

**Studie zur Identifizierung pH-abhängig regulierter
Zellwandkomponenten des humanpathogenen Pilzes
*Candida albicans***

Von der Fakultät Geo- und Biowissenschaften
der Universität Stuttgart
zur Erlangung der Würde eines
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
genehmigte Abhandlung

vorgelegt von

Henrike Lotz

aus Wuppertal

Hauptberichter: Prof. Dr. Herwig Brunner

Mitberichter: Prof. Dr. Wolfgang Seufert

Tag der mündlichen Prüfung: 10. August 2004

Institut für Grenzflächenverfahrenstechnik der Universität Stuttgart

2004

Inhaltsverzeichnis

1	ZUSAMMENFASSUNG	1
2	ABSTRACT	2
3	EINLEITUNG	4
3.1	Biologie des Hefepilzes <i>Candida albicans</i>	4
3.2	Medizinische Bedeutung von <i>C. albicans</i>	6
3.3	Therapie von Kandidosen	8
3.4	Virulenz und Invasivität	9
3.5	Funktion der Zellwand als äußere Barriere	11
3.6	Genregulation zur Anpassung an variable Habitate	12
3.6.1	Regulation der pH-abhängigen Genexpression durch den Transkriptionsfaktor Rim101p	13
3.6.2	Regulation der Hyphenbildung in <i>C. albicans</i>	16
3.6.2.1	MAPK- und cAMP-Signalweg	16
3.6.2.2	Kontrolle der pH-abhängigen Hyphenbildung durch <i>RIM101</i>	18
3.7	Suche nach Zielgenen von Rim101p	19
3.8	Zielsetzung der Arbeit	21
4	MATERIAL UND METHODEN	22
4.1	Material	22
4.1.1	Chemikalien	22
4.1.2	Enzyme	22
4.1.3	Reaktions-Kits	23
4.1.4	Radiochemikalien	23

4.1.5	Pufferlösungen	23
4.1.6	Kulturmedien	24
4.1.7	<i>C. albicans</i> -Stämme	26
4.1.8	Bakterienstämme	27
4.1.9	Plasmide und Vektoren	27
4.1.10	Datenbanken und Datenverarbeitung	29
4.2	Methoden	31
4.2.1	Kultivierung und Lagerung von Mikroorganismen	31
4.2.2	Transformation von <i>C. albicans</i>	31
4.2.2.1	Lithiumchlorid-Methode	32
4.2.2.2	Elektroporation	32
4.2.3	Präparation genomischer DNA aus <i>C. albicans</i>	33
4.2.4	RNA-Isolierung	34
4.2.5	Transkriptionsanalyse mittels DNA-Mikroarray	35
4.2.5.1	Auswahl und Annotation der Sonden	35
4.2.5.2	Herstellung der Arrays	37
4.2.5.3	Markierung von cDNA und Hybridisierung	38
4.2.6	Northern Blot-Hybridisierung	39
4.2.7	Gendeletion durch sequenzielle homologe Rekombination	40
4.2.7.1	Konstruktion der <i>RBR1</i> -Deletionskassetten	42
4.2.7.2	Herstellung der <i>RBR1</i> -Deletionsmutanten	42
4.2.8	Reversion der <i>RBR1</i> -Deletionsmutanten	43
4.2.9	Southern Blot-Hybridisierung	44
4.2.10	Virulenzstudien	44
5	ERGEBNISSE	45
5.1	Anpassung von <i>C. albicans</i> an den pH-Wert	45
5.2	Eigenschaften der untersuchten <i>RIM101</i>-Mutanten	46
5.2.1	<i>C. albicans</i> säuert das Kulturmedium stark an	46
5.2.2	<i>RIM101</i> wird pH-abhängig transkribiert	49
5.3	Transkriptionsanalyse potentieller Zellwandproteine	50
5.3.1	Rim101p aktiviert und reprimiert Zielgene	51

5.3.1.1	<i>RIM101</i> -aktivierte Gene	53
5.3.1.2	<i>RIM101</i> -reprimierte Gene	55
5.4	Phänotypische Charakterisierung von <i>RBR1</i>-Deletionsmutanten	58
5.4.1	Deletion und Reversion von <i>RBR1</i> in <i>C. albicans</i>	58
5.4.2	<i>RBR1</i> wird für die Filamentierung benötigt	60
5.5	Bedeutung von <i>RBR1</i> für die Virulenz von <i>C. albicans</i>	63
5.6	Aktivierung von <i>RBR1</i> durch den Transkriptionsfaktor Nrg1p	66
5.7	Repression von <i>NRG1</i> durch Rim101p	69
5.7.1	Hyphenspezifisches <i>HWP1</i> wird <i>RIM101</i> -abhängig exprimiert	72
5.7.2	Die <i>RIM101</i> -abhängige Repression von <i>NRG1</i> korreliert mit dem $\Delta rim101$ -Filamentierungsdefekt	73
6	DISKUSSION	77
6.1	Rim101p als transkriptioneller Aktivator und Repressor in <i>C. albicans</i>	77
6.1.1	Aktivierende Funktion von Rim101p	79
6.1.2	Reprimierende Funktion von Rim101p	83
6.2	Funktion und Regulation von <i>RBR1</i> in <i>C. albicans</i>	85
6.3	Regulation des hyphalen Repressors Nrg1p durch <i>RIM101</i>	88
7	LITERATURVERZEICHNIS	91
	Anhang	I
	Abkürzungsverzeichnis.....	I
	Abbildungsverzeichnis.....	III
	Tabellenverzeichnis.....	IV
	Lebenslauf.....	V
	Veröffentlichungen.....	VI

1 Zusammenfassung

Mikroorganismen, die ein breites Spektrum von Habitaten besiedeln, benötigen effektive Mechanismen zur Anpassung an den extrazellulären pH-Wert. Der humanpathogene Pilz *Candida albicans* besiedelt im menschlichen Körper den Darm und die Vaginalhöhle, in denen jeweils verschiedene pH-Bedingungen herrschen. Die zentrale Rolle der pH-Adaption für das Überleben des Pilzes verleiht der Aufklärung ihrer molekularen Grundlagen besondere Bedeutung im Hinblick auf die Entwicklung neuer Antimykotika. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der pH-abhängigen Genregulation in *C. albicans*.

Der Transkriptionsfaktor Rim101p reguliert die Gene *PHR1* und *PHR2*, welche essentielle Zellwandproteine für das Wachstum von *C. albicans* in neutraler bzw. saurer Umgebung kodieren. Zur Identifizierung weiterer, *RIM101*-regulierter Gene in *C. albicans* wurde für Transkriptionsanalysen ein zellwandspezifischer DNA-Mikroarray eingesetzt. Diese führten zur Identifizierung zum Teil bereits bekannter *RIM101*-aktivierter Gene (*HWP1*, *RBT1*, *ALS1*). Es wurden aber auch mehrere bisher nicht charakterisierte Gene gefunden, die durch *RIM101* reprimiert werden (z.B. *RBR1*, *RBR2*, *RBR3*, für „repressed by Rim101p“). Deletionsstudien für Rbr1p zeigten eine wichtige Funktion dieses Zellwandproteins für die Filamentierung bei saurem pH. Vor allem wies diese Mutante im systemischen Mausmodell eine signifikant verringerte Pathogenität gegenüber dem Wildtyp auf. Da Rbr1p großen Anteil an der *RIM101*-abhängigen pH-Adaption hat und mit der Virulenz des Pilzes assoziiert ist, stellt es als GPI-Protein eine potentielle Zielstruktur für neue Antimykotika dar. Die *RIM101*-aktivierten, hyphalen Zellwandproteine Als1p, Hwp1p und Rbt1p werden durch den Transkriptionsfaktor Nrg1p reprimiert. Im Rahmen der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass die Expression von Rim101p in *C. albicans* mit der Herabregulierung des hyphalen Repressors Nrg1p korreliert. Dieses Ergebnis charakterisiert Rim101p als zentralen Mediator an der Schnittstelle zwischen pH-Antwort und der komplexen Regulation der Filamentierung in *C. albicans* und verdeutlicht die Bedeutung von Rim101p für die Virulenz des Pilzes.

2 Abstract

The ascomycetous yeast *Candida albicans* is the major opportunistic human fungal pathogen. This eukaryotic microorganism is able to inhabit various habitats within the host including acidic environments like the skin or vaginal mucosae and neutral to alkaline environments as encountered in the gut. The ability to sense and adapt to extreme ambient pH-values from 2 to 10 (Odds, 1988) is essential for survival, growth and virulence of the pathogen *C. albicans*. External pH strongly effects particularly the cell wall and the cell membrane as the outermost barriers of the cell. In the plasma membrane, these effects include changes in protein activity, maintenance of the proton gradient and the availability of nutrients, while the molecular composition of the cell wall is rapidly remodeled due to a shift in external pH. So far, little is known about the molecular mechanisms of this adaptation process of the cell wall.

A conserved signal transduction pathway of fungi to respond to external pH is represented by the activity of the zinc finger transcription factor Rim101p/PacC (Su & Mitchell, 1993; Tilburn *et al.*, 1995). At acidic pH, Rim101p/PacC is predominantly found in the full-length form, while at neutral and alkaline pH, the protein is processed by a proteolytic cascade. *C. albicans* Rim101p has been shown to play a major role in pH-dependent gene regulation. The transcription factor is involved in cell wall biosynthesis as it regulates *PHR1* and *PHR2* (Porta *et al.*, 1999), two functionally almost redundant cell wall glycosidases important for adaptation to either neutral or acidic habitat (Muhlschlegel & Fonzi, 1997; Saporito-Irwin *et al.*, 1995). To identify additional cell wall components regulated by Rim101p, transcriptional profiling was performed using a cell wall specific DNA-microarray. Experimental data showed that Rim101p contributes to the activation of known hyphal specific genes like *HWP1*, *RBT1* and *ALS1* and also is required for repression of several potential cell wall genes. Three yet uncharacterized genes were named *RBR1*, *RBR2* and *RBR3* (repressed by Rim101p). Further characterization of *RBR1* revealed a small GPI-protein that is expressed under acidic conditions predominantly at lower temperature. Deletion of this gene resulted in a filamentation defect at low pH and furthermore, a

significantly reduced virulence of the deletion strain $\Delta rbr1$ versus the wildtype strain was shown in a systemic mouse model. These data suggest *RBR1* as a potential target for new antifungal drugs.

Changes in environmental pH also serve as a potent signal for morphological differentiation of *C. albicans* as it entails the differential expression of several genes affecting morphogenesis. The ability to switch between yeast and filamentous growth form is essential for the virulence of *C. albicans* and there is great impetus to understand the signals and regulatory pathways that govern this process (Braun & Johnson, 2000; Lo *et al.*, 1997a). One dominant repressor of filamentous growth in *C. albicans* is the transcription factor Nrg1p. Interestingly, *NRG1* is required for the transcription of the acid expressed and *RIM101*-repressed gene *RBR1*. This apparently activating effect of *NRG1* observed in this study has not been described yet. Transcriptional profiling data give rise to the presumption that this functional property of Nrg1p also affects other genes. In addition, this work shows that expression of *NRG1* is not only negatively correlated to temperature, but also pH-dependent. This pH-dependent expression of *NRG1* at lower pH seems to be mediated by *RIM101*, since *NRG1*-transcription is diminished in the presence of active Rim101p. Summarizing the results presented in this study, the transcription factor Rim101p is regulating the pH-response by activating as well as repressing several cell wall genes of *C. albicans* and also is part of the signaling pathway regulating hyphal growth of the fungus. Therefore, the function of Rim101p integrates two central pathways of the complex regulatory network required for the ability of *C. albicans* to be a successful opportunistic pathogen.

3 Einleitung

3.1 Biologie des Hefepilzes *Candida albicans*

Die systematische Einordnung der Gattung *Candida* erfolgt zum Stamm der Askomykota (Sprosspilze) in die Klasse der Endomyzeten und zur Ordnung der Saccharomycetales. Als heterotropher und fakultativ anaerober Hefepilz ist *C. albicans* wie auch andere Hefearten an sehr unterschiedliche Habitate angepasst. *Candida* wird im Boden, im Wasser und auf Früchten gefunden, besiedelt aber auch tierische Organismen. Der Pilz kann zur Energiegewinnung verschiedene Kohlenstoff- und Stickstoffverbindungen nutzen. Auf Haut und Schleimhäuten von Säugern lebt *C. albicans* in der Regel als Kommensale. Bei über 30% aller erwachsenen Menschen ist der Pilz symptomlos im Kot nachzuweisen (Khatib *et al.*, 2001), seine Übertragung erfolgt in der Regel konnatal, also bei der Geburt von der Mutter auf das Kind. *C. albicans* gehört jedoch zu den opportunistischen Krankheitserregern und kann bei immunkompromittierten Menschen schwere Infektionen hervorrufen (Odds, 1988).

In seiner einzelligen Wachstumsform bildet *C. albicans* ellipsoide Hefezellen aus, die Blastokonidien. Diese sind diploid mit 2 x 8 Chromosomen (Iwaguchi *et al.*, 1990) und vermehren sich ungeschlechtlich durch apikale Sprossung (Abbildung 1). *C. albicans* wird als obligat diploider Organismus betrachtet, da bisher weder Meiose, noch Sporulation oder haploide Wachstumsformen nachgewiesen werden konnten. Ein sexueller Fortpflanzungszyklus scheint zu fehlen (Scherer & Magee, 1990). Zwar konnte *in vitro* die Verschmelzung von diploiden Einzelzellen zu tetraploiden Stadien induziert werden, die Bedeutung dieses Mechanismus ist *in vivo* jedoch vermutlich von geringer Bedeutung (Hull & Johnson, 1999; Hull *et al.*, 2000; Magee & Magee, 2000).

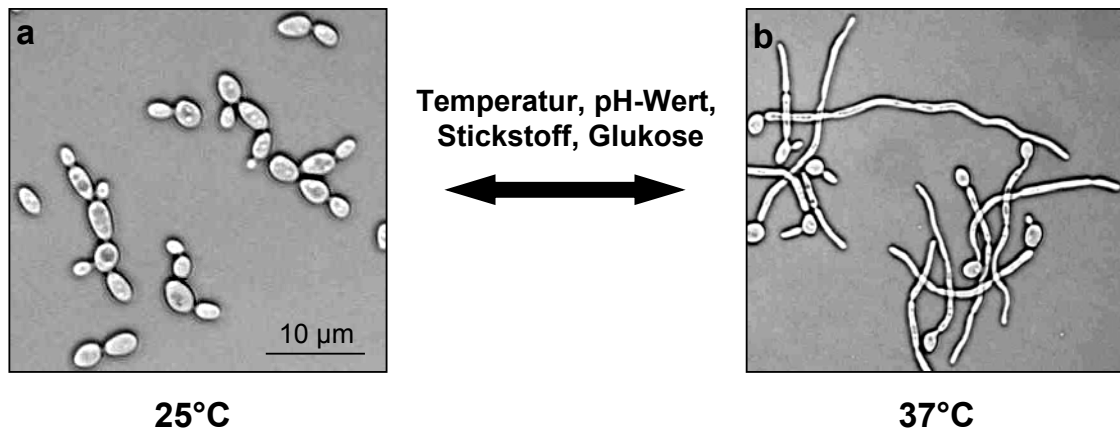


Abbildung 1: Dimorphismus von *C. albicans*. a: Sprossende Blastokonidien kultiviert bei 25°C; b: Filamentierende *C. albicans* 2 h nach Induktion der Hyphenbildung bei 37°C.

C. albicans ist pleiomorph und verändert seine Gestalt als Antwort auf externe Reize. Durch eine Erhöhung der Temperatur, des pH-Wertes oder durch Anreicherung des Kulturmediums mit Serum kann *in vitro* aus der ellipsoiden Hefeform eine filamentöse Wachstumsform induziert werden (Abbildung 1). Diese reversible Transition zwischen ellipsoidem und filamentösem Wachstum bezeichnet man als Dimorphismus. Der Gestaltwechsel des Pilzes beginnt mit dem Auswachsen eines Keimschlauches aus der Mutterzelle. Durch anhaltendes Längenwachstum des Keimschlauches und weitere Kernteilungen entstehen lange Filamente, die Hyphen. Diese mehrzelligen Hyphen verzweigen sich durch Sprossung und bilden bei fortgesetzt hyphalem Wachstum ein dichtes Geflecht, das Myzel aus. Die zellulären Segmente einer Hyphe sind durch Septen voneinander getrennt, die einen Austausch zwischen den Zellen ermöglichen; es wird an der Kontaktstelle zwischen zwei Zellen keine Zellwand ausgebildet. Von diesen echten Hyphen sind die Pseudohyphen zu unterscheiden, welche aus Ketten langgestreckter Einzelzellen bestehen, die jeweils vollständig von einer Zellwand umgeben sind. Von einem Myzel können unter geeigneten Lebensbedingungen wieder Blastokonidien hervorgebracht werden, bei Nährstoffmangel oder anderen lebensfeindlichen Umwelt-

bedingungen allerdings werden - meist durch Sprossung am distalen Ende der Hyphen - Chlamydosporen als Überdauerungsform gebildet.

3.2 Medizinische Bedeutung von *C. albicans*

Von den 300000 weltweit beschriebenen Pilzarten sind etwa 200 als Krankheitserreger des Menschen bekannt (Kerridge, 1993). Größte Verbreitung und medizinische Bedeutung haben die humanpathogenen Arten *C. albicans*, *C. glabrata* sowie *Aspergillus fumigatus* und *Pneumocystis carinii* (Viscoli *et al.*, 1999). Von den 150 bekannten *Candida*-Arten gelten maximal 20 als Krankheitserreger des Menschen (Odds, 1988). Über 50% aller diagnostizierten humanen *Candida*-Infektionen werden durch *C. albicans* hervorgerufen, an zweiter Stelle stehen Infektionen mit *C. glabrata*, *C. tropicalis* und *C. parapsilosis* (Pfaller *et al.*, 1998; Rennert *et al.*, 2000; Viscoli *et al.*, 1999).

Der Befall von Haut oder Schleimhäuten mit *C. albicans* wird als ektopische Infektion bezeichnet und von der systemischen Kandidose unterschieden. Eine systemische *Candida*-Infektion ist gekennzeichnet durch den Übertritt des Pilzes in das Blutgefäßsystem und die anschließende Besiedelung innerer Organe des Patienten. *C. albicans* wird für den größten Teil aller vulvo-vaginalen Pilzinfektionen (Vaginitis) verantwortlich gemacht, ektopische Kandidosen treten aber ebenso bei Neugeborenen und Patienten mit Diabetes mellitus auf (Mundsoor, Dermatitis). Mukosale Pilzinfektionen sind bei Menschen mit einem gesunden Immunsystem in der Regel nicht lebensbedrohlich.

Systemische Kandidosen dagegen führen unbehandelt zur Sepsis und zeigen eine sehr hohe Mortalitätsrate von bis zu 40% (de Pauw, 1999; Matuschak & Lechner, 1997). *C. albicans* durchbricht bei dieser Form des Befalls die epitheliale Barriere sowie die zelluläre Immunabwehr des Menschen und gelangt über die Blutbahn in die inneren Organe (Odds, 1994; Zink *et al.*, 1996). Vor allem die Leber und Nieren werden durch die Besiedelung mit *C. albicans*

stark geschädigt, daher ist multiples Organversagen eine häufige Todesursache der Betroffenen (www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/candidiasis_t.htm, Dezember 2003). Die Manifestation einer systemischen Kandidose stellt eine typische Sekundärerkrankung hospitalisierter Patienten dar (Ashman, 1998). Sie tritt in der Regel in Folge einer stark geschwächten Immunabwehr auf, durch die der endogene Kommensale zum Pathogen wird. Prädisponierende Faktoren sind daher schwere Störungen der Immunabwehr durch erbliche T-Zell-Defizienz oder AIDS, aber auch eine medikamentös erzielte Drosselung des Immunsystems bei Tumorpatienten und Transplantatempfängern kann bei nicht ausreichender Prophylaxe zu systemischen Kandidosen führen (Altiparmak *et al.*, 2002; Nucci & Colombo, 2002). Begünstigend für eine übermäßige Vermehrung von *C. albicans* wirkt ebenfalls die Dauermedikation mit Breitbandantibiotika, da durch diese die natürliche mikrobielle Darmflora zerstört wird (Nola *et al.*, 2003; Nucci & Colombo, 2002). Eine Übertragung des Pilzes in der Klinik erfolgt vor allem durch unzureichende Hygienemaßnahmen, möglicherweise aber auch durch die Bildung fungizidresistenter Biofilme von *C. albicans* auf Kunststoffoberflächen von Infusions- oder Katheterschläuchen (Chandra *et al.*, 2001a; Chandra *et al.*, 2001b; Kuhn *et al.*, 2002; Mukherjee *et al.*, 2003). Einen weiteren Risikofaktor stellt die Entstehung und die Verbreitung fungizidresistenter *C. albicans*-Stämme durch die prophylaktische Therapie mit Azolen dar (Morschhauser, 2002).

Die Zahl der systemischen Kandidosen ist in den letzten zwei Jahrzehnten signifikant angestiegen und *C. albicans* steht mittlerweile an vierter Stelle der nosokomialen Blutkeime (*Center for Disease Control and Prevention*, www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/candidiasis_t.htm, Dezember 2003). Aus diesem Grund kommen nicht nur der effektiven klinischen Prävention und der Therapie von Kandidosen, sondern auch der molekularbiologischen Erforschung der Pathogenitäts-Mechanismen von *C. albicans* eine besondere Bedeutung zu.

3.3 Therapie von Kandidosen

Zur Therapie von Kandidosen stehen Antimykotika verschiedener Stoffklassen zur Verfügung, die unterschiedliche biologische Wirkmechanismen aufweisen. Eine Wirkstoffgruppe mit breitem fungiziden Wirkungsspektrum bilden die Polyenderivate. Diese binden mit hoher Affinität an das in der Pilzzellmembran vorkommende Ergosterol, destabilisieren dadurch die Membran und töten den Pilz ab. Polyenpräparate wie Nystatin oder Amphotericin B gehören bis heute zu den erfolgreichsten Antiinfektiva mit sehr guter Wirksamkeit bei der Behandlung systemischer Kandidosen. Bei langfristiger systemischer Verabreichung, etwa in der begleitenden Prophylaxe während einer Chemotherapie, zeigt Amphotericin B allerdings stark nierenschädigende Wirkung, die auch durch die Entwicklung neuer, liposomaler Darreichungsformen nicht ausreichend reduziert werden konnte.

Die größte Zahl der heute verfügbaren Antimykotika gehört zur Stoffgruppe der Triazole, wie beispielsweise die Präparate Fluconazol, Itraconazol oder Voriconazol. Azole werden insbesondere zur Behandlung lokaler mukosaler Kandidosen, aber auch zur systemischen Therapie eingesetzt (Aly *et al.*, 2001). Ihre fungistatische Wirkung beruht auf der spezifischen Hemmung der Lanosterol-14- α -demethylase, einem Schlüsselenzym im Biosyntheseweg des für den Aufbau der Zellmembran essentiellen Ergosterols.

Ein weiteres Antimykotikum mit hohem Wirkungsgrad ist das Flucytosin. Dieses synthetisch fluorierte Pyrimidin-Analogon hemmt die RNA-Synthese des Pilzes und zeichnet sich wie die Azole durch sehr geringe Nebenwirkungen aus (Vanden Bossche *et al.*, 1998).

Die Stoffgruppe der Echinokandine bildet die jüngste, dritte Klasse der Antimykotika. Echinokandine sind seit 20 Jahren die erste neu entwickelte Klasse von Fungiziden - das Präparat Caspofungin wurde 2002 als Medikament zugelassen. Echinokandine stören durch eine schnelle, irreversible Hemmung der 1,3- β -Glukansynthese den Aufbau der Pilzzellwand und haben damit eine von den Azolen und Polyenen verschiedene Zielstruktur. Besonders geeignet

sind sie daher zur Therapie von Azol- oder Polyen-resistenten Stämmen, zudem sind sie in der Langzeitanwendung nicht nephrotoxisch wie das Amphotericin B.

Eine Vakzine gegen *C. albicans* konnte bisher nicht entwickelt werden. Es wurden jedoch Antikörper gegen Oberflächenantigene von *C. albicans* isoliert, durch deren Verabreichung im vaginalen Tiermodell eine partielle Immunität gegen den Pilz erzielt wurde (De Bernardis *et al.*, 1997). Für die Behandlung und Prophylaxe von Kandidosen werden neuerdings Formen der Kombinationstherapie von Fungiziden und Immunmodulatoren diskutiert (Graybill, 2000; Martinez *et al.*, 1998; Nitz *et al.*, 2002; Viudes *et al.*, 2001).

Der oft langfristige prophylaktische Einsatz von Antimykotika, insbesondere von Flucytosin und Azolen in der Klinik hat zur Entwicklung von fungizidresistenten *C. albicans*-Stämmen geführt (Anaissie *et al.*, 1994; Orozco, 1998; Perea & Patterson, 2002). Ursache hierfür ist die Fähigkeit von *C. albicans*, sich unter hohem Selektionsdruck schnell durch Mutation an seine Umgebung anzupassen. Diese Tatsache macht die ständige Weiter- und Neuentwicklung fungizider Wirkstoffe notwendig (Groll & Walsh, 2001; Walsh *et al.*, 2000). Die Suche nach möglichen Zielstrukturen für neuartige Antimykotika ist zu einer großen Herausforderung in der *Candida*-Forschung geworden, der auch die molekularbiologische Forschung zur Aufklärung intrazellulärer Signalwege von *C. albicans* dient.

3.4 Virulenz und Invasivität

Die Pathogenität von *C. albicans* ist eng gekoppelt an die Fähigkeit zur Kolonisierung und Invasion des Wirtsgewebes. Die Mechanismen der Induktion invasiven Wachstums von *C. albicans* sind noch nicht vollständig aufgeklärt, es sind jedoch mehrere Faktoren bekannt, die diesen Prozess begleiten. Die wichtigsten dieser Pathogenitätsfaktoren sind die Adhäsion an Epithelien, die Sekretion hydrolytischer Enzyme, der Dimorphismus und die Interaktion von

C. albicans mit dem Immunsystem des Wirtes (Calderone & Fonzi, 2001; Cutler, 1991; Odds, 1994).

Als Voraussetzung für eine erfolgreiche Kolonisierung von Epithelien gilt zunächst die nicht-kovalente Anheftung von *C. albicans* an das Wirtsgewebe mittels so genannter Adhäsine (Douglas, 1985; Douglas, 1987). Zu diesen gehören Agglutinine und zellwandassoziierte Proteine wie Int1p (Gale *et al.*, 1998), aber auch hyphenspezifische Zellwandproteine wie Hyr1p (Bailey *et al.*, 1996) oder Als3p (Hoyer *et al.*, 1998). Das Zellwandprotein Hwp1p stellt über eine wirtseigene Transglutaminase eine kovalente Bindung zum Wirtsepithel her (Staab *et al.*, 1999). Die Manifestation einer Kandidose geht außerdem einher mit der Sekretion von Aspartylproteasen und Phospholipasen, die zum Teil an die Regulation der Hyphenbildung gekoppelt ist (Felk *et al.*, 2002; Korting *et al.*, 2003; Staib *et al.*, 2002). Die sekretierten Enzyme zerstören die Keratinschicht epithelialer Zellen und ermöglichen dem Pilz dadurch das Eindringen in das Wirtsgewebe (Chandra *et al.*, 2001a; Ghannoum, 2000; Lopez-Ribot *et al.*, 1999; Odds, 1994).

Von besonderer Bedeutung für die Pathogenität von *C. albicans* ist der Dimorphismus. Am Ort der *Candida*-Infektion werden sowohl Blastokonidien als auch Pseudohyphen und Hyphen gefunden (Odds, 1988). Alle drei Wachstumsformen scheinen am Infektionsgeschehen beteiligt zu sein, filamentös wachsende *C. albicans* weisen jedoch mehrere hyphenspezifische Proteine in der Zellwand auf, ohne die der Pilz avirulent ist (Fu *et al.*, 2002; Sharkey *et al.*, 1999; Sohn *et al.*, 2003; Tsuchimori *et al.*, 2000). Die filamentöse Wachstumsform ermöglicht das Einwachsen des Pilzes in das Wirtsgewebe, seinen Übertritt in das Blutgefäßsystem und die anschließende Besiedelung innerer Organe. Infektionsstudien mit Gen-defizienten *C. albicans* haben gezeigt, dass Stämme mit einem Defekt in der Hyphenbildung im Tiermodell weniger pathogen sind als klinische Isolate. Sie wachsen weder im epidermalen noch im mukosalen Hautmodell invasiv (Braun & Johnson, 2000; Dieterich *et al.*, 2002; Gow *et al.*, 2003; Lo *et al.*, 1997a). Zusätzlich können Blastokonidien, die von Gewebsmakrophagen inkorporiert wurden, diese durch

die Induktion filamentösen Wachstums disruptieren und so den Fresszellen des Immunsystems entkommen. Neben der Resistenz gegen die zelluläre Immunantwort haben jüngere Studien gezeigt, dass *C. albicans* am Infektionsort auch die humorale Immunantwort beeinflusst (de Bernardis *et al.*, 2000) und Komponenten des Immunsystems enzymatisch abbauen kann (Hube *et al.*, 2000).

3.5 Funktion der Zellwand als äußere Barriere

Die Zellwand stellt die äußerste, mechanische Schutzschicht von Pilzen dar. Sie tritt in direkten Kontakt mit dem Wirt und erfüllt wichtige Funktionen bei der Adhäsion an Oberflächen (Douglas, 1985), der Interaktion mit dem Immunsystem (De Bernardis *et al.*, 1997) und der Bereitstellung von Nährstoffen (Braun, 1999).

Die Zellwand besitzt ein Grundgerüst, das bei *C. albicans* zu 60% aus β -1,3- und β -1,6-verknüpftem Glukan und zu etwa 0,6-9,0% aus Chitin (β -1,4-glykosidisch verknüpftes N-Acetyl-D-Glucosamin) besteht. An das Chitin dieser inneren, stabilen Schicht sind terminal Polysaccharide und Mannoproteine gebunden (Kapteyn *et al.*, 2000), welche die immunogene äußere Schicht der Zellwand bilden (Koch & Rademacher, 1980). Zusätzlich finden sich dort kovalent gebundene Proteine, z. B. die Adhäsine (Abschnitt 3.4). Man unterscheidet zwei Klassen der über β -1,6- und β -1,3-glykosodische Bindungen an das Chitingerüst gebundenen Zellwandproteine: die GPI- (Glykosylphosphatidylinositol) und die PIR-Proteine (Kapteyn *et al.*, 1999; Klis *et al.*, 2001). Die GPI-Proteine sind charakterisiert durch eine hydrophobe Transmembran-Domäne, den GPI-Anker, durch den sie zunächst von außen in der Zellmembran verankert werden, der jedoch bei in der Zellwand lokalisierten Proteinen später abgespalten wird (De Groot *et al.*, 2003). Viele GPI-Proteine sind als Zellwandproteine assoziiert mit dem Dimorphismus von *C. albicans* und daher von großer Bedeutung für die Virulenz.

Die Pilzzellwand ist kein statisches Gebilde, sondern wird von der Zelle in Anpassung an die herrschenden Lebensbedingungen dynamisch umstrukturiert. Ihre Zusammensetzung und Dicke ändert sich beispielsweise bei einem Wechsel des externen pH-Wertes oder einem Gestaltwechsel von *C. albicans* (Chen-Wu *et al.*, 1992; Elorza *et al.*, 1985; Muhlschlegel & Fonzi, 1997; Sullivan *et al.*, 1983; Tronchin *et al.*, 1989). Der Pilz weist in saurem Milieu eine wesentlich dickere Zellwand auf als in neutraler Umgebung. Hyphen dagegen, die eine viel festere Konsistenz besitzen als Blastokonidien, enthalten im Vergleich zu diesen in ihrer Zellwand etwa dreimal so viel Chitin (Chattaway *et al.*, 1968).

3.6 Genregulation zur Anpassung an variable Habitate

Die Besiedelung unterschiedlicher Habitate und eine ständige Interaktion mit dem Immunsystem des Wirtes erfordert eine schnelle Anpassung von *C. albicans* an äußere Bedingungen. Zellen antworten auf äußere Reize mit einer differentiellen Regulation der Transkription ihrer Gene. Dies führt zu einem veränderten Proteinmuster in der Zelle und ermöglicht so eine optimale Anpassung an die herrschenden Umweltbedingungen. In diesem Prozess wird ein Reiz auf molekularer Ebene durch spezielle Rezeptoren (z.B. in der Zellmembran) aufgenommen und über verschiedene Signaltransduktions-Kaskaden in den Zellkern weitergeleitet. Die Signaltransduktion ist ein mehrstufiger und signalverstärkender Vorgang, in dessen Verlauf Regulationsproteine aktiviert und deaktiviert werden können. An seinem Ende steht die Aktivierung oder Inaktivierung eines oder einer Vielzahl von Genen der Zelle. Die regulative Einheit eines Gens bildet die Promotorregion, in der eine große Zahl so genannter Transkriptionsfaktoren mit aktivierenden oder reprimierenden Eigenschaften an die DNA binden können. Auf diese Weise können verschiedene Signalkaskaden der Zelle an der Regulation eines einzigen Gens beteiligt sein.

3.6.1 Regulation der pH-abhängigen Genexpression durch den Transkriptionsfaktor Rim101p

Der umgebende pH-Wert hat für Mikroorganismen einen wesentlichen Einfluss auf das Wachstum und die Verfügbarkeit von Nährstoffen. *C. albicans* verfügt über effektive Mechanismen zur Anpassung an den pH-Wert seiner Umgebung. Diese Adaption verläuft zum einen durch die Regulation verschiedener Ionen-Transporter und Enzyme, zum anderen durch die Umstrukturierung der äußeren mechanischen Schutzhülle, der Zellwand (Abschnitt 3.5). Bisher ist wenig über die pH-abhängige, molekulare Veränderung der Zellwand von *C. albicans* bekannt, es konnte jedoch gezeigt werden, dass der DNA-bindende Transkriptionsfaktor Rim101p die pH-abhängige Expression von Zellwandproteinen reguliert (Ramon *et al.*, 1999).

