

**Die Rolle des
TEA/ATTS-Transkriptionsfaktors CaTEC1p
bei der Hyphenbildung und Virulenz
von *Candida albicans***

Den Naturwissenschaftlichen Fakultäten
der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg

zur

Erlangung des Doktorgrades

vorgelegt von

Anja Schweizer

aus Heilbronn-Neckargartach

Als Dissertation genehmigt von den Naturwissenschaftlichen Fakultäten der Universität Erlangen-Nürnberg.

Tag der mündlichen Prüfung: 24. Juli 2003

Vorsitzender der Promotionskommission: Prof. Dr. H. Kisch

Erstberichterstatter: PD Dr. J. Stülke

Zweitberichterstatter: PD Dr. med. K. Schröppel

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
I. Einleitung	2
I.1. <i>Candida albicans</i> : Kommensale und Pathogen	2
I.2. Dimorphismus und Virulenz von <i>C. albicans</i>	3
I.3. Regulation der Morphogenese in <i>C. albicans</i>	5
I.4. Regulation der Virulenz in <i>C. albicans</i>	9
I.5. <i>S. cerevisiae</i> Tec1p und die Familie der TEA/ATTS-Transkriptionsfaktoren	10
I.6. Der <i>Candida albicans</i> TEA/ATTS-Transkriptionsfaktor <i>CaTEC1</i>	11
I.7. Fragestellung	13
II. Material und Methoden	14
II.1. Material	14
II.1.1. Hefe- und Bakterienstämme	14
II.1.2. Versuchstiere	15
II.1.3. Medien, Puffer und Lösungen	15
II.1.4. Vektoren, Oligonukleotide (Primer)	17
II.1.5. Bezugsquellen	18
II.2. Methoden	19
II.2.1. Hefe- und Bakterienkultur	19
II.2.2. Peritonealexsudat-Makrophagen: Gewinnung und Kultivierung	20
II.2.3. Molekularbiologische Methoden	21
II.2.2.1. Plasmid-DNA: Isolation aus <i>E. coli</i> , Reinigung und Modifikation	21
II.2.2.2. Amplifikation und Sequenzierung von DNA	22
II.2.2.3. Transformation von DNA	23
II.2.2.4. Isolation genomischer DNA und RNA aus <i>C. albicans</i>	24
II.2.2.5. Bestimmung der Konzentration und Reinheit von Nukleinsäuren	24
II.2.2.6. Elektrophorese von Nukleinsäuren, Gelextraktion	25
II.2.2.7. Southern Blot	25
II.2.2.8. Northern Blot	26
II.2.3. Infektionsversuche	26
II.2.3.1. Makrophageninfektion <i>in vitro</i>	26
II.2.3.2. Mausinfektionen	26
II.2.4. Bilddokumentation	28

III.	Ergebnisse	29
III.1.	Expressionsanalysen: <i>CaTEC1</i> -regulierte hyphenspezifische Gene	29
III.2.	<i>catec1/catec1</i> -Mutante: Virulenzcharakterisierung.....	32
III.3.	Bestimmung der Position von CaTec1p in den morphogenetischen Signaltransduktionswegen von <i>C. albicans</i>	36
III.3.1.	Phänotypvergleich verschiedener Signaltransduktionsmutanten mit dem <i>catec1/catec1</i> -Phänotyp <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	36
III.3.2.	Expressionsanalysen	37
III.3.3.	Epistase-Analysen	38
III.3.4.	<i>CaTEC1</i> -induzierte Filamentation und Virulenzreaktivierung in der <i>efg1/efg1 cph1/cph1</i> -Doppelmutante	45
III.3.4.1.	Beschreibung der Phänotypvarianten CaAS25 sm und CaAS25 ^{wr}	45
III.3.4.2.	<i>CaTEC1</i> -induzierte Filamententwicklung in der nichtfilamentösen <i>efg1/efg1 cph1/cph1</i> -Mutante	49
III.3.4.3.	Virulenzreaktivierung in der <i>efg1/efg1 cph1/cph1</i> -Mutante in <i>in vitro</i> - und <i>in vivo</i> -Infektionsversuchen	51
III.3.5.	Virulenzverstärkung von <i>C. albicans</i> durch <i>CaTEC1</i> -Überexpression	56
IV.	Diskussion	58
IV.1.	Der <i>C. albicans</i> TEA/ATTS-Transkriptionsfaktor CaTec1p	58
IV.2.	CaTec1p übernimmt regulatorische Funktionen bei der Virulenz von <i>C. albicans</i>	59
IV.3.	Die morphogenetischen Signaltransduktionswege von <i>C. albicans</i> konvergieren auf CaTec1p	61
IV.4.	<i>CaTEC1</i> reaktiviert die Virulenz der <i>efg1/efg1 cph1/cph1</i> -Mutante	63
IV.5.	Morphogenese und Virulenz	64
IV.6.	Die Rolle des TEA/ATTS-Transkriptionsfaktors CaTec1p bei der Hyphenbildung und Virulenz von <i>C. albicans</i>	65
	Literaturverzeichnis	68

Zusammenfassung

Die Fähigkeit des humanpathogenen Pilzes *Candida (C.) albicans*, seine Zellmorphologie zwischen einer Hefe- und einer Hypheform zu wechseln (Dimorphismus), wird als eine wichtige Virulenzeigenschaft angesehen. Im Verlauf solcher morphologischer Entwicklungsprozesse wird die räumliche und zeitliche Expression von phasenspezifischen Genen in Pilzen, wie auch in höheren Eukaryonten, von Transkriptionsfaktoren kontrolliert. In *C. albicans* wurde ein neues Mitglied der Familie der TEA/ATTS-Transkriptionsfaktoren identifiziert [1, 2]. Entsprechend seiner funktionellen Homologie zum *Saccharomyces (S.) cerevisiae* *TEC1* wurde dieses Gen *C. albicans* *TEC1* (*CaTEC1*) genannt. *CaTEC1* wird vorwiegend in der Hyphenphase von *C. albicans* exprimiert. Zudem weist eine homozygote *catec1/catec1*-Mutante *in vitro* Defekte in der Hyphenbildung auf. Diese Daten deuten bereits darauf hin, daß *CaTEC1* eine wichtige regulatorische Funktion bei der Hyphenentwicklung von *C. albicans* erfüllt. Im Rahmen der hier vorgelegten Dissertation wird darüberhinaus gezeigt, daß *C. albicans* in Abwesenheit von *CaTEC1* Virulenzdefizienzen aufweist. In der *catec1/catec1*-Mutante werden wichtige Virulenzfaktoren, wie die hyphenspezifischen Proteinase-Gene *SAP4*, *SAP5* und *SAP6* nicht mehr exprimiert und die Evasion aus Makrophagen ist *in vitro* supprimiert. In einem systemischen Modell der murinen Kandidose ist die Virulenz der *catec1/catec1*-Mutante attenuiert, obwohl sie *in vivo*, in den infizierten Organen und auf dem vaginalen Epithel, hyphenähnliche Zellformen ausbildet. Des Weiteren konnte gezeigt werden, daß die morphogenetischen Defekte und Virulenzdefizienzen von *C. albicans*-Stämmen mit Mutationen in den Signalkaskaden der Hyphenbildung - welche Ras1p, eine MAPK-Kaskade und einen cAMP-Signaltransduktionsweg umfassen - durch die kontrollierte Überexpression von *CaTEC1* kompensiert werden. Außerdem wird die Virulenz eines *C. albicans* Wildtyp-Stammes durch die *CaTEC1*-Überexpression verstärkt. Aus diesen Resultaten konnte geschlossen werden, daß die diversen Signaltransduktionswege auf dem Transkriptionsfaktor CaTec1p konvergieren, um die Aktivierung ausgewählter Virulenzgene sicherzustellen, die essentiell für die Pathogenität von *C. albicans* sind. Den TEA/ATTS-Transkriptionsfaktoren wurden bisher nur regulatorische Funktionen in Entwicklungsprozessen zugeschrieben. In dieser Arbeit wurde mit dem *C. albicans* Transkriptionsfaktor CaTec1p zum ersten Mal ein Mitglied dieser Familie identifiziert, das eine zentrale Rolle als Virulenzregulator in der mikrobiellen Pathogenität übernimmt.

I. Einleitung

I.1. *Candida albicans*: Kommensale und Pathogen

C. albicans ist ein opportunistischer, aber auch fakultativ pathogener Sproßpilz. Er besiedelt den Magen-Darm-Trakt von Säugetieren (u.a. Mensch, Meerschweinchen, Maus) und andere Schleimhautoberflächen (z.B. Mundhöhle, Nasen-Rachen-Raum, Urogenitaltrakt). Die Tatsache, daß sich *C. albicans* neben anderen Mikroorganismen in der normalen Flora etablieren kann und nicht vom Immunsystem des Wirts eliminiert wird, spricht für eine hochentwickelte Anpassung dieses Kommensalen an seinen Wirtsorganismus.

C. albicans ist jedoch auch der am häufigsten aus Patienten isolierte pathogene Pilz und gehört nach den *Enterobacteriaceae*, *Staphylococcus aureus* und *Pseudomonas spp.* zu den vier am häufigsten auftretenden nosokomialen Infektionen in Krankenhäusern [3]. Studien unserer Arbeitsgruppe zufolge erwerben die Patienten den die Infektion verursachenden *C. albicans*-Stamm jedoch nicht erst im Krankenhaus (nosokomiale Infektion), sondern die Infektion erfolgt offensichtlich durch den bereits im Patienten als Kommensalen etablierten *C. albicans*-Stamm [4].

