeit: Nukleotidsequenz und
Sequenzanalyse eines Eisenbindungs- und
Eisentransportsystems von *Listeria monocytogenes*
Serotyp 1/2a
Hochschulabschluss: Diplom-Biologe
seit 1997 Promotion am Institut für Hygiene und Mikrobiologie der
Universität Würzburg

Publikationen

El Barkani, A., Kurzai, O., Fonzi, W.A., Ramon, A., Porta, A., Frosch, M. & Mühlischlegel, F. A. (2000). Dominant active alleles of *RIM101 (PRR2)* bypass the pH restriction on filamentation of *Candida albicans*. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 4635-4647.

El Barkani, A., Haynes, K., Mösch, H. U., Frosch, M. & Mühlischlegel, F. A. (2000) *Candida glabrata* shuttle vectors suitable for translational fusions to *lacZ* and use of β -galactosidase as a reporter of gene expression. *Gene* **246**, 151-155.

Kurzai, O., El Barkani, A. & Mühlischlegel, F. A. Adaptation of Fungi to Alterations of the Ambient pH. In Cihlar & Calderone (eds) *Fungal Pathogenesis: Principals and Clinical Applications*. Marcel Decker, Inc., New York, USA. In Druck.