Beispiele für solche Zellwandproteine sind *PRA1*, *PHR1* und *PHR2*. Die Gene *PRA1* und *PHR1* werden bei neutralem bis alkalischem pH-Wert in Abhängigkeit von *RIM101* aktiviert (Davis *et al.*, 2000a; Ramon *et al.*, 1999; Saporito-Irwin *et al.*, 1995; Sentandreu *et al.*, 1998), während *PHR2* unter diesen Bedingungen *RIM101*-abhängig reprimiert wird und Bestandteil der an ein saures Milieu adaptierten Zellwand ist (Muhlschlegel & Fonzi, 1997; Ramon *et al.*, 1999). Die Zellwandproteine Phr1p und Phr2p sind zwei weitgehend funktionshomologe Glykosidasen, die β -1,3-glykosidische Verknüpfungen in der Zellwand katalysieren (Fonzi, 1999). Nach neueren Untersuchungen führt die Bindung von Rim101p an *C. albicans*-spezifische Konsensus-Sequenzen im *PHR1*-Promotor zur direkten Aktivierung dieses Gens (Ramon & Fonzi, 2003). Auch der Promotor von *PHR2* weist zwei Bindestellen für Rim101p auf, allerdings wird dieses Gen in Gegenwart von aktivem Rim101p reprimiert. In der Deletionsmutante $\Delta rim101$ dagegen findet eine konstitutive Expression von *PHR2* statt (Ramon *et al.*, 1999).

Der *C. albicans* Transkriptionsfaktor Rim101p besitzt Orthologe in PacC des humanpathogenen Pilzes *Aspergillus nidulans* (Espeso *et al.*, 1997; Ramon *et al.*, 1999) und in ScRim101p der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* (Li & Mitchell, 1997; Su & Mitchell, 1993). Alle drei Proteine weisen konservierte

DNA-Bindedomänen, so genannte Zn²⁺-Finger auf, die sie als Transkriptionsregulatoren kennzeichnen. Rim101p wird wie PacC als ein Vorläuferprotein exprimiert und in Abhängigkeit des pH-Wertes unter Beteiligung einer Enzymkaskade proteolytisch aktiviert (Diez *et al.*, 2002; Orejas *et al.*, 1995; Porta *et al.*, 1999; Porta *et al.*, 2001; Ramon *et al.*, 1999). Die Transkription von Rim101p wird dabei analog zu PacC durch einen pH-abhängigen Rückkopplungsmechanismus kontrolliert und ist unter neutralen bis alkalischen Bedingungen um ein Vielfaches höher, als unter sauren Bedingungen (Ramon *et al.*, 1999).

Die Aktivierung des Proteins erfolgt unter neutralen bis alkalischen Bedingungen durch enzymatische Abspaltung der C-terminalen Domäne. Diese proteolytische Prozessierung beginnt mit einer Änderung der im Sauren überwiegenden, Protease-insensitiven Konformation zum proteolytisch prozessierbaren Protein. Studien in *S. cerevisiae* haben gezeigt, dass an der Aktivierung von Rim101p die Gene *RIM8*, *RIM9*, *RIM13*, *RIM20* und *RIM21* beteiligt sind (Futai *et al.*, 1999; Xu & Mitchell, 2001). Die Transmembranproteine Rim9p und Rim21p vermitteln dabei vermutlich externe pH-Signale ins Zellinnere, während Rim20p, das möglicherweise als *Scaffold*-Protein die Konformation von Rim101p kontrolliert, über Snf6p mit Rim101p interagiert. Die Cystein-Protease Rim13p bindet Snf7p und ist wahrscheinlich das für die Abspaltung des C-Terminus verantwortliche Enzym. Die Funktion des proteolytischen Proteins Rim8p ist bisher nicht bekannt. Mit Ausnahme von *RIM9* weisen alle diese Proteine Homologien zu entsprechenden *C. albicans* Proteinen auf (Davis, 2003; Davis *et al.*, 2000a). Abbildung 2 zeigt das Modell der Aktivierung von Rim101p im neutralen Milieu.

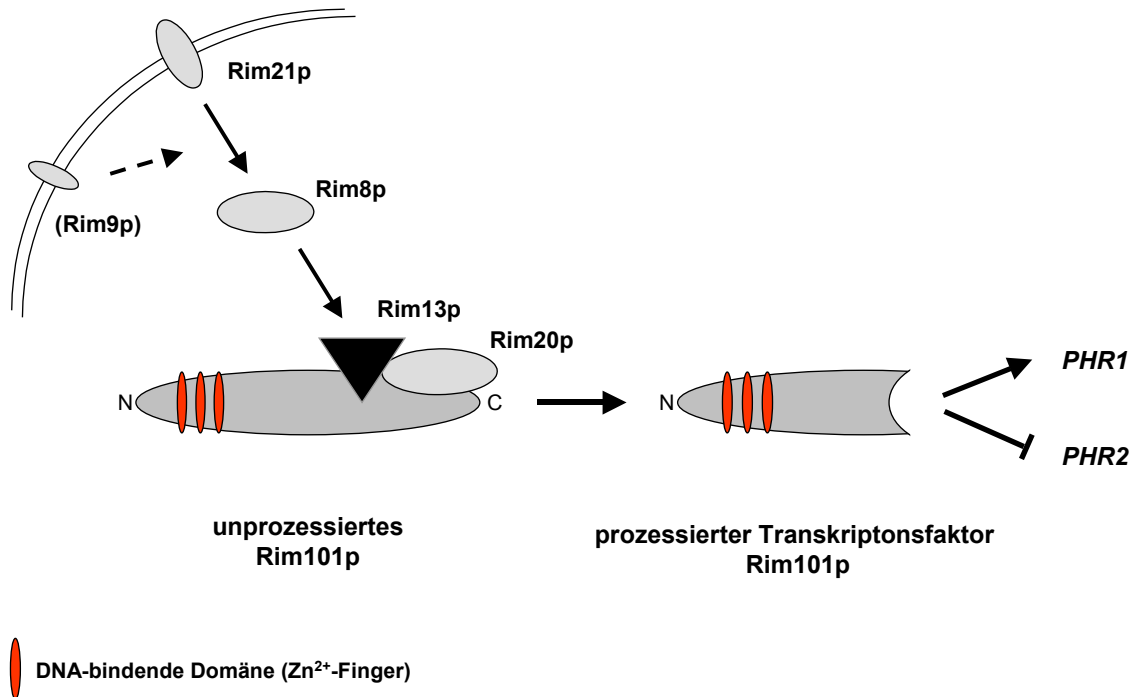


Abbildung 2: Modell der pH-abhängigen Aktivierung des Transkriptionsfaktors Rim101p. Bei neutralem bis alkalischem pH-Wert wird Rim101p durch enzymatische Abspaltung des C-Terminus proteolytisch prozessiert. Rim9p und Rim21p vermitteln als Transmembranproteine externe pH-Signale ins Zellinnere, Rim20p kontrolliert durch Interaktion mit Rim101p dessen Konformation. Die Cystein-Protease Rim13p katalysiert vermutlich die Abspaltung des C-Terminus. Die Funktion des proteolytischen Proteins Rim8p ist nicht bekannt. Modell verändert nach (Davis, 2003).

Durch experimentell induzierte Mutationen wurden C-terminal trunkierte Formen von Rim101p erzeugt, die zu einer pH-unabhängigen, konstitutiven Aktivierung oder Repression der genannten Zielgene führen (Davis *et al.*, 2000a; El Barkani *et al.*, 2000). Diese Untersuchungen legen nahe, dass Rim101p als Aktivator und als Repressor fungieren kann. PacC ist von den genannten Faktoren bis heute am besten untersucht und ebenfalls für die positiv und negativ pH-abhängige Regulation von Genen bekannt. Die Bindung von PacC aktiviert direkt *ipnA*, ein alkalisch exprimiertes Gen des Penicillin Biosyntheseweges und reprimiert gleichzeitig das sauer exprimierte *gabA*, welches einen Repressor des Kohlenstoff- und Stickstoffmetabolismus in der pH-Antwort von *A. nidulans* kodiert (Espeso & Penalva, 1996; Espeso & Arst, 2000; Tilburn *et al.*, 1995).

Auch *ScRIM101* zeigt aktivierende und reprimierende Funktionen, denn es spielt zum einen eine aktivierende Rolle bei der Meiose und der Sporulation (Li & Mitchell, 1997), andererseits wurden in Transkriptionsstudien eine Reihe von Genen als *RIM101*-reprimiert gefunden. Die Funktion von *ScRIM101* steht nach bisherigem Verständnis nicht ausschließlich in Zusammenhang mit der pH-Adaption in *S. cerevisiae*, durch die Repression des transkriptionellen Repressors Nrg1p induziert der Transkriptionsfaktor jedoch indirekt eine Ionentoleranz (Lamb & Mitchell, 2003; Lamb *et al.*, 2001). In *C. albicans* ist der Transkriptionsfaktor Nrg1p bekannt als ein prominenter Repressor des hyphalen Wachstums (Braun *et al.*, 2001). Das DNA-bindende Protein interagiert mit weiteren Regulatoren wie Tup1p oder Mig1p, um unterschiedliche Gruppen von hyphal exprimierten Zielgenen zu reprimieren (Murad *et al.*, 2001a).

3.6.2 Regulation der Hyphenbildung in *C. albicans*

3.6.2.1 MAPK- und cAMP-Signalweg

Die Induktion hyphalen Wachstums in *C. albicans* ist ein komplexer, bisher noch unvollständig beschriebener Prozess, der durch die Interaktion verschiedener Signalkaskaden kontrolliert wird (Abbildung 3). *In vitro* ist filamentöses Wachstum durch Serumzugabe, Mangel an Nährstoffen und eine Medientemperatur von 37°C leicht induzierbar. Diese Faktoren sind den Bedingungen im menschlichen Körper ähnlich und begünstigen daher wahrscheinlich das für die Gewebsinvasion essentielle filamentöse Wachstum von *C. albicans* (Abschnitt 3.4). An der Regulation der Hyphenbildung von *C. albicans* sind zwei zentrale morphogenetische Signalwege beteiligt, die Homologien zur Regulation pseudohyphalen Wachstums und des Paarungstypes in *S. cerevisiae* aufweisen (Liu *et al.*, 1994). Beide Wege werden durch

CaRas1p reguliert (Leberer *et al.*, 2001), konvergieren jedoch über unterschiedliche Transkriptionsfaktoren auf die Promotoren hyphenspezifischer Gene (Lane *et al.*, 2001). Der *C. albicans* cAMP-Weg führt über Aktivierung der Adenylatcyclase CDC35p zur Bildung von cAMP (Rocha *et al.*, 2001). Die katalytisch aktive Untereinheit der Proteinkinase A, Tpk2p (Sonneborn *et al.*, 2000), phosphoryliert dann wahrscheinlich den Transkriptionsfaktor Efg1p (Bockmuhl & Ernst, 2001; Murad *et al.*, 2001b). Efg1p ist für das hyphale Wachstum und die Virulenz von *C. albicans* essentiell (Stoldt *et al.*, 1997). Der MAPK-Signalweg (*Mitogen-activated-protein kinase cascade*) verläuft cAMP-unabhängig (Lo *et al.*, 1997a). Die MAPK-Kaskade verläuft über die zu ScSte20p homologe Serin-Threonin Proteinkinase Cst20p (Kohler & Fink, 1996) sowie einen Komplex aus Hsp1p (Kohler & Fink, 1996) und Cek1p (Whiteway *et al.*, 1992). Durch diesen wird vermutlich der Transkriptionsfaktor Cph1p aktiviert (Csank *et al.*, 1998), der gemeinsam mit Efg1p an der Regulation der Hyphenbildung beteiligt ist. Weitere, in *C. albicans* an der Regulation hyphalen Wachstums beteiligte Transkriptionsfaktoren zeigt Abbildung 3.

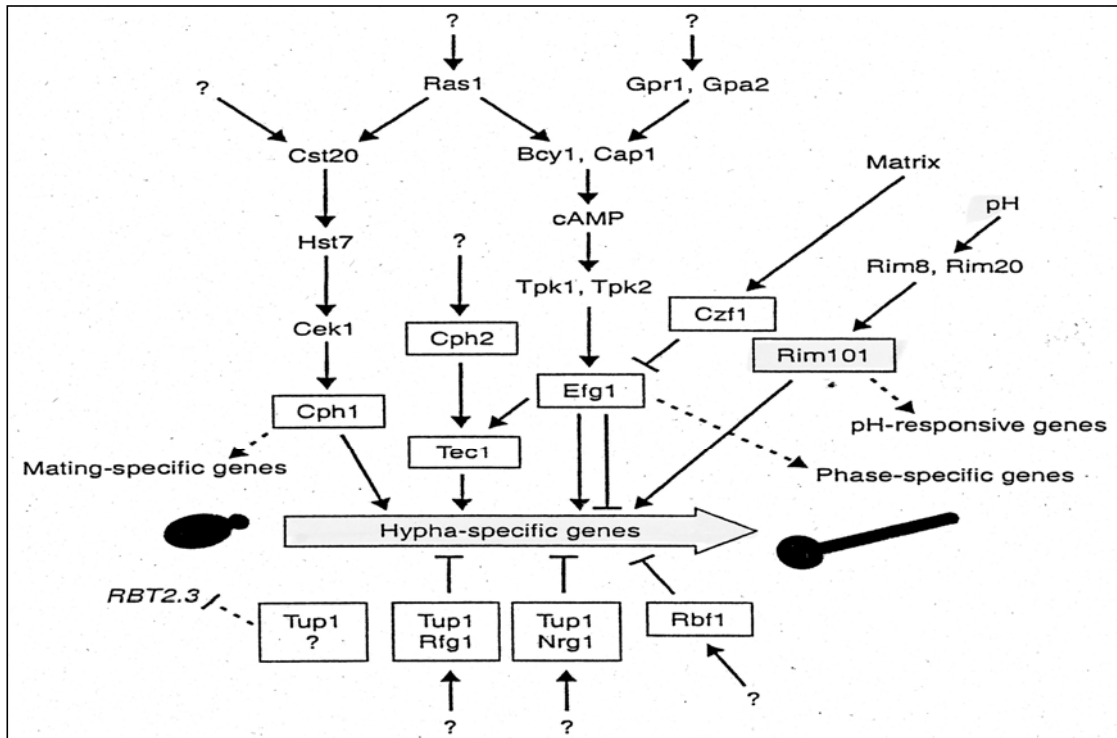


Abbildung 3: Die Interaktion zentraler Signaltransduktionswege bei der Regulation hyphenspezifischer Gene in *C. albicans* (Liu, 2001).

3.6.2.2 Kontrolle der pH-abhängigen Hyphenbildung durch *RIM101*

In saurer Umgebung, wie sie beispielsweise auf der Vaginalschleimhaut oder im Magen herrscht, wird bei *C. albicans* eine deutlich geringere Filamentierungsrate beobachtet als bei neutralem pH-Wert. Dennoch ist der Pilz auch im Sauren fähig zur Induktion von Filamenten. Kolonisierende *C. albicans* säuern *in vitro* ihre Umgebung durch Stoffwechselprodukte stark an und induzieren auch bei niedrigem pH-Wert Hyphenwachstum. Phänotypische Untersuchungen an der $\Delta rim101$ -Mutante haben gezeigt, dass der pH-regulierte Transkriptionsfaktor Rim101p in *C. albicans* nicht nur Proteine der Zellwand reguliert (Muhlschlegel & Fonzi, 1997; Saporito-Irwin *et al.*, 1995), sondern auch an der Steuerung der Hypheninduktion beteiligt ist. Während $\Delta rim101$ einen

medienspezifischen Defekt der Filamentierung bei neutralem pH-Wert aufweist (Davis *et al.*, 2000a), führt eine Überexpression multipler Allele von trunkiertem, konstitutiv aktivem Rim101-1426p zur Induktion hyphalen Wachstums schon bei einer relativ niedrigen Temperatur von 29°C (El Barkani *et al.*, 2000).

3.7 Suche nach Zielgenen von Rim101p

Die bekannten Zielgene des Transkriptionsfaktors Rim101p, *PHR1* und *PHR2*, kodieren für Zellwandproteine von *C. albicans* und sind für die pH-Adaption des Pilzes essentiell (Muhlschlegel & Fonzi, 1997; Saporito-Irwin *et al.*, 1995). Aufgrund dieser bereits beschriebenen, zentralen Beteiligung von *RIM101* an der pH-abhängigen Umstrukturierung der Zellwand konnten weitere, in Abhängigkeit von *RIM101* regulierte Proteine in der Zellwand von *C. albicans* erwartet werden. Weiterhin war davon auszugehen, dass an einer möglicherweise indirekten *RIM101*-abhängigen Regulation von Zellwandproteinen auch zytoplasmatische Proteine, beispielsweise zentrale Transkriptionsfaktoren zur Regulation des hyphalen Wachstums, beteiligt sind.

Zur Detektion differentiell regulierter Faktoren in *C. albicans* sind grundsätzlich zwei verschiedene *Screening*-Methoden möglich: zum einen die differentielle Analyse von Proteinfractionen mittels der zweidimensionalen Polyacrylamid-Gelelektrophorese (2D-SDS-PAGE) und zum anderen die Erstellung von Transkriptionsprofilen mittels DNA-Mikroarray-Technologie. Beide Methoden beruhen auf der vergleichenden Analyse zweier Stämme, deren Expressions- bzw. Transkriptionsmuster sich beispielsweise aufgrund unterschiedlicher Wachstumsbedingungen oder genetischer Manipulation eines Stammes unterscheiden.

Viele Zellwandproteine sind kovalent an die Zellwand gebunden oder aufgrund der rigiden und komplexen Struktur der Zellwand nur nach enzymatischer und biochemischer Aufarbeitung dieses Organells zu isolieren. Eine Zellwandaufarbeitung mit Detergenzien erschwert allerdings die anschließende

Auftrennung und Identifizierung der Proteine mittels 2D-Gelelektrophorese ebenso wie die für Zellwandproteine typische, starke Glykosylierung. Um bisher unbekannte, *RIM101*-abhängige Gene in *C. albicans* zu identifizieren, die für Zellwandproteine kodieren, wurde in dieser Studie daher die DNA-Mikroarray-Technologie eingesetzt. Diese Methode bietet eine effektive Möglichkeit, die transkriptionelle Aktivität einer Reihe von ausgewählten Genen vergleichend darzustellen. Nach Kultivierung zweier zu vergleichender Stämme wird als Analysematerial zunächst mRNA isoliert, welche die Gesamtheit aller unter den gewählten Bedingungen transkribierten Gene repräsentiert. Die mRNA-Populationen werden jeweils als Probe oder Referenz in unterschiedlich fluoreszenzmarkierte cDNA umgeschrieben und dann vereinigt. Es folgt eine konkurrierende Hybridisierung des cDNA-Gemisches mit spezifischen Sonden, die in definierter Position auf die Oberfläche des DNA-Mikroarrays aufgebracht wurden (Spots). Das Auslesen der Fluoreszenzintensität der einzelnen Spots erfolgt jeweils getrennt für Proben- und Referenzsignale, die relative Transkription eines Gens wird durch Quotientenbildung der Signale von Probe und Referenz ermittelt. Auf diese Weise liefert der DNA-Mikroarray Aussagen über die relative Aktivierung oder Repression eines Gens unter verschiedenen Bedingungen. Im Gegensatz zur differentiellen Proteomanalyse bietet diese Methode sowohl die Möglichkeit, genomweite Screens durchzuführen (genomweiter *C. albicans* DNA-Mikroarray mit 7200 Genen), als auch bei der Herstellung des Mikroarrays eine Vorauswahl der für die jeweilige Fragestellung relevanten Gene zu treffen. Für die vorliegende Arbeit zur Identifizierung von Zielgenen des Transkriptionsfaktors Rim101p wurde ein DNA-Mikroarray eingesetzt, der 117 bekannte und potentielle Zellwandgene von *C. albicans* trägt (Sohn *et al.*, 2003).

3.8 Zielsetzung der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, durch den pH-abhängigen Transkriptionsfaktor Rim101p regulierte Gene in *C. albicans* zu identifizieren und deren physiologische Funktion zu charakterisieren. Die Identifizierung bisher unbekannter Zielgene von Rim101p sollte erfolgen, um Einsicht in die Mechanismen der pH-Adaption des Pilzes an seine vielfältigen Habitate zu gewinnen. Bekannte „downstream-targets“ von Rim101p waren die Gene *PHR1* und *PHR2*, welche essentielle Zellwandproteine für das Wachstum von *C. albicans* in neutraler bzw. saurer Umgebung kodieren. Da die Zellwand bereits als Zielstruktur von Rim101p identifiziert worden war, erschien die Rolle dieses Transkriptionsfaktors in dem pH-abhängigen Prozess des dynamischen Zellwandaufbaus von *C. albicans* besonders interessant. Es wurde daher ein spezifischer DNA-Mikroarray zur Detektion von Genen eingesetzt, die für Zellwandproteine in *C. albicans* kodieren.

Bislang war wenig über den Einfluss des pH-Wertes aus *C. albicans* bekannt. Frühere Untersuchungen wiesen jedoch darauf hin, dass der pH-abhängige Transkriptionsfaktor Rim101p nicht nur die Zellwandstruktur von *C. albicans* reguliert, sondern auch an der Regulation des filamentösen Wachstums beteiligt ist. In diesem Zusammenhang wurde durch die Identifizierung neuer Zielgene auch eine weitere Aufklärung der Funktion von *RIM101* für die Virulenz des Pilzes erwartet. Gene, die an der Virulenz von *C. albicans* beteiligt sind, sind immer auch potentielle Zielstrukturen für die Entwicklung neuer Antimykotika. Daher bestand in dieser Studie ein besonderes Interesse an der Charakterisierung von *RIM101*-regulierten Genen, welche die Virulenz des humanpathogenen Pilzes *C. albicans* vermitteln.

4 Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Chemikalien

Allgemeine Chemikalien und Verbrauchsmaterial wurden, sofern sie nicht im Methodenteil gesondert aufgeführt sind, in p. a. Qualität von der Carl Roth GmbH in Karlsruhe bezogen. Kulturmedien und Puffer wurden mit Wasser hergestellt, das mittels einer Ionentauscher-Anlage der Firma Millipore, Schwalbach, deionisiert wurde.

4.1.2 Enzyme

Tabelle 1: Fluoreszenzfarbstoffe und Enzyme

Enzym	Firma/Referenz
cy3-/cy5-dUTP	Amersham Biosciences, Freiburg
Alkalische Phosphatase	New England Biolabs, Frankfurt a.M.
Restriktionsenzyme	New England Biolabs, Frankfurt a.M.
SuperScript™ II Reverse Transcriptase	Invitrogen, Karlsruhe
T4-DNA-Ligase	Amersham Biosciences, Freiburg
Taq-DNA-Polymerase	L. Schalwyk, ICRF, London*

* Die Taq-Polymerase wurde nach (Pluthero, 1993) isoliert und freundlicherweise von Dr. Nicole Hauser zur Verfügung gestellt.

4.1.3 Reaktions-Kits

Tabelle 2: Reaktions-Kits

Name	Firma
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
QIAEX II Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
NUCLEOBOND Kit für Plasmid-Maxipreps	Macherey-Nagel, Düren
Prime-It [®] II Random Primer Labeling Kit	Stratagene, Amsterdam

4.1.4 Radiochemikalien

Radioaktiv markiertes [α -³²P]-dCTP wurde von Amersham Biosciences, Freiburg, bezogen.

4.1.5 Pufferlösungen

Allgemeine Puffer- und Stammlösungen wurden nach Sambrook und Ausubel hergestellt (Ausubel, 1994; Sambrook, 1989). Spezielle Puffer und Lösungen sind im Methodenteil unter der jeweiligen Methode aufgeführt, für die sie verwendet wurden.

4.1.6 Kulturmedien

α -MEM:	Minimalmedium für die Zellkultur mit L-Glutamin und Desoxyribo-/Ribo-Nukleotiden ohne NaHCO ₃ , Pulver (Invitrogen, Karlsruhe)		
	HEPES	100	mM
	Uridin	0,1	mM
	Glukose	2%	(w/v)
M-199:	Zellkulturmedium mit L-Glutamin und 1% Glukose, Pulver (Difco, Becton Dickinson, Heidelberg)		
	HEPES	100	mM
	Uridin	0,1	mM
SC-uri:	synthetisches Selektionsmedium für Hefen ohne Uridin		
	Hefe Stickstoff Basis, YNB (Difco)	1,5	g/l
	Ammoniumsulfat	5	g/l
	AS-Mix (Guthrie & Fink, 1991)	2	g/l
	Adenin	0,3	mM
	Uracil	0,2	mM
	Histidin	0,3	mM
	Leucin	1,6	mM
	Tryptophan	0,4	mM
	HEPES	100	mM
	Glukose	2%	(w/v)

YPD:	Vollmedium für Hefen		
	Hefeextrakt (Difco)	10	g/l
	Bacto Pepton (Difco)	20	g/l
	HEPES	100	mM
	Uridin	0,1	mM
	Glukose	2%	(w/v)
YNB:	Hefe Stickstoff Basis, YNB (Difco)	1,5	g/l
	Ammoniumsulfat	5	g/l
	Uridin	0,1	mM
YCB-BSA:	Induktion des SAP-Promotors, <i>URA3</i> -Flipper		
	Hefe Kohlenstoff Basis, YCB (Difco)	23,4	g/l
	Rinderserumalbumin (BSA)	4	g/l
	Uridin	0,1	mM
LB-Medium:	Vollmedium für Bakterien		
	Hefeextrakt	5	g/l
	Bacto Pepton (Difco)	10	g/l
	NaCl	10	g/l

Für Agarplatten wurde eine Endkonzentration von 2% (w/v) Agarose eingestellt.

4.1.7 *C. albicans*-Stämme

Tabelle 3: *C. albicans*-Stämme

Name	Referenz-Name	Genotyp	Referenz
Wildtyp	SC5314	klinisches Isolat	(Gillum et al., 1984)
CAI4	CAI4	<i>ura3::imm434/ura3::imm434</i>	(Fonzi & Irwin, 1993)
$\Delta rim101$	CAF3-X	<i>ura3::imm434/ura3::imm434 rim101::hisG/rim101::hisG::URA3</i>	(El Barkani et al., 2000)
<i>RIM101-1426</i>	CAF3-16-2	<i>ura3::imm434/ura3::imm434 RIM101/RIM101-(pBSK⁺-RIM101-1426-URA3)<i>n</i>>2</i>	(El Barkani et al., 2000)
$\Delta efg1$	HLC52	<i>ura3::imm434/ura3::imm434 efg1::hisG/efg1::hisG::URA3</i>	(Lo et al., 1997b)
$\Delta nrg1$	MMC3	<i>ura3::imm434/ura3::imm434 nrg1::hisG/nrg1::hisG::URA3</i>	(Murad et al., 2001b)
Δnrg - <i>pmet_NRG1</i>	MMC5	<i>ura3::imm434/ura3::imm434 nrg1::hisG/nrg1::hisG rpn10::pmet-NRG1-URA3</i>	(Murad et al., 2001b)
$\Delta tup1$	BCA2-9	<i>ura3::imm434/ura3::imm434 tup1::hisG/tup1::hisG::URA3</i>	(Braun & Johnson, 1997)
$\Delta rbr1$ -12	HL12-2	<i>ura3::imm434/ura3::imm434</i>	diese Arbeit
$\Delta rbr1$ -13	HL12-3	<i>rbr1::FRT*/rbr1::FRT rpn10::URA3</i>	
$\Delta rbr1$ -14	HL12-5		
$\Delta rbr1$ -RBR1	HL13-6	<i>ura3::imm434/ura3::imm434 rbr1::FRT/rbr1::FRT rpn10::RBR1-URA3</i>	diese Arbeit

* *FRT* bezeichnet die nach dem Ausschneiden der *URA3-FRT*-Flipper-Kassette am Lokus der Insertion verbleibende FLP-Erkennungssequenz (Morschhauser et al., 1999).

4.1.8 Bakterienstämme

Der Bakterienstamm *E. coli* DH5 α (Genotyp: F- supE44 hsdR17 recA1 gyrA96 endA1 thi-1 relA1 deoR lambda-) wurde von der Firma Invitrogen in Karlsruhe bezogen.

4.1.9 Plasmide und Vektoren

Tabelle 4: Vektoren und Plasmide

Plasmid, Vektor	Bezugsquelle, Referenz
pBS-KS II ⁺	Stratagene, Amsterdam
pSFU1	(Morschhauser <i>et al.</i> , 1999)
pCaEXP	(Care <i>et al.</i> , 1999)
pSFU1-RBR1-FR1/2	diese Arbeit
pSFU1-RBR1-FR3/4	diese Arbeit
pSFU1-RBR2-FR1/2	diese Arbeit
pSFU1-RBR2-FR3/4	diese Arbeit
pCaEXP-RBR1	diese Arbeit
pCaEXP-OVE1	diese Arbeit
pCaEXP-RBR2	diese Arbeit
pCaEXP-OVE2	diese Arbeit

Tabelle 5: Primer zur Klonierung der Deletionskonstrukte und Revertanten

Primer	Basensequenz	Produkt
FR1_for	AAGGG <u>CCCC</u> CACAAAATAAAAGCAGCAGGAA*	
FR1_rev	CCGCTCGAGTTCCA <u>ACTTTAAT</u> CCCGCAC	457 bp
FR2_for	ATAAGAATGCGG <u>CCGCTT</u> GCCACCAGTCAAATTCAA	
FR2_rev	CGAGCT <u>CCC</u> GAAATGCCACCATAGTTT	527 bp
FR3_for	AAGGG <u>CCCGT</u> GCGGGATTAAAGTTGGAA	
FR3_rev	CCGCTCGAGTTGTTGTTGTAAGCGAAGCC	563 bp
FR4_for	ATAAGAATGCGG <u>CCGCT</u> GAAATGAGAATGAGGGGGAC	
FR4_rev	CGAGCTCTTGAATTTGACTGGTGGCAA	565 bp
2736f-1- FR1-for	AAGGG <u>CCCC</u> CACAAAATAAAAGCAGCAGGAA	
RBR1- RVT-rev	CCGCTCGAGCCGAAATGCCACCATAGTTT	

* Die unterstrichen Sequenzen kennzeichnen jeweils die Schnittstellen für die Klonierung in den Vektor pSFU1 (Abschnitt 4.2.7.1).

Tabelle 6: Primer für Northern Blot-Sonden

Genname	Primer	Basensequenz
<i>ACT1</i>	act1for	TTTCCA <u>ACT</u> GGGACGATA
	act1rev	TCTTGGACA <u>AAAT</u> GGTTGG
<i>ALS1</i>	als1for	ACTGGTTGCTACTACACA
	als1rev	GGACAATAATGTGATCAA
<i>ALS5</i>	2848f+3bfor	ACTGCCGATGGTGTAA
	2848f+3brev	TGGTGCCACAAAAGAGT
<i>CHT2</i>	cachtfor	GTGCTGGTGAAGATCCAGAAA
	cachtrev	AGCAGGAACACCAACAAATAA
<i>HWP1</i>	2426for	CTAAACCAGCTGCTCCAAAAT
	2436rev	GTTGTTACCAGCACCTTCAA

<i>NRG1</i>	NRG1for	ATGCTTTATCAACAATCATATCC
	NRG1rev	CTATACTAGGCTCTTGGTG
<i>PHO11</i>	1020for	TCAATTTTCTTGGCGGTA
	1020rev	CTCTAAACGCAGCACCAT
<i>PHR1</i>	phr1for	TTGCAATGTCCAGGAACT
	phr1rev	CTGCCACTAGCACTAGCC
<i>PHR2</i>	phr2for	GAATCTGCCTCCTCCATT
	phr2rev	AATGAAGCAGAACCACCA
<i>RBR1</i>	forRBR1prox	CTACCAGCACCCAGCGACAG
	revRBR1down	CTGTTGGTGTGGGTTGTGAG
<i>RBR2</i>	RBR2proxfor	AACAGGGGCAACAAGTTCAC
	RBR2downrev	AGTTTGGATTCTGACTGTGGG
<i>RBR3</i>	1477for	CCCTGCCTTCCTTAACATCGT
	1477rev	TAAAATTTTTCGATGTGGAA
<i>RBT1</i>	2768f+2for	ACTGCCGATGGTGTAAAT
	2768f+2rev	TGGTGCCACAAAAGAGTT
<i>RIM101</i>	RIM101/1-23	ATGGGTAACAGTCCCCATTCCTC
	RIM101/1048-1027	GGCTTCAATGGGACATGGACTC
<i>TUP1</i>	CaTUP1for	ATGTATCCCCAACGCACC
	CaTUP1rev	TTATTTTTTGGTCCATTTCC

4.1.10 Datenbanken und Datenverarbeitung

Sämtliche in dieser Arbeit aufgeführten Basensequenzen der offenen Leserahmen (ORFs) und Gene von *C. albicans* wurden der Datenbank des *Stanford Sequencing Center* der Stanford Universität in Kalifornien, USA, entnommen (www-sequence.stanford.edu/group/candida/search.html).

Sequenzvergleiche und Homologieanalysen auf DNA- und Proteinebene wurden mittels verschiedener BLAST-Programme gemacht, die auf der Internetseite des NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) zur Verfügung standen. Die verwendeten Programme sind in den entsprechenden Abschnitten des Ergebnisteils aufgeführt.