Als prädisponierend für *Candida*-Infektionen wurden verschiedene Typen von Faktoren definiert [5]: (1) natürliche Faktoren, wie mikrobielle (z.B. bakterielle) Infektionen, Diabetes, Lymphozytendefekte oder Reduktion der Lymphozytenzahl (z.B. AIDS), Phagozytenabnormalitäten und das Alter der Patienten (Kindesalter oder hohes Alter), (2) mechanische Faktoren, wie Trauma, Verbrennungen, Wunden und Prothesen (z.B. Zahnprothesen) und (3) iatrogene (durch ärztliche Behandlung ausgelöste) Faktoren, wie Antibiotika, Immunsuppressiva, Operationen und das Einsetzen körperfremder Apparaturen (z.B. Katheter). Begünstigt durch diese Faktoren kann es zu Infektionen (Kandidiasis) der Haut und Schleimhäute, aber auch zu tiefen Organmykosen und systemischen Infektionen kommen [6], deren Mortalitätsrate bei bis zu 44% liegt [7].

Für das Auftreten einer Kandidiasis ist nicht nur das geschwächte Immunsystem des Wirtes verantwortlich. Ebenso ist die Fähigkeit von *C. albicans*, von dem oberflächlich kolonisierten Epithel in das Wirtsgewebe einzudringen, eine wichtige Voraussetzung für eine Infektion. Diese Fähigkeit wird in *C. albicans* hauptsächlich durch die Bildung von Hyphen vermittelt. Die Kompetenz zur Hyphenentwicklung wird daher neben der Fähigkeit zur Adhäsion als eine essentielle Virulenzeigenschaft von *C. albicans* angesehen.

I.2. Dimorphismus und Virulenz von *C. albicans*

C. albicans ist ein dimorpher Pilz. Er ist in der Lage, reversibel zwischen einer einzelligen knospenden Hefeform (Blastosporen) (Abb. I-1, a) und zwei unterschiedlichen filamentösen Formen, Pseudohyphen und Hyphen, zu wechseln. Pseudohyphen entstehen durch apikales Knospen aus der Hefezelle. Im Gegensatz zu den Blastosporen trennen sich Mutter- und Tochterzelle jedoch nach der Zellteilung nicht voneinander. So entstehen durch kontinuierliche polare Knospungen verzweigte Ketten aus unterschiedlich langen Pilzzellen, die durch Zellwand-Einschnürungen (Konstriktionen) am Ort der Zellteilung mikroskopisch gut zu erkennen sind (Abb. I-1, b). Die sogenannten „echten“ Hyphen wachsen polar als apikale Keimschläuche aus der Hefezelle aus und entwickeln sich zu langen verzweigten Filamenten. Das Zellwachstum und die Zellteilung erfolgen nahe der Hyphenspitze [8] und die einzelnen Zellen sind durch parallel angeordnete Septen voneinander getrennt. Bei dieser filamentösen Form sind mikroskopisch keine Konstriktionen zu erkennen (Abb. I-1, c).

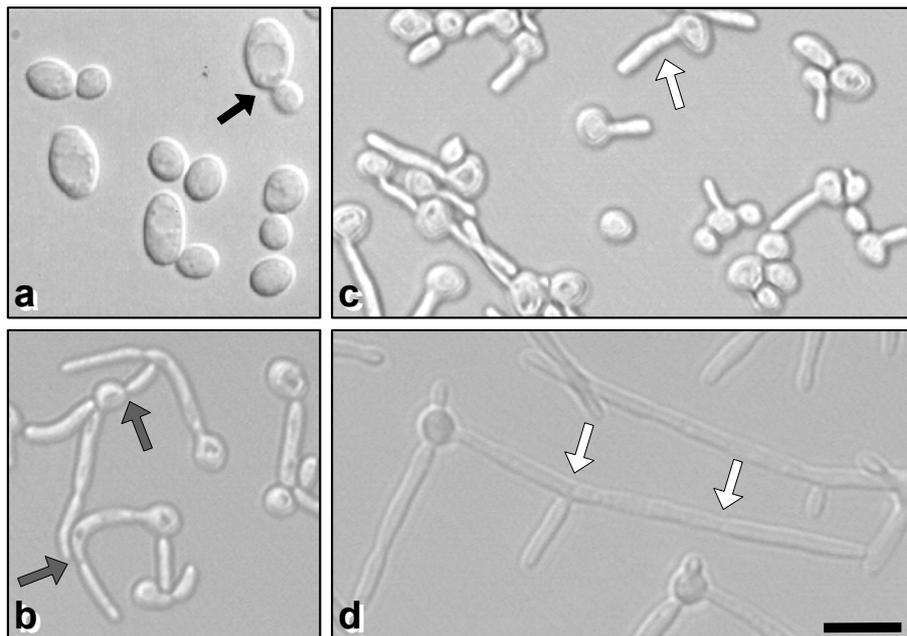


Abb. I-1: Wachstumsformen von *C. albicans*

C. albicans kann seine Morphologie reversibel zwischen einer Hefeform (a) und filamentösen Formen (b – d) wechseln (Maßstab entspricht 5µm). Hefezellen replizieren durch Knospung (schwarzer Pfeil in a), wobei sich die Tochterzelle nach der Mitose von der Mutterzelle ablöst. Pseudohyphen entstehen, indem sich die Tochterzellen nach der Teilung nicht von der Mutterzelle lösen. Die entstehenden Zellketten sind durch Einkerbungen der Zellwand am Ort der Zellteilung (Konstriktionen) charakterisiert (graue Pfeile in b). Die Bildung „echter“ Hyphen beginnt mit dem apikalen Auswachsen eines Keimschlauchs aus der Hefezelle (weißer Pfeil in c). Die Zellteilung findet direkt hinter der Hyphenspitze statt und geht mit der Bildung von Septen einher (weiße Pfeile in d). Es entstehen lange verzweigte Filamente, die keine Konstriktionen aufweisen.

Die morphogenetische Transition von der Hefeform in die filamentösen Formen wird unter *in vivo*-Bedingungen im Wirtsorganismus induziert und entsprechend findet man in den infizierten Geweben neben knospenden Zellen beide filamentösen Formen von *C. albicans* [9]. Die Invasion in das Wirtsgewebe wird in der Hyphenphase durch unterschiedliche Mechanismen vermittelt. Zum einen findet das Wachstum polarisiert an der Spitze der Hyphe statt. Dadurch entsteht ein biomechanischer Druck, der die Penetration des Wirtsepithels durch das Filament ermöglicht [10]. In der Hyphenform ist *C. albicans* in der Lage, Oberflächenbeschaffenheiten zu erkennen (Thigmotropismus) [11, 12]. Diese Eigenschaft dient im Wirt höchstwahrscheinlich dazu, geschwächte Stellen im Epithel zu erkennen, die für eine Invasion in das Gewebe geeignet sind. Zum anderen werden an der Spitze der Hyphe Enzyme sekretiert, die Proteine, Lipide und andere zelluläre Komponenten degradieren und somit die Invasion in das geschädigte Wirtsgewebe ermöglichen [13]. Von denselben hyphenvermittelten Mechanismen wird vermutet, daß sie *C. albicans* dazu dienen, der initialen Immunabwehr des Wirtsorganismus zu entkommen [14]. Diese wird in erster Linie von polymorphnukleären Phagozyten [15] und Monozyten/Makrophagen [16] vermittelt. *In vitro* wurde gezeigt, daß *C. albicans*-Zellen nach der Phagozytose durch Makrophagen (M Φ) Hyphen bilden, die die Makrophagenmembran von innen durchstoßen und somit die Evasion der Pilzzellen aus diesen Phagozyten ermöglichen [17].

Die Hefe-Hyphe-Morphogenese scheint nicht nur wegen der morphologischen Veränderung eine bedeutende Rolle für die Virulenz von *C. albicans* zu spielen. Die Entwicklung von Hyphen geht außerdem mit der Expression wichtiger Virulenzfaktoren einher. Als Virulenzfaktoren werden nach den molekularen Koch'schen Postulaten [18] die Gene und deren Produkte definiert, deren Deletion oder „*loss of function*“-Mutation eine meßbare Abschwächung der Virulenz des untersuchten Pathogens verursacht. Zu diesen nur in der Hyphenphase exprimierten (sogenannten hyphenspezifischen) Virulenzfaktoren gehören in *C. albicans* die sekretierten Aspartyl-Proteinasen Sap4p, Sap5p und Sap6p [19]. Diese Proteinase werden an der Spitze der Hyphen sekretiert, die in engem Kontakt mit dem Wirtsepithel [20] oder Immunzellen des Wirtes stehen [20, 21]. *sap4-6* Triplemutanten zeigen eine verringerte Fähigkeit zur Invasion in das Wirtsgewebe [20] und ihre Virulenz ist im Modell der systemischen Mausinfektion inhibiert [22]. Andere hyphenspezifische Virulenzfaktoren von *C. albicans* sind neben den übrigen sieben Mitgliedern der Familie der Sekretierten Aspartyl-Proteinasen [23] weitere hydrolytische Enzyme (z.B. Phospholipasen [24] und sekretierte Lipasen [25]) und adhäsionsvermittelnde Proteine, wie z.B. die Mitglieder der *ALS* (*agglutinin-like sequence*)-Familie [26] und die Adhäsine Ala1p (*agglutinine-like adhesine*) und Hwp1p (*hyphal wall*

protein) [27].

Die Morphogenese und Expression von Virulenzfaktoren scheinen wie die Adhäsion und der Thigmotropismus an bestimmte Stadien der Infektion adaptiert, jedoch wirken alle diese Virulenzeigenschaften zusammen, um *C. albicans* das Etablieren und das Fortschreiten eines Infektionsprozesses im Wirt zu ermöglichen [14, 28].

1.3. Regulation der Morphogenese in *C. albicans*

Die Hefe-Hyphe-Morphogenese geht in *C. albicans* mit der Expression von wichtigen Virulenzfaktoren einher, die die Adhäsion an und die Invasion in das Wirtsgewebe vermitteln. Diese Virulenzeigenschaften scheinen in *C. albicans* koreguliert zu sein. Es wurde gezeigt, daß Mutanten mit Defekten in der morphogenetischen Entwicklung zumeist auch Virulenzdefizienzen aufweisen [2, 29-31]. Um Erkenntnisse über die Virulenz von *C. albicans* zu erhalten, wurde daher ein Schwerpunkt der Forschung auf die Regulation der Morphogenese von *C. albicans* gelegt. In *C. albicans* scheint die Hefe-Hyphe-Transition sehr komplex reguliert zu sein, da mindestens fünf verschiedene Signaltransduktionswege für die Übermittlung unterschiedlichster hypheninduzierender Signale zuständig sind [32]. Diese Signaltransduktionswege bilden offenbar ein verzweigtes Netzwerk, in dem einzelne unabhängige Wege entweder direkt miteinander verknüpft sind oder bei der Aktivierung bestimmter hyphenspezifischer Gene zusammenwirken [33]. Diese komplexe Signalweiterleitung dient *C. albicans* anscheinend um zu differenzieren, welche Zellmorphologie für das Überleben in der jeweiligen Umgebung des Wirtsorganismus (Schleimhautoberfläche, Blut, Gewebe) optimal geeignet ist [34].

Die Entwicklung von Hyphen wird in *C. albicans* durch unterschiedliche Signale induziert [5, 35]. Dazu gehören u.a. nährstoffbedingte Signale, wie Kohlenstoff- oder Stickstoffmangel, geringe Sauerstoffkonzentrationen, pH-Werte über 6,5 und Temperaturen über 35°C. Serum ist einer der stärksten Induktoren der Hyphenbildung. Um die morphogenetische Entwicklung auszulösen reichen diese Faktoren einzeln jedoch nicht aus, sondern es müssen immer Kombinationen hypheninduzierender Signale in der Umgebung vorhanden sein [5]. Temperaturen um 37°C und die Anwesenheit von Serum entsprechen den physiologischen Bedingungen, die *C. albicans* in einem Wirtsorganismus antrifft. Entsprechend findet man in infizierten Geweben neben knospenden Hefezellen überwiegend filamentöse Formen von *C. albicans* [9].

Hypheninduzierende Signale werden von noch unbekanntem Oberflächenrezeptoren über die entsprechenden Signaltransduktionswege in die Zelle und den Zellkern übermittelt, um dort

die Expression hyphenspezifischer Gene zu regulieren. Die Identifizierung einzelner Komponenten spezifischer Signaltransduktionswege und morphogenetischer Regulatoren erfolgt zumeist durch die Deletion einzelner Zielgene und die Charakterisierung der generierten Mutanten in Bezug auf ihre morphogenetische Entwicklung. Diese Phänotypisierungen erfolgt *in vitro* in spezialisierten Medien, die die spezifischen hypheninduzierenden Bedingungen artifizial nachahmen (z.B. Stickstoffmangelmedien, mit Serum ergänzte Vollmedien und Inkubation bei 37°C).

Es scheint, daß jeder der in *C. albicans* identifizierten Signaltransduktionswege eine gewisse Spezialisierung in Bezug auf die weitergeleiteten hypheninduzierenden Signale aufweist [36] (Abb. 1-2, grüne Pfeile und Beschriftung). So erfolgt z.B. die Aktivierung pH-responsiver hyphenspezifischer Gene über den Transkriptionsfaktor Rim101p, der am Ende eines konservierten pH-Signaltransduktionsweges liegt [37]. Nicht nur die Aktivierung, sondern auch die negative Regulation spielt eine wichtige Rolle bei der Kontrolle der *C. albicans* Morphogenese. So wurden mit *CaTUP1* und *CaNRG1* Repressoren der Hyphenentwicklung identifiziert, deren Deletion zur konstitutiven Filamentbildung von *C. albicans*-Zellen führt [38-40].

Bisher wurden die meisten Daten bezüglich der Signaltransduktion in *C. albicans* erhalten, indem Vorergebnisse aus der Forschung an dem Modellorganismus *Saccharomyces (S.) cerevisiae* als Anhaltspunkte herangezogen wurden. *S. cerevisiae* wächst in Anwesenheit von Stickstoff in Form von Hefezellen, unter Stickstoffmangel-Bedingungen wird jedoch die Entwicklung von Pseudohyphen induziert [41]. Viele Komponenten der Signaltransduktionswege in *C. albicans* weisen einen hohen Grad an Sequenz- und zumeist auch Funktionshomologien zu Komponenten der Signaltransduktionswege in *S. cerevisiae* auf [34]. Der erste Signaltransduktionsweg, der infolge genetischer „Screens“ von *S. cerevisiae* in *C. albicans* identifiziert wurde, war der Cph1p-abhängige MAPK (Mitogen-aktivierte Proteinkinase)-Signaltransduktionsweg (Abb. 1-2). Die MAPK-Kaskade unterhalb des „small rho-like G-protein“ CaCdc42p [42, 43] ist in *C. albicans* aus der p21-aktivierten Kinase Cst20p [44, 45], dem MAP Kinase Kinase Kinase-Homolog CaSte11p [30], dem MAP Kinase Kinase-Homolog Hst7p [45] und dem MAP Kinase-Homolog Cek1p [46] zusammengesetzt. Unterhalb der MAPK-Kaskade liegt in *C. albicans* der terminale Transkriptionsfaktor Cph1p (*Candida pseudohyphal regulator*), ein funktionelles Homolog zum unterhalb der MAPK-Kaskade in *S. cerevisiae* liegenden Transkriptionsfaktor Ste12p [47]. Ste12p ist in *S. cerevisiae* an der Aktivierung von Genen beteiligt, die für die Filamentbildung und das invasive Wachstum infolge nährstoffbedingtem Streß, wie z.B. Stickstoffmangel, relevant sind [48, 49]. Die Charakterisierung von *C. albicans*-Mutanten mit Deletionen einzelner Komponenten der MAPK-

Kaskade, z.B. *cst20/cst20* oder *hst7/hst7* [45], oder des terminalen Transkriptionsfaktors Cph1p [47] zeigte, daß dieser Signaltransduktionsweg in *C. albicans* ebenfalls eine Rolle bei der Hyphenentwicklung spielt. Die untersuchten Mutanten wiesen Defekte in der morphogenetischen Entwicklung auf und waren nur noch zur Bildung von Pseudohyphen in der Lage. Allerdings sind diese Phänotypen auf spezifischen Wachstumsbedingungen, wie Stickstoffmangel beschränkt. Die Hyphenentwicklung nach Induktion mit Serum ist in diesen Mutanten nicht beeinträchtigt [44, 45, 47]. Auch ist die Expression hyphenspezifischer Gene, wie z.B. *ALS8* und *HWP1* in der *cph1/cph1*-Mutante nicht inhibiert [50, 51]. Der Cph1p-abhängige MAPK-Signaltransduktionsweg scheint in *C. albicans* demnach lediglich für die Übermittlung nährstoffbedingter hypheninduzierender Signale zuständig zu sein (Abb. I-2).

Eine entscheidende Rolle für die morphogenetische Entwicklung nicht nur von *C. albicans*, sondern auch von *S. cerevisiae* und anderen Pilzen, spielt der konservierte cAMP-Signaltransduktionsweg [52]. Die Schlüsselkomponente dieses Signaltransduktionsweges in *C. albicans*, der terminale bHLH (*basic helix-loop-helix*) Transkriptionsfaktor Efg1p (*enhanced filamentous growth*), wurde identifiziert, da er in *S. cerevisiae* verstärktes filamentöses Wachstum auslöste [31]. Efg1p bindet an regulatorische Sequenzen, sogenannte „E-boxes“, in den Promotoren hyphenspezifischer Gene, wie z.B. *HWP1*, *ALS3* und *ALS8* [53]. Die Expression dieser Gene wird unter hypheninduzierenden Bedingungen nach Deletion von *EFG1* nicht mehr aktiviert. Weiterhin sind die Zellen einer *efg1/efg1*-Mutante nicht mehr in der Lage, *in vitro* unter verschiedensten hypheninduzierenden Bedingungen (alkalischer pH-Wert, Stickstoffmangel) und auch nach Induktion mit Serum bei 37°C (stringenteste hypheninduzierende Bedingungen), echte Hyphen zu entwickeln [29, 31]. Efg1p wird daher als essentieller Regulator der morphogenetischen Entwicklung von *C. albicans* angesehen [29, 31]. Die Aktivierung von Efg1p erfolgt höchstwahrscheinlich durch das oberhalb von Efg1p im cAMP-Signaltransduktionsweg positionierte Adenylatcyclase (Cdc35p)/Proteinkinase A (PKA)-Modul [54, 55] (Abb. I-2).