Zur Proteinanalyse und zur Vorhersage von Signalpeptiden wurden verschiedene Algorithmen und Proteindatenbanken des Expasy-Protein-Servers genutzt (<http://us.expasy.org/>):

Prosite: Suche nach konservierten Protein-Motiven
(<http://us.expasy.org/tools/scanprosite/>)

SignalP: Vorhersage von Signalpeptid-Schnittstellen
(www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/)

YinOYang und NetOGlyc: Vorhersage von Glykosylierungsstellen
(www.cbs.dtu.dk/services/YinOYang/) und
(www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/)

big-PI Predictor und *DGPI*: Vorhersage von Schnitt- und Modifikationsstellen für das Anfügen eines Glykosyl-Phosphatidylinositol (GPI)-Ankers.

Zur Erstellung und Berechnung von Primer-Sequenzen wurde das Programm Primer3 des *Whitehead Institute for Biomedical Research/MIT*, (www.genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi) verwendet.

Auswertungssoftware DNA-Mikrochip: ImaGene3

Quantifizierung von ³²P-Signalen: ImageQuant

Bearbeitung von DNA-Sequenzen: Clonemanager5

4.2 Methoden

Sofern in diesem Abschnitt nicht gesondert aufgeführt, wurden molekularbiologische und biochemische Methoden nach Standardprotokollen durchgeführt (Ausubel, 1994; Sambrook, 1989).

4.2.1 Kultivierung und Lagerung von Mikroorganismen

Die langfristige Lagerung von Hefe- und Bakterienstämmen erfolgte in Form 30%iger Glycerinkulturen bei -70°C . Aus diesen Dauerkulturen wurden die Zellen vor der Weiterkultivierung zunächst auf geeigneten Festmedien ausgestrichen oder als Vorkulturen in Flüssigmedien und ü.N. bei 30°C und 180 rpm bis zur stationären Phase herangezogen. *C. albicans*-Kulturen für die Transformation, RNA-Isolierung oder zur Isolierung von genomischer DNA wurden aus diesen Vorkulturen 1:50 oder 1:100 in 10 ml Medium angeimpft und entsprechend der jeweiligen Methode kultiviert. Zur RNA-Isolierung angezogene Zellen wurden vor einen Medienwechsel 2 min bei 1000 g (2200 rpm, Biofuge 1.0, Rotor 2704, Heraeus) pelletiert, im Residualvolumen resuspendiert und das entsprechende Medium dann auf eine optische Dichte von 0,02 bei 600 nm angeimpft.

4.2.2 Transformation von *C. albicans*

Die Transformation von *C. albicans* zur Integration genetischen Materials in das Genom wurde entweder nach der Lithiumacetat-Methode (Braun & Johnson, 1997; Schiestl & Petes, 1991) oder mittels Elektroporation (MicroPulser, Biorad) durchgeführt. Es wurden jeweils 10-100 μg linearisierter Plasmid-DNA oder durch Restriktionsverdau ausgeschnittene Deletionskonstrukte eingesetzt (Kohler *et al.*, 1997).

4.2.2.1 Lithiumchlorid-Methode

Zur Transformation nach der Lithiumchlorid-Methode wurden 50 ml Medium 1:100 aus einer Vorkultur angeimpft und 4 h bei 30°C inkubiert (2 Generationen). Die Zellen wurden bei 1000 g für 2 min pelletiert, mit 5 ml kaltem LATE-Puffer gewaschen und in 0,5 ml LATE resuspendiert. Die Zellsuspension wurde mit 5 µl denaturierter Kalbsthymus-DNA (10 mg/ml, Roche Diagnostics) und mit der Transformations-DNA (Plasmid-DNA: 2-10 µg, PCR-Produkte: 80 µl des Ansatzes) gemischt und 30 min bei 30°C inkubiert. Es wurden 0,7 ml PLATE-Puffer zugeben, 2 s gemixt (Vortex) und ü.N. bei 30°C inkubiert. Anschließend wurde für 1 h ein Hitzeschock bei 42°C durchgeführt, die Zellen pelletiert und in 10 ml TE-Puffer gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen in 0,2 ml TE-Puffer resuspendiert und auf Selektivmedium ausplattiert.

LATE-Puffer:	LiAc	0,1	M
	TRIS-HCl, pH 7,5	10	mM
	EDTA	1	mM
PLATE-Puffer:	Polyethylenglykol 3350	40%	(v/v)
	in LATE-Puffer		

4.2.2.2 Elektroporation

Für die Elektroporation wurden 50 ml einer *C. albicans*-Kultur ü.N. bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 kultiviert, anschließend für 2 min bei 1000 g und 4°C pelletiert und 3x mit 50 ml eiskaltem dH₂O gewaschen. 80 µl des gut dekantierten und im Residualvolumen resuspendierten Zellpellets wurden mit maximal 10 µl der salzfrei aufgereinigten Transformations-DNA (PCR-Purification Kit, Qiagen)

gemischt und 10 min auf Eis inkubiert. Die Zellsuspension wurde in gut gekühlte Elektroporations-Küvetten mit 4 mm (Biorad) Plattenabstand überführt und 1x mit 1500 V gepulst. Die Zellen wurden anschließend sofort in 1 ml kaltem 1 M Sorbit resuspendiert und für 30 min bei 30°C und 180 rpm regeneriert. Die Selektion erfolgte nach 1-3 Tagen Wachstum auf SC-uri bei 30°C.

4.2.3 Präparation genomischer DNA aus *C. albicans*

C. albicans wurde in 10 ml Medium für 24 h bei 30°C kultiviert und die Zellen durch 3 min Zentrifugation bei 1000 g und 4°C geerntet. Das Pellet wurde mit dH₂O gewaschen, erneut abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Hefe-Lysispuffer, Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) und Glasperlen (0,25-0,5 mm Durchmesser) wurden zu gleichen Teilen zugesetzt und 5 min gemixt (Vortex). Die Zelltrümmer wurden bei 16000 (13000 rpm, Picofuge fresco, Heraeus) abzentrifugiert. Aus dem Überstand wurde die DNA mit dem 2,5-fachen Volumen 100%igen Ethanols gefällt, abzentrifugiert und das Pellet in 0,4 ml TE-Puffer und 3 µl einer 10 mg/ml RNaseA-Lösung resuspendiert. Nach 5 min Inkubation bei 37°C wurde die genomische DNA durch Zugabe von 1 ml 100%igen Ethanols erneut gefällt, abzentrifugiert und das luftgetrocknete DNA-Pellet in 50 µl dH₂O aufgenommen.

Hefe-Lysispuffer:	Triton X-100	2%	(v/v)
	SDS	1%	(w/v)
	NaCl	100	mM
	Tris-HCl, pH 8,0	10	mM
	EDTA	1	mM

4.2.4 RNA-Isolierung

Die Isolierung von RNA wurde durch Extraktion des Zellaufschlusses mit saurem Phenol durchgeführt. Alle Reagenzien wurden mit RNase-freiem, DEPC (Sigma Aldrich)-behandeltem dH₂O hergestellt. Die Zellen wurden für 6 h in 15-20 ml Medium bis zu einer maximalen OD₆₀₀ von 0,9 kultiviert und durch Zentrifugation für 3 min bei 1000 g und 4°C geerntet. Die Zellpellets wurden nach sorgfältigem Dekantieren des Mediums in flüssigem Stickstoff eingefroren, bevor sie weiter verarbeitet wurden. Zur RNA-Isolierung wurden die noch gefrorenen Zellpellets mit 1 ml TES-Puffer und 1 ml sauren Phenols versetzt, kurz bei 65°C im Wasserbad aufgetaut und gründlich gemixt (Vortex). Während der weiteren Inkubation für 45 min bei 65°C im Wasserbad wurde alle 15 min gut geschüttelt, anschließend auf Eis gekühlt und für 15 min bei 1000 g und RT zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde in ein frisches 15 ml Schraubdeckel-Röhrchen überführt und erneut für 15 min mit 1 ml sauren Phenols bei 65°C extrahiert, gekühlt und wieder für 15 min bei 1000 g und RT zentrifugiert. Zur Entfernung von Phenolresten wurde der Überstand mit 1 ml Chloroform ausgeschüttelt und wieder 15 min zentrifugiert. Die RNA im Überstand wurde mit reinem Ethanol und 3 M NaAc bis zu einer Endkonzentration von 70% Ethanol und 0,3 M NaAc versetzt und für mindestens 1 h bei -20°C gefällt. Durch 20 min Zentrifugation bei 3000 g und 4°C wurde die RNA pelletiert. Das Pellet wurde 2x mit 2 ml 70%igen Ethanols gewaschen, 5 min luftgetrocknet und in 100-200 µl DEPC-H₂O resuspendiert. RNA für die cDNA-Synthese zur Hybridisierung auf dem DNA-Mikroarray (Abschnitt 4.2.5.3) wurde anschließend 1:1 mit 4 M LiCl versetzt und ü.N. bei -20°C erneut gefällt. Nach 30 min Zentrifugation bei 3000 g und 4°C wurde das Pellet dreimal jeweils 5 min mit 1 ml 70%igen Ethanols gewaschen und jeweils erneut für 10 min bei 3000 g und 4°C zentrifugiert. Die Konzentration der RNA wurde durch photometrische Messung bei 260 nm bestimmt, die Reinheit der RNA wurde durch den Quotienten der Extinktion bei 260 nm und 280 nm ermittelt. Der Quotient für gut aufgereinigte RNA sollte zwischen 1,6 und 1,8 liegen.

TES-Puffer:	TRIS-HCl, pH 7,5	10	mM
	EDTA	10	mM
	SDS	0,5 %	(w/v)

4.2.5 Transkriptionsanalyse mittels DNA-Mikroarray

Zur vergleichenden Analyse der Transkription wurde die Deletionsmutante *Δrim101* und die Überexpressionsmutante *RIM101-1426* eingesetzt. Die Transkription beider Stämme wurden jeweils mit dem Wildtypstamm SC5314 verglichen, der unter identischen Bedingungen kultiviert wurde. Da der Transkriptionsfaktor Rim101p im Wildtypstamm nur bei neutralem bis alkalischem Medium in aktivierter Form vorliegt, wurde das Transkriptionsprofil für *Δrim101* bei pH 7,4 erstellt, für den Überexpressionsstamm *RIM101-1426* dagegen bei pH 4,5.

4.2.5.1 Auswahl und Annotation der Sonden

Die Transkriptionsprofile in *C. albicans* wurden mittels eines DNA-Mikroarrays erstellt, der 117 Sonden für zellwandassoziierte Gene umfasst (Sohn *et al.*, 2003). Für diesen zellwandspezifischen *C. albicans*-Mikroarray wurden aus der YPD Proteom-Datenbank (www.proteome.com) 65 Gene ausgewählt, die für Zellwandproteine von *Saccharomyces cerevisiae* kodieren. Die annotierten Sequenzen dieser Gene (*AGA1*, *AGA2*, *ASP3a*, *ASP3b*, *ASP3c*, *ASP3d*, *BGL2*, *CIS3*, *CRH1*, *CSI1*, *CTS1*, *CWP1*, *CWP2*, *DAN1*, *EGT2*, *EXG1*, *EXG2*, *FIG1*, *FIG2*, *FLO1*, *FLO5*, *FLO9*, *FLO10*, *HSP150*, *KRE1*, *MUC1*, *PHO5*, *PIR1*, *PIR3*, *PRY3*, *RAX2*, *SAG1*, *SCW4*, *SCW10*, *SCW11*, *SED1*, *SPI1*, *SPO19*, *SPR1*, *SPS100*, *SSR1*, *SUN4*, *TIP1*, *TIR1*, *TIR2*, *UTR2*, *YDR134c*, *YDR534c*, *YHR126c*, *YIL011w*, *YJL171c*, *YJR151c*, *YKL046c*, *YLR040c*, *YLR042c*, *YLR046c*, *YLR110c*, *YLR194c*, *YNL260c*, *YNL300w*, *YOL155c*, *YOR009w*, *YOR214c*, *YOR382w*, *YOR383c*) wurden eingesetzt, um die genomische

C. albicans-Datenbank (www-sequence.stanford.edu/group/candida/) mittels des BLAST-Programmes *tblastn* (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) nach Homologen zu durchsuchen. In dieser Arbeit aufgeführte Gennamen und Sequenzen entsprechen der Annotation 6 dieser Datenbank. Zusätzlich wurden für den Array bereits charakterisierte Gene von *C. albicans* ausgewählt, die für Zellwandproteine kodieren [*AAF1* (U44747/U18983), *ALA1* (AF025429), *ALS1* (L25902), *ALS5* (AF068866), *ALS3* (U87956), *ALS8* (AF051313), *ALS4* (AF024586, AF024584), *ALS6* (AF075293), *ALS7* (AF201684, AF075294), *ALS9* (AF229989), *BGL2* (U12975), *CHS1* (X52420), *CHS2* (M82937), *CHS3* (D13454), *CHS4* (AB003310), *CHS5* (AB012123), *CHT1* (U36490), *CHT2* (U15800), *CHT4* (AY009150), *FKS1* (AF027295)/*GSC1* (D88815), *GSL1* (D88816), *GSL2* (AB001077), *HWP1* (U64206)/*ECE2* (AF001978), *HYR1* (Z50123), *INT1* (U35070), *KRE1* (M81588), *KRE6* (D88490), *KRE9* (AF069763), *MP65* (CAL010064), *PHR1* (AF247190), *PHR2* (AF011386), *RBT1* (AF254142), *RBT4* (AF254144), *SKN1* (D88491), *SSA2* (U25718), *TCA1* (AF043301) and *WAP1* (AF254147)/*CSA1* (AF080221)]. Zwei Sonden für *ACT1* (X16377) wurden als Positivkontrollen eingesetzt. Zur Ermittlung geeigneter Primer-Sequenzen für die Amplifikation der Sonden wurde das Programm Primer3 (www.genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi) verwendet. Die durchschnittliche Länge der PCR-Produkte betrug 350 bp.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der beschriebene DNA-Mikroarray um 66 Gene erweitert, die für potentielle GPI-Proteine kodieren (De Groot *et al.*, 2003). Diese entsprechen folgenden offenen Leserahmen in *C. albicans*: orf6.143, orf6.756, orf6.796, orf6.838, orf6.848, orf6.1331, orf6.1697, orf6.1959, orf6.2029, orf6.2753, orf6.2785, orf6.2824, orf6.3348, orf6.3407, orf6.3431, orf6.3523, orf6.3757, orf6.3746, orf6.3874, orf6.3933, orf6.3969, orf6.4053, orf6.4292, orf6.4387, orf6.4430, orf6.4494, orf6.4504, orf6.4505, orf6.4752, orf6.4795, orf6.4846, orf6.4926, orf6.4960, orf6.4996, orf6.5354, orf6.5468, orf6.5470, orf6.5496, orf6.5972, orf6.5983, orf6.5925, orf6.5954, orf6.6064, orf6.6115, orf6.6116, orf6.6196, orf6.6197, orf6.6205, orf6.6348, orf6.6914, orf6.6933, orf6.7285, orf6.7301, orf6.7314, orf6.7427, orf6.7448, orf6.7493,

orf6.7495, orf6.8217, orf6.8292, orf6.8294, orf6.8792, orf6.8847, orf6.8945, orf6.8957, orf6.8973, orf6.6933.

4.2.5.2 Herstellung der Arrays

Die Sonden wurden mittels PCR aus genomischer *C. albicans*-DNA in einem Volumen von 100 µl in 96-well Mikrotiterplatten amplifiziert (30 Zyklen bei 94°C, 55°C und 72°C, je 1 min, Peltier Thermal Cycler 200, MJ Research). Die PCR-Produkte wurden im 1%igen Agarosegel analysiert und die Mikrotiterplatten unabgedeckt ü.N. bei 8°C aufbewahrt, um durch Verdunstung eine Endkonzentration von mindestens 2 M Betain zu erreichen (Diehl *et al.*, 2001).

PCR-Reaktion:	TRIS-HCl, pH 8,8	100	mM
	KCl	600	mM
	MgCl ₂	15	mM
	Betain (Sigma)	1	M
	Kresolrot (Sigma)	0,3	µM
	genomische DNA	20	ng
	Primer je	0,25	µM
	dNTP-Mix	0,2	mM
	Taq-Polymerase	1	U

Die Sonden wurden auf vorgereinigte Glasobjektträger (Melvin Freed Brand, Sigma) gedruckt, die zuvor mit Polylysin beschichtet worden waren. Für die Beschichtung wurden die Objektträger 2 h in 2,5 M NaOH/60% Ethanol auf einem Orbitalschüttler gewaschen und danach mehrmals in 2 l frischem dH₂O gespült. Die Beschichtung erfolgte durch Inkubation für 1 h in 0,01% Polylysin (Sigma)/0,1x PBS unter leichtem Schütteln. Anschließend wurden die Slides

kurz in dH₂O gewaschen, 5 min bei 150 g zentrifugiert und 2 h bei 80°C getrocknet. Die PCR-Sonden wurden mit einem GMS417 Microarrayer (Genetic Microsystems) im Duplikat gedruckt und am folgenden Tag zur Blockierung unspezifischer Bindestellen nachbehandelt (*post-processing*). Dazu wurden die DNA-Mikroarrays für 1 s in Wasserdampf rehydriert und sofort für 2 s bei 80°C auf einem Heizblock getrocknet. Die DNA-Sonden wurden danach mittels UV-Licht mit 65 mJ/cm² (UV-Stratalinker 180, Stratagene) an die Polylysin-Oberfläche gebunden und die Slides anschließend für 20 min in Blockierungslösung (170 mM Bernsteinsäureanhydrid, 70 mM Natriumborat pH 8,0 in 1-Methyl-2-pyrrolidinon) inkubiert. Die Chips wurden sofort für 2 min in kurz zuvor aufgekochtes dH₂O (95°C) getaucht, kurz in 95% Ethanol gespült und erneut durch Zentrifugation bei 150 g getrocknet.

4.2.5.3 Markierung von cDNA und Hybridisierung

Zur Hybridisierung der DNA-Mikroarrays wurde aus 30 µg mRNA (Abschnitt 4.2.4) des zu untersuchenden *C. albicans*-Stammes ($\Delta rim101$ oder *RIM101-1426*) und der entsprechenden Wildtyp-Referenz (SC5314) fluoreszenzmarkierte cDNA hergestellt. Alle Stämme wurden 6 h in YPD bei 30°C unter nicht hyphen-induzierenden Bedingungen kultiviert. Der Stamm $\Delta rim101$ wurde bei pH 7,4, *RIM101-1426* bei pH 4,5 und der Wildtyp bei pH 7,4 und pH 4,5 angezogen.

Das *Labeling* erfolgte durch reverse Transkription (Superscript II, Invitrogen) unter Einbau von cy3-dUTP (Mutante) oder cy5-dUTP (Referenz) (Amersham Biosciences) nach Standardprotokollen. Die Ansätze wurden mit TE-Puffer pH 7,4 mittels *Filter-Tubes* (Microcon YM-30, Millipore) aufgereinigt, vereinigt und auf ein Gesamtvolumen von 15 µl eingengt (Microcon YM-50, Millipore). Die Hybridisierung in 4x SSC/0,2% SDS erfolgte ü.N. bei 63°C im Wasserbad unter einem Deckglas. Nach der Hybridisierung wurden die Arrays durch jeweils mehrmaliges Eintauchen in 1x SSC/0,03% SDS, 0,2x SSC und 0,05x SSC

gewaschen. Die DNA-Mikroarrays wurden durch Zentrifugation getrocknet und sofort im Fluoreszenzscanner (GMS 418, Applied Precision) ausgelesen.

4.2.6 Northern Blot-Hybridisierung

Die Hybridisierung der RNA mit radioaktiv markierten Sonden zum Nachweis der Transkription der untersuchten Gene wurde nach einer Standardmethode (Sambrook, 1989) auf Nylonmembran (Hybond-N, Amersham Biosciences) durchgeführt.

Dazu wurden zunächst jeweils 15 µg RNA pro Probe ü.N. (1,5 V/cm, 15 h) im denaturierenden Agarosegel aufgetrennt. Die RNA wurde danach für mindestens 6 h mit 20x SSC auf eine Nylonmembran übertragen, kurz mit dH₂O gespült und 10 min luftgetrocknet. Zur kovalenten Bindung der RNA an die Membran wurde mit UV-Licht bestrahlt (2x 120 mJ/cm², UV-Crosslinker 180, Stratagene). Die Membran wurde entweder in Folie verschweißt und bei -20°C gelagert, oder sofort zur Prähybridisierung mit 15 ml CHURCH-Puffer für 1 h bei 65°C im Hybridisierungssofen rotiert.

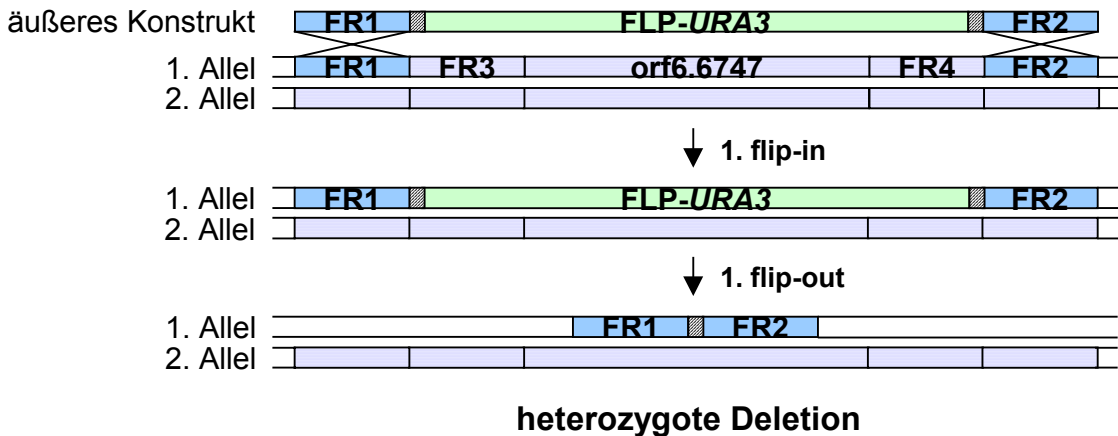
Radioaktiv markierte Sonden wurden mit Hilfe des Prime-It II Random Primer Labeling Kit (Stratagene) unter Verwendung von [α -³²P]-dCTP (Amersham Biosciences) nach Angaben des Herstellers synthetisiert. Die Hybridisierung der Sonden mit der RNA wurde für mindestens 6 h ebenfalls bei 65°C in 10 ml CHURCH-Puffer durchgeführt, danach wurde die Membran 3x 15 min bei 65°C mit 1x SSC/0,1% SDS gewaschen und in Folie verschweißt. Zur Detektion der gebundenen, radioaktiv markierten Sonde wurde die Nylonmembran 24 h auf einem Phosphor Screen (Molecular Dynamics) exponiert und zur weiteren quantitativen Auswertung mit einem Phosphoimager (Amersham) ausgelesen. Die elektronische Datenverarbeitung und Analyse der Ergebnisse erfolgte mit dem Programm ImageQuant. Vor einer Wiederverwendung der Blot-Membranen zur Hybridisierung wurden diese zur Entfernung der Sonde für 10 min in dH₂O/0,5% SDS bei 95°C im Hybridisierungssofen rotiert.

20x SSC:	NaCl	3	M
	Na-Citrat	0,3	M
CHURCH-Puffer:	SDS	7%	(w/v)
	BSA	1%	(w/v)
	EDTA	1	mM
	NaH ₂ PO ₄	70	mM
	Na ₂ HPO ₄	180	mM
	pH 7,2		

4.2.7 Gendeletion durch sequenzielle homologe Rekombination

Zur Deletion von Genen in *C. albicans* wurde die in das Plasmid pSFU1 integrierte *URA3*-Flipper-Kassette eingesetzt (Morschhauser *et al.*, 1999). Die Integration der Flipper-Kassette in das *C. albicans*-Genom erfolgt durch homologe Rekombination mit flankierenden Regionen (FR) und im Austausch mit der eingeschlossenen kodierenden Sequenz. Die eingesetzte Deletionskassette enthält *URA3* als selektierbaren Marker und zwei 34 bp lange, terminale FRT-Sequenzen. Diese terminalen FRT-Sequenzen werden von der sequenzspezifischen FLP-Rekombinase aus *S. cerevisiae* erkannt. Mittels eines integrierten *SAP2*-Promotors aus *C. albicans* kann die Expression der Rekombinase induziert und die gesamte *URA3*-Kassette wieder aus dem Genom herausgeschnitten werden. *URA3* ist somit nach der Deletion eines Allels erneut als integrierbarer Selektionsmarker verfügbar. Abbildung 4 verdeutlicht schematisch die Methode der Gendeletion mittels *URA3*-Flipper.

1. Transformation



2. Transformation

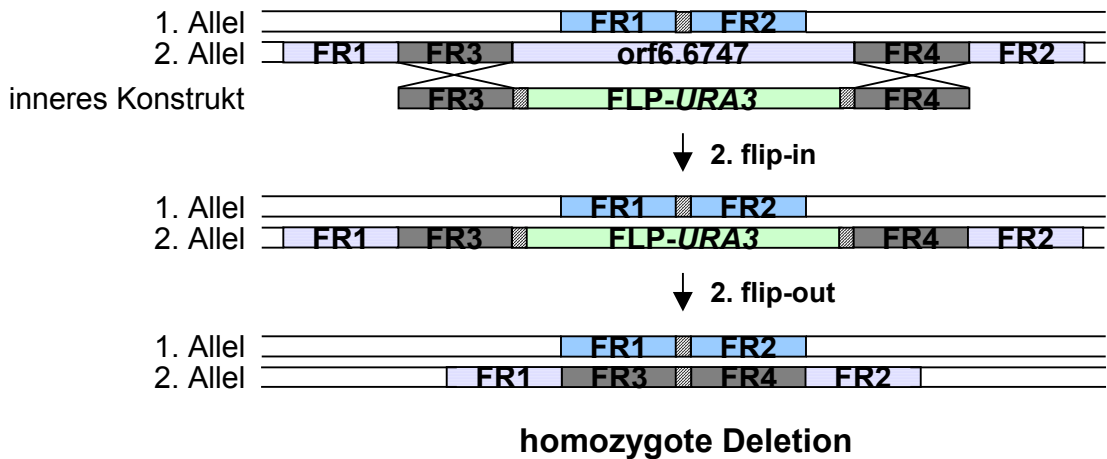


Abbildung 4: Herstellung von *RBR1*-Deletionsmutanten mittels *URA3*-Flipper-Kassette. Die Integration einer äußeren (*RBR1*-FR1/2) und einer inneren (*RBR1*-FR3/4) Deletionskassette erfolgte in zwei Transformationsschritten. Durch Rekombination sequenzhomologer flankierender Regionen von *RBR1* (*orf6.6747*) wurde zunächst das äußere Konstrukt im Austausch gegen *RBR1* ins Genom integriert (1. flip-in). Aus der entstandenen heterozygoten *RBR1*-Mutante wurde das Konstrukt durch Induktion der FLP-Rekombinase (4.2.7.2) wieder herausgeschnitten (1. flip-out), wodurch *URA3* als Selektionsmarker wiedergewonnen wurde. Eine zweite Transformation mit dem inneren Konstrukt *RBR1*-FR3/4 führte zur Deletion des 2. *RBR1*-Allels (2. flip-in) und damit zu einer homozygoten *RBR1*-Mutante ($\Delta rim101$).

4.2.7.1 Konstruktion der *RBR1*-Deletionskassetten

Zur Klonierung der *RBR1*-Deletionskassetten wurden ein inneres und ein äußeres Paar flankierender Regionen von 457-565 bp Länge mittels PCR (Peltier Thermal Cycler 200, MJ Research) aus genomischer DNA (Abschnitt 4.2.3) amplifiziert. Zur PCR-Amplifikation (30 Zyklen bei 94°C, 55°C und 72°C, je 1 min) wurden Primer verwendet, die Schnittstellen für Restriktionsenzyme zur gerichteten Ligation der FR in das Plasmid pSFU1 enthielten (Tabelle 4). Die PCR-Produkte FR1 und FR3 wurden nach *Apal*- und *XhoI*-Verdau in den identisch verdauten und dephosphorylierten Vektor pSFU1 ligiert, die Fragmente FR2 and FR4 wurden über *NotI* und *SacI* in pSFU1 integriert. Daraus resultierten das Plasmid pSFU1-RBR1-FR1/2 mit dem äußeren Deletionskonstrukt und das Plasmid pSFU1-RBR1-FR3/4, welches das innere Deletionskonstrukt trägt.

4.2.7.2 Herstellung der *RBR1*-Deletionsmutanten

Das äußere Paar flankierender Regionen (FR1 und FR2) wurde zur Deletion des ersten Allels verwendet, das innere Paar (FR3 und FR4) zur Deletion des zweiten Allels von *RBR1* (Abbildung 4). Zur Integration in das *C. albicans*-Genom wurden die innere und die äußere Deletionskassette mit den Restriktionsendonukleasen *Apal* und *SacI* aus den Vektoren pSFU1-RBR1-FR1/2 und pSFU1-RBR1-FR3/4 herausgeschnitten. Das äußere Deletionskonstrukt wurde in den *URA3*-defizienten Ausgangsstamm CA14 transformiert (Abschnitt 4.2.2) und positive Transformanten auf SC-uri Medium selektiert. Der Genotyp der Transformanten wurde im Southern Blot überprüft (Abschnitt 4.2.9). Anschließend wurde durch 12 h Inkubation in YCB-BSA-Medium mit 100 µg/ml Uridin bei 30°C der *SAP2*-Promotor aktiviert und dadurch die FLP-Rekombinase im *URA3*-Flipper induziert (Morschhauser *et al.*, 1999). Durch die FLP-Rekombinase wurde das am *RBR1*-Lokus integrierte Deletionskonstrukt zwischen den terminalen FRT-Sequenzen heraus-

geschnitten. Zur Selektion *URA3*-defizienter Kolonien wurden 2×10^2 Zellen/100 μl auf SC-Medium mit 10 $\mu\text{g/ml}$ Uridin ausplattiert. Auf diesem Medium wachsen *URA*-auxotrophe Klone langsamer als die prototrophen Elternstämme und bilden daher nach 24 h kleinere Kolonien als diese. Kleine Kolonien wurden vereinzelt und auf Uridinauxotrophie getestet. Die genotypische Charakterisierung dieser heterozygoten *RBR1*-Deletionsmutanten erfolgte mittels Southern Blot (Abschnitt 4.2.9).

Zur Herstellung homozygoter *RBR1*-Deletionsmutanten wurden die *URA3*-defizienten, heterozygoten Stämme mit der inneren *URA3*-Flipper-Kassette transformiert. Da die flankierenden Sequenzen dieses Deletionskonstruktes am Locus des ersten Allels mit herausgeschnitten worden waren, konnte keine erneute Integration des inneren Konstruktes an diesen Locus stattfinden. Die Deletion des zweiten *RBR1*-Allels sowie die nachfolgende Exzision des *URA3*-Flippers wurden ebenfalls durch Southern Blot bestätigt.

4.2.8 Reversion der *RBR1*-Deletionsmutanten

Die Reversion der $\Delta rbr1$ -Mutanten erfolgte mittels Transformation mit dem integrativen Expressionsvektor pCaEXP (Care *et al.*, 1999). Dieser Vektor trägt als Selektionsmarker *C. albicans URA3* unter seinem nativen Promotor, sowie homologe Sequenzen zur Integration in den *RP10*-Lokus von *C. albicans*.

Zur ektopischen Reintegration von *RBR1* in *URA3*-defiziente $\Delta rbr1$ -Stämme wurden die kodierende Sequenz von *RBR1* und zirka 500 bp seiner Promotorregion in pCaEXP kloniert. Mittels PCR war diese Sequenz aus genomischer DNA amplifiziert und über *Apal*- und *XhoI*-Schnittstellen gerichtet in den Vektor kloniert worden. Unabhängige $\Delta rbr1$ -Stämme wurden sowohl mit dem resultierenden Vektor pCaEXP-*RBR1*, als auch mit dem ursprünglichen Vektor pCaEXP transformiert. Die Transformanten wurden auf SC-uri Medium selektiert und vereinzelt. Die Expression von *RBR1* in den resultierenden Revertanten wurde in α -MEM bei pH 4,5 und 25°C im Northern Blot überprüft.

4.2.9 Southern Blot-Hybridisierung

Die Hybridisierung genomischer DNA mit radioaktiv markierten Sonden zur Analyse transformierter *C. albicans*-Stämme wurde nach enzymatischem Schneiden der genomischen DNA durchgeführt (Sambrook, 1989). Mit dieser Methode wurden die berechneten Restriktionsfragment-Längen für die deletierten Loci überprüft und damit der Genotyp der Transformanten bestätigt. Nach Auftrennung von 5-10 µl genomischer DNA je Probe im 0,8%igen Agarosegel (4 V/cm, 2 h) und anschließender Denaturierung und Neutralisierung für jeweils 20 min erfolgte die weitere Durchführung der Methode wie in Abschnitt 4.2.6 beschrieben.

4.2.10 Virulenzstudien

Virulenzstudien geben Aufschluss über die Pathogenität von *C. albicans*-Stämmen *in vivo*. Mittels dieser Tests wird die Fähigkeit von *Candida*-Stämmen zur Manifestation einer systemischen Kandidose im Versuchstier getestet. Die in dieser Arbeit zitierten *in vivo* Virulenzstudien wurden freundlicherweise von Dr. Klaus Schröppel an der Universität Erlangen durchgeführt (Schweizer *et al.*, 2000). Es wurden Mäuse des Stammes Balb/c (Charles River) verwendet.