In *S. cerevisiae* ist der cAMP-Signaltransduktionsweg nicht wie der MAPK-Signaltransduktionsweg nur an der Regulation der Filamentation beteiligt, sondern essentiell für das Wachstum [56]. Seine Aktivierung wird daher durch zwei funktionelle Ras-Homologe, Ras1p und Ras2p, gewährleistet, die beide in der Lage sind, die Adenylatcyclase CDC35p zu aktivieren [57]. Ras2p, nicht aber Ras1p, kontrolliert die Filamentation von *S. cerevisiae* außerdem durch die Aktivierung des MAPK-Signaltransduktionswegs [58]. In *C. albicans* wurde nur ein Ras-Homolog, Ras1p identifiziert [59]. Eine *ras1/ras1*-Mutante von *C. albicans* ist lebensfähig, weist jedoch Defekte in der Hyphenentwicklung nach Seruminduktion auf [59]. Equiva-

lent zum *S. cerevisiae* Ras2p konnte für Ras1p gezeigt werden, daß es in *C. albicans* Signale auf beide morphogenetischen Signaltransduktionswege vermittelt [30]. Ras1p aktiviert sowohl die MAPK-Kaskade über CaCdc42p als auch den cAMP-Weg über das Adenylatcyclase (Cdc35p)/Proteinkinase A (PKA)-Modul [54, 55] (Abb. I-2). Damit nimmt Ras1p eine wichtige Rolle als übergeordneter Regulator dieser beiden Signaltransduktionswege von *C. albicans* ein. Da die induzierte Expression von Ras1p auch in Abwesenheit von *EFG1* und *CPH1* die morphogenetische Entwicklung aktivieren kann, wird postuliert, daß Ras1p auch noch einen dritten, proximal abzweigenden Signaltransduktionsweg reguliert [60].

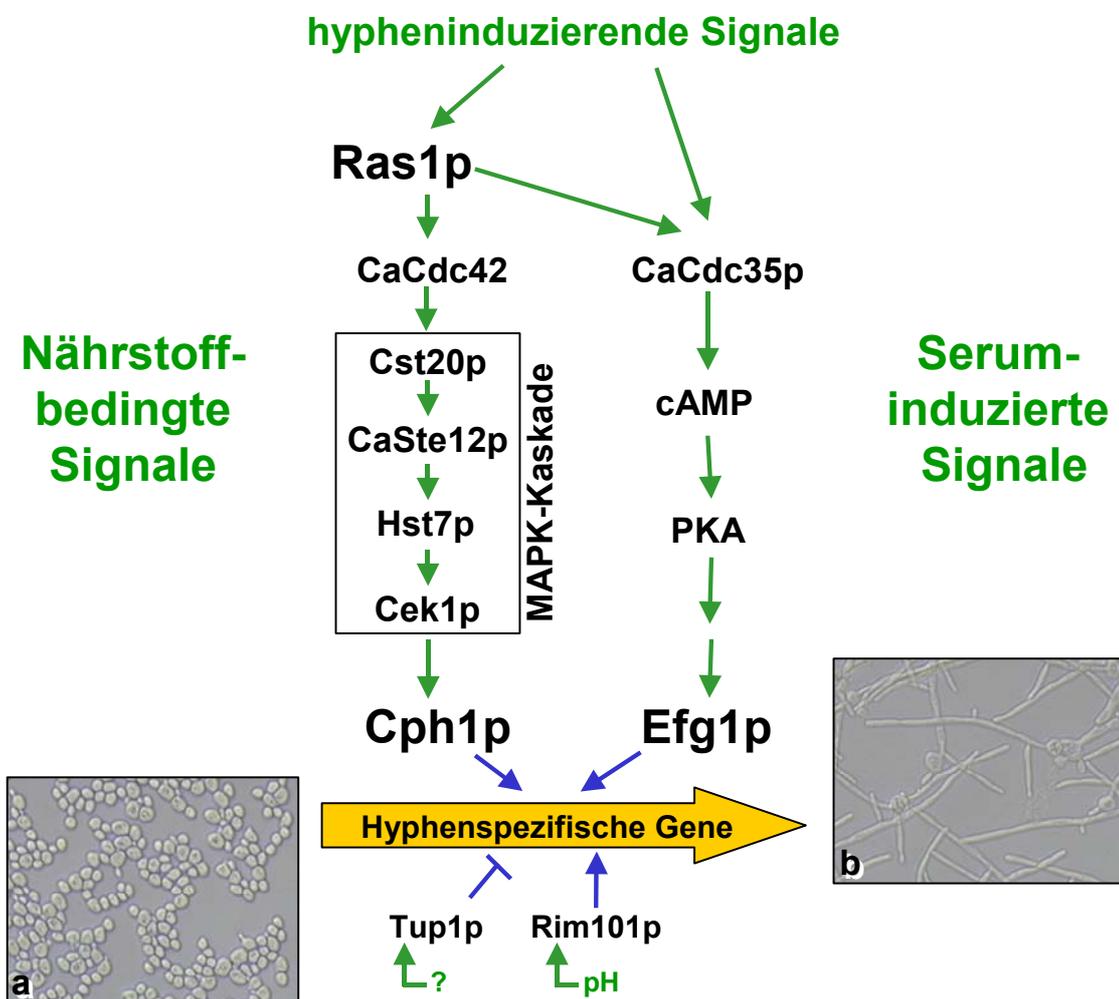


Abb. I-2: Signaltransduktionswege der Morphogenese in *C. albicans*

Signale (grün eingerahmte Schrift), die die Transition von *C. albicans*-Zellen aus der Hefe- (a) in die Hyphephase (b) induzieren, werden über verschiedene Signaltransduktionswege vermittelt (grüne Pfeile). Ras1p überträgt hypheninduzierende Signale auf zwei für die Morphogenese von *C. albicans* essentielle Signaltransduktionswege. Nährstoffbedingte hypheninduzierende Signale werden über die MAPK-Kaskade (schwarz eingerahmter Kasten) auf den terminalen Transkriptionsfaktor Cph1p übertragen. Stringente induzierende Signale, wie die Anwesenheit von Serum, werden über den cAMP-Weg auf den terminalen Transkriptionsfaktor Efg1p übermittelt. Die Transkriptionsfaktoren Cph1p und Efg1p kontrollieren (blaue Pfeile) die Expression von spezifischen Genen, die ausschließlich in der Hyphephase exprimiert werden (gelber Pfeil).

I.4. Morphogenetische Signaltransduktion und Virulenz

C. albicans-Mutanten mit Defekten in der morphogenetischen Entwicklung weisen zumeist auch Virulenzdefizienzen auf [29-31]. Aus diesen Ergebnissen wurde geschlossen, daß die Morphogenese und deren Regulation in direktem Zusammenhang mit der Virulenz von *C. albicans* steht [29]. Die beiden morphogenetischen Signaltransduktionswege haben unterschiedliche Bedeutungen für die Virulenz von *C. albicans*. Die Deletion einzelner Komponenten der MAPK-Kaskade (z.B. *HST7*) oder des terminalen Transkriptionsfaktors Cph1p bewirken keine Inhibition der Virulenz von *C. albicans* in systemischen Mausinfektionsmodellen [29, 45]. Ebenso ist die hyphenvermittelte Evasion aus M Φ in der *cph1/cph1*-Mutante *in vitro* nicht beeinträchtigt [29]. Im Gegensatz zum MAPK-Signaltransduktionsweg scheint der Efg1p-abhängige cAMP-Signaltransduktionsweg an der Regulation der Virulenz von *C. albicans* beteiligt zu sein. Die Deletion des terminalen Transkriptionsfaktors *EFG1* resultiert nicht nur in Defekten in der Hyphenbildung, sondern hat auch Virulenzdefizienzen zur Folge. *C. albicans efg1/efg1*-Mutanten sind nicht mehr in der Lage, *in vitro* aus M Φ auszubrechen und weisen eine attenuierte Virulenz in systemischen Mausinfektionsmodellen auf [29]. Einen vergleichbaren Phänotyp weisen *C. albicans*-Zellen auf, in denen der übergeordnete Regulator Ras1p deletiert wurde. *ras1/ras1*-Mutanten sind nicht mehr zur hyphenvermittelten Evasion aus M Φ fähig und ihre Virulenz ist in murinen systemischen Infektionsmodellen ebenfalls attenuiert [30].

Den deutlichsten Phänotyp in Bezug auf die Morphogenese und Virulenz von *C. albicans* zeigt die *efg1/efg1 cph1/cph1*-Doppelmutante [29]. In dieser Mutante sind beide morphogenetischen Signaltransduktionswege, der MAPK- und der cAMP-Signaltransduktionsweg unterbrochen. Die *efg1/efg1 cph1/cph1*-Mutante ist *in vitro* unter allen hypheninduzierenden Bedingungen, auch in Gegenwart der stringentesten hypheninduzierenden Signale Serum und Temperaturen von 37°C, nichtfilamentös, d.h. nicht mehr in der Lage, Keimschläuche und Filamente zu entwickeln [29]. Diese Mutante ist nicht zur Evasion aus M Φ fähig und ihre Virulenz ist im systemischen Mausinfektionsmodell vollständig inhibiert [29]. Aus diesen Ergebnissen wurde die Schlußfolgerung gezogen, daß nichtfilamentöse *C. albicans*-Mutanten avirulent sind [29].

I.5. S. cerevisiae Tec1p und die Familie der TEA/ATTS-Transkriptionsfaktoren

Die Komponenten des MAPK-Signaltransduktionsweges in *C. albicans* weisen einen hohen Grad an Sequenz- und Funktionshomologien zu Komponenten des MAPK-Signaltransduktionsweges in *S. cerevisiae* auf [34]. Die terminalen Transkriptionsfaktoren dieser MAPK-Kaskaden, Ste12p in *S. cerevisiae* und das funktionelle *C. albicans*-Homolog Cph1p sind beide an der Regulation der morphogenetischen Entwicklung dieser Pilze beteiligt [47, 61]. Ste12p kontrolliert in *S. cerevisiae* die Pseudohyphenbildung und die Expression von Insertions-Mutationen durch das Retrotransposon Ty1 (*transposons in yeast*) [62]. Jedoch reguliert Ste12p nicht alleine die Aktivierung der Gene, die Ty1 infolge der Insertion nachgeschaltet sind. In dem sogenannten „Ste12p *responsiv element*“ (SRE), das in der regulatorischen Sequenz von Ty1 liegt, wurde neben der Bindestelle für Ste12p (*pheromon response element*, PRE) [63] auch eine sogenannte TEA/ATTS-Konsensus-Sequenz (TCS) identifiziert [64]. Bei der Suche nach dem TCS-bindenden Protein wurde der Transkriptionsfaktor Tec1p (*Ty1 enhancement control*) identifiziert, der als zweites transaktivierendes Protein im Komplex mit Ste12p die Expression Ty1-nachgeschalteter Gene kontrolliert [64-66].

Dieser *S. cerevisiae* Transkriptionsfaktor Tec1p gehört zur Familie der TEA/ATTS-Transkriptionsfaktoren. Mitglieder dieser Familie wurden außer in Pilzen auch in Säugetieren, Vögeln, Nematoden und Insekten identifiziert. Allen gemeinsam ist der Besitz einer spezifischen, evolutionär konservierten DNA-Bindedomäne. Diese besteht aus einem N-terminalen Block von 66-76 Aminosäuren und wird als TEA (TEF-1, Tec1p, AbaAp)- oder ATTS (AbaAp, TEF-1, Tec1p und *scalloped*)-Domäne bezeichnet [67]. Diese Domäne vermittelt die Bindung an spezifische regulatorische Promotorsequenzen mit den konservierten Basenabfolgen 5'-CATTCC-3' oder 5'-CATTCT-3', genannt TEA/ATTS-Konsensus-Sequenzen (TCS) [48, 66, 68, 69]. Die TEA/ATTS-Transkriptionsfaktoren wurden funktionell als Regulatoren von Entwicklungsprozessen charakterisiert, d.h. sie kontrollieren die räumliche und zeitliche Expression von stadienspezifischen Genen, z.B. während der Anpassung an bestimmte Umweltbedingungen oder während der Organo- und Embryogenese. Bisher sind vier humane TEA/ATTS-Transkriptionsfaktoren bekannt, die unterschiedliche Funktionen während der Entwicklung übernehmen, darunter der Enhancer-Faktor TEF-1, der an der Regulation der Myogenese und Cardiogenese beteiligt ist [70, 71]. Als wichtiges Beispiel aus Insekten ist *scalloped* zu nennen, das eine regulatorische Funktion bei der zellspezifischen Genexpression während der Flügel- und Neuralentwicklung von *Drosophila melanogaster* übernimmt [72, 73].

In dem filamentösen Pilz *Aspergillus (A.) nidulans* wurde der TEA/ATTS-Transkriptionsfaktor *abacus* (AbaAp) identifiziert, der an der Entwicklung des vielzelligen sporeproduzierenden Apparates, der Konidiphore beteiligt ist [68]. Die Expression von AbaAp führt zur Einstellung des einzelligen vegetativen Wachstums von *A. nidulans* und zur Induktion der asexuellen Sporenbildung. Daher wird die Transkription von AbaAp und seinem Aktivator BrlAp in der vegetativen Phase höchstwahrscheinlich von StuAp (einem Homolog zum *C. albicans* Efg1p) reprimiert [74]. Nach der Aktivierung der AbaAp-Expression durch den Transkriptionsfaktor BrlAp reguliert AbaAp die eigene und die AbaAp-Expression über einen positiven Rückkopplungsmechanismus [68]. Außerdem induziert AbaAp zusammen mit BrlAp die Expression von Strukturgenen, die zur Bildung der Konidiphore notwendig sind [74, 75].

Die Expression des *A. nidulans* TEA/ATTS-Transkriptionsfaktors AbaAp induzierte in *S. cerevisiae* die Bildung von Pseudohyphen [76]. Daraus schlossen die Autoren, daß ein zum AbaAp homologes Protein in *S. cerevisiae* vorhanden ist und eine Rolle bei der morphogenetischen Entwicklung übernimmt. Diese Hypothese wurde in Form des einzigen in *S. cerevisiae* identifizierten TEA/ATTS-Transkriptionsfaktors Tec1p bestätigt, der bis zu diesem Zeitpunkt nur als transaktivierender Faktor bei der Ty1 Insertions-Mutagenese bekannt war [64-66]. Homozygote *tec1/tec1*-Mutanten waren nicht mehr in der Lage, unter Stickstoffmangel-Bedingungen Pseudohyphen zu entwickeln [76]. Neben dem Transkriptionsfaktor Ste12p wurde somit der TEA/ATTS-Transkriptionsfaktor Tec1p als ein weiterer Regulator der Pseudohyphenentwicklung charakterisiert.

Wie für die Expression der Ty1 Insertions-Mutationen konnte auch für die Transkription pseudohyphenspezifischer Gene in *S. cerevisiae* gezeigt werden, daß diese von Ste12p und Tec1p gemeinsam reguliert wird. Die beiden Transkriptionsfaktoren bilden einen heterodimeren Komplex, der in den Promotoren der Zielgene an das *filamentation and invasion response element* (FRE) bindet [48]. Dieses „Enhancer“-Element setzt sich aus einer Bindestelle für Ste12p (PRE) und einer Bindestelle für Tec1p (TCS) zusammen [48]. FRE-Sequenzen sind Genen vorgeschaltet, die für das invasive Wachstum haploider *S. cerevisiae*-Zellen und die Entwicklung von Pseudohyphen aus diploiden Zellen zuständig sind [48, 76], u.a. *FLO11*, das für ein Zelloberflächen-Flocculin von *S. cerevisiae* kodiert [77, 78].

I.6. Der *Candida albicans* TEA/ATTS-Transkriptionsfaktor CaTEC1

Aufgrund der großen Homologien in den Signaltransduktionswegen von *S. cerevisiae* und *C. albicans* konnte postuliert werden, daß neben Cph1p (Homolog zum *S. cerevisiae* Ste12p) auch in *C. albicans* ein Homolog zum *S. cerevisiae* Tec1p aus der Familie der

TEA/ATTS-Transkriptionsfaktoren an der Regulation der Morphogenese beteiligt ist. Diese Hypothese wurde durch Daten gestützt, die im Rahmen der Analyse der *SAP4-6*-Isogene in unserer Arbeitsgruppe erarbeitet wurden. Sequenzanalysen der 5'-UTRs dieser hyphenspezifischen Gene ergaben, daß in den Promotoren von *SAP4*, *SAP5* und *SAP6* neben Bindestellen für das Ste12p-Homolog Cph1p (PREs) auch TEA/ATTS-Konsensus-Sequenzen (TCS) vorliegen [1]. Die Bindestellen für einen potentiellen *C. albicans* TEA/ATTS-Transkriptionsfaktor sind in diesen Promotoren jedoch nicht wie in den FRE-Sequenzen von *S. cerevisiae* [48] in unmittelbarer Nähe der PRE-Sequenzen angeordnet. Dies weist darauf hin, daß der putative *C. albicans* TEA/ATTS-Transkriptionsfaktor nicht mit Cph1p interagiert, wie es für Tec1p und Ste12p in *S. cerevisiae* beschrieben wurde [48].

Die aufgrund dieser Vorergebnisse durchgeführten Datenbankanalysen resultierten in der Identifizierung einer einzigen, zum *S. cerevisiae* *TEC1* homologen Sequenz. Diese weist einen offenen Leserahmen (ORF) von 2.232bp auf und kodiert für eine N-terminale TEA-Domäne, die zu 66%, 53% und 54% mit den TEA-Domänen von Tec1p, AbaAp und *scalloped* übereinstimmt [2].

Die heterologe Expression des klonierten *C. albicans*-Gens in *S. cerevisiae* komplementierte zum einen die durch haploide und diploide *tec1/tec1*-Deletion verursachten Defekte in der Filamentbildung und dem invasiven Wachstum und aktivierte zum anderen die Expression des *S. cerevisiae*-Gens *FLO11*. Dies zeigt, daß es sich bei dem klonierten *C. albicans*-Gen um ein funktionelles Homolog zum *S. cerevisiae* *TEC1* handelt und es wurde daher als *C. albicans-TEC1* (*CaTEC1*) bezeichnet [2].

Die ersten Daten zur Funktion des TEA/ATTS-Transkriptionsfaktors CaTec1p in *C. albicans* wurden im Rahmen meiner Diplomarbeit erhalten [1]. Die Ergebnisse der damals durchgeführten *CaTEC1*-Expressionsanalysen lieferten Hinweise darauf, daß *CaTEC1* an der Regulation der Hefe-Hyphe-Transition beteiligt ist. Es konnte gezeigt werden, daß die *CaTEC1*-Transkription durch Inkubation von *C. albicans* unter hypheninduzierenden Bedingungen (Serum, 37°C) hochreguliert wird [2]. Die homozygote Deletion von *CaTEC1* hat keine negativen Auswirkungen auf die Lebensfähigkeit und die Replikationszeit der Mutante. Jedoch sind *C. albicans*-Zellen in Abwesenheit von *CaTEC1* nicht mehr in der Lage, Keimschläuche und echte Hyphen zu entwickeln. Nach der Induktion der Hyphenbildung durch Serum und Inkubation bei 37°C *in vitro* bildete die *catec1/catec1*-Mutante lediglich kurze gekrümmte Filamente, welche die für Pseudohyphen charakteristischen Konstriktionen am Ort der Zellteilung aufwiesen [2].

Der in *C. albicans* identifizierte TEA/ATTS-Transkriptionsfaktor CaTec1p scheint diesen

Ergebnissen zufolge eine wichtige regulatorische Rolle bei der morphogenetischen Entwicklung von *C. albicans* zu übernehmen.