Um die Bedeutung des *RBR1*-Gens für die Virulenz von *C. albicans* zu überprüfen, wurden 5 Mäusen eine Zellzahl von 5×10^5 bzw. in einem weiteren Experiment 1×10^6 Zellen eines $\Delta rbr1$ -Stammes (HL12-2) über die Schwanzvene appliziert. Als Kontrollstamm wurde die *C. albicans* *RBR1*-Revertante (HL13-6) eingesetzt. Zellen dieses Stammes wurden einer Kontrollgruppe von ebenfalls 5 Tieren in gleicher Dosis verabreicht. Die eingesetzte Anzahl von Zellen des Wildtypstammes führt in Balb/c-Mäusen in der Regel innerhalb von 14 Tagen zum Tod durch systemische Kandidose. Der durch die getesteten Stämme verursachte Infektionsverlauf wurde anhand der Mortalitätsrate der infizierten Versuchstiere über 7-12 Wochen hinweg dokumentiert und gegen die Versuchsdauer aufgetragen. Insgesamt wurden 3 Versuche durchgeführt.

5 Ergebnisse

5.1 Anpassung von *C. albicans* an den pH-Wert

Der humanpathogene Pilz *C. albicans* besiedelt ein breites Spektrum verschiedener Habitats im Körper seines Wirtes. Dies sind z.B. die Haut, die Mundhöhle und der Gastro-Intestinaltrakt sowie die Vaginalschleimhaut. Während in der Mundhöhle und im Darm neutrale bis alkalische Bedingungen herrschen, setzen eine Magenpassage und auch die erfolgreiche Ansiedelung in der Vaginalhöhle eine große Toleranz gegenüber saurer Umgebung voraus. Die Adaption von *C. albicans* an den externen pH-Wert wird reguliert durch den Transkriptionsfaktor Rim101p. Dieser wird in neutralem Milieu aktiviert und kann sowohl für die Aktivierung als auch für die Repression von Genen verantwortlich sein (Ramon & Fonzi, 2003; Ramon *et al.*, 1999). Bereits charakterisierte Zielgene von Rim101p kodieren für die Zellwandproteine Phr1p und Phr2p, zwei funktionshomologe, sekretierte Glykosidasen (Fonzi, 1999; Muhlschlegel & Fonzi, 1997; Saporito-Irwin *et al.*, 1995). Während *PHR1* im Neutralen direkt von Rim101p aktiviert wird (Ramon & Fonzi, 2003), bleibt *PHR2* unter diesen Bedingungen reprimiert und wird im Säuren bzw. in Abwesenheit von Rim101p exprimiert (El Barkani *et al.*, 2000). Um weitere *RIM101*-abhängige Gene zu identifizieren, die für Zellwandproteine in *C. albicans* kodieren, wurde in dieser Arbeit ein spezifischer DNA-Mikroarray eingesetzt (Sohn *et al.*, 2003). Die *RIM101*-abhängige Expression von Genen sollte anhand der vergleichenden Analyse der Transkriptionsprofile zweier unterschiedlicher *RIM101*-Mutanten dargestellt werden. Die Deletionsmutante $\Delta rim101$ und die Überexpressionsmutante *RIM101-1426* wurde dazu jeweils mit dem Transkriptionsprofil des klinischen Isolates SC5314 (Wildtyp, WT) verglichen.

5.2 Eigenschaften der untersuchten *RIM101*-Mutanten

Zur Identifizierung bisher unbekannter Zielgene des pH-abhängigen Transkriptionsfaktors Rim101p wurde die Deletionsmutante $\Delta rim101$ und die Überexpressionsmutante *RIM101-1426* eingesetzt. Das *RIM101*-Allel *RIM101-1426* wurde durch Insertion eines Stopp-Kodons an der Basenposition 1426 erzeugt und kodiert das C-terminal verkürzte Protein Rim101-1426p. Dieses wird nicht proteolytisch prozessiert, sondern zeigt eine pH-unabhängige, konstitutive Aktivität als Transkriptionsfaktor. Die Mutante *RIM101-1426* trägt neben den zwei *RIM101*-Wildtypallelen drei *RIM101-1426*-Allele, die ektopisch am *URA3*-Lokus integriert wurden (El Barkani *et al.*, 2000).

5.2.1 *C. albicans* säuert das Kulturmedium stark an

Da *RIM101* sowohl für die Repression im Sauren exprimierter Gene (*PHR2*), als auch für die Aktivierung alkalisch exprimierter Gene (*PHR1*) verantwortlich ist, wurden für die vergleichende Transkriptionsanalyse der Mutanten mit dem Wildtyp mittels DNA-Mikroarray zwei verschiedene pH-Bedingungen gewählt. Die Zellen wurden in dem Hefevollmedium YPD im Sauren bei pH 4,5 und im neutralen Milieu bei pH 7,4 kultiviert. Ein pH-Wert von pH 4,5 entspricht den auf der Vaginalschleimhaut herrschenden Bedingungen, pH 7,4 dagegen liegt in Blut und Gewebe von Säugern vor, die *C. albicans* bei einer systemischen Infektion besiedelt.

Um das Wachstum, den Glukoseverbrauch und die Änderung des pH-Wertes des Kulturmediums durch den Wildtyp, $\Delta rim101$ und *RIM101-1426* zu überprüfen, wurden alle drei Stämme für 72 h unter nicht hyphen-induzierenden Bedingungen in YPD-pH 7 und YPD-pH 4 bei 30°C kultiviert. Die optische Dichte bei 600 nm (OD_{600}), der Glukosegehalt und der pH-Wert des Mediums wurden regelmäßig gemessen und gegen die Kultivierungsdauer aufgetragen (Abbildung 5). In dem gewählten Vollmedium wiesen alle Stämme vergleichbare Wachstumsraten auf. Nach 6 h in YPD-pH 7 befanden sich die Kulturen in der

späten exponentiellen Wachstumsphase (OD_{600} 1,1-1,2). Der Glukosegehalt des Mediums war nach 7 h (WT 6 h) um die Hälfte auf 1% gesunken, während die Zellen das Medium stark angesäuert hatten (pH 5,6 - pH 6,1). Im Vergleich der drei Stämme zeigte die Deletionsmutante $\Delta rim101$ nach 8 h Kultivierung die geringste Wachstumsrate und einen verzögerten Beginn der signifikanten Glukoseverwertung sowie der Ansäuerung des Mediums (Abbildung 5a). Dieser Anpassungsdefekt an neutrale Bedingungen ist möglicherweise zurückzuführen auf die Deregulierung *RIM101*-abhängiger Gene bei neutralem pH (De Bernardis *et al.*, 1998).

In YPD-pH 4 zeigten alle drei Stämme gleiche Wachstumsraten und erreichten nach 6 h eine OD_{600} von etwa 1,0 (Abbildung 5b), die nur wenig geringer war als die bei neutralem pH-Wert gemessene optische Dichte des Mediums. Auch bei pH 4 wurde parallel zum Abbau der zugesetzten Glukose eine Ansäuerung des Mediums von pH 4,0 auf pH 3,7 gemessen. Die für $\Delta rim101$ bei pH 7 nach 8 h beobachtete Stagnation des Glukosestoffwechsels zeigte sich nach etwa 9 h Kultivierungszeit auch im Säuren, ebenfalls bei einer Glukosekonzentration von 0,5% im Medium. Dieser Effekt ging bei pH 4 nicht mit einem verzögerten Wachstum der Zellen einher (Abbildung 5b). Der vollständige Abbau der Glukose war bei Wildtyp und *RIM101-1426* im Neutralen und im Säuren nach 8-10 h erfolgt, im Medium der Deletionsmutante $\Delta rim101$ konnte erst nach mehr als 15 h keine Glukose mehr gemessen werden. Nach dem vollständigen Abbau der Glukose erfolgte eine stetige Alkalisierung des Mediums, die nach 72 h deutlich über den ursprünglich eingestellten pH-Wert des Kulturmediums hinausging.

Für die Erstellung von Transkriptionsprofilen der *RIM101*-Mutanten sind konstante pH-Bedingungen essentiell. Durch Pufferung der Medien mit 100 mM HEPES konnten unter identischen Kulturbedingungen über 7-8 h weitgehend konstante pH-Werte der Kulturen erreicht werden. Die Schwankungen des pH-Wertes in gepufferten Medien lagen unter 0,2 Einheiten für Kulturen von pH 7,4 und unter 0,1 Einheiten für Kulturen von pH 4,5.

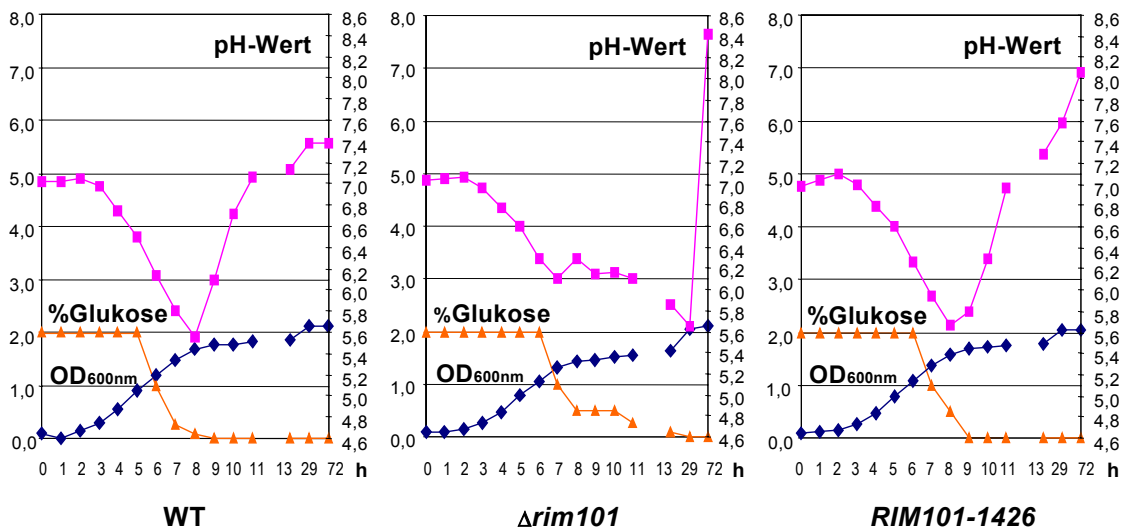
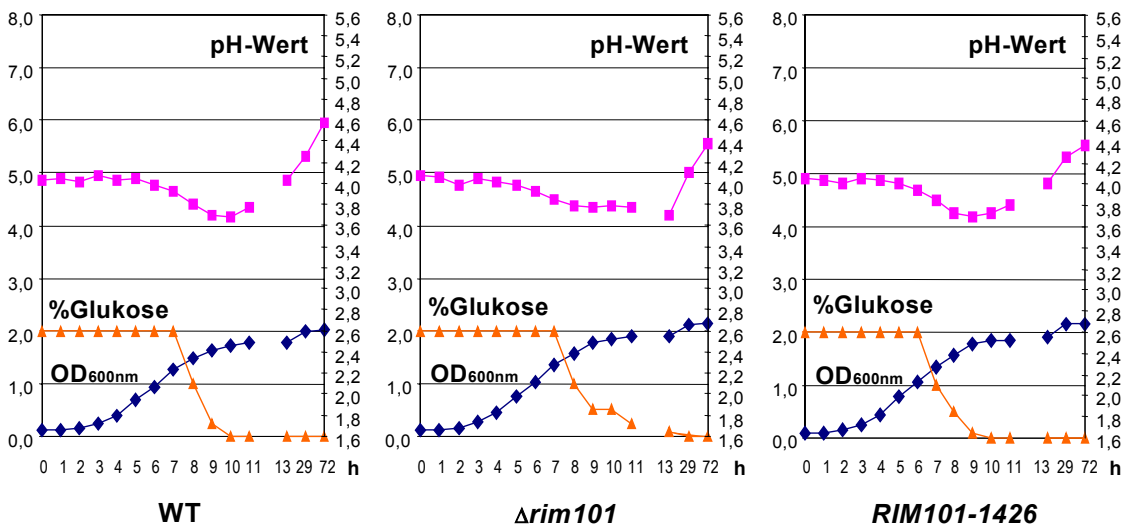
a pH 7**b pH 4**

Abbildung 5: Wachstums- und pH-Kurven von *C. albicans*-Stämmen. Die *C. albicans*-Stämme SC5314 (klinisches Isolat, WT), $\Delta rim101$ und RIM101-1426 wurden für 72 h in YPD-pH 7 und YPD-pH 4 bei 30°C und 180 rpm unter nicht hyphen-induzierenden Bedingungen kultiviert. Das Zellwachstum (OD₆₀₀ der Kulturen, Rauten, linke Größenachse), der Glukosegehalt (Dreiecke, linke Größenachse) und der pH-Wert des Mediums (Quadrate, rechte Größenachse) wurden regelmäßig bestimmt und über die Zeit aufgetragen. Die untersuchten *C. albicans*-Stämme zeigten vergleichbares Wachstum in YPD und säuerten parallel zu dem Abbau der zugesetzten Glukose das Medium innerhalb von 6 h stark an. Der vollständige Glukoseabbau durch $\Delta rim101$ war deutlich verzögert (9-10 h WT und RIM101-1426, 15-29 h $\Delta rim101$); ihm folgte innerhalb der gemessenen Zeitspanne eine stetige Alkalisierung des Mediums deutlich über den ursprünglichen pH-Wert hinaus.

5.2.2 *RIM101* wird pH-abhängig transkribiert

Nicht nur die proteolytische Aktivierung, sondern auch die Transkription von *RIM101* in *C. albicans* ist pH-abhängig. Unter alkalischen Bedingungen erfolgt eine stärkere Transkription von *RIM101* als im Sauren (Ramon *et al.*, 1999). Um die Transkription des pH-abhängigen Regulators Rim101p unter den für die Transkriptionsanalyse gewählten Versuchsbedingungen zu quantifizieren, wurden die Transkriptionsmuster von Wildtyp und *RIM101*-Mutanten im Northern Blot vergleichend dargestellt (Abbildung 6). Die Northern Blot-Hybridisierungen mit einer *RIM101*-Sonde zeigten wie erwartet ein starkes *RIM101*-Signal im Wildtyp bei pH 7,4, während nur sehr geringe Transkriptmengen bei pH 4,5 detektiert wurden. Im Sauren liegt natives Rim101p zudem nicht in aktivierter Form vor. In der Überexpressionsmutante *RIM101-1426* dagegen wurde *RIM101* bei pH 4,5 vergleichbar stark transkribiert wie im Wildtyp bei pH 7,4. Zur Analyse der differentiellen Transkription *RIM101*-abhängiger Gene in *C. albicans* wurde daher YPD mit einem pH-Wert von 7,4 als Medium für $\Delta rim101$ und die Wildtypferenz ausgewählt, während *RIM101-1426* in YPD bei pH 4,5 kultiviert wurde.

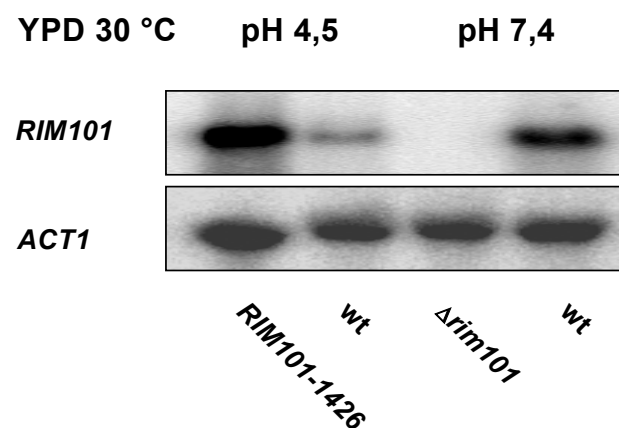


Abbildung 6: Die pH-abhängige Transkription von *RIM101*. Northern Blot-Hybridisierung der Überexpressionsmutante *RIM101-1426* und der Deletionsmutante $\Delta rim101$ im Vergleich zum Wildtypstamm. Das C-terminal trunke Rim101-1426p ist pH-unabhängig aktiv, im Wildtyp liegt natives Rim101p bei pH 4,5 in der unprozessierten Form vor. Für die RNA-Isolierung wurden die Zellen für 6 h bei 30°C in YPD kultiviert.

5.3 Transkriptionsanalyse potentieller Zellwandproteine

Der zur Detektion *RIM101*-regulierter Gene eingesetzte DNA-Mikroarray enthielt insgesamt 117 Sonden. Diese Sonden zeigten spezifische Bindungsaffinität sowohl für die Transkripte bekannter Zellwandgene, als auch für 65 bisher unbekannte, offene Leserahmen von *C. albicans*, die aufgrund ihrer Homologie zu bereits charakterisierten Zellwandgenen von *S. cerevisiae* ausgewählt wurden (Abschnitt 4.2.5.1). Im Rahmen dieser Arbeit wurde der bestehende Array zudem um weitere 66 Sonden für solche Gene erweitert, die für Proteine mit einem Glykosyl-Phosphatidylinositol-(GPI)-Anker kodieren (De Groot *et al.*, 2003). Diese Gene enthalten eine N-terminale Signalsequenz für ihre Translokation in das Lumen des endoplasmatischen Retikulums (ER) und eine C-terminale Sequenz, über die sie mit einem GPI-Anker zunächst von außen in der Zellmembran verankert werden. Dieser GPI-Anker kann bei Zellwandproteinen abgespalten werden.

Zur vergleichenden Analyse der *RIM101*-abhängigen Transkription wurden Transkriptionsprofile von zwei *C. albicans*-Stämmen erstellt (Abschnitte 3.7 und 4.2.5). Diese waren die Deletionsmutante $\Delta rim101$ und eine Überexpressionsmutante *RIM101-1426*, die das C-terminal trunkeerte und dadurch pH-unabhängig konstitutiv aktive Rim101-1426p überexprimiert. Die Transkriptionssignale beider Stämme wurden dazu verglichen mit den Signalen des Wildtypstammes SC5314, der jeweils unter identischen Bedingungen kultiviert wurde. Da der Transkriptionsfaktor Rim101p nur in neutralem bis alkalischen Medium in aktivierter Form vorliegt, wurde das Transkriptionsprofil von $\Delta rim101$ bei pH 7,4 erstellt, um möglichst viele Unterschiede zwischen Mutante und Wildtyp zu erfassen. Durch einen Vergleich der *RIM101-1426* Mutante mit dem Wildtyp in YPD bei pH 4,5 sollten Gene detektiert werden, die unabhängig von weiteren pH-abhängigen Faktoren durch aktiviertes Rim101p reguliert werden. Eine Überlagerung von *RIM101*-induzierten Effekten mit denen der Induktion der Filamentierung sollte vermieden werden, indem die Kultivierungstemperatur und das Medium so gewählt wurden, dass keiner der Stämme unter diesen Bedingungen hyphales Wachstum zeigte (YPD, 30°C).

5.3.1 Rim101p aktiviert und reprimiert Zielgene

Insgesamt konnten durch die vergleichende Transkriptionsanalyse 32 bekannte *C. albicans*-Gene und offene Leserahmen detektiert werden, die durch *RIM101* reguliert werden. Neun der untersuchten Zellwandgene werden durch Rim101p aktiviert (Tabelle 7) und 23 Gene erwiesen sich als Rim101p-reprimiert (Tabelle 8). Eine mindestens 2,5-fache Regulation der aufgeführten ORFs und Gene durch Rim101p wurde in drei unabhängigen Experimenten im Duplikat gemessen. Dargestellt ist der Quotient der Transkriptionssignale von Mutante und Wildtyp sowie die mittlere absolute Abweichung der Messwerte von ihrem Mittelwert.

Tabelle 7: *RIM101*-aktivierte Gene

Gen/offener Leserahmen	Regulation durch <i>RIM101</i> <i>RIM101-1426</i> /WT* bei pH 4,5	d**
<i>PHR1</i> (AF247190)	32,1	19,6
<i>HWP1</i> (U64206)/ <i>ECE2</i> (AF001978)	25,8	20,0
<i>ALS1</i> (L25902)	12,8	8,8
orf6.7834	8,0	5,8
<i>SKN1</i> (D88491)	5,6	1,1
<i>ALS5</i> (AF068866)	4,2	2,7
orf6.1982	3,4	1,1
<i>RBT1</i> (AF254142)	3,1	0,7
orf6.1230/orf6.1231/orf6.1232	2,9	0,3

* Die Werte repräsentieren das arithmetische Mittel der Quotienten von Signalintensitäten aus mindestens drei unabhängigen Messungen.

** d bezeichnet die mittlere absolute Abweichung der Messwerte von ihrem arithmetischen Mittel.

Tabelle 8: *RIM101*-reprimierte Gene

Gen/offener Leserahmen	Regulation durch <i>RIM101</i> $\Delta rim101/WT^*$ bei pH 7,4	d**
<i>PHR2</i> (AF011386)	15,2	2,9
<i>RBR1</i> (orf6.6747)	15,2	10,9
<i>PHO</i> -Gene (orf6.4212/orf6.1652/orf6.1832)	9,2	2,3
<i>PHO11</i> (orf6.1832)	6,7	1,4
<i>RBR2</i> (orf6.6744)	5,2	1,3
<i>RBR3</i> (orf6.1159)	4,8	2,1
<i>CHS1</i> (X52420)	4,5	1,9
orf6.4590	4,5	2,0
<i>INT1</i> (U35070)	4,1	1,6
orf6.3954	3,6	0,9
orf6.4388	3,6	0,6
orf6.3476	3,4	0,7
orf6.2804	3,4	0,7
orf6.4736/orf6.4737	3,1	1,0
orf6.799	3,0	0,7
orf6.7718	3,0	1,6
orf6.8118	2,9	0,5
orf6.474/orf6.475	2,7	0,5
orf6.6972	2,7	0,5
<i>ALS4</i> (AF024586, AF024584)	2,7	0,8
<i>KRE6</i> (D88490)	2,6	0,4
orf6.5422/orf6.5423/orf6.537/orf6.538	2,6	0,7
orf6.7977	2,6	0,6
orf6.4073/orf6.4765	2,5	0,7

* Die aufgeführten Werte repräsentieren das arithmetische Mittel der Quotienten von Signalintensitäten aus mindestens drei unabhängigen Messungen.

** d bezeichnet die mittlere absolute Abweichung der Messwerte von ihrem arithmetischem Mittel.

5.3.1.1 *RIM101*-aktivierte Gene

Unter den *RIM101*-aktivierten Genen konnte *PHR1* als gut charakterisiertes Zielgen von Rim101p bestätigt werden. *SKN1*, eine weitere Glykosidase der Zellwand, ist nach Transkriptionsstudien anderer Autoren kürzlich ebenfalls als *RIM101*-abhängig beschrieben worden (Ramon & Fonzi, 2003). Dieses Ergebnis konnte in der vorliegenden Studie bestätigt werden. *PHR1* und *SKN1* enthalten jeweils drei mögliche Bindestellen für den Transkriptionsfaktor innerhalb der ersten 1000 bp ihrer Promoterregion (Ramon & Fonzi, 2003; Ramon *et al.*, 1999). Für *PHR1* konnte die Bindung von Rim101p an den Promotor des Gens und eine daraus resultierende direkte Aktivierung der Transkription gezeigt werden (Ramon & Fonzi, 2003). Neben *PHR1* wies das hyphenspezifisch exprimierte Gen *HWP1* (Sharkey *et al.*, 1999) die stärkste Aktivierung durch den Transkriptionsfaktor Rim101p auf. Weiterhin wurden *RBT1*, ein nicht essentielles, ebenfalls mit der Hypheninduktion assoziiertes Gen (Bailey *et al.*, 1996), sowie die Glykoproteine *ALS1* und *ALS5* aus der Familie der Adhäsine (Hoyer & Hecht, 2001; Hoyer *et al.*, 1995) durch Rim101p aktiviert.

Eine Interaktion von *RIM101* mit der Induktion filamentösen Wachstums ist auf phänotypischer und molekularer Ebene bereits beschrieben worden (Davis *et al.*, 2000a; Davis *et al.*, 2002; El Barkani *et al.*, 2000). Die *RIM101*-abhängige Induktion des hyphalen Gens *HWP1* in Blastokonidien war jedoch überraschend, da eine Induktion dieses Gens bisher nur in filamentierenden *C. albicans* gezeigt wurde. Zur relativen Quantifizierung und Bestätigung der DNA-Mikroarray-Daten wurden Northern Blot-Hybridisierungen (Abschnitt 4.2.6) mit dem Wildtypstamm, der Deletionsmutante $\Delta rim101$ und der Überexpressionsmutante *RIM101-1426* ebenfalls unter nicht-induzierenden Bedingungen durchgeführt. Die relative Quantifizierung der Transkription aller vier durch *RIM101* aktivierten Gene erfolgte nach Hybridisierung der isolierten mRNA mit spezifischen Sonden und Normalisierung gegen das Aktin1-Signal. Übereinstimmend mit den bereits publizierten Daten wurde unter diesen Bedingungen kein *HWP1*-Transkript im Wildtyp detektiert, die starke Aktivierung

von *HWP1*, *RBT1* und der *ALS*-Gene durch konstitutiv aktives Rim101-1426p konnte jedoch bestätigt werden (Abbildung 7). Die *RIM101*-abhängige Transkription der überprüften Gene war bei neutralem pH etwa 10-fach stärker als bei pH 4,5. Dieses Ergebnis deutete darauf hin, dass an der *RIM101*-abhängigen Aktivierung der hyphenspezifischen Gene weitere pH-abhängige, aber *RIM101*-unabhängige Faktoren beteiligt sind.

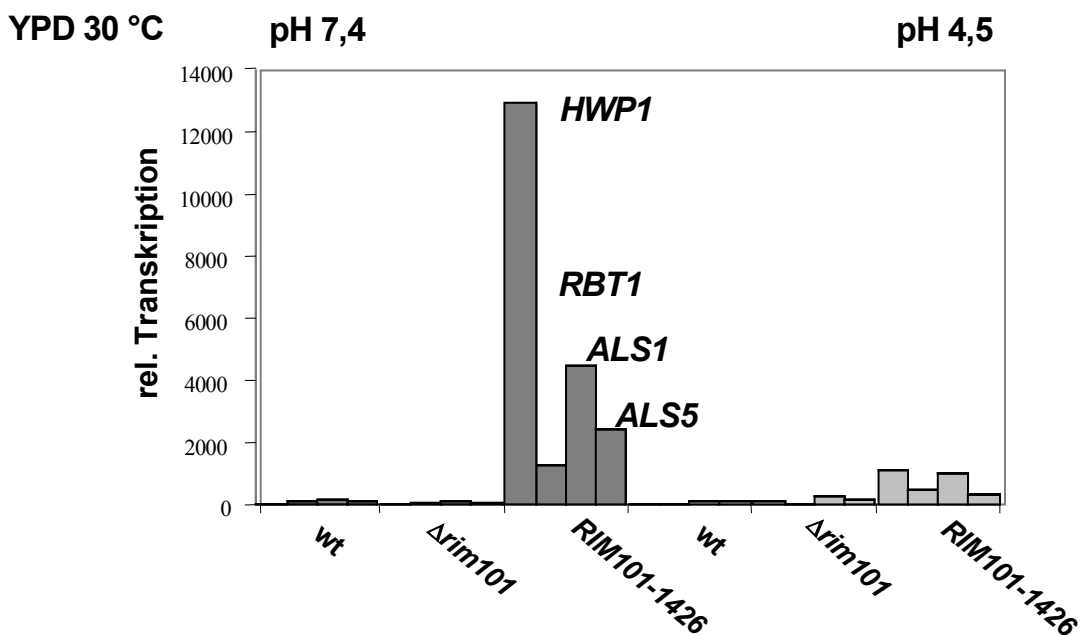


Abbildung 7: Quantifizierung der *RIM101*-abhängigen Aktivierung von Genen. Darstellung der relativen Transkriptmengen der hyphenspezifischen Gene *HWP1*, *RBT1* und der Adhäsins-Gene *ALS1* und *ALS5* unter nicht-induzierenden Bedingungen im Northern Blot. Die Hybridisierung des Northern Blots erfolgte mit genspezifischen Sonden und die Quantifizierung der Signale durch Normalisierung gegen das Aktin1-Signal. Der Wildtypstamm SC5314, der homozygote Deletionsstamm $\Delta rim101$ und die Überexpressionsmutante *RIM101-1426* wurden 6 h in YPD bei 30°C kultiviert; dunkle Balken: relative Transkription bei pH 7,4; helle Balken: relative Transkription bei pH 4,5.

5.3.1.2 *RIM101*-reprimierte Gene

Insgesamt 22 bekannte und potentielle Zellwandgene konnten mittels der durchgeführten DNA-Mikroarray-Experimente als *RIM101*-reprimiert identifiziert werden. Die in Tabelle 8 aufgeführten Gene waren in drei experimentellen Wiederholungen in der $\Delta rim101$ -Mutante mindestens 2,5-fach dereprimiert. Stark durch Rim101p reprimiert waren wie erwartet die im Sauren exprimierte Glykosidase Phr2p (Muhlschlegel & Fonzi, 1997) und die saure Phosphatase Pho11p (Ramon & Fonzi, 2003). Andere, bereits charakterisierte Gene wie das Integrin-kodierende *INT1* oder die *C. albicans*-Chitinsynthase *CHS1* waren bisher nicht als *RIM101*-Zielgene bekannt und zeigen die vielfältige Wirkung von Rim101p auf die pH-abhängige Zusammensetzung der Zellwand.

Drei der stark durch Rim101p reprimierten und bisher nicht charakterisierten ORFs wurden benannt als *RBR1* (orf6.6744), *RBR2* (orf6.6747) und *RBR3* (orf6.1159), für „repressed by Rim101p“. *RBR1* und *RBR2* kodieren relativ kleine Proteine von 111 bzw. 168 Aminosäuren Länge. Diese sind insgesamt 2323 bp voneinander entfernt in gleicher Orientierung auf dem *C. albicans*-Contig6-2471 (bzw. Contig6-1560) lokalisiert und durch einen ORF unbekannter Funktion getrennt. Verschiedene Datenbanken wurden nach Homologien der Gene *RBR1*, *RBR2* und *RBR3* mit kodierenden Sequenzen von prokaryotischen und eukaryotischen Genomen durchsucht (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi). Diese Suche ergab für *RBR1* und *RBR2* keine sequenzspezifischen Homologien zu Genen anderer pro- oder eukaryotischer Organismen. *RBR3* dagegen kodiert ein Protein von 560 Aminosäuren Länge, das insgesamt 40% Identität zu dem hyphal exprimierten Hyr1p in *C. albicans* aufweist. *HYR1* ist ein nicht-essentielles, mit der morphologischen Transition zu hyphalem Wachstum assoziiertes Gen (Bailey *et al.*, 1996). Das Protein trägt charakteristische Signalsequenzen an C- und N-Terminus, welche die Lokalisation von Hyr1p in der Zellwand von *C. albicans* vorhersagen lassen (Bailey *et al.*, 1996; De Groot *et al.*, 2003). Eine *in silico* Analyse der Rbr-Proteine ergab jeweils eine etwa 20 Aminosäuren lange N-terminale Signalsequenz zur Translokation in das endoplasmatische

Retikulum und eine C-terminale hydrophobe GPI-Domäne zur Verankerung in der Zellmembran (www.cbs.dtu.dk/services/SignalP). Ein weiteres Merkmal für die Lokalisation eines Proteins in der Zellwand ist die *omega-site*, eine kurze Erkennungssequenz oberhalb der C-terminalen hydrophoben Domäne in Verbindung mit einer Schnittstelle für die Ankopplung eines Glykosyl-Phosphatidylinositol-(GPI)-Ankers (Caro *et al.*, 1997; De Groot *et al.*, 2003). Über diesen GPI-Anker erfolgt die Verankerung des Proteins von außen in der Pilzzellmembran. Rbr1p und Rbr2p wiesen eine *omega-site* und eine potentielle Schnittstelle an den Positionen 81 bzw. 143 auf, bei Rbr3p fand sich eine potentielle Schnittstelle an Position 640 des Proteins (http://129.194.185.165/dgpi/DGPI_demo_en.html).

Die Transkription von *RBR1*, *RBR2* und *RBR3* wurde im Northern Blot bestätigt und quantifiziert (Abbildung 8). Im Wildtyp wurden alle drei Gene im Sauren exprimiert, während bei pH 7,4 kein Transkript detektiert werden konnte. In Gegenwart von dominant aktivem Rim101p erfolgte eine starke Repression der *RBR*-Gene bei pH 4,5, in der $\Delta rim101$ -Mutante dagegen wurde eine konstitutive Aktivierung der im WT nur im Sauren exprimierten Gene bei pH 7,4 beobachtet. Diese Derepression ging in YPD bei 30°C 2- bis 3-fach über das Niveau der Transkription im Wildtyp hinaus und wies darauf hin, dass unter den gewählten Kulturbedingungen keines der *RBR*-Gene im Wildtyp maximal exprimiert wurde. Weiterhin ließ die starke Induktion der im Wildtyp nur bei pH 4,5 aktivierten Gene in der $\Delta rim101$ -Mutante bei pH 7,4 darauf schließen, dass ein pH-unabhängiger oder ein ebenfalls *RIM101*-reprimierter Aktivator an der Aktivierung von *RBR1*, *RBR2* und *RBR3* beteiligt ist.

Um optimale Bedingungen für eine starke Induktion der *RIM101*-reprimierten Gene zu finden, wurde die Transkription in verschiedenen Medien (YPD, α -MEM; M-199), pH-Werten und Temperaturen mittels Northern Blot-Analyse untersucht. In allen getesteten Medien nahm die gemessene mRNA-Menge mit zunehmender Temperatur ab. Die stärkste Transkription der *RBR*-Gene wurde in der Deletionsmutante $\Delta rim101$ in α -MEM, einem stark hyphen-induzierenden Medium, bei pH 4,5 und niedrigen Kultivierungstemperaturen von 25°C detektiert (Abschnitt 5.7, Abbildung 13). *RBR1*, *RBR2* und *RBR3* werden also

nicht nur negativ pH-abhängig, sondern auch reziprok zur Kultivierungstemperatur induziert.