I.7. Fragestellung

Die morphogenetische Entwicklung gilt als wichtige Voraussetzungen für die Virulenz von *C. albicans*, denn Mutanten mit Defekten in der Hyphenbildung weisen erhebliche Virulenz-Defizienzen auf [29-31, 59].

Die phänotypische Charakterisierung der *catec1/catec1*-Mutante *in vitro* zeigte, daß diese Mutante nicht mehr in der Lage ist, echte Hyphen zu bilden [2]. Aus diesem Befund ergab sich die Frage, ob die defekte Hyphenbildung der *catec1/catec1*-Mutante auch die Virulenz dieser Mutante beeinflußt. Übernimmt der TEA/ATTS-Transkriptionsfaktor CaTec1p also nicht nur eine wichtige regulatorische Rolle bei der Filamententwicklung, sondern auch bei der Regulation der Virulenz von *C. albicans*?

Zur Beantwortung dieser Fragestellung wurde im Rahmen dieser Arbeit zum einen die *C. albicans catec1/catec1*-Mutante in Bezug auf ihre Genexpression und die Virulenz charakterisiert und zum anderen die Position des Transkriptionsfaktors CaTec1p in den morphogenetischen Signalkaskaden der Hyphenbildung von *C. albicans* bestimmt. Als experimentelle Methoden wurden für diese Charakterisierung molekularbiologische Analysen sowie etablierte *in vitro* und *in vivo* Infektionsmodelle eingesetzt.

II. Material und Methoden

II.1. Material

II.1.1. Hefe- und Bakterienstämme

II.1.1.1. Hefestämme

Tab. II-1: Hefestämme

<i>C. albicans</i> Stamm	Relevanter Genotyp	Referenz
SC5314	Wildtyp-Stamm aus Klinischem Isolat, <i>Ura</i> ⁺	[79]
CAI4	<i>ura3Δ::imm434/ura3Δ::imm434</i>	[80]
CaAS15	<i>ura3/ura3 catec1Δ::hisG/catec1Δ::hisG</i>	[2]
CaAS18	<i>ura3/ura3 catec1Δ::hisG/catec1Δ::hisG</i> (pVEC)	
CaAS20	<i>ura3/ura3 catec1Δ::hisG/catec1Δ::hisG</i> (pVEC- <i>CaTEC1</i>)	
CDH109	<i>ura3/ura3 caras1Δ::hisG/caras1Δ::hisG</i> (pVEC)	[30]
CDH110-2	<i>ura3/ura3 caras1Δ::hisG/caras1Δ::hisG</i> (pVEC- <i>CaRAS1</i>)	
YPD-ADH/ CDH108	<i>ura3/ura3 caras1Δ::hisG/caras1Δ::hisG</i> (pADHp)	
CDH111	<i>ura3/ura3 caras1Δ::hisG/caras1Δ::hisG</i> (pADHp- <i>HST7</i>)	
HLC52	<i>ura3/ura3 efg1Δ::hisG/efg1Δ::hisG-URA3-hisG</i>	[29]
HLC54	<i>ura3/ura3 cph1Δ::hisG/cph1Δ::hisG efg1Δ::hisG/efg1Δ::hisG-URA3-hisG</i>	[47]
JKC19	<i>ura3/ura3 cph1Δ::hisG/cph1Δ::hisG-URA3-hisG</i>	
CaAS18 ^{int}	<i>ura3/ura3 catec1Δ::hisG/catec1Δ::pVEC</i>	Im Rahmen dieser Arbeit generiert
CaAS20 ^{int}	<i>ura3/ura3 catec1Δ::hisG/catec1Δ::pVEC-CaTEC1</i>	
CDH109 ^{ura⁻}	<i>ura3/ura3 caras1Δ::hisG/caras1Δ::hisG</i>	
HLC52 ^{ura⁻}	<i>ura3/ura3 efg1Δ::hisG/efg1Δ::hisG</i>	
HLC54 ^{ura⁻}	<i>ura3/ura3 cph1Δ::hisG/cph1Δ::hisG efg1Δ::hisG/efg1Δ::hisG</i>	
CaAS24	<i>ura3/ura3 cph1Δ::hisG/cph1Δ::hisG efg1Δ::hisG/efg1Δ::hisG</i> (pPCKp)	
CaAS25 sm	<i>ura3/ura3 cph1Δ::hisG/cph1Δ::hisG efg1Δ::hisG/efg1Δ::hisG</i> (pPCKp- <i>CaTEC1</i>)	
CaAS25 ^{wr}	<i>ura3/ura3 cph1Δ::hisG/cph1Δ::hisG efg1Δ::hisG/efg1Δ::hisG</i> (pPCKp- <i>CaTEC1</i>)	
CaAS26	<i>ura3/ura3 efg1Δ::hisG/efg1Δ::hisG</i> (pPCKp)	
CaAS27	<i>ura3/ura3 efg1Δ::hisG/efg1Δ::hisG</i> (pPCKp- <i>CaTEC1</i>)	
CaAS28	<i>ura3/ura3 cph1Δ::hisG/cph1Δ::hisG</i> (pPCKp)	
CaAS29	<i>ura3/ura3 cph1Δ::hisG/cph1Δ::hisG</i> (pPCKp- <i>CaTEC1</i>)	
CaAS30	<i>ura3/ura3 caras1Δ::hisG/caras1Δ::hisG</i> (pPCKp)	

<i>C. albicans</i> Stamm	Relevanter Genotyp	Referenz
CaAS31	<i>ura3/ura3 caras1Δ::hisG/caras1Δ::hisG</i> (pPCKp-CaTEC1)	Im Rahmen dieser Arbeit generiert
CaAS32	<i>ura3/ura3</i> (pPCKp)	
CaAS33	<i>ura3/ura3</i> (pPCKp-CaTEC1)	
CaAS34	<i>ura3/ura3 catec1Δ::hisG/catec1Δ::hisG</i> (pPCKp)	
CaAS35	<i>ura3/ura3 catec1Δ::hisG/catec1Δ::hisG</i> (pPCKp-CaTEC1)	
CaAS36	<i>ura3/ura3 catec1Δ::hisG/catec1Δ::hisG</i> (pADHp-CPH1)	
CaAS38	<i>ura3/ura3 catec1Δ::hisG/catec1Δ::hisG</i> (pPCKp-EFG1)	

II.1.1.2. Bakterienstämme

Der Stamm *Escherichia coli* DH10B wurde von der Firma Promega [Mannheim] bezogen. In Anlehnung an ein modifiziertes Protokoll nach Hanahan [81] wurden die Zellen durch eine Behandlung mit Rubidiumchlorid zur Plasmidaufnahme vorbereitet und bei -70°C eingefroren.

II.1.2. Versuchstiere

Für Infektionsversuche mit *C. albicans* wurden weibliche, sechs bis zwölf Wochen alte Mäuse des Inzuchtstammes Balb/c [Charles Rivers Breeding Laboratories, Sulzfeld] eingesetzt. Die Haltung erfolgte unter pathogenfreien Bedingungen.

II.1.3. Medien, Puffer und Lösungen

Die aufgeführten Medien, Puffer und Lösungen wurden, soweit nicht abweichend angegeben, mit H₂O_{dd} angesetzt. Prozentangaben beziehen sich, soweit nicht abweichend angegeben auf Gewichtsprozent (w/v).

Tab. II-2: Medien

Medium	Zusammensetzung
YPD*	1% Hefeextrakt; 2% Pepton; 2% Glukose
YED	1% Hefeextrakt; 2% Pepton
CSM-URA*	1,7g/l YNB ohne AS und (NH ₄) ₂ SO ₄ ; 0,77 g/l CSM ohne Uridin; 5g/l (NH ₄) ₂ SO ₄ ; 2% Glukose
SCAA*	1,7g/l YNB ohne AS und (NH ₄) ₂ SO ₄ ; 0,77 g/l CSM ohne Uridin; 5g/l (NH ₄) ₂ SO ₄ ; 2% Casamino Säuren
Succinat*	1,7g/l YNB ohne AS und (NH ₄) ₂ SO ₄ ; 0,77 g/l CSM ohne Uridin; 5g/l (NH ₄) ₂ SO ₄ ; 2% Succinat

Medium	Zusammensetzung
SabC-Agar	62g/l Sabauroud-Dextrose-Agar mit Pepton; 0,5g/l Chloramphenicol
TOP-Agar	6,7g/l YNB ohne AS und $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 1M Sorbitol, 2% Glukose; 1% Agar
FOA-Agar	1,7mg/ml YNB ohne AS und $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,77g/l CSM ohne Uridin; 5mg/ml $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 12,5mg/ml Dextrose; 20g/l Agar. Nach Sterilisation Zugabe von 12,5mg/ml Uridin; 1mg/ml FOA
SOS	10ml 2M Sorbitol; 6,8ml YPD-Medium; 0,13ml 1M CaCl_2 ; 3ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$
Click-RPMI +10%(v/v) FCS	11,33g/l Click-RPMI-Trockenmedium ohne NaHCO_3 und FCS, mit L-Glutamin, 60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ PenicillinG, 0,16g/l Gentamicin, 0,1g/l Streptomycinsulfat, pH7,2-7,3. Nach Sterilfiltrieren Zugabe von 10%(v/v) FCS; 0,14% NaHCO_3 ; 1%(v/v) HEPES; 0,05mM β -Mercaptoethanol
10%Click-RPMI +10%(v/v) FCS	10%(v/v)Click-RPMI ohne FCS in PBS; 10%(v/v) FCS
DMEM-1 +10%(v/v) FCS	DMEM mit 1000mg/l Glukose, Pyridoxin.HCL, NaHCO_3 , ohne L-Glutamin [Sigma D5546]; 20ml 200mM L-Glutamin pro Liter [Gibco]; 10%(v/v) FCS
DMEM-2 +10%(v/v) FCS	DMEM mit 1000mg/l Glukose, Pyridoxin.HCL, NaHCO_3 , mit L-Glutamin [Sigma D6046]; 10%(v/v) FCS
DMEM-3 +10%(v/v) FCS	DMEM mit 1000mg/l Glukose, Pyridoxin.HCL, NaHCO_3 , ohne L-Glutamin, Phenolrot [Sigma D5921]; 20ml 200mM L-Glutamin pro Liter [Gibco]; 10%(v/v) FCS
LB-Amp	1% Trypton; 0,5% Hefeextrakt; 1% NaCl; pH7,4. Für Agarplatten: 1,2% Agar. Nach Sterilisation und Abkühlen auf $<60^\circ\text{C}$ Zugabe von 0,1mg/ml Ampicillin.
SOC	20g/l Trypton; 5g/l Hefeextrakt; 0,5g/l NaCl; 2,5mM KCl; pH 7,0. Nach Sterilisation und Abkühlen auf $<60^\circ\text{C}$ Zugabe von 20mM MgCl_2 ; 20mM Glukose.

Für Festmediumplatten wurden vor der Sterilisation 2% Agar zugesetzt.

Tab. II-3: Puffer und Lösungen

Puffer, Lösung	Zusammensetzung
CaST	1M Sorbitol; 10mM Tris pH7,4; 10mM CaCl_2
SED	1M Sorbitol; 25mM EDTA; 50mM Dithiothreitol
20% PEG	200mg/ml PEG 3350; 10mM Tris pH7,4; 10mM CaCl_2
PBS	137mM NaCl; 2,68mM KCl; 7,3mM Na_2HPO_4 ; 1,47mM KH_2PO_4 ; 1mM CaCl_2 ; 2mM MgCl_2 ; pH7,4
MOPS	10mM MOPS; 2,5mM Natriumacetat; 0,5mM EDTA; pH 7,0
10x SSC	1,5M NaCl; 0,15M Natriumcitrat; 5mM EDTA, pH7,0
Hybridisierungspuffer	10mg/ml BSA; 7% SDS; 0,5M NaH_2PO_4 ; 10mM EDTA
Waschpuffer A	5mg/ml BSA; 5% SDS; 40mM NaH_2PO_4 ; 1mM EDTA
Waschpuffer B	1% SDS; 40mM NaH_2PO_4 ; 1mM EDTA
TE	10mM Tris-HCl pH 7,5; 10mM EDTA
RNase-TE	10mM Tris-HCl pH 7,5; 10mM EDTA; 0,01mg/ml RNase A
DEPC- H_2O	0,1%(v/v) DEPC in $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$; üN bei 37°C rühren
TES	10mM Tris-HCl pH7,5; 10mM EDTA; 0,5% SDS)

Puffer, Lösung	Zusammensetzung
0,5x TBE	45mM Tris-HCl; 45mM Borsäure; 1,25mM EDTA
DNA-Ladepuffer	1x Ficoll, 4µg/ml EtBr
RNA-Ladepuffer	1x MOPS; 50%(v/v) Formamid; 2,2M Formaldehyd; "Prise" Bromphenolblau; 0,05mg/ml EtBr in DEPC-H ₂ O

II.1.4. Vektoren, Oligonukleotide (Primer)

Tab. II-3: Vektoren

Vektor	Verwendung	Referenz
pVEC	Klonierung von Genen für Mutantenreversion, Kontrollvektor	[82]
pVEC- <i>CaTEC1</i>	Reversion der <i>catec1/catec1</i> Mutante	[2]
pADHp- <i>CPH1</i>	Konstitutive ÜE von <i>CPH1</i> durch <i>ADHp</i>	[46]
pBI-HAHD	PCKp-kontrollierte ÜE von <i>EFG1</i>	[55]
pGEM [®] -T Easy	Klonierung von PCR-Fragmenten	[83]
p206	<i>SAP4</i> -Sonde für Hybridisierung von Northern Blots	[2]
p207	<i>SAP5</i> -Sonde für Hybridisierung von Northern Blots	
p208	<i>SAP6</i> -Sonde für Hybridisierung von Northern Blots	
p254	<i>ACT1</i> -Sonde für Hybridisierung von Northern Blots	

Tab. II- 4: Oligonukleotide (Primer)

Bezeichnung	Nukleotidsequenz 5' - 3'	Tm [°C]	Verwendung
TEC1ORF.01	ttt agg atc caa tga caa caa ccc agg ttt ca	65,6	Klonierung, Sequenzierung
TEC1ORF.03	ttt agg atc caa tga tgt cga aag cta ctc c	66,9	Klonierung des <i>CaTEC1</i> -ÜEV
TEC1ORF.06	ttt agg atc cac taa aac tca cta gta aat cct tct g	66,1	PCR nach Reverser Transkription
TEC1ORF.08	cgt gta cct ggt aaa gtt gct tac c	63,0	Genotypisierung, Sequenzierung
TEC1ORFUTR.02	ttt agg atc ccc cgc ctt gcc cct ctt	69,5	Klonierung des <i>CaTEC1</i> -ÜEV
TEC1seq.01	gtc tcc atc tag tct caa cc	57,3	Sequenzierung
TEC1seq.02	gca ttg aac aag ctt gcc tg	57,3	
TEC1seq.03	cag tca cga gga aca att gg	57,3	

Bezeichnung	Nukleotidsequenz 5' - 3'	Tm [°C]	Verwendung
TEC1seq.05	ggt tcc ctg gtt taa gtg	53,5	Sequenzierung
TEC1seq.07	ccg gga ttt tgg aag ttc ttc	57,9	
TEC1seq.09	gcc aac acc ctt cag c	54,3	
PCKpro.01	ccg ttc ccc cgc tcc tac	62,8	Genotypisierung, Sequenzierung
PCKpro.03	ggg agg ttg cgc gta ac	57,6	
PCKseq.01	gga tcc act gta ttc caa ttt aac ag	60,1	Sequenzierung
PCKseq.02	ctc ttt aac tcc acg cat agc c	60,3	
PCKseq.03	ccc caa ctg tta cgt aac aca tc	60,6	
PCKseq.05	gcc ttg tcc act ttc tcg ag	59,4	
PCKseq.07	ccc gaa tga gct ggt cag	58,2	
EFG1.03	aca ata acg gta tgc ccc agc	59,8	Genotypisierung
EFG1.04	cga tac atg tgg tgg gat agg	59,8	
EFG1.06	gct gct gtt gtt gtt gtt gtc ctg ctg tct	68,1	

II.1.5. Bezugsquellen

II.1.5.1. Chemikalien

5-Fluoroorotic Acid, Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranoside, Qualex Gold Agarose [Hybaid, Heidelberg]; CSM-URA [BIO 101, Vista CA]; Yeast Nitrogen Base w/o AA w/o $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, Agar, Yeast Extract, Pepton, Trypton, Casamino acids [Difco über BD, Heidelberg]; BSA [Amresco, Solon Ohio]; Ammoniumsulfat, Uridin, 1,4-Dithio-DL-threitol, Chloramphenicol [Fluka, Deisenhofen]; Dextrose, FCS, Sorbitol, Polyethylenglycol 3350, LPS, IFN γ , β -Estradiol 17-Valerate, Sesamöl [Sigma, Deisenhofen]; X-Gal [Roth, Karlsruhe]; Saures Phenol pH4,5, Phenol pH7,9, Click-RPMI-Trockenmedium w/o Glutamin w/o NaHCO_3 , PBS [Seromed, Berlin], Ficoll [Pharmacia, Freiburg] Sabauroud-Dextrose-Agar [Mast Diagnostica, Reinfeld].

Alle weiteren verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Roth [Karlsruhe], Merck [Nürnberg], Fluka [Deisenhofen] und Amresco [Solon Ohio] bezogen.

II.1.5.2. Enzyme

Restriktionsenzyme [NEB, Schwalbach]; GibcoBRL® *Taq* DNA Polymerase recombinant, Platinum® *Taq*PCRx DNA Polymerase [Invitrogen, Karlsruhe]; Zymolase-20T [Medac, Wedel]; RNase A-pancreatic [Amresco, Solon Ohio]; AMV Reverse Transcriptase [Usb, Cleveland Ohio].

II.1.5.3. Nukleotide, Radionukleotide, Oligonukleotide, Längenstandards

dATP, dTTP, dCTP, dGTP [NEB, Schwalbach]; α -³²P dCTP [Amersham, Braunschweig]; Lambda DNA/*Eco* 130I (*Sty* I) Marker, Gene Ruler 100bp DNA Ladder Plus [MBI Fermentas, St. Leon-Rot]; Oligonukleotide [Metabion, Martiensried; MWG-Biotech, Ebersberg].

II.1.5.4. Kommerziell erhältliche Systeme, Technische Geräte und Sonstiges

Periodic Acid-Schiff Staining (PAS) System [Sigma, Deisenhofen]; HistoChoice Tissue Fixative MB [Amresco, Solon Ohio]; Primus 25/96 Thermocycler [MWG-Biotech, Ebersberg]; UV Stratalinker 2400 [Stratagene, NL-Amsterdam]; Zählkammer [Brand, Wertheim]; Glass Chamber Slides w/cover [Nunc, Wiesbaden]; Reaktionsgefäße [Eppendorf, Hamburg; Sarstedt, Nümbrecht]; Röntgenfilm X-Omat [Kodak, New York].