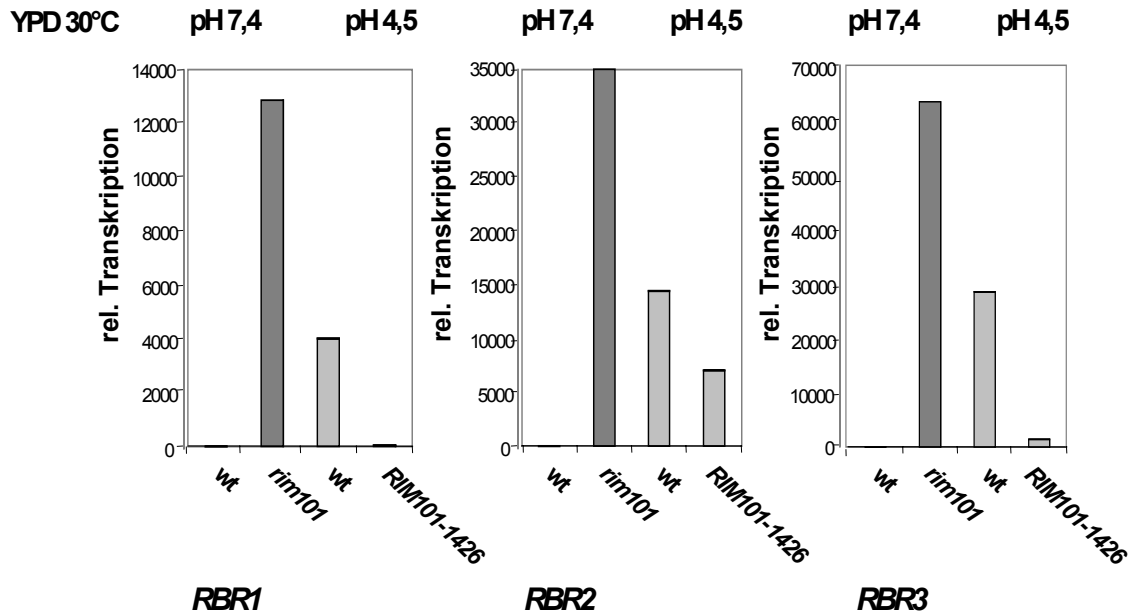


Abbildung 8: Quantifizierung der *RIM101*-abhängigen Repression von Genen. Darstellung der relativen Transkriptmengen der *RIM101*-reprimierten Gene *RBR1*, *RBR2* und *RBR3* unter nicht-induzierenden Bedingungen im Northern Blot. Die Hybridisierung erfolgte mit genspezifischen Sonden und die Quantifizierung der Signale nach Normalisierung gegen das Aktin1-Signal. Der Wildtypstamm SC5314, der homozygote Deletionsstamm $\Delta rim101$ und die Überexpressionsmutante *RIM101-1426* wurden für 6 h bei 30°C in YPD kultiviert; dunkle Balken: relative Transkription bei pH 7,4; helle Balken: relative Transkription bei pH 4,5.

5.4 Phänotypische Charakterisierung von *RBR1*-Deletionsmutanten

RBR1 zeigte im Transkriptionsprofil unter den durch Rim101p reprimierten Genen die stärkste Regulation durch den Transkriptionsfaktor. Aus diesem Grund wurde das Gen sowohl anhand einer phänotypischen Untersuchung von Deletionsmutanten funktionell charakterisiert, als auch auf seine Regulation durch andere Transkriptionsfaktoren hin untersucht (Abschnitt 5.6).

5.4.1 Deletion und Reversion von *RBR1* in *C. albicans*

Zur funktionellen Charakterisierung von *RBR1* wurden die beiden allelischen Genloki (*Assembly 19, Stanford NCBI C. albicans database*) durch sequenzielle homologe Rekombination mit einer *URA3*-FLP-Kassette (Morschhauser *et al.*, 1999) deletiert (Abschnitt 4.2.7). *URA3*-positive Transformanten wurden jeweils auf SC-urj selektiert und subkultiviert. Durch das FLP-vermittelte Ausschneiden der Flipper-Kassette entstanden jeweils wieder *URA3*-defiziente $\Delta rbr1$ -Stämme zur weiteren Transformation. Aus drei unabhängigen Linien resultierten die Stämme $\Delta rbr1-12$, $\Delta rbr1-13$ und $\Delta rbr1-14$ (Tabelle 3), deren homozygote Deletion im *RBR1*-Lokus durch Southern Blot-Hybridisierung nachgewiesen wurde (Abbildung 9 und Abschnitt 4.2.9).

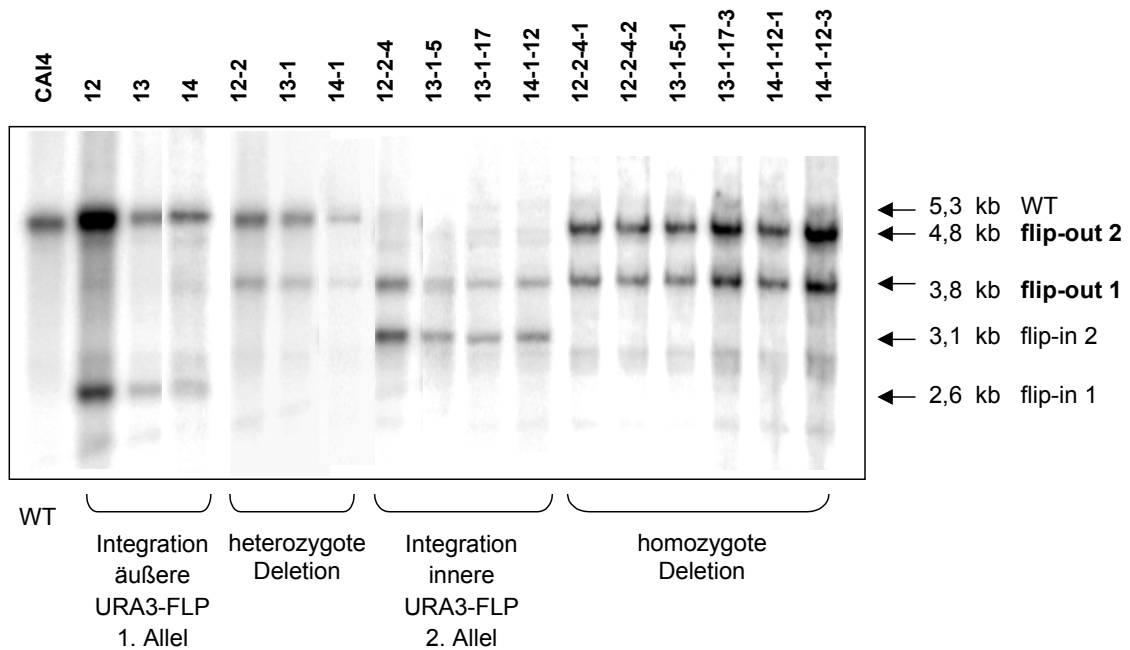


Abbildung 9: Nachweis der sequenziellen *RBR1*-Deletion im Southern Blot. Der *URA3*-defiziente *C. albicans*-Stamm CAI4 wurde mit verschiedenen *URA3*-Flipper-Kassetten (*URA3*-FLP) transformiert, die unterschiedliche flankierende Regionen von *RBR1* trugen. Durch homologe Rekombination zunächst mit einer äußeren und dann mit einer inneren flankierenden Region wurde bei der zweiten Transformation eine Reintegration in den bereits deletierten allelischen Locus verhindert. Das Herausschneiden der Kasette zur Wiederherstellung *URA3*-defizienter Stämme wurde in YNB-Medium induziert. Die genomische DNA aller Transformanten wurde mit *EcoRI* geschnitten und die Restriktionsfragmente durch Southern Blot-Hybridisierung analysiert. Die Wildtypbande des *RBR1*-Lokus bei 5,3 kb verschwindet nach der zweiten Integration von *URA3*-FLP. Da die Kasette eine *EcoRI*-Schnittstelle trägt, entsteht nach Integration in den Originalloкус ein verkürztes Restriktionsfragment.

Die *URA3*-defizienten homozygoten Deletionsmutanten wurden durch ektopische Integration von pCaEXP stabil revertiert (Care *et al.*, 1999). Dies geschah entweder mittels des Vektors pCaEXP mit *URA3* allein (Stamm $\Delta rbr1$), oder durch das Plasmid pCaEXP-*RBR1*, das neben *URA3* auch *RBR1* unter seinem nativen Promotor trägt (Stamm $\Delta rbr1$ -*RBR1*). Für die anschließend durchgeführte phänotypische Charakterisierung wurden nur solche $\Delta rbr1$ -Reversionsstämme ausgewählt, die in α -MEM eine signifikante ektopische Transkription von *RBR1* im Northern Blot zeigten.

5.4.2 *RBR1* wird für die Filamentierung benötigt

Die starke Transkription von *RBR1* bei pH 4,5 und nicht hyphen-induzierenden Temperaturen ließ einen phänotypischen Defekt der $\Delta rbr1$ -Mutanten unter eben diesen Bedingungen erwarten. Da *RBR1* als potentiell glykosyliertes GPI-Protein in der Zellwand oder Zellmembran von *C. albicans* lokalisiert ist (De Groot *et al.*, 2003), wurde die Vitalität der $\Delta rbr1$ -Stämme zunächst unter dem Einfluss von Faktoren getestet, die externen Stress verursachen bzw. die Zellwand als äußere Barriere des Hefepilzes besonders belasten. Diese phänotypischen Untersuchungen wurden auf verschiedenen Festmedien bei pH 4,5 und pH 7,4 durchgeführt. Keine der zugesetzten stressinduzierenden Agenzien ließ jedoch eine Beeinträchtigung des Wachstums der Deletionsmutanten beobachten. Weder osmotischer Stress in Gegenwart von 0,3 M Natriumchlorid, noch oxidativer Stress durch 0,1-5,0 mM Wasserstoffperoxid zeigten signifikante Auswirkungen auf das Wachstum der $\Delta rbr1$ -Stämme. Auch die Zugabe des chitinbindenden und daher die Zellwand destabilisierenden Farbstoffs *Calcofluor White* in einer Konzentration von bis zu 50 µg/ml resultierte nicht in einem deutlich verminderten Koloniewachstum der $\Delta rbr1$ -Mutanten im Vergleich zum Wildtypstamm. Selbst bei einem extrem niedrigen pH-Wert von 2,5 zeigte die $\Delta rbr1$ -Mutante auf allen getesteten Medien ein dem Wildtyp-Stamm vergleichbares Wachstum. Rbr1p wird also unter den getesteten Bedingungen nicht essentiell für das Wachstum und den Zellwandaufbau von *C. albicans* benötigt.

Filamentöses Wachstum von *C. albicans* ist *in vitro* bei 37°C durch den Zusatz von Serum sehr leicht induzierbar. Andererseits werden Hyphen aber auch bei Nährstoffmangel über das Hungersignal cAMP induziert. Ein in Blut und Gewebe herrschender pH-Wert von 7,4 begünstigt ebenfalls die Bildung von Hyphen. *C. albicans* säuert allerdings sowohl in Flüssigkultur als auch auf Festmedien seine Umgebung durch Stoffwechselprodukte stark an (Abschnitt 5.2.1) und kann auch bei niedrigem pH-Wert echte Hyphen ausbilden. Um den Einfluss von *RBR1* auf das hyphale Wachstum von *C. albicans* zu untersuchen, wurde die Morphologie von Wildtypstamm, $\Delta rbr1$ -Mutanten und *RBR1*-

Revertanten in Flüssigkultur und auf verschiedenen Festmedien bei 30°C und 37°C miteinander verglichen. Die eingesetzten Medien waren in der Regel auf pH 4,5 und pH 7,4 gepuffert. Die Deletion von *RBR1* erzeugte einen pH-abhängigen Defekt der Filamentierung auf M-199 Softagar (Abbildung 10). Nach 30-48 h Wachstum bei pH 4,5 auf diesem Medium wiesen die Kolonien von Wildtyp und *RBR1*-Revertante eine deutliche Filamentierung auf, während $\Delta rbr1$ -Sämme nach 48 h noch keine Hyphenbildung beobachten ließen.

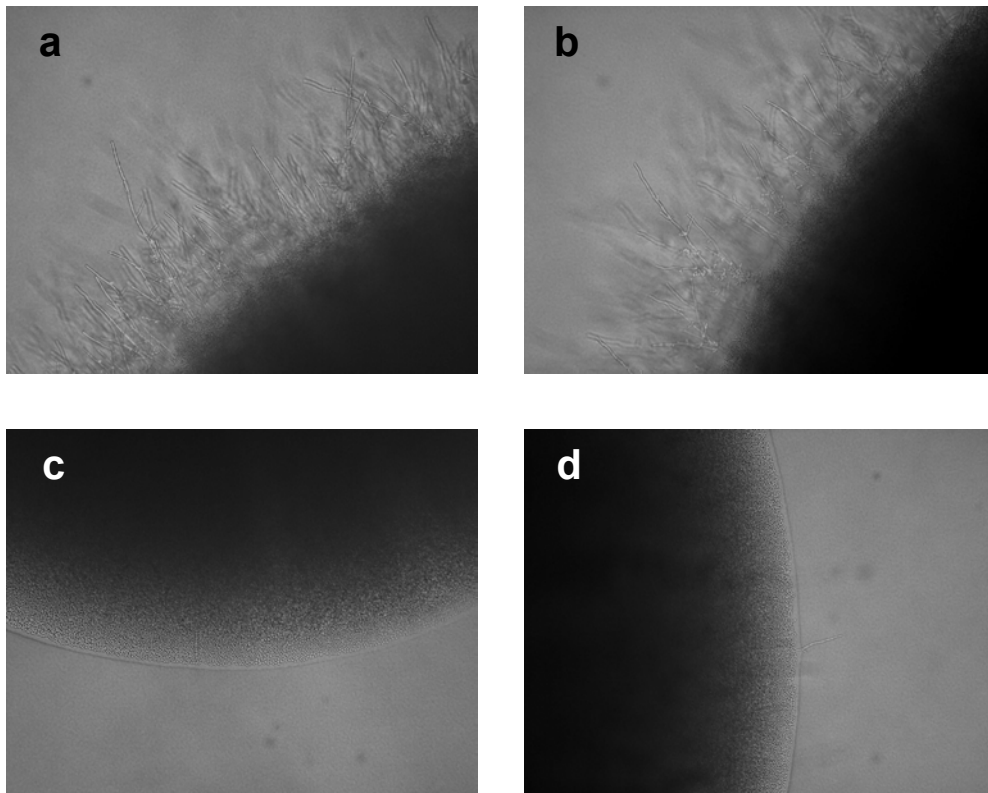


Abbildung 10: Filamentierungsdefekt der $\Delta rbr1$ -Mutanten bei pH 4,5. Kolonien des Wildtypstammes SC5314 (a), der *RBR1*-Revertante HL13-6 (aus Stamm HL12-2) (b) und zweier unabhängiger $\Delta rbr1$ -Mutanten HL12-2 und HL12-3 (c und d) nach 48 h auf M-199 Softagar von pH 4,5. Im Gegensatz zu Wildtyp und *RBR1*-Revertante zeigten $\Delta rbr1$ -Mutanten keine Filamentierung. Alle Stämme wurden bis zur exponentiellen Wachstumsphase in SC-uri vorkultiviert. Je 5 μ l einer dichten Zellsuspension wurden auf den Agar aufgetropft und für 48 h bei 30°C inkubiert.

Dieser Defekt der Filamentierung war in ähnlicher Weise auch auf Softagar mit α -MEM, einem stark hyphen-induzierenden Minimalmedium für die Zellkultur zu beobachten. Im Gegensatz dazu bildeten in beiden Medien bei pH 7,4 alle Stämme bereits nach 24-30 h Hyphen. Fortgesetzte Inkubation über 5 Tage induzierte, möglicherweise aufgrund von Nährstoffmangel, auch bei den $\Delta rbr1$ -Mutanten das Auswachsen von Filamenten, die von der Koloniemitte aus über deren Rand hinaus und nach unten in den Agar hinein wuchsen (Abbildung 11).

Auf 2%igem Agar induzierte unter diesen Bedingungen keiner der getesteten Stämme Hyphen. Es wurden demzufolge keine Unterschiede zwischen Wildtyp und Mutante detektiert. Waren die Stämme auf ungepufferten M-199 Agar mit neutralem pH-Wert ausgestrichen worden, wurde nach 12 h ein Umschlag des pH-Indikators von Rot nach Gelb auf pH 4-5 beobachtet. Während Wildtyp und Revertante auf diesem ungepufferten Agar bereits über Nacht hyphales Wachstum induzierten, bildeten die $\Delta rbr1$ -Mutanten, wie auf M-199 Softagar, auch nach fortgesetzter Kultivierung keine Filamente aus. Der morphogenetische Defekt der Deletionsmutante bei pH 4,5 ließ darauf schließen, dass das Zellwandprotein Rbr1p eine wichtige Funktion bei der Anpassung von *C. albicans* an den externen pH-Wert hat. Rbr1p wird bei einem geringen pH-Wert von 4,5 stark exprimiert und hat eine wichtige Funktion für die Hyphenbildung von *C. albicans* in saurer Umgebung.

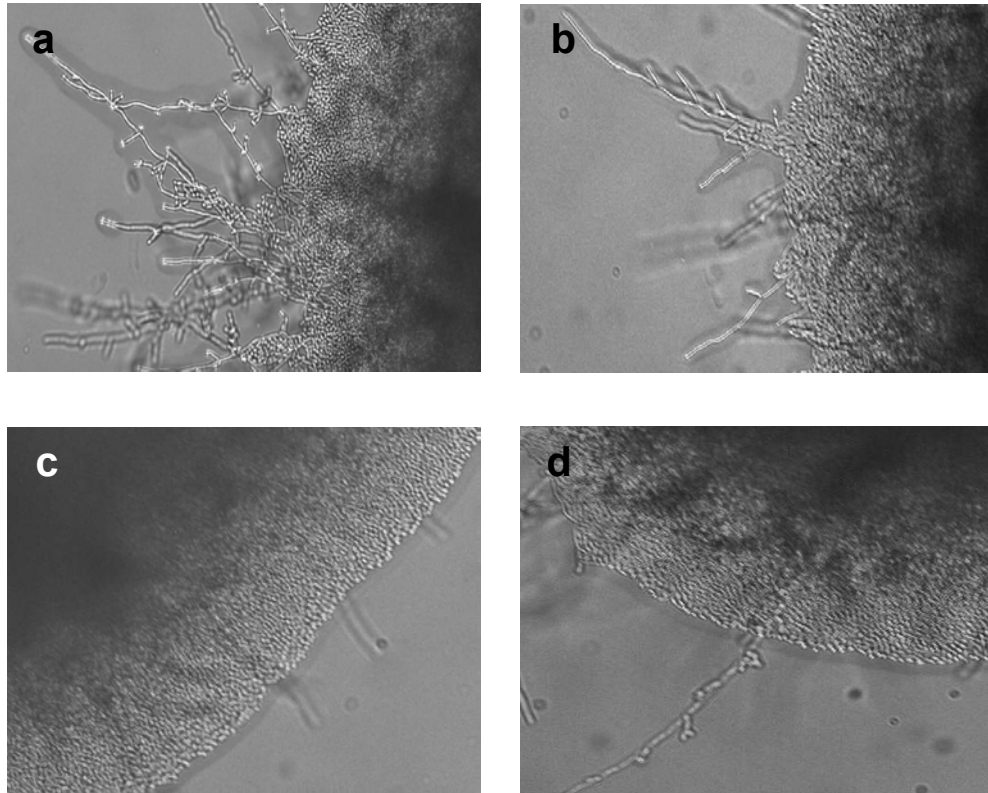


Abbildung 11: Hypheninduktion der $\Delta rbr1$ -Mutanten nach 5 Tagen auf M-199 Softagar. Kolonien **a**: des Wildtypstammes SC5314; **b**: der *RBR1*-Revertante HL13-6 (aus Stamm HL12-2) sowie zweier unabhängiger $\Delta rbr1$ -Mutanten HL12-2 und HL12-3 (**c** und **d**) auf M-199 Softagar von pH 4,5 bei 30°C. Die $\Delta rbr1$ -Mutanten zeigen eine schwächere Filamentierung als Wildtyp und *RBR1*-Revertante.

5.5 Bedeutung von *RBR1* für die Virulenz von *C. albicans*

Die funktionelle *in vitro* Charakterisierung von Rbr1p zeigte eine entscheidende Beteiligung dieses Zellwandproteins an der pH-abhängigen Filamentierung von *C. albicans*. Da der Filamentierungsdefekt der $\Delta rbr1$ -Mutanten bei konstant saurem pH-Wert insbesondere auf Softagar zu beobachten war, wurde ein Zusammenhang der Funktion des GPI-Proteins Rbr1p mit der Adhäsion bzw. Wechselwirkung von *C. albicans* mit der besiedelten Oberfläche vermutet. Die Fähigkeit zur Zell-Zell-Adhäsion an epitheliale Oberflächen und zum Vollzug

eines morphogenetischen Wechsels von der Hefe zur Hyphe ist eng mit der Virulenz von *C. albicans* verknüpft (Abschnitt 3.4). Deletionsstudien verschiedener Gene haben gezeigt, dass Mutanten, welche die Fähigkeit zur Adhäsion oder zur Hyphenbildung verloren haben, im Tiermodell apathogen oder von stark reduzierter Virulenz sind (Lo *et al.*, 1997a; Tsuchimori *et al.*, 2000). Daher erschien es sinnvoll, die Virulenz der $\Delta rbr1$ -Stämme im systemischen Mausmodell zu überprüfen, obwohl der Filamentierungsdefekt der $\Delta rbr1$ -Stämme *in vitro* vorwiegend bei saurem pH-Wert beobachtet wurde.

Mittels *in vivo* Virulenzstudien (Schweizer *et al.*, 2000) wurde überprüft, ob die $\Delta rbr1$ -Mutante (HL12-2) gegenüber der *C. albicans*-Revertante $\Delta rbr1$ -*RBR1* (HL13-6) im Mausmodell eine veränderte Fähigkeit zur Manifestation einer systemischen Kandidose zeigt. Zwei Gruppen von Balb/c-Mäusen wurden dazu jeweils intravenös mit 5×10^5 oder 1×10^6 *C. albicans*-Zellen der entsprechenden Stämme infiziert (Abschnitt 4.2.10). Dieselbe Menge von Zellen des klinischen Isolates SC5314 führt bei den verwendeten Mäusen zu einer systemischen Infektion mit 100% Mortalität nach etwa 10-14 Tagen. Die Überlebensrate der infizierten Tiere innerhalb einer Zeitspanne von 45 bzw. 80 Tagen nach der Infektion zeigt Abbildung 12. Die *RBR1*-Deletionsmutante wies in dem eingesetzten Tiermodell in allen drei Versuchen eine signifikant geringere Virulenz auf als die getestete Revertante der $\Delta rbr1$ -Mutante. Alle Versuchstiere der mit $\Delta rbr1$ infizierten Gruppe überlebten die Applikation von $\Delta rbr1$ mindestens 30 Tage. Nach 6 bis 12 Wochen lag die Überlebensrate der mit 5×10^5 Zellen des $\Delta rbr1$ -Stammes infizierten Tiere zwischen 70% und 100%, eine Infektion mit der doppelten Zellzahl reduzierte die Überlebensrate der Tiere auf 60%. Der mit *RBR1* revertierte Stamm HL13-6 induzierte demgegenüber eine höhere Mortalität, die jedoch in zwei von drei Versuchen deutlich niedriger war als die durch den Wildtypstamm verursachte Sterberate. In zwei von drei Tests überlebten noch etwa 40% der Versuchstiere die Infektion mit dem Reversionsstamm. Da die Zellen des revertierten Stammes nur jeweils eine Kopie des *RBR1*-Gens tragen, lassen die Ergebnisse auf einen *RBR1*-Dosiseffekt schließen. Die Virulenzstudien im Mausmodell bestätigen einen signifikanten Beitrag von Rbr1p zu der Fähigkeit von *C. albicans*, eine

systemischen Kandidose zu verursachen. Obwohl im Northern Blot die Transkription des Zellwandproteins Rbr1p in allen getesteten Medien bei 37°C und neutralem pH-Wert nicht detektiert werden konnte, führte die vollständige Deletion von *RBR1* zu einem starken Verlust der Pathogenität von *C. albicans*. Die Daten der Virulenzstudie lassen darauf schließen, dass Rbr1p auch innerhalb eines nicht konstant sauren Milieus eine wichtige Funktion in der Zellwand ausübt.

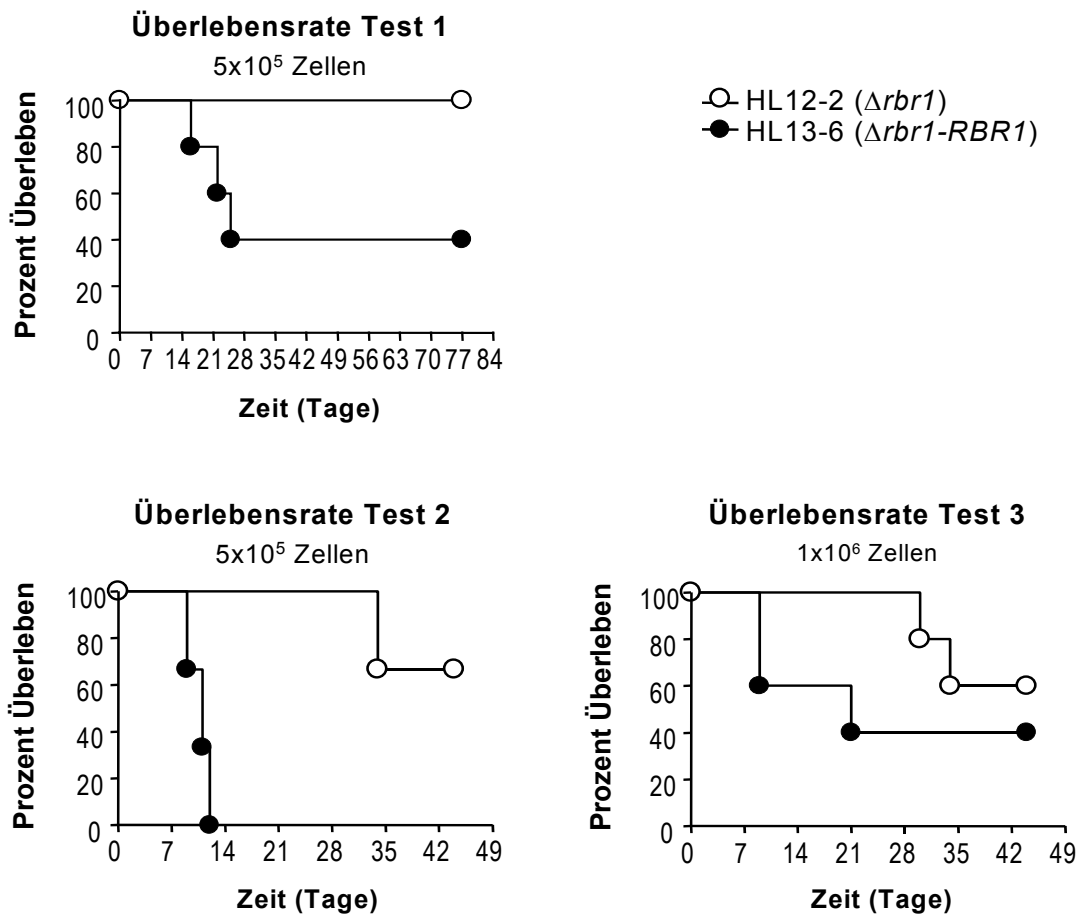


Abbildung 12: $\Delta rbr1$ zeigt eine signifikant reduzierte Virulenz gegenüber der Revertante. Die Virulenztests 1 und 2 wurden mit einer Zellzahl von 5×10^5 Zellen durchgeführt, Test 3 mit der doppelten Zellzahl von 1×10^6 . Die Überlebensdauer der Versuchstiere nach der Infektion wurde über 7 bzw. 12 Wochen beobachtet und die prozentuale Überlebensrate der Tiere gegen die Zeit aufgetragen.

5.6 Aktivierung von *RBR1* durch den Transkriptionsfaktor Nrg1p

Das potentielle Zellwandprotein Rbr1p wurde bei neutralem pH-Wert von Rim101p reprimiert und war insbesondere bei saurem pH-Wert beteiligt an der Bildung von Hyphen (Abbildung 8 und Abbildung 10). In der $\Delta rim101$ -Mutante wurde *RBR1* bei pH 7,4 stark dereprimiert (Abbildung 8). Diese Ergebnisse ließen auf die Beteiligung von pH-unabhängigen oder ebenfalls *RIM101*-regulierten Faktoren an der Aktivierung von *RBR1* schließen.

Um zu überprüfen, ob andere zentrale Transkriptionsfaktoren für die Steuerung morphogenetischer Vorgänge in *C. albicans* an der transkriptionellen Regulation von *RBR1* beteiligt sind, wurden weitere Northern Blot-Analysen durchgeführt. Mittels dieser Experimente wurde die mRNA-Abundanz von *RBR1* in den Deletionsstämmen $\Delta efg1$, $\Delta nrg1$ und $\Delta tup1$ im Vergleich zum Wildtyp unter hyphen-induzierenden (pH 7,4 und 37°C) und nicht-induzierenden Bedingungen (pH 4,5 und 25°C) in α -MEM dargestellt (Abbildung 13). Die Transkription von *RBR1* in der $\Delta nrg1$ -Mutante war im Vergleich zum Wildtyp stark reprimiert. Nur etwa 20% des Wildtyp-Transkriptes konnten unter den gewählten Bedingungen detektiert werden. Damit zeigte sich eine aktivierende Funktion des Transkriptionsfaktors Nrg1p gegenüber *RBR1* bei pH 4,5. Diese aktivierende Wirkung von Nrg1p auf die Transkription von *RBR1* bei pH 4,5 war insofern erstaunlich, als dieser Transkriptionsfaktor bisher ausschließlich als transkriptionaler Repressor beschrieben worden war (Braun *et al.*, 2001; Murad *et al.*, 2001a; Murad *et al.*, 2001b). Nach aktueller Hypothese dieser Autoren bindet Nrg1p an ein NRG-Repressor-Element (NRE) und rekrutiert dabei beispielsweise den Transkriptionsfaktor Tup1p zur Bildung spezifischer Repressorkomplexe an den Promotoren hyphaler Gene (Murad *et al.*, 2001a). An der *NRG1*-abhängigen Aktivierung von *RBR1* war *TUP1* unter den gewählten Bedingungen nicht beteiligt (Abbildung 13). Bei pH 7,4 war kein signifikanter Einfluss der Transkriptionsfaktoren Efg1p, Nrg1p oder Tup1p auf die Regulation von *RBR1* zu beobachten. Übereinstimmend mit den in YPD durchgeführten Versuchen wurde das potentielle Zellwandgen *RBR1* bei

neutralem pH-Wert weder im Wildtyp noch in einem der getesteten Deletionsstämme detektierbar exprimiert. Das durchgeführte Experiment zeigte weiterhin, dass die Expression von *RIM101* selbst sowohl von *NRG1* als auch von *EFG1* und *TUP1* unabhängig war.

Parallel zu *RBR1* wurde im Northern Blot die Transkription des ebenfalls *RIM101*-reprimierten Gens *PHR2* in Abhängigkeit von *EFG1*, *NRG1* und *TUP1* abgefragt. Im Gegensatz zu *RBR1* war die Aktivierung von *PHR2* nicht von *NRG1* abhängig (Abbildung 13). Aus diesem Ergebnis ließen sich unterschiedliche Regulationsmechanismen für diese beiden *RIM101*-reprimierten Gene folgern. Die Darstellung der Regulation des hyphenspezifisch exprimierten Gens *HWP1* diente der experimentellen Kontrolle. Einerseits war die *EFG1*-abhängige Aktivierung von *HWP1* bekannt (Sharkey *et al.*, 1999), andererseits seine Repression durch transkriptionellen Repressor Nrg1p (Braun *et al.*, 2001). Beide Effekte konnten in dem in α -MEM durchgeführten Experiment bestätigt werden.

Zur Erhärtung der durch Northern Blot gewonnenen Ergebnisse über das Zusammenwirken von *RIM101* und *NRG1* bei der Regulation von *RBR1* wurde eine *in silico* Analyse der Promotorregion von *RBR1* durchgeführt. Diese zeigte das Vorkommen der für *C. albicans* spezifischen Konsensussequenz CCAAGAAA (Ramon & Fonzi, 2003) zur Bindung von Rim101p in Position -1403 des Promotors sowie eine mögliche Nrg1p-Bindestelle in Position -1302. Dieses Ergebnis lieferte einen Hinweis darauf, dass möglicherweise sowohl Rim101p als auch Nrg1p direkt an der Regulation von *RBR1* beteiligt sind. Die Promotorregion des direkt von Rim101p regulierten Gens *PHR1* weist, wie auch der Promotor von *PHR2*, jeweils drei mögliche Rim101p-Konsensussequenzen innerhalb der ersten 1000 bp auf (Ramon & Fonzi, 2003). Das Vorliegen nur einer Rim101p-Bindestelle im *RBR1*-Promoter im Gegensatz zur Existenz dreier solcher Sequenzen im *PHR2*-Promotor liefert wie die Northern Blot-Analysen von *RBR1* und *PHR2* (Abbildung 13) einen Hinweis darauf, dass diese beiden *RIM101*-abhängigen Gene nach einem unterschiedlichen Mechanismus reguliert werden. Das Ergebnis deutete ebenfalls auf die

Beteiligung weiterer Transkriptionsfaktoren, wie etwa Nrg1p, an der Regulation von *RBR1* hin.

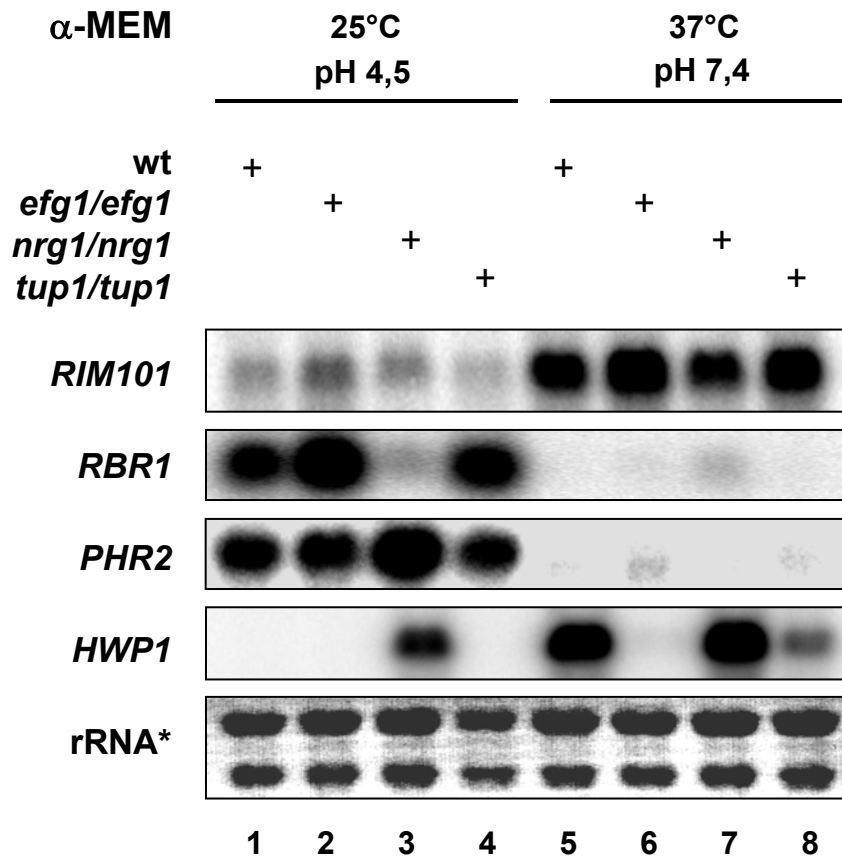


Abbildung 13: *NRG1* aktiviert die Expression von *RBR1*. Northern Blot-Analyse der Transkription von *RIM101*, *RBR1*, *PHR2* und *HWP1* unter nicht-induzierenden (Spuren 1-4) und hyphen-induzierenden Bedingungen (Spuren 5-8). Die *RBR1*-Transkription unter nicht-induzierenden Bedingungen war stark reduziert in der $\Delta nrg1$ Mutante, nicht jedoch die *PHR2*-Transkription. *HWP1*: *NRG1*-reprimiertes Kontrollgen; rRNA*: mit Ethidiumbromid gefärbte 18s- und 28s-rRNA Banden als Ladekontrolle. Die mRNA wurde isoliert aus den Stämmen SC5314, $\Delta efg1$, $\Delta nrg1$ und $\Delta tup1$ nach 4 h Kultivierung in α -MEM, gepuffert auf pH 4,5 bei 25°C (Spuren 1-4) und auf pH 7,4 bei 37°C (Spuren 5-8).

5.7 Repression von *NRG1* durch Rim101p

Die durchgeführten DNA-Mikroarray-Experimente (Tabelle 8) und die Darstellung der *RBR1*-Transkription im Northern Blot zeigten die Beteiligung der Transkriptionsfaktoren Rim101p und Nrg1p an der Regulation von *RBR1*. Bei neutralem pH wurde *RBR1* in Abhängigkeit von Rim101p reprimiert, während für seine pH-abhängige Aktivierung im Sauren *NRG1* benötigt wurde (Abbildung 8 und Abbildung 13). Die genannten Versuche führten außerdem zu dem Ergebnis, dass die Transkription von *RIM101* unter den untersuchten Bedingungen nicht *NRG1*-abhängig ist (Abbildung 13). Um das Zusammenwirken der Transkriptionsfaktoren Rim101p und Nrg1p an der Regulation von *RBR1* weiter aufzuklären, wurde die Transkription von *NRG1* in Abhängigkeit von *RIM101* bei verschiedenen pH-Werten und Kultivierungstemperaturen untersucht. Abbildung 14 zeigt die quantifizierte Darstellung der *RIM101*-abhängigen Transkription von *NRG1* und *RBR1* im Northern Blot. Dieses Experiment resultierte in einer signifikanten *NRG1*-Repression in Anwesenheit des aktiven Rim101p unter allen getesteten Bedingungen (Abbildung 14a). Im Wildtypstamm wurde die stärkste *NRG1*-Transkription in saurem Medium bei 25°C beobachtet. Nur 10% dieser *NRG1*-Transkriptmenge wurde bei gleicher Temperatur und neutralem pH-Wert detektiert. Ebenso korrelierte die Überexpression des aktiven Rim101p im Sauren mit einer starken Repression von *NRG1* (Repression auf 13% des korrespondierenden Wildtyp-Levels). Demgegenüber wurde die Rim101p-vermittelte Repression von *NRG1* in der $\Delta rim101$ -Mutante bei pH 7,4 aufgehoben. Verglichen mit dem Wildtyp induzierte die Deletion von *RIM101* im Neutralen sowohl bei 25°C als auch bei 37°C jeweils eine 4- 5-fach erhöhte Transkription von *NRG1*. Analog zu dieser in *C. albicans* gefundenen Korrelation von Rim101p-Expression und *NRG1*-Repression ist eine reprimierende Funktion von Rim101p auf *NRG1* in *S. cerevisiae* bekannt (Lamb & Mitchell, 2003). In diesem Organismus wird die physiologisch aktivierende Funktion von Rim101p durch eine direkte Repression der regulatorischen Gene *NRG1* and *SMP1* vermittelt (Lamb & Mitchell, 2003; Lamb et al., 2001).

Neben der durch *RIM101* vermittelten, pH-abhängigen Regulation von *NRG1* war eine negative Abhängigkeit der *NRG1*-Transkriptmenge von der Temperatur zu beobachten (Abbildung 14a). Durch Quantifizierung der *NRG1*-Transkription anhand der entsprechenden Aktin-Signale wurden unter hyphen-induzierenden 37°C nur 23% der im Wildtyp bei pH 4,5 gemessenen Transkription ermittelt. Da *RIM101* selbst nicht temperaturabhängig exprimiert wurde (Abbildung 13), sind zusätzliche Faktoren für die temperaturabhängige Regulation von *NRG1* anzunehmen.

Die *NRG1*-Transkription korrelierte stark mit der Transkription des *RIM101*-abhängig reprimierten Gens *RBR1* (Abbildung 14). Eine stark verminderte Transkription von *RBR1* trat also nicht nur in der $\Delta nrg1$ -Mutante bei 25°C und pH 4,5 auf (Abbildung 13), sondern die Transkription von *RBR1* verhielt sich unter allen getesteten Bedingungen proportional zur Menge des *NRG1*-Transkriptes. *RBR1* kann daher - ebenso wie *NRG1* - als pH- und temperaturabhängig exprimiertes Gen bezeichnet werden. Abbildung 14b verdeutlicht zudem die *RIM101*-abhängige und negativ *NRG1*-korrelierte Transkription des hyphenspezifischen Gens *HWP1* in α -MEM. Auch die Transkription von *HWP1* ist folglich als temperatur- und pH-abhängig anzusehen.

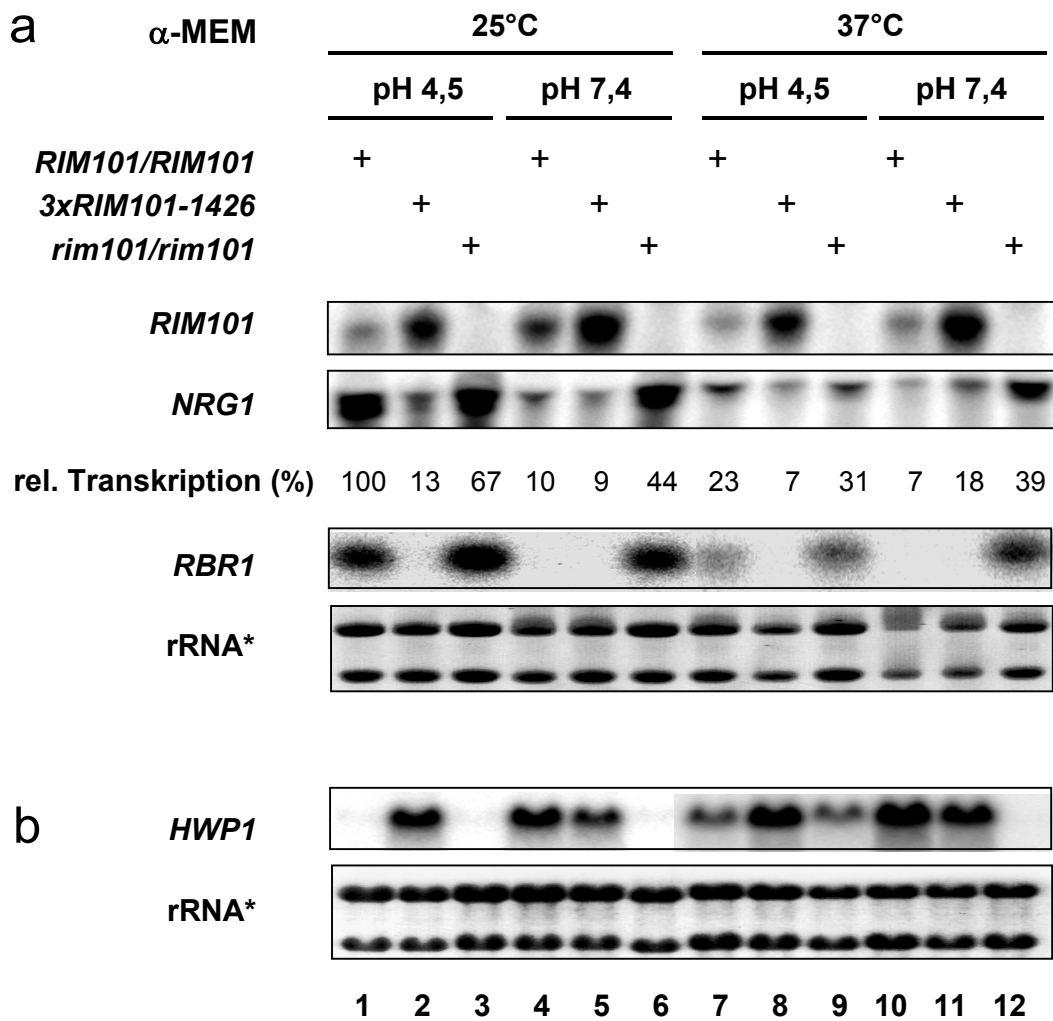


Abbildung 14: *RIM101* reprimiert die Transkription von *NRG1*. Northern Blot-Analyse der *RIM101*-abhängigen Transkription von *NRG1*, *RBR1* (**a**) und *HWP1* (**b**) unter nicht-induzierenden Temperaturen nach 4 h in α -MEM von pH 4,5 (Spuren 1-3) und pH 7,4 (Spuren 4-6), sowie unter hyphen-induzierenden Temperaturen bei pH 4,5 (Spuren 6-9) und pH 7,4 (Spuren 10-12). Die stärkste Transkription von *NRG1* erfolgte bei 25°C im Sauren, Repression in Abhängigkeit von aktivem Rim101p und temperatur-abhängige Repression bei 37°C. *HWP1*: *NRG1*-reprimiertes Kontrollgen; rRNA*: mit Ethidiumbromid gefärbte 18s- und 28s-rRNA Banden als Ladekontrolle.

5.7.1 Hyphenspezifisches *HWP1* wird *RIM101*-abhängig exprimiert

HWP1 ist spezifisch für *C. albicans* und wurde beschrieben als ein temperaturinduziertes Gen, das parallel zur Induktion filamentösen Wachstums exprimiert wird (Sharkey *et al.*, 1999). Die homozygote $\Delta hwp1$ -Mutante entwickelt einen medienspezifischen Filamentierungsdefekt und wird für die Virulenz von *C. albicans* benötigt. Essentiell für die Induktion von *HWP1* und für die Hyphenbildung ist der cAMP-aktivierte Transkriptionsfaktor Efg1p (Lane *et al.*, 2001; Sharkey *et al.*, 1999), während die Transkriptionsfaktoren Nrg1p und Tup1p *HWP1* unter nicht-induzierenden Bedingungen reprimieren (Braun *et al.*, 2001; Murad *et al.*, 2001a; Murad *et al.*, 2001b).

Die DNA-Mikroarray-Experimente zeigten einen aktivierenden Einfluss von Rim101p auf das hyphenspezifische Gen *HWP1*. Transkriptionsanalysen mittels Northern Blot konnten die *RIM101*-abhängige Aktivierung von *HWP1* unter hyphen-induzierenden Bedingungen bestätigen. Diese Aktivierung war temperatur- und pH-abhängig. Bei pH 4,5 erwies sich die Transkription eines *HWP1*-Basislevels jedoch als *RIM101*-unabhängig (Abbildung 14b). Unter diesen, Rim101p nicht aktivierenden Bedingungen wurde *HWP1*-Transkript in gleicher Menge sowohl im Wildtyp, als auch in der $\Delta rim101$ -Mutante detektiert. Diese Ergebnisse ließen auf eine indirekte Regulation von *HWP1* und die Beteiligung anderer Faktoren an diesem Prozess schließen. Gleichzeitig zeigte die Transkriptionsanalyse unter identischen Bedingungen eine stark negative Korrelation von *NRG1* und *HWP1* (Abbildung 14), die bereits von anderen Autoren beschrieben wurde (Murad *et al.*, 2001a). Wird in der $\Delta rim101$ -Mutante bei pH 4,5 die *RIM101*-abhängige Repression von *NRG1* aufgehoben, ist parallel eine starke Repression von *HWP1* zu beobachten. Wird dagegen bei saurem pH aktives Rim101-1426p überexprimiert, verringert sich die *NRG1*-Transkription und *HWP1* wird stärker exprimiert.

5.7.2 Die *RIM101*-abhängige Repression von *NRG1* korreliert mit dem $\Delta rim101$ -Filamentierungsdefekt

Die durchgeführten Untersuchungen haben ergeben, dass die *RIM101*-Expression in *C. albicans* mit der Repression von *NRG1* korreliert und Rim101p dadurch vermutlich indirekt einen aktivierenden Effekt auf *HWP1* ausübt. In *C. albicans* besitzt Nrg1p die Funktion eines starken Repressors des hyphalen Wachstums. Die $\Delta nrg1$ -Mutante wächst in den meisten Medien konstitutiv hyphal (Murad *et al.*, 2001b). Die Deletion von *RIM101* dagegen führt zu einem medienspezifischen Filamentierungsdefekt in M-199 bei pH 7,4 (Davis *et al.*, 2000b). Durch die Überexpression von dominant aktivem Rim101-1426p dagegen wird die temperaturabhängige Beschränkung der Filamentierung zum Teil außer Kraft gesetzt, die Zellen zeigen eine Filamentierung bereits bei 29°C (El Barkani *et al.*, 2000).

Zur molekularbiologischen Untersuchung des *RIM101*-abhängigen Einflusses auf die Filamentierung von *C. albicans* in M-199 wurden weitere Transkriptionsanalysen der hyphenspezifischen Gene *HWP1* und *RBT1* durchgeführt. *HWP1* ist entscheidend für die Hyphenbildung und die Virulenz von *C. albicans* verantwortlich (Sharkey *et al.*, 1999; Tsuchimori *et al.*, 2000). *RBT1* wird in Abhängigkeit des Transkriptionsfaktors Tup1p reprimiert und besitzt ebenfalls Eigenschaften als Virulenzfaktor (Braun *et al.*, 2000). Beide Gene wurden im DNA-Mikroarray-Experiment als *RIM101*-abhängig aktiviert gefunden. In M-199 konnte durch die Überexpression von Rim101-1426p eine starke Aktivierung von *HWP1* und *RBT1* im Vergleich zum Wildtyp detektiert werden (Abbildung 15a). Während der Wildtyp im Säuern bei 37°C keine Hyphen ausbildete, zeigten Zellen des *RIM101-1426*-Stammes unter identischen Bedingungen eine mit dem Wachstum des Wildtyps bei neutralem pH-Wert vergleichbare Filamentierung (Abbildung 15b). Im Vergleich zur Aktivierung von *HWP1* in α -MEM (Abbildung 14) gingen in M-199 bei neutralem pH-Wert sowohl die *HWP1*- als auch die *RBT1*-Expression über das entsprechende Wildtyp-Niveau hinaus (Abbildung 15b). Parallel dazu wurde bei

RIM101-1426 eine verstärkte Adhäsion der Zellen beobachtet, die sich durch eine feine Flokkulation im Flüssigmedium zeigte.

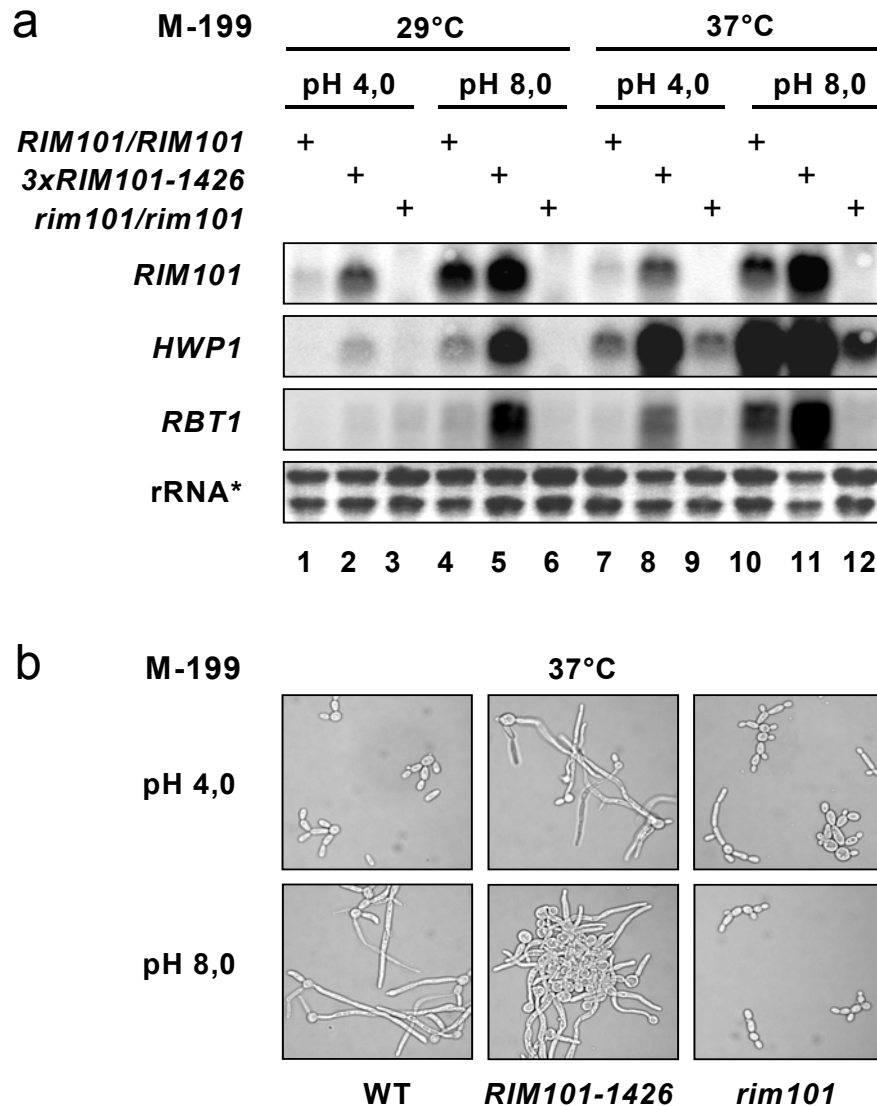


Abbildung 15: Die *RIM101*-abhängige Filamentierung korreliert mit der Expression von *HWP1* und *RBT1*. **a:** Northern Blot-Analyse der *RIM101*-abhängigen Transkription von *HWP1* und *RBT1* unter nicht-induzierenden Bedingungen bei pH 4,0 (Spuren 1-3) und pH 8,0 (Spuren 4-6), sowie unter hyphen-induzierenden Bedingungen bei pH 4, (Spuren 6-9) und pH 8,0 (Spuren 10-12). rRNA*: mit Ethidiumbromid gefärbte 18s- und 28s-rRNA Banden als Ladekontrolle. Die mRNA der Stämme SC5314 (WT), *RIM101-1426* und $\Delta rim101$ wurde isoliert nach 4 h Kultivierung in M-199; **b:** Filamentierungsphänotyp von WT, *RIM101-1426* und $\Delta rim101$ nach 4 h in M-199 bei 37°C.

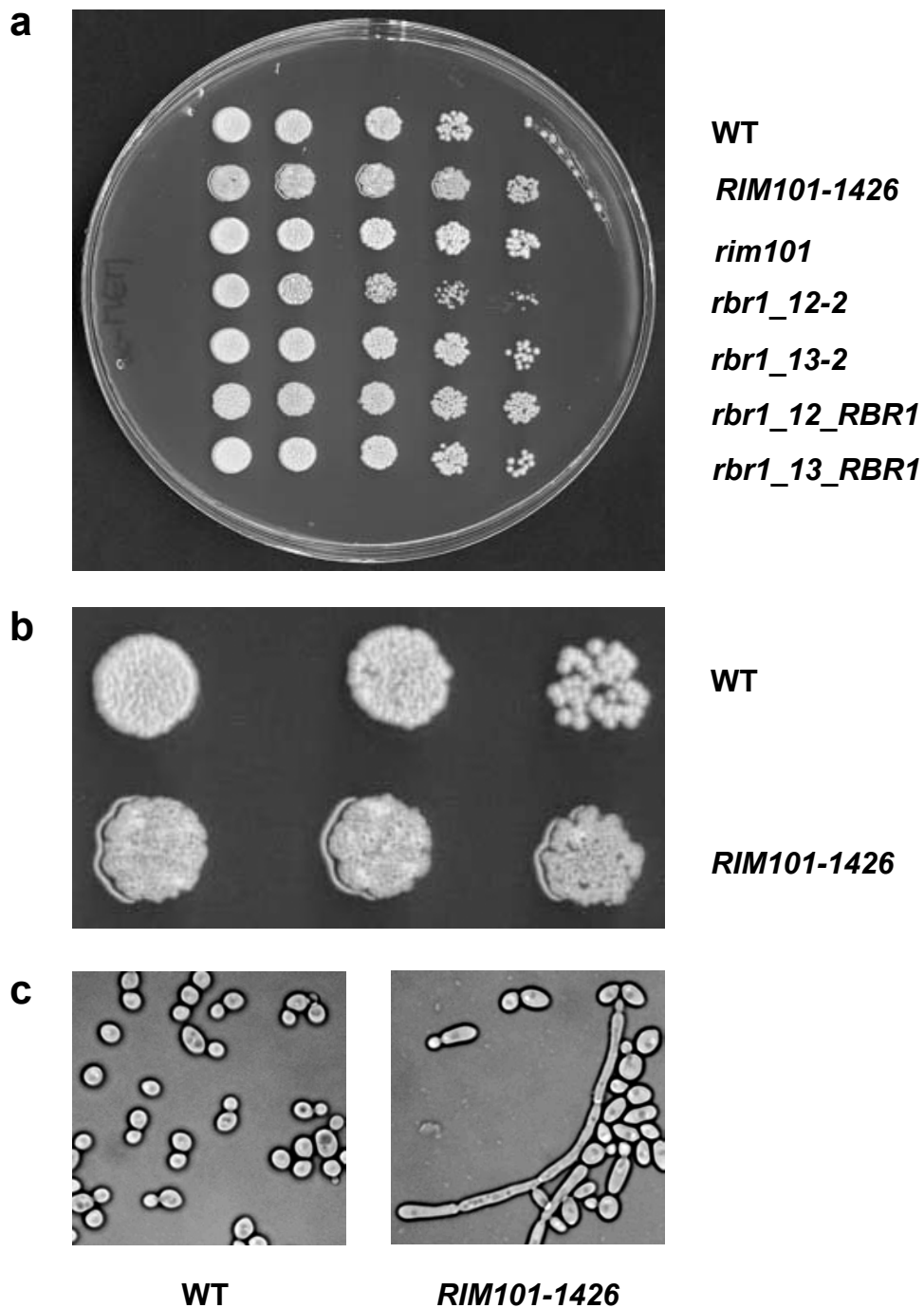


Abbildung 16: Überexpression von aktivem Rim101p verstärkt die Zelladhäsion.

a: Definierte Verdünnungsreihen verschiedener *C. albicans*-Mutanten wurden auf α -MEM pH 7,4 Agarplatten aufgebracht. Nach 12 h Inkubation bei 30°C wurde das Koloniewachstum der Stämme dokumentiert. **b:** Die vergrößerte Darstellung von WT und *RIM101-1426*-Kolonien im Vergleich verdeutlicht die miteinander verbundenen Einzelkolonien innerhalb der Spots, die unregelmäßigen Kolonieränder und ihre raue Oberfläche infolge der Überexpression von Rim101-1426p. **c:** Mikroskopische Aufnahme von Zellen aus *RIM101-1426*-Kolonien zeigen gegenüber dem WT eine verstärkte Zelladhäsion und vereinzelte Hyphenbildung.

Dieser Filamentierungsphänotyp wurde auch auf α -MEM Agarplatten beobachtet (Abbildung 16). Nach 12 h Wachstum auf α -MEM bei 30°C waren die Kolonien der Überexpressionsmutante *RIM101-1426* deutlich unregelmäßig gerandet und bildeten eine raue Kolonieoberfläche aus. Dieser Hinweis auf verstärkte Hyphenbildung und Zell-Zell-Adhäsion konnte durch mikroskopische Beobachtung bestätigt werden (Abbildung 16c). Zudem korrelierte die in $\Delta rim101$ reprimierte *HWP1*-Aktivität mit dem beschriebenen Filamentierungsdefekt unter neutralen Bedingungen und der verminderten Virulenz dieses *C. albicans*-Stammes (Davis *et al.*, 2000a; Davis *et al.*, 2000b).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Aktivierung von *HWP1* und *RBT1* in Abhängigkeit von aktivem Rim101p signifikant mit dem Einfluss von *RIM101* auf die Filamentierung von *C. albicans* korreliert (Abbildung 15, Abbildung 16, (Davis *et al.*, 2000a; El Barkani *et al.*, 2000). Die beiden Proteine Hwp1p und Rbt1p sind im Wildtyp - wie Rim101p selbst - am stärksten in neutraler Umgebung exprimiert. Rbr1p dagegen wird unter diesen Bedingungen durch Rim101p reprimiert (Abbildung 8), ebenso zeigte sich ein reprimierender Effekt von Rim101p auf den Repressor hyphalen Wachstums, Nrg1p (Abbildung 14). Im sauren Milieu werden sowohl Rbr1p, Rbr2p und Rbr3p als auch Nrg1p signifikant stärker exprimiert als im Neutralen. Es konnte zudem gezeigt werden, dass die Expression von Rbr1p in Abhängigkeit von *NRG1* erfolgt (Abbildung 13). Rbr1p spielt - ähnlich wie Hwp1p im Neutralen - eine wichtige Rolle bei der Induktion der Filamentierung im Sauren (Abbildung 10). Das Zellwandprotein ist darüber hinaus essentiell für die Pathogenität von *C. albicans* im systemischen Mausmodell (Abbildung 12). Der direkt oder indirekt reprimierende Einfluss des Transkriptionsfaktors Rim101p auf den hyphalen Repressor Nrg1p moduliert also die pH-spezifische Regulation einer Reihe von Zellwandproteinen, die entweder in saurer oder in neutraler bis alkalischer Umgebung exprimiert werden. Einige dieser Proteine sind sowohl mit der Filamentierung von *C. albicans* als auch mit der Pathogenität des Pilzes assoziiert.

6 Diskussion

6.1 Rim101p als transkriptioneller Aktivator und Repressor in *C. albicans*

Die Anpassung an veränderliche Umweltbedingungen ist essentiell für das Überleben vieler Mikroorganismen. Der humanpathogene Hefepilz *C. albicans* ist als häufiger Kommensale insbesondere des Gastro-Intestinaltraktes und der Vaginalschleimhaut extremen pH-Werten ausgesetzt. Er verfügt über sehr effiziente Adaptionenmechanismen, die sein Wachstum unter variablen Bedingungen ermöglichen und seine morphologische Differenzierung steuern. Dazu gehören Umstrukturierungen der Zellwand ebenso wie die Regulation der Filamentierung des Pilzes. In *C. albicans* ist der Transkriptionsfaktor Rim101p für die pH-Adaption von zentraler Bedeutung.

In der vorliegenden Studie wurden Transkriptionsprofile von *C. albicans* erstellt, um bisher unbekannte Zielgene des pH-abhängigen Transkriptionsfaktors Rim101p zu detektieren. Zur Durchführung der Experimente wurde ein DNA-Mikroarray mit Sonden für solche Gene eingesetzt, die für bekannte und potentielle Zellwandproteine des Pilzes kodieren. Die Auswahl dieser Gene basierte zu einem großen Teil auf der Homologie zu Zellwandproteinen von *S. cerevisiae*, da viele molekulare Regulationsmechanismen dieser beiden Hefepilze gemeinsamen Ursprungs und zum Teil konserviert sind. Dies gilt zum Beispiel für die Regulation des pseudohyphalen Wachstums von *S. cerevisiae* und das filamentöse Wachstum von *C. albicans*. An dieser Regulation sind in beiden Organismen ein cAMP-Signalweg und eine MAPK-Kaskade beteiligt, innerhalb derer viele funktionell homologe Proteine charakterisiert werden konnten.

Die Transkriptionsstudien zu *C. albicans* *RIM101* fokussierten auf die pH-abhängige Transkription von Zellwandkomponenten, da bereits bekannt war,

dass die Gene *PHR1* und *PHR2*, welche Zellwandproteine kodieren, durch Rim101p reguliert werden (Ramon *et al.*, 1999). Rim101p übt dabei sowohl eine Funktion als transkriptioneller Repressor, als auch eine aktivierende Wirkung auf die Transkription aus. Exemplarisch hierfür steht die reziproke Regulation der Zellwandglykosidasen Phr1p und Phr2p. Beide Proteine sind essentiell für das Wachstum und die Virulenz jeweils im Sauren (*PHR2*) oder in neutralem Milieu (*PHR1*) (De Bernardis *et al.*, 1998; Ghannoum *et al.*, 1995; Muhlschlegel & Fonzi, 1997; Saporito-Irwin *et al.*, 1995). Auch in der Anpassung an den externen pH-Wert finden sich Parallelen zwischen verschiedenen einzelligen Pilzen. In *C. glabrata*, *C. dublinensis* und *C. maltosa*, aber auch in *S. cerevisiae* oder *Pneumocystis carinii* wurden bereits Homologe zu den pH-abhängig exprimierten Genen *PHR1* und *PHR2* gefunden (Kottom *et al.*, 2001; Kurzai *et al.*, 1999; Nakazawa *et al.*, 2000; Vai *et al.*, 1996; Weig *et al.*, 2001), die auf verwandte Mechanismen der pH-Adaption in diesen Pilzen schließen lassen.

Verwandtschaft zu anderen Eukaryoten besitzt auch der Regulator dieser Gene, Rim101p. Er weist Homologien zu ScRim101p auf (Li & Mitchell, 1997; Su & Mitchell, 1993), insbesondere jedoch zu PacC des ebenfalls humanpathogenen Pilzes *Aspergillus nidulans*, dessen Bedeutung als Regulator der pH-abhängigen Genexpression schon früh beschrieben wurde (Caddick *et al.*, 1986; Orejas *et al.*, 1995; Tilburn *et al.*, 1995). In darauf folgenden Studien wurden Transkriptionsfaktoren mit vergleichbarer Wirkungsweise auch in *Yarrowia lipolytica* (Lambert *et al.*, 1997), *Sclerotinia sclerotiorum* (Rollins, 2003) und ebenfalls in pflanzenpathogenen Pilzen (Caracuel *et al.*, 2003) identifiziert. Darüber hinaus wurden Parallelen von Rim101p zu Transkriptionsfaktoren höherer Eukaryoten gezogen (Arst & Penalva, 2003). Die weit reichende Konservierung der pH-Adaption eukaryotischer Zellen verdeutlicht die existentielle Bedeutung dieses Mechanismus für das Überleben und gegebenenfalls auch für die Virulenzeigenschaften von Organismen.

Die Ergebnisse der in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Transkriptionsstudien zeigen sowohl die aktivierende, als auch die reprimierende Funktion von Rim101p in *C. albicans*. Es konnten eine Reihe von Genen detektiert

werden, die in Abhängigkeit des externen pH-Wertes durch Rim101p aktiviert bzw. reprimiert wurden (Abbildung 7 und Tabelle 8). Auf die Funktion und die Bedeutung dieser Gene für die pH-Adaption von *C. albicans* soll im Folgenden eingegangen werden.

6.1.1 Aktivierende Funktion von Rim101p

Der experimentelle Ansatz der vorliegenden Studie war ausgerichtet auf die pH-abhängige Regulation von Genen durch Rim101p, die für Zellwandproteine von *C. albicans* kodieren. Die bei weitem stärkste transkriptionsaktivierende Wirkung übte Rim101p im Rahmen dieser Experimente auf *PHR1* aus (Tabelle 7). Dieses Ergebnis bestätigte die zellwandassoziierte Glykosidase (Fonzi, 1999) als bereits bekanntes Zielgen von Rim101p. *PHR1* diene damit als zusätzliches, positives Kontrollgen für die DNA-Mikroarray-Experimente. In jüngsten Studien konnte die Bindung von Rim101p an drei mögliche Konsensus-Sequenzen des *PHR1*-Promotors gezeigt werden, also die direkte Regulation des Gens durch den Transkriptionsfaktor in Abhängigkeit des pH-Wertes (Ramon & Fonzi, 2003).

In Übereinstimmung mit den in dieser Arbeit dargestellten Ergebnissen identifizierten Ramon *et al.* (2003) auch *SKN1* als Rim101p-aktiviert (Tabelle 7). Wie *PHR1* besitzt *SKN1* einen Promotor mit drei potentiellen Rim101p-Bindestellen und könnte daher zu den durch Rim101p direkt aktivierten Zielgenen gehören. *SKN1* und *KRE6* kodieren, ähnlich wie *PHR1* und *PHR2*, ein Paar funktionshomologer Proteine, deren Rolle als Transglutaminasen, Glykosylhydrolasen oder Transglykosylasen der Zellwand kontrovers diskutiert wird (Montijn *et al.*, 1999; Roemer *et al.*, 1993). Beide Proteine besitzen Homologe in *S. cerevisiae* (Roemer *et al.*, 1994). Ihre Deletion in *C. albicans* führt zu einer starken Reduktion von β -1-6-Glukan in der Zellwand und infolgedessen zu deren Destabilisierung (Mio *et al.*, 1997). Die Tatsache, dass *KRE6* als durch Rim101p reprimiert gefunden wurde (Tabelle 8), weist auf eine möglicherweise mit *PHR1* und *PHR2* vergleichbare Bedeutung bei der pH-

Adaption von *C. albicans* hin. Weitere Untersuchungen zur Funktion von *SKN1* und *KRE6* sind jedoch notwendig, um diese Hypothese zu erhärten.

Zur Erstellung pH- und *RIM101*-abhängiger Transkriptionsprofile wurden Versuchsbedingungen gewählt, die eine Aktivierung hyphenspezifisch exprimierter Gene vermeiden sollten. Alle untersuchten Stämme wurden unter Bedingungen kultiviert, die das genetische Programm zur Induktion filamentösen Wachstums nicht aktivieren, sondern die Bildung von Blastokonidien begünstigen (Abschnitt 4.2.5). Erstaunlicherweise zeigten die DNA-Mikroarray-Daten dennoch eine signifikante Aktivierung mehrerer hyphenspezifischer Gene durch aktives Rim101p in der Überexpressionsmutante *RIM101-1426*. Von den bekannten Zellwandgenen wies *HWP1* die stärkste Aktivierung auf, aber auch *RBT1* und die Adhäsine *ALS1* und *ALS5* wurden durch Rim101p in pH-abhängiger Weise aktiviert (Tabelle 7 und Abbildung 7).

HWP1 wurde beschrieben als ein spezifisch in *C. albicans* vorkommendes Gen, welches keine signifikante Homologie zu Proteinen in *S. cerevisiae* zeigt. Das Gen wird während der Hyphenbildung exprimiert (Sharkey *et al.*, 1999) und besitzt ebenfalls eine große Bedeutung für die Virulenz von *C. albicans*. Homozygote $\Delta hwp1$ -Mutanten wachsen im Schleimhautmodell deutlich weniger invasiv und sind im Tiermodell nicht zur Manifestation einer systemischen Kandidose fähig (Tsuchimori *et al.*, 2000). Es konnte gezeigt werden, dass *C. albicans* mittels Hwp1p und einer wirtseigenen sekretierten Transglutaminase eine kovalente Bindung zum Wirtsepithel herstellt (Staab *et al.*, 1999). Diese Bindung steht möglicherweise in Zusammenhang mit der essentiellen Funktion von Hwp1p für die Virulenz von *C. albicans*.

Rbt1p gehört zu einer Gruppe von sechs hyphalen *C. albicans*-Proteinen, die als Tup1p-reprimiert (*repressed by* Tup1p) charakterisiert wurden (Braun *et al.*, 2000). *RBT1* kodiert wie *HWP1* ein GPI-Protein. Diese Proteine tragen eine konservierte N-terminale Domäne, den Glykosyl-Phosphatidylinositol-Anker, der ihre Lokalisation in der Zellwand vorhersagen lässt (De Groot *et al.*, 2003). Rbt1p ist wie viele andere GPI-Proteine mit der Virulenz von *C. albicans*

assoziiert, *in vitro* konnte jedoch bisher für keine der Δrbt -Deletionsmutanten ein Phänotyp charakterisiert werden.

ALS1 und *ALS5* (*agglutinin-like sequence*), zwei weitere, von Rim101p aktivierte Gene, gehören zu einer Familie von Adhäsinen, die homolog zu dem Agglutinin $\alpha 1$ von *S. cerevisiae* sind. Homologe dieses Glykoproteins, welches die Adhäsion und die Paarung haploider Hefezellen vermittelt, kommen erstaunlicherweise auch in *C. albicans* vor, obwohl in diesem Pilz keine Sporulation bekannt ist (Hoyer & Hecht, 2001; Hoyer *et al.*, 1995). *ALS1* wird in *C. albicans* durch den Transkriptionsfaktor Efg1p reguliert und ist wie auch *HWP1* wesentlich beteiligt an der Hyphenbildung und Virulenz dieses Pathogens (Fu *et al.*, 2002).

Die positive Assoziation des Transkriptionsfaktors Rim101p mit der Filamentierung wurde auf phänotypischer Ebene bereits beschrieben (El Barkani *et al.*, 2000). Auf molekularer Ebene deutete eine verringerte *HWP1*-Transkription in der $\Delta rim101$ -Mutante auf diesen Zusammenhang hin (Davis *et al.*, 2002). Die Transkriptionsprofile von $\Delta rim101$ und *RIM101-1426* zeigten die Abhängigkeit weiterer hyphenspezifischer Gene von *RIM101*. Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit dem Phänotyp des Überexpressionsstammes *RIM101-1426*, der im Gegensatz zum Wildtyp medienabhängig bei saurem pH-Wert filamentiert und eine verstärkte Adhäsion bei neutralem pH-Wert und 37°C zeigt (Abbildung 15). Wurden Verdünnungsreihen von *RIM101-1426* auf α -MEM-Agarplatten gespottet, entwickelten sie Kolonien mit rauer Oberfläche und stark gelappten Rändern (Abbildung 16). Die mikroskopische Untersuchung dieser Zellen ließ lange Filamente erkennen und bestätigte die von El Barkani *et al.* (2000) beschriebene, verstärkte Filamentierung der Überexpressionsmutante *RIM101-1426* auch bei relativ niedrigen Temperaturen von 30°C.

Bei saurem pH-Wert war die Aktivierung sowohl von *RBT1*, als auch von *HWP1* durch *RIM101-1426* signifikant, jedoch nicht so stark wie im Neutralen (Abbildung 7 und Abbildung 16). Die Transkriptionsstudien zeigten zudem, dass die *RIM101*-vermittelte Aktivierung der Gene temperaturabhängig war. Eine höhere Kultivierungstemperatur hatte eine stärkere Aktivierung von *HWP1* und

RBT1 zur Folge. Da *RIM101* selbst nicht temperaturabhängig transkribiert wurde (Abbildung 13), konnte darauf geschlossen werden, dass neben Rim101p weitere, temperaturabhängig wirkende Faktoren an der Regulation dieser hyphalen Gene beteiligt sind. Auch die basale Aktivierung von *HWP1* bei pH 4,5 in der *RIM101*-Deletionsmutante zeugte von der direkten oder indirekten aktivierenden Wirkung anderer pH- oder temperaturabhängiger Faktoren auf diese Gene. In *C. albicans* wurde vor kurzem eine *RIM101*-unabhängige pH-Antwort durch Mds3p beschrieben, die möglicherweise ebenfalls einen Einfluss auf die beobachteten pH-abhängigen Effekte haben könnte (Davis *et al.*, 2002).

EFG1 kodiert einen Transkriptionsfaktor, der essentiell für die Hyphenbildung in *C. albicans* ist (Lane *et al.*, 2001) und für die Transkription der hyphen-spezifischen Proteine Hwp1p, Rbt1p und Als1p benötigt wird (Braun *et al.*, 2000; Fu *et al.*, 2002; Sundstrom, 1999; Sundstrom, 2002). Die Repression von *HWP1* ist andererseits abhängig von Nrg1p und Tup1p, während *RBT1* wahrscheinlich hauptsächlich durch Tup1p kontrolliert wird (Braun & Johnson, 2000; Braun *et al.*, 2000). Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Expression von *RBT1* in Abhängigkeit von aktivem Rim101p und der Temperatur erfolgt (Abbildung 15). Das Gen wurde im Wildtyp nur im Neutralen und bei hyphen-induzierender Temperatur signifikant transkribiert. Unter diesen Bedingungen wurde in weiterführenden Versuchen im Wildtyp eine *TUP1*-Aktivierung festgestellt, die mit dem Transkriptionslevel in der Überexpressionsmutante *RIM101-1426* vergleichbar war. Zudem erwies sich die Expression von Rim101p als unabhängig von Tup1p (Abbildung 13). Die dargestellten Ergebnisse legen daher nahe, dass die *RIM101*-abhängige Aktivierung von *RBT1* nicht über eine Repression von Tup1p vermittelt wird. Rim101p wirkt also in *C. albicans* wie auch Efg1p als Aktivator von *RBT1*, aber offensichtlich über einen anderen Weg.

EFG1 ist für die Expression von Hwp1p und Als1p essentiell (Fu *et al.*, 2002; Sharkey *et al.*, 1999). Damit weist Efg1p gleiche Zielgene wie Rim101p auf und könnte als *downstream*-Effektor dieses Transkriptionsfaktors agieren. Durch Northern Blot-Analysen konnte jedoch gezeigt werden, dass die Transkription von *RIM101* unabhängig von *EFG1* erfolgt (Abbildung 13). Da *RIM101* nach

weiteren, im Rahmen dieser Studie durchgeführten Untersuchungen auch keine Aktivierung von *EFG1* bewirkte, scheint der positive Effekt von Rim101p auf die Filamentierung von *C. albicans* nicht über Efg1p vermittelt zu sein. Die beiden Transkriptionsfaktoren sind wahrscheinlich unabhängig voneinander an der Regulation mehrerer hyphenspezifischer Gene beteiligt. Ihr Zusammenspiel bei der Regulation gleicher Zielgene dient möglicherweise der exakten Modulation der Adaption von *C. albicans* an verschiedene Parameter externer Bedingungen. Auch die Beteiligung weiterer, DNA-bindender Faktoren wie *CPH1* und *CPH2* an der Regulation von *HWP1*, *RBT1* und *HYR1*, einem weiteren hyphenspezifischen Gen, wurde als unabhängige Konversion auf deren Promotoren postuliert (Lane *et al.*, 2001). Ähnlich komplexe Mechanismen der Genregulation finden sich auch bei der Kontrolle pseudohyphalen Wachstums von *S. cerevisiae*. Für die pseudohyphale Differenzierung ist *ScFLO11* essentiell, dessen Promotor eine Vielzahl unabhängiger Transkriptionsfaktoren bindet (Lo & Dranginis, 1998; Rupp *et al.*, 1999). Die kooperative Regulation invasiven und filamentösen Wachstums durch Tec1p und Ste12p (Madhani & Fink, 1997) ist ein weiteres Beispiel für die Beteiligung unabhängiger Faktoren an der Steuerung zentraler morphogenetischer Prozesse in *C. albicans*.

6.1.2 Reprimierende Funktion von Rim101p

Die überwiegende Mehrheit im DNA-Mikroarray identifizieren und durch Rim101p regulierten Gene wird durch den Transkriptionsfaktor reprimiert (23 von 32 Genen, Abschnitt 5.3.1, Tabelle 8). Eine reprimierende Wirkung von Rim101p auf die Genregulation ist auch aus *S. cerevisiae* bekannt (Lamb & Mitchell, 2003; Lamb *et al.*, 2001). Durch parallele, genomweite Transkriptionsstudien in *C. albicans* wurden insgesamt 13 Gene identifiziert und mittels RT-PCR bestätigt, deren Transkription durch Rim101p reprimiert wurde (Ramon & Fonzi, 2003). Die relativ geringe Anzahl der in dieser Publikation als *RIM101*-reprimiert aufgeführten Gene lässt sich möglicherweise auf die Verwendung

eines anderen Mediums zur Kultivierung von Stämmen für die RNA-Isolierung zurückführen. Zwei dieser Gene, *PHR2* und *PHO11*, kodieren Zellwandproteine, die auch mit Hilfe des in der vorliegenden Studie eingesetzten, zellwandspezifischen DNA-Mikroarrays identifiziert und im Northern Blot bestätigt werden konnten.

Drei stark reprimierte Gene, die mittels der durchgeführten Transkriptionsanalysen gefunden wurden, kodieren GPI-Proteine (De Groot *et al.*, 2003). Sie waren von bisher unbekannter Funktion und wurden als *RBR1*, *RBR2* und *RBR3* benannt (*repressed by* Rim101p). Keiner der bisher uncharakterisierten ORFs zeigte eine signifikante Homologie zu *S. cerevisiae* oder anderen Pilzen, auf Proteinebene wurde für *RBR3* jedoch eine Ähnlichkeit mit Hyr1p von *C. albicans* gefunden (Protein BLAST). Bei diesem durch Rim101p reprimierten Protein handelt es sich um ein GPI-Protein der Zellwand, welches in Zusammenhang mit der Induktion filamentösen Wachstums exprimiert wird (Bailey *et al.*, 1996). Die Sequenzen aller drei Proteine enthielten hydrophobe C- und N-terminale Signalsequenzen, sowie eine Omega-Site für die Übertragung eines GPI-Ankers oberhalb der C-terminalen hydrophoben Sequenz. Diese Merkmale sind charakteristisch für Proteine der Zellwand.

C. albicans Rbr2p (orf6.6744) wurde kürzlich mit Hilfe zweier verschiedener Algorithmen als potentielles GPI-Protein postuliert (De Groot *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2003), Rbr1p und Rbr3p werden in dieser Publikation allerdings nicht als Zellwandproteine aufgeführt. Für Rbr1p ist dies durch die geringe Größe des Proteins zu erklären. Die Sequenz des Gens *RBR1* (orf6.6744) hat eine Länge von 336 bp, und kodiert 111 Aminosäuren, bei der Erstellung von *C. albicans* Protein-Datenbanken wurden allerdings ausschließlich Sequenzen berücksichtigt, die für Proteine mit mindestens 150 Aminosäuren kodieren. Rbr3p dagegen wies zwar charakteristische Merkmale eines GPI-Proteins auf, die *in silico*-Vorhersage (mittels DGPI) lieferte diesbezüglich aber negative Ergebnisse wegen eines sehr kurzen hydrophoben C-Terminus. Diese Tatsache lässt sich auf die Annotation als unvollständiger ORF zurückführen (www-sequence.stanford.edu/group/candida/search.html), während die vollständige *RBR3*-Sequenz vermutlich ebenfalls ein GPI-Protein kodiert.

Alle drei Gene zeigten ein ähnliches Expressionsmuster. Sie wurden in sauren Medien exprimiert und bei neutralem pH-Wert durch *RIM101* reprimiert (Abbildung 8). Vergleichbar mit der Regulation von *PHR2* (Muhlschlegel & Fonzi, 1997), führte die Deletion von *RIM101* zur konstitutiven Transkription der *RBR*-Gene, während dominant aktives Rim101-1426p unabhängig des pH-Wertes eine stark reprimierende Wirkung auf sie ausübte (Abbildung 8 und Abbildung 14). *RIM101* kann daher als Repressor der Gene *RBR1*, *RBR2* and *RBR3* bezeichnet werden. Die Promotoranalyse von *RBR1* mittels Nucleotid-BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) lieferte eine potentielle Bindestelle für Rim101p (Ramon & Fonzi, 2003) in Position -1400 bp. *RBR2* und *RBR3* wiesen hingegen keine bekannte Konsensussequenz für eine potentielle direkte Rim101p-Bindung auf.

6.2 Funktion und Regulation von *RBR1* in *C. albicans*

Da *RBR1* unter den *RIM101*-reprimierten Genen die stärkste Regulation durch den Transkriptionsfaktor aufwies, wurde das Gen funktionell charakterisiert und ferner *in vivo* auf seine Bedeutung für die Virulenz von *C. albicans* hin überprüft. Gleichfalls wurden Experimente zur Regulation dieses Zellwandproteins durchgeführt.

Nach der Herstellung homozygoter *RBR1*-Deletionsmutanten wurde der Phänotyp dreier unabhängiger $\Delta rbr1$ -Stämme unter verschiedenen Bedingungen untersucht. Da das *RBR1*-Gen ein kleines GPI-Protein der Zellwand kodiert, welches hauptsächlich bei pH 4,5 exprimiert wird (Abbildung 8), wurden strukturelle Veränderungen der Zellwand besonders in saurer Umgebung erwartet. Störungen der Zellwandintegrität können beispielsweise durch eine fehlerhafte Vernetzung von Chitingerüst und Proteinen verursacht werden. Die Mutanten $\Delta phr1$ und $\Delta phr2$, sowie $\Delta skn1$ und $\Delta kre6$ in *C. albicans* und *P. carinii* beispielsweise weisen eine signifikante Störung der Zellwandsynthese auf, die eine Wachstumsstörung verursachen (Kottom *et al.*, 2001; Mio *et al.*, 1997; Saporito-Irwin *et al.*, 1995). In *S. cerevisiae* resultieren

sehr niedrige pH-Werte in einer schnellen Induktion der Resistenz gegen β -1,3-Glukanase (Kapteyn *et al.*, 2001). Auf molekularer Ebene konnte als Ursache hierfür die starke Vernetzung des GPI-Proteins Cwp1p mit β -1,3-Glukan über einen neuen, alkali-labilen Bindungstyp definiert werden, der abhängig von *HOG1* (*high osmolarity glycerol*) war. Die Integrität der Zellwand lässt sich über die Resistenz gegen hyperosmotischen oder oxidativen Stress, zellwandschädigende Substanzen oder extreme pH-Werte des Mediums prüfen (Elorza *et al.*, 1983; Higgins *et al.*, 2002). Da weder extreme pH-Werte, noch H₂O₂-Einwirkung oder das kovalent interagierende *Calcofluor White* eine signifikante Wachstumsstörung der $\Delta rbr1$ -Mutanten erzeugen konnten, scheint die Funktion von Rbr1p nicht vorrangig mit der strukturell bedingten Resistenz gegen diese Umweltfaktoren assoziiert zu sein. Eine kompensatorische Überexpression der Proteine Rbr2p und Rbr3p könnte gleichzeitig die Detektion eines signifikanten Wachstumsphänotyps unter einigen Bedingungen verhindert haben.

Die Deletion von *RBR1* resultierte in einem pH-abhängigen Filamentierungsdefekt auf M-199 Softagar von pH 4,5 (Abbildung 10). Daraus kann die Bedeutung dieses Proteins für das hyphale Wachstum im Säuren geschlossen werden. Der beobachtete Phänotyp steht in Einklang mit dem Expressionsmuster von *RBR1*, das in diesem Medium die stärkste Transkription bei pH 4,5 zeigt (Abbildung 14). Da Rbr2p und Rbr3p ein mit Rbr1p identisches Expressionsmuster aufweisen (Abbildung 8), liegt eine Beteiligung auch dieser Proteine an der Regulation pH-abhängiger Filamentierung nahe. Diese Hypothese ist jedoch durch weitere Untersuchungen zu bestätigen.

Die zur Regulation von *RBR1* durchgeführten Studien zeigen außer der Repression dieses potentiellen Zellwandproteins durch Rim101p eine signifikante Abhängigkeit seiner Aktivierung von *NRG1*. Die *NRG1*-Transkription korrelierte bei allen getesteten pH-Werten und Temperaturen mit der Transkription von *RBR1* (Abbildung 14). Aus den experimentellen Daten ließ sich also auf die aktivierende Wirkung von Nrg1p auf die Expression von *RBR1* schließen. Da Nrg1p bis zum heutigen Zeitpunkt ausschließlich als transkriptioneller Repressor beschrieben wurde, waren diese Ergebnisse

zunächst sehr überraschend. Nach gängiger Hypothese rekrutiert Nrg1p die Proteine Tup1p oder Mig1p, um Repressorkomplexe an den Promotoren hyphaler Zielgene zu bilden (Murad *et al.*, 2001b). Der beobachtete aktivierende Einfluss des Transkriptionsfaktors kann sowohl direkt als auch indirekt über die Beteiligung weiterer Transkriptionsregulatoren erfolgen. Die Transkriptionsfaktoren Efg1p und Tup1p zeigten unter den getesteten Bedingungen jedoch keinen Effekt auf die Transkription von *RBR1* (Abbildung 13). Obwohl die offensichtlich aktivierende Wirkung von Nrg1p in *C. albicans* in dieser Arbeit anhand von *RBR1* zum ersten Mal beschrieben wird, liegen Hinweise über eine bifunktionelle Wirkung auch von anderen Transkriptionsfaktoren vor. Überdies geben DNA-Mikroarray-Daten, die in Zusammenhang mit der Charakterisierung des Transkriptionsfaktors Nrg1p veröffentlicht wurden (www.pasteur.fr/recherche/unites/RIF/transcriptdata/Transcriptdata.xls), starke Hinweise auf eine direkt oder indirekt transkriptionsaktivierende Wirkung von Nrg1p auf eine Reihe weiterer *C. albicans* Gene.

Im Gegensatz zur Aktivierung von *RBR1* wird *NRG1* unter den getesteten Bedingungen nicht für die Expression des ebenfalls im Sauren exprimierten Gens *PHR2* benötigt (Abbildung 13). Folglich müssen für die Regulation von *RBR1* und *PHR2* unterschiedliche Mechanismen angenommen werden. Einen Hinweis auf die verschiedene Regulation der beiden Zellwandproteine gibt auch deren Promotorregion. Der Promotor von *PHR2* weist wie der *PHR1*-Promotor mehrere Konsensus-Sequenzen für die Bindung von *C. albicans* auf. Das Gen könnte daher im Gegensatz zum *RBR1* durch Mehrfachbindung von Rim101p im Neutralen reprimiert werden. Ein entsprechender Mechanismus der Repression durch kompetitive Bindung von Aktivator und Repressor ist von PacC aus *A. nidulans* bekannt (Espeso & Arst, 2000). In diesem Organismus wird die Bindestelle für den Aktivator des sauer exprimierten Gens *gabA* durch zwei überlappend bindende PacC-Moleküle blockiert und somit seine Transkription bei neutralem oder alkalischen pH-Wert verhindert.

Von besonderer Bedeutung ist die signifikante Reduktion der Virulenz von *RBR1*-defizienten *C. albicans*-Stämmen im systemischen Mausmodell (Abbildung 12). Proteine, die mit der Virulenz des Pilzes assoziiert sind, stehen

vor allem im Interesse der pharmakologischen Forschung. Dazu gehören insbesondere GPI-Proteine wie Rbr1p, aber auch Hwp1p und Als1p, deren Beteiligung an der Adhäsion von *C. albicans* gezeigt werden konnte (Fu *et al.*, 2002). Studien über den Mechanismus der Modifikation und der erfolgreichen Lokalisation von GPI-Proteinen in der Zellwand haben gezeigt, dass diese Zellwandproteine ein vielversprechendes Ziel für neue fungizide Substanzen sein könnten (Tsukahara *et al.*, 2003). Unter diesem Aspekt ist auch die Bedeutung von Rbr2p und Rbr3p für die Pathogenität von *C. albicans* von Interesse als Gegenstand weiterer Forschung.

6.3 Regulation des hyphalen Repressors Nrg1p durch *RIM101*

Die vorliegende Studie zeigt eine Koregulation des GPI-Proteins *RBR1* durch Rim101p und Nrg1p. Weitere Untersuchungen zur Interaktion von Rim101p-abhängiger pH-Regulation und *NRG1* ergaben, dass Rim101p die Transkription von *NRG1* reprimiert (Abbildung 14). Demgegenüber hatte die Deletion von *NRG1* keinen signifikanten Einfluss auf die Menge an *RIM101*-Transkript (Abbildung 13). Diese Daten lassen darauf schließen, dass Rim101p als Repressor von *NRG1* wirkt, wie dies auch für *S. cerevisiae* beschrieben wurde (Lamb & Mitchell, 2003). Obwohl die Ergebnisse eine vergleichbare Funktion von Rim101p und ScRim101p nahe legen, führte die ektopische Expression von Rim101p in einer *S. cerevisiae* $\Delta rim101$ -Mutante nicht zur Komplementierung der Defekte von Filamentierung und invasivem Wachstum (persönliche Mitteilung, Dr. S. Rupp).

Im Rahmen einer Untersuchung über die Bindungsspezifität von Rim101p wurden ebenfalls Transkriptionsprofile von $\Delta rim101$ und Wildtyp erstellt (Ramon & Fonzi, 2003). Die Ergebnisse dieser Transkriptionsstudien ließen nicht auf die Aktivierung von *NRG1* oder *NRG1*-reprimierter Gene in der $\Delta rim101$ im Vergleich zum Wildtyp schließen. Für die zitierten Experimente wurden die

Stämme in M-199 bei 28°C und pH 7,4 kultiviert. In der vorliegenden Studie wurden Northern Blot Experimente unter ähnlichen Bedingungen, in M-199 bei 29°C und pH 8,0 durchgeführt. Diese Experimente zeigten eine nur schwache Induktion des *NRG1*-reprimierten Gens *HWP1* im Wildtyp (Abbildung 15). In der geringen *HWP1*-Transkriptmenge könnte die Ursache dafür liegen, dass die genannten Autoren unter den gewählten Bedingungen keine signifikante Herabregulierung von *NRG1*-reprimierten Genen gegenüber dem Wildtyp-Niveau detektieren konnten. Der reprimierende Effekt von Rim101p auf *NRG1* wurde insbesondere bei niedrigen Temperaturen in α -MEM beobachtet (Abbildung 14). Die dargestellten Ergebnisse zeigen, dass Rim101p nicht ausschließlich als Aktivator von *PHR1* fungiert, sondern über die Repression des hyphalen Repressors Nrg1p die pH-abhängige Transkription weiterer Gene kontrolliert. Insbesondere ist hier das hyphenspezifisch exprimierte Gen *HWP1* zu nennen, dessen *NRG1*-abhängige Repression bereits beschrieben wurde (Braun & Johnson, 2000; Braun *et al.*, 2001). Weiterhin korreliert die Expression von *RBT1* stark mit der Aktivität von Rim101p (Abbildung 15).

Eine starke Expression von Nrg1p bei saurem pH-Wert unterdrückt die Filamentierung unter diesen Bedingungen (Murad *et al.*, 2001b). Daher korrespondiert die Derepression von *NRG1* durch die Deletion von *RIM101* mit dem für die Deletionsmutante $\Delta rim101$ beschriebenen Defekt der Filamentierung bei neutralem pH-Wert (Davis *et al.*, 2000a). Die verstärkte Adhäsion und Induktion hyphalen Wachstums in der Überexpressionsmutante *RIM101-1426* (El Barkani *et al.*, 2000) reflektiert dagegen die Herunterregulierung von *NRG1* auch bei niedrigem pH-Wert. Wie Nrg1p und Rim101p die gemeinsame Regulation des pH- und zellwandspezifischen Proteins Rbr1p bewerkstelligen, ist nach wie vor unklar und sollte Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

Die Ergebnisse dieser Studie dokumentieren Rim101p als Teil des komplexen Netzwerkes von Signaltransduktionswegen, die für die Regulation der Morphogenese von *C. albicans* verantwortlich sind. Die pH-Adaption des Pilzes ist also nicht als ein von anderen Signalwegen unabhängiger Prozess zu betrachten, sondern wird durch den Transkriptionsfaktor Rim101p mit zentralen

regulatorischen Vorgängen in der Zelle verknüpft. Abbildung 17 stellt die Beteiligung von Rim101p an der Regulation verschiedener morphogenetischer Prozesse von *C. albicans* schematisch dar. Mittels der durchgeführten Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass Rim101p in *C. albicans* pH-Signale und andere Umweltreize zu einer effektiven Modulation der Zellantwort auf externen Stress integriert.

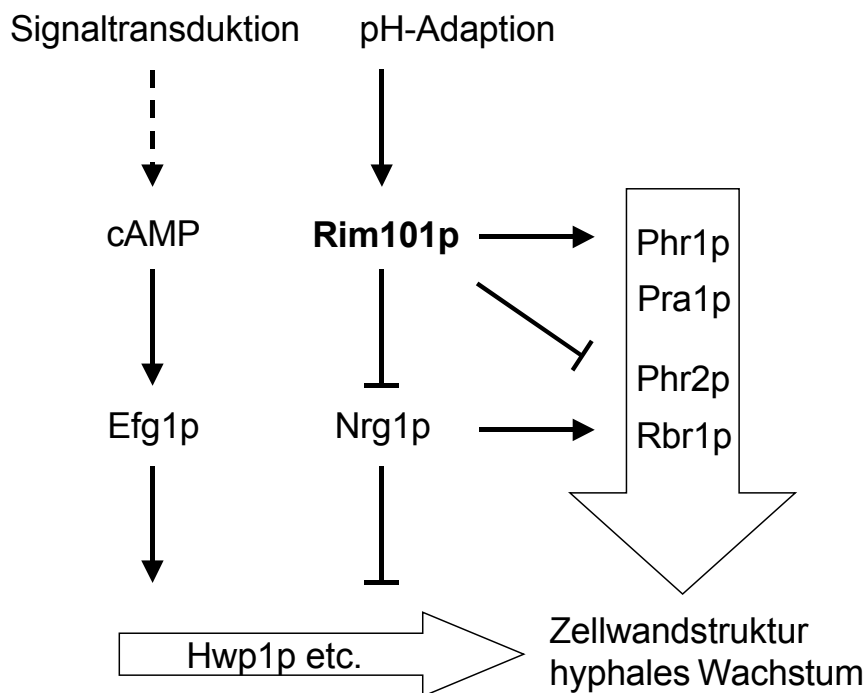


Abbildung 17: Direkte und indirekte Interaktion von Rim101p mit morphogenetischen Prozessen in *C. albicans*. Der Transkriptionsfaktor Rim101p wirkt im Neutralen aktivierend auf die Zellwandproteine Phr1p und Pra1p und reprimiert gleichzeitig sowohl Phr2p und Rbr1p als auch den hyphalen Repressor Nrg1p. Dies hat die Induktion hyphenspezifischer Gene zur Folge. Im Sauren wird durch Derepression von Nrg1p die Filamentierung von *C. albicans* unterdrückt und die Expression der Zellwandproteine Phr1p und Rbr1p aktiviert. Damit interagiert Rim101p an der Schnittstelle zwischen cAMP-Signalweg, Nrg1p-regulierter Filamentierung und der pH-abhängigen dynamischen Zellwandstruktur des Pilzes *C. albicans*.

7 Literaturverzeichnis

Altiparmak, M. R., Apaydin, S., Trablus, S., Serdengecti, K., Ataman, R., Ozturk, R. & Ereik, E. (2002). Systemic fungal infections after renal transplantation. *Scand J Infect Dis* **34**, 284-288.

Aly, R., Forney, R. & Bayles, C. (2001). Treatments for common superficial fungal infections. *Dermatol Nurs* **13**, 91-94, 98-99; quiz 100-101.

Anaissie, E. J., Karyotakis, N. C., Hachem, R., Dignani, M. C., Rex, J. H. & Paetznick, V. (1994). Correlation between in vitro and in vivo activity of antifungal agents against *Candida* species. *J Infect Dis* **170**, 384-389.

Arst, H. N. & Penalva, M. A. (2003). pH regulation in *Aspergillus* and parallels with higher eukaryotic regulatory systems. *Trends Genet* **19**, 224-231.

Ashman, R. B. (1998). *Candida albicans*: pathogenesis, immunity and host defence. *Res Immunol* **149**, 281-288; discussion 494-286.

Ausubel, F. M. (1994). *Current protocols in molecular biology*. John Wiley & Sons, Inc. USA.

Bailey, D. A., Feldmann, P. J., Bovey, M., Gow, N. A. & Brown, A. J. (1996). The *Candida albicans* HYR1 gene, which is activated in response to hyphal development, belongs to a gene family encoding yeast cell wall proteins. *J Bacteriol* **178**, 5353-5360.

Bockmuhl, D. P. & Ernst, J. F. (2001). A potential phosphorylation site for an A-type kinase in the Efg1 regulator protein contributes to hyphal morphogenesis of *Candida albicans*. *Genetics* **157**, 1523-1530.

Braun, B. R. & Johnson, A. D. (1997). Control of filament formation in *Candida albicans* by the transcriptional repressor TUP1. *Science* **277**, 105-109.

Braun, B. R. & Johnson, A. D. (2000). TUP1, CPH1 and EFG1 make independent contributions to filamentation in *Candida albicans*. *Genetics* **155**, 57-67.

- Braun, B. R., Kadosh, D. & Johnson, A. D. (2001).** NRG1, a repressor of filamentous growth in *C. albicans*, is down-regulated during filament induction. *Embo J* **20**, 4753-4761.
- Braun, B. R., Head, W. S., Wang, M. X. & Johnson, A. D. (2000).** Identification and characterization of TUP1-regulated genes in *Candida albicans*. *Genetics* **156**, 31-44.
- Braun, P. C. (1999).** Nutrient uptake by *Candida albicans*: the influence of cell surface mannoproteins. *Can J Microbiol* **45**, 353-359.
- Caddick, M. X., Brownlee, A. G. & Arst, H. N., Jr. (1986).** Regulation of gene expression by pH of the growth medium in *Aspergillus nidulans*. *Mol Gen Genet* **203**, 346-353.
- Calderone, R. A. & Fonzi, W. A. (2001).** Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends Microbiol* **9**, 327-335.
- Caracuel, Z., Roncero, M. I., Espeso, E. A., Gonzalez-Verdejo, C. I., Garcia-Maceira, F. I. & Di Pietro, A. (2003).** The pH signalling transcription factor PacC controls virulence in the plant pathogen *Fusarium oxysporum*. *Mol Microbiol* **48**, 765-779.
- 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.
- Caro, L. H., Tettelin, H., Vossen, J. H., Ram, A. F., van den Ende, H. & Klis, F. M. (1997).** In silico identification of glycosyl-phosphatidylinositol-anchored plasma-membrane and cell wall proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **13**, 1477-1489.
- Chandra, J., Kuhn, D. M., Mukherjee, P. K., Hoyer, L. L., McCormick, T. & Ghannoum, M. A. (2001a).** Biofilm Formation by the Fungal Pathogen *Candida albicans*: Development, Architecture, and Drug Resistance. *J Bacteriol* **183**, 5385-5394.

Chandra, J., Mukherjee, P. K., Leidich, S. D., Faddoul, F. F., Hoyer, L. L., Douglas, L. J. & Ghannoum, M. A. (2001b). Antifungal resistance of candidal biofilms formed on denture acrylic in vitro. *J Dent Res* **80**, 903-908.

Chattaway, F. W., Holmes, M. R. & Barlow, A. J. (1968). Cell wall composition of the mycelial and blastospore forms of *Candida albicans*. *J Gen Microbiol* **51**, 367-376.

Chen-Wu, J. L., Zwicker, J., Bowen, A. R. & Robbins, P. W. (1992). Expression of chitin synthase genes during yeast and hyphal growth phases of *Candida albicans*. *Mol Microbiol* **6**, 497-502.

Csank, C., Schroppel, K., Leberer, E., Harcus, D., Mohamed, O., Meloche, S., Thomas, D. Y. & Whiteway, M. (1998). Roles of the *Candida albicans* mitogen-activated protein kinase homolog, Cek1p, in hyphal development and systemic candidiasis. *Infect Immun* **66**, 2713-2721.

Cutler, J. (1991). Putative virulence factors of *Candida albicans*. *Annu Rv Microbiol* **45**, 187-218.

Davis, D. (2003). Adaptation to environmental pH in *Candida albicans* and its relation to pathogenesis. *Curr Genet* **44**, 1-7.

Davis, D., Wilson, R. B. & Mitchell, A. P. (2000a). RIM101-dependent and-independent pathways govern pH responses in *Candida albicans*. *Mol Cell Biol* **20**, 971-978.

Davis, D., Edwards, J. E., Jr., Mitchell, A. P. & Ibrahim, A. S. (2000b). *Candida albicans* RIM101 pH response pathway is required for host-pathogen interactions. *Infect Immun* **68**, 5953-5959.

Davis, D. A., Bruno, V. M., Loza, L., Filler, S. G. & Mitchell, A. P. (2002). *Candida albicans* Mds3p, a conserved regulator of pH responses and virulence identified through insertional mutagenesis. *Genetics* **162**, 1573-1581.

- De Bernardis, F., Muhlschlegel, 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.
- De Bernardis, F., Boccanera, M., Adriani, D., Spreghini, E., Santoni, G. & Cassone, A. (1997).** Protective role of antimannan and anti-aspartyl proteinase antibodies in an experimental model of *Candida albicans* vaginitis in rats. *Infect Immun* **65**, 3399-3405.
- de Bernardis, F., Santoni, G., Boccanera, M., Spreghini, E., Adriani, D., Morelli, L. & Cassone, A. (2000).** Local anticandidal immune responses in a rat model of vaginal infection by and protection against *Candida albicans*. *Infect Immun* **68**, 3297-3304.
- De Groot, P. W., Hellingwerf, K. J. & Klis, F. M. (2003).** Genome-wide identification of fungal GPI proteins. *Yeast* **20**, 781-796.
- de Pauw, B. E. a. M., F (1999).** The challenge of invasive fungal infection. *Chemotherapy* **45 Suppl 1**, 1-14.
- Diehl, F., Grahlmann, S., Beier, M. & Hoheisel, J. D. (2001).** Manufacturing DNA microarrays of high spot homogeneity and reduced background signal. *Nucleic Acids Res* **29**, E38.
- Dieterich, C., Schandar, M., Noll, M., Johannes, F. J., Brunner, H., Graeve, T. & Rupp, S. (2002).** In vitro reconstructed human epithelia reveal contributions of *Candida albicans* EFG1 and CPH1 to adhesion and invasion. *Microbiology* **148**, 497-506.
- Diez, E., Alvaro, J., Espeso, E. A., Rainbow, L., Suarez, T., Tilburn, J., Arst, H. N., Jr. & Penalva, M. A. (2002).** Activation of the *Aspergillus* PacC zinc finger transcription factor requires two proteolytic steps. *Embo J* **21**, 1350-1359.
- Douglas, L. J. (1985).** Adhesion of pathogenic *Candida* species to host surfaces. *Microbiol Sci* **2**, 243-247.

Douglas, L. J. (1987). Adhesion of *Candida* species to epithelial surfaces. *Crit Rev Microbiol* **15**, 27-43.

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

Elorza, M. V., Rico, H. & Sentandreu, R. (1983). Calcofluor white alters the assembly of chitin fibrils in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans* cells. *J Gen Microbiol* **129**, 1577-1582.

Elorza, M. V., Murgui, A. & Sentandreu, R. (1985). Dimorphism in *Candida albicans*: contribution of mannoproteins to the architecture of yeast and mycelial cell walls. *J Gen Microbiol* **131 (Pt 9)**, 2209-2216.

Espeso, E. A. & Penalva, 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. & Arst, H. N., Jr. (2000). On the mechanism by which alkaline pH prevents expression of an acid- expressed gene. *Mol Cell Biol* **20**, 3355-3363.

Espeso, E. A., Tilburn, J., Sanchez-Pulido, L., Brown, C. V., Valencia, A., Arst, H. N., Jr. & Penalva, M. A. (1997). Specific DNA recognition by the *Aspergillus nidulans* three zinc finger transcription factor PacC. *J Mol Biol* **274**, 466-480.

Felk, A., Kretschmar, M., Albrecht, A., Schaller, M., Beinbauer, S., Nichterlein, T., Sanglard, D., Korting, H. C., Schafer, W. & Hube, B. (2002). *Candida albicans* hyphal formation and the expression of the Efg1- regulated proteinases Sap4 to Sap6 are required for the invasion of parenchymal organs. *Infect Immun* **70**, 3689-3700.

- Fonzi, W. A. (1999).** PHR1 and PHR2 of *Candida albicans* encode putative glycosidases required for proper cross-linking of beta-1,3- and beta-1,6-glucans. *J Bacteriol* **181**, 7070-7079.
- Fonzi, W. A. & Irwin, M. Y. (1993).** Isogenic strain construction and gene mapping in *Candida albicans*. *Genetics* **134**, 717-728.
- Fu, Y., Ibrahim, A. S., Sheppard, D. C., Chen, Y. C., French, S. W., Cutler, J. E., Filler, S. G. & Edwards, J. E., Jr. (2002).** *Candida albicans* Als1p: an adhesin that is a downstream effector of the EFG1 filamentation pathway. *Mol Microbiol* **44**, 61-72.
- Futai, E., Maeda, T., Sorimachi, H., Kitamoto, K., Ishiura, S. & Suzuki, K. (1999).** The protease activity of a calpain-like cysteine protease in *Saccharomyces cerevisiae* is required for alkaline adaptation and sporulation. *Mol Gen Genet* **260**, 559-568.
- Gale, C. A., Bendel, C. M., McClellan, M., Hauser, M., Becker, J. M., Berman, J. & Hostetter, M. K. (1998).** Linkage of adhesion, filamentous growth, and virulence in *Candida albicans* to a single gene, INT1. *Science* **279**, 1355-1358.
- Ghannoum, M. A. (2000).** Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. *Clin Microbiol Rev* **13**, 122-143, table of contents.
- Ghannoum, M. A., Spellberg, B., Saporito-Irwin, S. M. & Fonzi, W. A. (1995).** Reduced virulence of *Candida albicans* PHR1 mutants. *Infect Immun* **63**, 4528-4530.
- Gillum, A. M., Tsay, E. Y. & Kirsch, D. R. (1984).** Isolation of the *Candida albicans* gene for orotidine-5'-phosphate decarboxylase by complementation of *S. cerevisiae* *ura3* and *E. coli* *pyrF* mutations. *Mol Gen Genet* **198**, 179-182.
- Gow, N. A., Knox, Y., Munro, C. A. & Thompson, W. D. (2003).** Infection of chick chorioallantoic membrane (CAM) as a model for invasive hyphal growth and pathogenesis of *Candida albicans*. *Med Mycol* **41**, 331-338.

Graybill, J. R. (2000). Changing strategies for treatment of systemic mycoses. *Braz J Infect Dis* **4**, 47-54.

Groll, A. H. & Walsh, T. J. (2001). Uncommon opportunistic fungi: new nosocomial threats. *Clin Microbiol Infect* **7**, 8-24.

Guthrie, C. & Fink, G. R. (1991). Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology. *Methods Enzymol* **194**.

Higgins, V. J., Alic, N., Thorpe, G. W., Breitenbach, M., Larsson, V. & Dawes, I. W. (2002). Phenotypic analysis of gene deletant strains for sensitivity to oxidative stress. *Yeast* **19**, 203-214.

Hoyer, L. L. & Hecht, J. E. (2001). The ALS5 gene of *Candida albicans* and analysis of the Als5p N-terminal domain. *Yeast* **18**, 49-60.

Hoyer, L. L., Scherer, S., Shatzman, A. R. & Livi, G. P. (1995). *Candida albicans* ALS1: domains related to a *Saccharomyces cerevisiae* sexual agglutinin separated by a repeating motif. *Mol Microbiol* **15**, 39-54.

Hoyer, L. L., Payne, T. L., Bell, M., Myers, A. M. & Scherer, S. (1998). *Candida albicans* ALS3 and insights into the nature of the ALS gene family. *Curr Genet* **33**, 451-459.

Hube, B., Stehr, F., Bossenz, M., Mazur, A., Kretschmar, M. & Schafer, W. (2000). Secreted lipases of *Candida albicans*: cloning, characterisation and expression analysis of a new gene family with at least ten members. *Arch Microbiol* **174**, 362-374.

Hull, C. M. & Johnson, A. D. (1999). Identification of a mating type-like locus in the asexual pathogenic yeast *Candida albicans*. *Science* **285**, 1271-1275.

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.

Iwaguchi, S., Homma, M. & Tanaka, K. (1990). Variation in the electrophoretic karyotype analysed by the assignment of DNA probes in *Candida albicans*. *J Gen Microbiol* **136** (Pt 12), 2433-2442.

Kapteyn, J. C., Van Den Ende, H. & Klis, F. M. (1999). The contribution of cell wall proteins to the organization of the yeast cell wall. *Biochim Biophys Acta* **1426**, 373-383.

Kapteyn, J. C., ter Riet, B., Vink, E., Blad, S., De Nobel, H., Van Den Ende, H. & Klis, F. M. (2001). Low external pH induces HOG1-dependent changes in the organization of the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *Mol Microbiol* **39**, 469-479.

Kapteyn, J. C., Hoyer, L. L., Hecht, J. E., Muller, W. H., Andel, A., Verkleij, A. J., Makarow, M., Van Den Ende, H. & Klis, F. M. (2000). The cell wall architecture of *Candida albicans* wild-type cells and cell wall-defective mutants. *Mol Microbiol* **35**, 601-611.

Khatib, R., Riederer, K. M., Ramanathan, J. & Baran, J., Jr. (2001). Faecal fungal flora in healthy volunteers and inpatients. *Mycoses* **44**, 151-156.

Klis, F. M., de Groot, P. & Hellingwerf, K. (2001). Molecular organization of the cell wall of *Candida albicans*. *Med Mycol* **39**, 1-8.

Koch, Y. & Rademacher, K. H. (1980). Chemical and enzymatic changes in the cell walls of *Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae* by scanning electron microscopy. *Can J Microbiol* **26**, 965-970.

Kohler, G. A., White, T. C. & Agabian, N. (1997). Overexpression of a cloned IMP dehydrogenase gene of *Candida albicans* confers resistance to the specific inhibitor mycophenolic acid. *J Bacteriol* **179**, 2331-2338.

Kohler, J. R. & Fink, G. R. (1996). *Candida albicans* strains heterozygous and homozygous for mutations in mitogen-activated protein kinase signaling components have defects in hyphal development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 13223-13228.

- Korting, H. C., Hube, B., Oberbauer, S., Januschke, E., Hamm, G., Albrecht, A., Borelli, C. & Schaller, M. (2003).** Reduced expression of the hyphal-independent *Candida albicans* proteinase genes SAP1 and SAP3 in the *efg1* mutant is associated with attenuated virulence during infection of oral epithelium. *J Med Microbiol* **52**, 623-632.
- Kottom, T. J., Thomas, C. F., Jr. & Limper, A. H. (2001).** Characterization of *Pneumocystis carinii* PHR1, a pH-regulated gene important for cell wall Integrity. *J Bacteriol* **183**, 6740-6745.
- Kuhn, D. M., George, T., Chandra, J., Mukherjee, P. K. & Ghannoum, M. A. (2002).** Antifungal susceptibility of *Candida* biofilms: unique efficacy of amphotericin B lipid formulations and echinocandins. *Antimicrob Agents Chemother* **46**, 1773-1780.
- Kurzai, O., Heinz, W. J., Sullivan, D. J., Coleman, D. C., Frosch, M. & Muhlschlegel, F. A. (1999).** Rapid PCR test for discriminating between *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* isolates using primers derived from the pH-regulated PHR1 and PHR2 genes of *C. albicans*. *J Clin Microbiol* **37**, 1587-1590.
- Lamb, T. M. & Mitchell, A. P. (2003).** The transcription factor Rim101p governs ion tolerance and cell differentiation by direct repression of the regulatory genes NRG1 and SMP1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **23**, 677-686.
- Lamb, T. M., Xu, W., Diamond, A. & Mitchell, A. P. (2001).** Alkaline response genes of *Saccharomyces cerevisiae* and their relationship to the RIM101 pathway. *J Biol Chem* **276**, 1850-1856.
- Lambert, M., Blanchin-Roland, S., Le Louedec, F., Lepingle, A. & Gaillardin, C. (1997).** Genetic analysis of regulatory mutants affecting synthesis of extracellular proteinases in the yeast *Yarrowia lipolytica*: identification of a RIM101/pacC homolog. *Mol Cell Biol* **17**, 3966-3976.
- Lane, S., Birse, C., Zhou, S., Matson, R. & Liu, H. (2001).** DNA array studies demonstrate convergent regulation of virulence factors by Cph1, Cph2, and Efg1 in *Candida albicans*. *J Biol Chem* **276**, 48988-48996.

Leberer, E., Marcus, D., Dignard, D., Johnson, L., Ushinsky, S., Thomas, D. Y. & Schroppel, K. (2001). Ras links cellular morphogenesis to virulence by regulation of the MAP kinase and cAMP signalling pathways in the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Mol Microbiol* **42**, 673-687.

Lee, S. A., Wormsley, S., Kamoun, S., Lee, A. F., Joiner, K. & Wong, B. (2003). An analysis of the *Candida albicans* genome database for soluble secreted proteins using computer-based prediction algorithms. *Yeast* **20**, 595-610.

Li, W. & Mitchell, A. P. (1997). Proteolytic activation of Rim1p, a positive regulator of yeast sporulation and invasive growth. *Genetics* **145**, 63-73.

Liu, H. (2001). Transcriptional control of dimorphism in *Candida albicans*. *Curr Opin Microbiol* **4**, 728-735.

Liu, H., Kohler, 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., Kohler, J. R., DiDomenico, B., Loebenberg, D., Cacciapuoti, A. & Fink, G. R. (1997). Nonfilamentous *C. albicans* mutants are avirulent. *Cell* **90**, 939-949.

Lo, W. S. & Dranginis, A. M. (1998). The cell surface flocculin Flo11 is required for pseudohyphae formation and invasion by *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **9**, 161-171.

Lopez-Ribot, J. L., Bikandi, J., San Millan, R. S. & Chaffin, W. L. (1999). Interactions between *Candida albicans* and the human extracellular matrix component tenascin-C. *Mol Cell Biol Res Commun* **2**, 58-63.

Madhani, H. D. & Fink, G. R. (1997). Combinatorial control required for the specificity of yeast MAPK signaling. *Science* **275**, 1314-1317.

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.

- Martinez, J. P., Gil, M. L., Lopez-Ribot, J. L. & Chaffin, W. L. (1998).** Serologic response to cell wall mannoproteins and proteins of *Candida albicans*. *Clin Microbiol Rev* **11**, 121-141.
- Matuschak, G. M. & Lechner, A. J. (1997).** The yeast to hyphal transition following hematogenous candidiasis induces shock and organ injury independent of circulating tumor necrosis factor-alpha. *Crit Care Med* **25**, 111-120.
- Mio, T., Yamada-Okabe, T., Yabe, T., Nakajima, T., Arisawa, M. & Yamada-Okabe, H. (1997).** Isolation of the *Candida albicans* homologs of *Saccharomyces cerevisiae* KRE6 and SKN1: expression and physiological function. *J Bacteriol* **179**, 2363-2372.
- Montijn, R. C., Vink, E., Muller, W. H., Verkleij, A. J., Van Den Ende, H., Henrissat, B. & Klis, F. M. (1999).** Localization of synthesis of beta1,6-glucan in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **181**, 7414-7420.
- Morschhauser, J. (2002).** The genetic basis of fluconazole resistance development in *Candida albicans*. *Biochim Biophys Acta* **1587**, 240-248.
- Morschhauser, J., Michel, S. & Staib, P. (1999).** Sequential gene disruption in *Candida albicans* by FLP-mediated site-specific recombination. *Mol Microbiol* **32**, 547-556.
- Muhlschlegel, 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.
- Mukherjee, P. K., Chandra, J., Kuhn, D. M. & Ghannoum, M. A. (2003).** Mechanism of fluconazole resistance in *Candida albicans* biofilms: phase-specific role of efflux pumps and membrane sterols. *Infect Immun* **71**, 4333-4340.
- Murad, A. M., d'Enfert, C., Gaillardin, C., Tournu, H., Tekaia, F., Talibi, D., Marechal, D., Marchais, V., Cottin, J. & Brown, A. J. (2001a).** Transcript profiling in *Candida albicans* reveals new cellular functions for the

transcriptional repressors CaTup1, CaMig1 and CaNrg1. *Mol Microbiol* **42**, 981-993.

Murad, A. M., Leng, P., Straffon, M., Wishart, J., Macaskill, S., MacCallum, D., Schnell, N., Talibi, D., Marechal, D., Tekaiia, F., d'Enfert, C., Gaillardin, C., Odds, F. C. & Brown, A. J. (2001b). NRG1 represses yeast-hypha morphogenesis and hypha-specific gene expression in *Candida albicans*. *Embo J* **20**, 4742-4752.

Nakazawa, T., Takahashi, M., Horiuchi, H., Ohta, A. & Takagi, M. (2000). Cloning and characterization of EPD2, a gene required for efficient pseudohyphal formation of a dimorphic yeast, *Candida maltosa*. *Biosci Biotechnol Biochem* **64**, 369-377.

Nitz, M., Ling, C. C., Otter, A., Cutler, J. E. & Bundle, D. R. (2002). The unique solution structure and immunochemistry of the *Candida albicans* beta - 1,2-mannopyranan cell wall antigens. *J Biol Chem* **277**, 3440-3446.

Nola, I., Kostovic, K., Oremovic, L., Soldo-Belic, A. & Lugovic, L. (2003). *Candida* infections today--how big is the problem? *Acta Dermatovenerol Croat* **11**, 171-177.

Nucci, M. & Colombo, A. L. (2002). Risk factors for breakthrough candidemia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **21**, 209-211.

Odds, F. C. (1988). *Candida and candidosis*. London: Bailliere Tindall.

Odds, F. C. (1994). Pathogenesis of *Candida* infections. *J Am Acad Dermatol* **31**, S2-5.

Orejas, M., Espeso, E. A., Tilburn, J., Sarkar, S., Arst, H. N., Jr. & Penalva, 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.

Orozco, A. S., Higginbotham, L.M., Hitchcock, C.A., Parkinson, T., Falconer, D., Ibrahim, A.S., Ghannoum, M.A. and Filler, S.G. (1998).

Mechanism of fluconazole resistance in *Candida krusei*. *Antimicrob Agents Chemother* **42**, 2645-2649.

Perea, S. & Patterson, T. F. (2002). Antifungal resistance in pathogenic fungi. *Clin Infect Dis* **35**, 1073-1080.

Pfaller, M. A., Jones, R. N., Messer, S. A., Edmond, M. B. & Wenzel, R. P. (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. SCOPE Participant Group. Surveillance and Control of Pathogens of Epidemiologic. *Diagn Microbiol Infect Dis* **30**, 121-129.

Pluthero, F. G. (1993). Rapid purification of high-activity Taq DNA polymerase. *Nucleic Acids Res* **21**, 4850-4851.

Porta, A., Ramon, A. M. & Fonzi, W. A. (1999). PRR1, a homolog of *Aspergillus nidulans* palF, controls pH-dependent gene expression and filamentation in *Candida albicans*. *J Bacteriol* **181**, 7516-7523.

Porta, A., Wang, Z., Ramon, A., Muhlschlegel, F. A. & Fonzi, W. A. (2001). Spontaneous second-site suppressors of the filamentation defect of *prp1*Delta mutants define a critical domain of Rim101p in *Candida albicans*. *Mol Genet Genomics* **266**, 624-631.

Ramon, A. M. & Fonzi, W. A. (2003). Diverged binding specificity of Rim101p, the *Candida albicans* ortholog of PacC. *Eukaryot Cell* **2**, 718-728.

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., Schroppel, K., Harcus, D., Marcil, A., Dignard, D., Taylor, B. N., Thomas, D. Y., Whiteway, M. & Leberer, E. (2001). Signaling through adenylyl cyclase is essential for hyphal growth and virulence in the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Mol Biol Cell* **12**, 3631-3643.

Roemer, T., Delaney, S. & Bussey, H. (1993). SKN1 and KRE6 define a pair of functional homologs encoding putative membrane proteins involved in beta-glucan synthesis. *Mol Cell Biol* **13**, 4039-4048.

Roemer, T., Paravicini, G., Payton, M. A. & Bussey, H. (1994). Characterization of the yeast (1-->6)-beta-glucan biosynthetic components, Kre6p and Skn1p, and genetic interactions between the PKC1 pathway and extracellular matrix assembly. *J Cell Biol* **127**, 567-579.

Rollins, J. A. (2003). The *Sclerotinia sclerotiorum* pac1 gene is required for sclerotial development and virulence. *Mol Plant Microbe Interact* **16**, 785-795.

Rupp, S., Summers, E., Lo, H. J., Madhani, H. & Fink, G. (1999). MAP kinase and cAMP filamentation signaling pathways converge on the unusually large promoter of the yeast FLO11 gene. *Embo J* **18**, 1257-1269.

Sambrook, J., E. F. Fritsch und T. Maniatis. (1989). Molecular Cloning. A laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*.

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.

Scherer, S. & Magee, P. T. (1990). Genetics of *Candida albicans*. *Microbiol Rev* **54**, 226-241.

Schiestl, R. H. & Petes, T. D. (1991). Integration of DNA fragments by illegitimate recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 7585-7589.

- Schweizer, A., Rupp, S., Taylor, B. N., Rollinghoff, M. & Schroppel, K. (2000).** The TEA/ATTS transcription factor CaTec1p regulates hyphal development and virulence in *Candida albicans*. *Mol Microbiol* **38**, 435-445.
- 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.
- Sohn, K., Urban, C., Brunner, H. & Rupp, S. (2003).** EFG1 is a major regulator of cell wall dynamics in *Candida albicans* as revealed by DNA microarrays. *Mol Microbiol* **47**, 89-102.
- Sonneborn, A., Bockmuhl, D. P., Gerads, M., Kurpanek, K., Sanglard, D. & Ernst, J. F. (2000).** Protein kinase A encoded by TPK2 regulates dimorphism of *Candida albicans*. *Mol Microbiol* **35**, 386-396.
- 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.
- Staib, P., Kretschmar, M., Nichterlein, T., Hof, H. & Morschhauser, J. (2002).** Transcriptional regulators Cph1p and Efg1p mediate activation of the *Candida albicans* virulence gene SAP5 during infection. *Infect Immun* **70**, 921-927.
- Stoldt, V. R., Sonneborn, A., Leuker, C. E. & Ernst, J. F. (1997).** Efg1p, an essential regulator of morphogenesis of the human pathogen *Candida albicans*, is a member of a conserved class of bHLH proteins regulating morphogenetic processes in fungi. *Embo J* **16**, 1982-1991.
- Su, S. S. & Mitchell, A. P. (1993).** Molecular characterization of the yeast meiotic regulatory gene RIM1. *Nucleic Acids Res* **21**, 3789-3797.

Sullivan, P. A., Yin, C. Y., Molloy, C., Templeton, M. D. & Shepherd, M. G. (1983). An analysis of the metabolism and cell wall composition of *Candida albicans* during germ-tube formation. *Can J Microbiol* **29**, 1514-1525.

Sundstrom, P. (1999). Adhesins in *Candida albicans*. *Curr Opin Microbiol* **2**, 353-357.

Sundstrom, P. (2002). Adhesion in *Candida* spp. *Cell Microbiol* **4**, 461-469.

Tilburn, J., Sarkar, S., Widdick, D. A., Espeso, E. A., Orejas, M., Mungroo, J., Penalva, M. A. & Arst, H. N., Jr. (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.

Tronchin, G., Bouchara, J. P. & Robert, R. (1989). Dynamic changes of the cell wall surface of *Candida albicans* associated with germination and adherence. *Eur J Cell Biol* **50**, 285-290.

Tsuchimori, N., Sharkey, L. L., Fonzi, W. A., French, S. W., Edwards, J. E., Jr. & Filler, S. G. (2000). Reduced virulence of HWP1-deficient mutants of *Candida albicans* and their interactions with host cells. *Infect Immun* **68**, 1997-2002.

Tsukahara, K., Hata, K., Nakamoto, K., Sagane, K., Watanabe, N. A., Kuromitsu, J., Kai, J., Tsuchiya, M., Ohba, F., Jigami, Y., Yoshimatsu, K. & Nagasu, T. (2003). Medicinal genetics approach towards identifying the molecular target of a novel inhibitor of fungal cell wall assembly. *Mol Microbiol* **48**, 1029-1042.

Vai, M., Orlandi, I., Cavadini, P., Alberghina, L. & Popolo, L. (1996). *Candida albicans* homologue of GGP1/GAS1 gene is functional in *Saccharomyces cerevisiae* and contains the determinants for glycosylphosphatidylinositol attachment. *Yeast* **12**, 361-368.

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.

Viudes, A., Perea, S. & Lopez-Ribot, J. L. (2001). Identification of continuous B-cell epitopes on the protein moiety of the 58-kiloDalton cell wall mannoprotein of *Candida albicans* belonging to a family of immunodominant fungal antigens. *Infect Immun* **69**, 2909-2919.

Walsh, T. J., Viviani, M. A., Arathoon, E., Chiou, C., Ghannoum, M., Groll, A. H. & Odds, F. C. (2000). New targets and delivery systems for antifungal therapy. *Med Mycol* **38**, 335-347.

Weig, M., Haynes, K., Rogers, T. R., Kurzai, O., Frosch, M. & Muhlschlegel, F. A. (2001). A GAS-like gene family in the pathogenic fungus *Candida glabrata*. *Microbiology* **147**, 2007-2019.

Whiteway, M., Dignard, D. & Thomas, D. Y. (1992). Dominant negative selection of heterologous genes: isolation of *Candida albicans* genes that interfere with *Saccharomyces cerevisiae* mating factor-induced cell cycle arrest. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 9410-9414.

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

Zink, S., Nass, T., Rosen, P. & Ernst, J. F. (1996). Migration of the fungal pathogen *Candida albicans* across endothelial monolayers. *Infect Immun* **64**, 5085-5091.

Abkürzungsverzeichnis

α -MEM	<i>minimal essential medium</i>
AS	Aminosäure
bp	Basenpaar
BSA	bovines Serumalbumin
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat (3',5'-cyclo-AMP)
cDNA	<i>copy/complementary</i> Desoxyribonukleinsäure
dH ₂ O	deionisiertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FLP	<i>site specific recombinase</i> (aus <i>S. cerevisiae</i>)
FRT	<i>FLP recognition target</i>
g	Gramm
g	Fallbeschleunigung [9,81 m/s ²]
GPI-Anker	Glykosyl-Phosphatidylinositol-Anker
h	Stunde
kb	Kilobasen (10 ³ Basen)
NaAc	Natriumacetat
M	molare Stoffkonzentration [mol/l]
min	Minute
mJ	10 ⁻³ Joule (Millijoule)
mRNA	<i>messenger RNA</i>
NaH ₂ PO ₄	Natriumdihydrogenphosphat
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
nm	Nanometer (10 ⁻⁹ m)
OD	optische Dichte
ORF	offener Leserahmen (<i>Open Reading Frame</i>)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)

RT	Raumtemperatur
RT-PCR	<i>Reverse Transkription-PCR</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNaseA	Ribonuklease A
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
s	Sekunde
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
TE	TRIS/EDTA
TRIS	Trihydroxymethylaminomethan
SDS	Sodiumdodecylsulfat
U	Unit
ü.N.	über Nacht
UV	ultraviolettes Licht
uri	Uridin (<i>uridine</i>)
Ura	Uracil
w/v	Gewichtsprozent (<i>weight/volume</i>)
V	Volt
WT	Wildtyp
YPD	<i>Yeast extract bacto Peptone Dextrose</i>
YCB	<i>Yeast Carbon Base</i>
YNB	<i>Yeast Nitrogen Base</i>

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Dimorphismus von <i>C. albicans</i>	5
Abbildung 2:	Modell der pH-abhängigen Aktivierung des Transkriptionsfaktors Rim101p.....	15
Abbildung 3:	Die Interaktion zentraler Signaltransduktionswege bei der Regulation hyphenspezifischer Gene in <i>C. albicans</i>	18
Abbildung 4:	Herstellung von <i>RBR1</i> -Deletionsmutanten mittels <i>URA3</i> -Flipper-Kassette.....	41
Abbildung 5:	Wachstums- und pH-Kurven von <i>C. albicans</i> -Stämmen.....	48
Abbildung 6:	Die pH-abhängige Transkription von <i>RIM101</i>	49
Abbildung 7:	Quantifizierung der <i>RIM101</i> -abhängigen Aktivierung von Genen.....	54
Abbildung 8:	Quantifizierung der <i>RIM101</i> -abhängigen Repression von Genen.....	57
Abbildung 9:	Nachweis der sequenziellen <i>RBR1</i> -Deletion im Southern Blot.....	59
Abbildung 10:	Filamentierungsdefekt der $\Delta rbr1$ -Mutanten bei pH 4,5.....	61
Abbildung 11:	Hypheninduktion der $\Delta rbr1$ -Mutanten nach 5 Tagen auf M-199 Softagar.....	63
Abbildung 12:	$\Delta rbr1$ zeigt eine signifikant reduzierte Virulenz gegenüber der Revertante.....	65
Abbildung 13:	<i>NRG1</i> aktiviert die Expression von <i>RBR1</i>	68
Abbildung 14:	<i>RIM101</i> reprimiert die Transkription von <i>NRG1</i>	71
Abbildung 15:	Die <i>RIM101</i> -abhängige Filamentierung korreliert mit der Expression von <i>HWP1</i> und <i>RBT1</i>	74
Abbildung 16:	Überexpression von aktivem Rim101p verstärkt die Zelladhäsion....	75
Abbildung 17:	Direkte und indirekte Interaktion von Rim101p mit morphogenetischen Prozessen in <i>C. albicans</i>	90

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Fluoreszenzfarbstoffe und Enzyme.....	22
Tabelle 2:	Reaktions-Kits	23
Tabelle 3:	<i>C. albicans</i> -Stämme	26
Tabelle 4:	Vektoren und Plasmide	27
Tabelle 5:	Primer zur Klonierung der Deletionskonstrukte und Revertanten	28
Tabelle 6:	Primer für Northern Blot-Sonden.....	28
Tabelle 7:	<i>RIM101</i> -aktivierte Gene	51
Tabelle 8:	<i>RIM101</i> -reprimierte Gene.....	52

Lebenslauf

von Henrike Lotz, geboren am 24.05.1967 in Wuppertal

Ausbildung und Berufspraxis

1973 bis 1977	Grundschule in Wuppertal
1977 bis 1986	Karl-Fuhlrott-Gymnasium in Wuppertal Abschluss: Abitur
1986 bis 1988	Studium der Sozialwissenschaften an der Bergischen Universität in Wuppertal
1988 bis 1990	Rheinische Akademie e.V. in Köln Abschluss: Biologisch-technische Assistentin
1990 bis 1992	Molekulares Forschungsprojekt „Myelodysplastische Syndrome“ am Klinikum der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Abteilung für Hämatologie, Onkologie und klinische Immunologie
1992 bis 2000	Studium der Biologie an der Heinrich-Heine-Universität in Düsseldorf, an der Universität Hohenheim in Stuttgart und an der Humboldt-Universität zu Berlin Abschluss: Diplom-Biologin
seit Mai 2000	Promotionsstudium an der Fakultät Geo- und Biowissenschaften der Universität Stuttgart und Dissertation in der Nachwuchsforschungsgruppe I <i>Genomics</i> und <i>Proteomics</i> am Fraunhofer Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik (IGB), betreut durch Dr. Steffen Rupp, Prof. Dr. Herwig Brunner

Veröffentlichungen

Henrike Lotz, Kai Sohn, Herwig Brunner, Fritz A. Mühlischlegel, Steffen Rupp. *RBR1*, a novel pH-regulated cell wall gene of *C. albicans*, is repressed by *RIM101* and activated by *NRG1*.

Das Manuskript wurde bei der *American Society for Microbiology* (ASM), Washington, DC zur Begutachtung eingereicht und zur Publikation in der Fachzeitschrift ***Eukaryotic Cell*** im Juni 2004 akzeptiert (EC00247-03).

Teile der in der vorliegenden Arbeit aufgeführten Daten sind in diesem Manuskript enthalten.