II.2. Methoden

II.2.1. Hefe- und Bakterienkultur

II.2.1.1. Hefekulturen

II.2.1.1.1. *C. albicans* Kulturen

Unter Berücksichtigung der anschließenden Verwendung wurden *C. albicans*-Zellen in verschiedenen Medien angeimpft. Für die Isolation von Nukleinsäuren erfolgte eine Inokulation in YPD-Medium. Die zur Transformation vorgesehene Pilzzellen wurden in YEP-Medium kultiviert. Kulturen, aus denen Blastosporen (Hefezellen) für Infektionsversuche geerntet werden sollten, wurden in dem Selektivmedium CSM-URA inkubiert. Die Inkubation der Kulturen erfolgte für 24h (knospende Zellen) bis 48h (Stationärphasezellen) bei 28-30°C im Schüttelinkubator (180min⁻¹). Im Anschluß wurden die Pilzzellen durch Zentrifugation geerntet (5min, 4.000rpm, 4°C).

II.2.1.1.2. Induktion der Hyphenbildung in *C. albicans*

Die Induktion der Hyphenbildung von *C. albicans* erfolgte durch Inkubation der Zellen in serumhaltigem (10%(v/v) FCS) Medium bei 37°. Im Einzelnen wurden die Pilzzellen in ÜNK bis zur Stationärphase angezogen (vgl. II.2.1.1.1.) und nach der Ernte dreimal in 4°C kaltem PBS (PBS_{4°C}) gewaschen. Anschließend wurden 1×10^7 Zml⁻¹ in Click-RPMI +10%(v/v) FCS inokuliert und bei 37°C inkubiert. Als Kontrolle wurden die Zellen desselben Ansatzes in frischem YPD-Medium angeimpft und bei 28-30°C inkubiert.

II.2.1.1.3. Kulturen unter Überexpressionsbedingungen

Die plasmidvermittelte, PCKp-kontrollierte ÜE von *C. albicans*-Genen wurde durch Inkubation der Pilzzellen in glukosefreiem SCAA-Medium erreicht. Stationärphasezellen aus ÜNK (in glukosehaltigem CSM-URA-Medium) wurden dreimal in PBS_{4°C} gewaschen und für 2h bei 28°C in SCAA-Medium inkubiert (Derepression des PCKp, [84]). Die überexprimierenden Zellen aus dieser Derepressionskultur wurden anschließend eingesetzt, um sie unter (a) hypheninduzierenden Bedingungen (SCAA-Medium+10%(v/v) FCS, 37°C) und (b) hefe-favorisierenden Bedingungen (SCAA-Medium, 28°C) zu charakterisieren (Etablierung dieser Methode vgl. III.3.3.1.2).

II.2.1.1.4. FOA-Selektion

Die Deletion des für die Transformation von *C. albicans* relevanten Selektionsmarkergens *URA3* aus uridinautotrophen Zellen wurde mit Hilfe der negativen Selektion durch „5-fluoroorotic acid“ (FOA) [85] erreicht. Hierfür wurden je 100µl der ÜNK (in YPD-Medium) von *URA3*⁺ Zellen auf FOA-Platten ausplattiert und bei RT bebrütet. Zur Kontrolle der Deletion wurden die erhaltenen Klone parallel auf Vollmedium (YPD) und uridinfreiem Selektivmedium (CSM-URA) subkloniert.

II.2.1.2. Bakterienkulturen

Die Anzucht von Bakterienstämmen erfolgte auf LB-Amp-Agar üN bei 37°C.

Für die Isolation von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurden die Bakterienzellen üN bei 37°C unter Schütteln in LB-Amp-Medium kultiviert.

II.2.2. Peritonealexsudat-Makrophagen: Gewinnung und Kultivierung

Für die Gewinnung von Makrophagen (MΦ) wurden jeweils drei bis vier weibliche Balb/c Mäuse (Alter: ≥6 Monate) verwendet. Diesen wurde durch eine intraperitoneale Injektion von

je 2ml 4% Thioglycolat eine sterile Infektion gesetzt. Die Isolation der MΦ erfolgte nach 4d durch Spülen des Peritoneums der getöteten Mäuse mit je 2x 4ml sterilem PBS_{4°C}. Anschließend wurden die Zellen zweimal in sterilem PBS_{4°C} gewaschen und in 5ml kaltes Click-RPMI+10%(v/v) FCS aufgenommen. Die Kultivierung erfolgte in „8-well Glas Chamber Slides“, wobei pro Kammer 1x10⁶ MΦ in 0,5ml Medium eingesetzt wurden. Die Inkubation erfolgte bei 37°C und 5% CO₂. Nach 4h wurden die Zellen einmal mit PBS_{37°C} gewaschen und das Medium erneuert.

II.2.3. Molekularbiologische Methoden

II.2.3.1. Plasmid-DNA: Isolation aus *E. coli*, Reinigung und Modifikation

Zur Isolation von Plasmid-DNA aus *E. coli* für analytische Zwecke wurden Puffer aus dem „Plasmid Midi Kit“ [Qiagen, Hilden] verwendet. Das Protokoll basiert hier auf einer modifizierten alkalischen Lyse [86]. Aus den angeimpften ÜNK (vgl. II.2.1.2) wurden je 1,5ml geerntet (1min, 15.000xg, 4°C). Für die Lyse wurden die Zellen in 200µl Resuspensionspuffer P1 aufgenommen und durch Zugabe von 200µl Lysepuffer P2 aufgeschlossen. Nach einer Inkubationszeit von 5min bei RT wurden 200µl Neutralisierungspuffer P3 zugegeben und der Ansatz für 15min auf Eis gesetzt. Nach anschließender Zentrifugation (30min, 15.000xg, 4°C) wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die Plasmid-DNA durch Zugabe von 1ml Isopropanol gefällt und pelletiert (30min, 15.000xg, 4°C). Das Plasmidpellet wurde in 70% EtOH gewaschen, luftgetrocknet und in 50µl RNase-TE aufgenommen. Nach dem RNA-Verdau (15min, 37°C) wurde das Plasmidpellet bei 65°C resuspendiert.

Plasmidisolationen für präparative Zwecke wurde mit Hilfe des „Plasmid Midi Kit“ gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt.

Die Entfernung von Proteinverunreinigungen aus Nukleinsäurelösungen erfolgte durch Phenol/Chloroform-Extraktion mit anschließender Ethanol-Fällung. Die DNA-Lösung wurde mit ½ Volumen Phenol/Chloroform [1:1] versetzt, 10sec gevortext, 1min auf Eis gesetzt und abzentrifugiert (5min, 15.000xg, 4°C). Nach Überführen der oberen wässrigen Phase in ein neues Reaktionsgefäß wurde diese mit 0,1 Volumen 3M Natriumacetat pH5,2 und 1 Volumen 100% EtOH versetzt, durch vortexen gemischt und für 10min bei -70°C inkubiert. Die gefällte DNA wurde abzentrifugiert (20min, 15.000xg, 4°C), mit 70% EtOH gewaschen und zur weiteren Verwendung in 1x TE oder H₂O_{dd} resuspendiert.

Für die Spaltung von DNA wurde diese mit 1-5U Restriktionsenzym in den zugehörigen Reaktionspuffer (1x) eingesetzt und für 3h bzw. ün bei der für das Enzym optimalen Reaktionstemperatur inkubiert. Die Analyse der Reaktion erfolgte durch Auftrennen der erhaltenen

Fragmente im Agarosegel (vgl. II.2.3.6).

Um eine effektive Klonierung von DNA-Fragmenten in Vektoren zu erhalten, war es teilweise notwendig, 5'-überhängende Restriktionsschnittstellen zu „*blunt-ends*“ aufzufüllen. Dies wurde mit Hilfe der DNA Polymerase I (Klenow-Fragment) erreicht. Die Pufferbedingungen der vorausgegangenen Restriktion wurden auf die für die Polymerase optimalen Reaktionsbedingungen umgestellt und dNTPs (EK 33 μ M) sowie 10U DNA Polymerase zugegeben. Die Reaktion wurde nach der Inkubation (20min, 37°C) durch Zugabe von EDTA (EK 10mM) und Hitzeinaktivierung bei 75°C (10min) gestoppt. Anschließend erfolgte eine Phenol/Chloroform-Extraktion.

Die Dephosphorylierung von 5'-DNA-Enden erfolgte mittels alkalischer Phosphatase („Alkaline Phosphatase, Shrimp“ (SAP), [usb, Cleveland Ohio]) entsprechend den Angaben des Herstellers.

Für eine Ligation wurden Vektor- und Insertfragment in einem molaren Verhältnis von 1:1-1:5 eingesetzt. Die Reaktion erfolgte 16h bei 16°C in einem Reaktionsvolumen von 15-20 μ l. Die T4 DNA Ligase und der zugehörige Reaktionspuffer stammten aus dem „pGEM-T[®] Easy Vector System“ [Promega, Mannheim] und wurden entsprechend den Angaben des Herstellers verwendet. In die anschließende Transformation von *E. coli* wurden 1-5 μ l Ligationsansatz eingesetzt.

II.2.3.2. Amplifikation und Sequenzierung von DNA

Zur selektiven Anreicherung von spezif. DNA-Sequenzen wurde die Methode der Polymerase-Kettenreaktion angewendet. Die Reaktionen erfolgten in Endvolumen (EV) von 25 bzw. 50 μ l und setzten sich aus 1/10 EV Reaktionspuffer, 0,1mM Nukleotidgemisch, 2mM MgCl₂, 0,2 μ M Primer, 50-100ng Matrizen-DNA und 1,25U *taq* DNA-Polymerase zusammen. Die Amplifikation erfolgte in 30 Zyklen. Ein Zyklus bestand aus Denaturierungsphase (1min, 94°C), Primeranlagerung (45sec, 1°C unter primerspezif. T_m) und Elongationsphase (1min, 72°C). Vor dem ersten Zyklus erfolgte eine zusätzliche Denaturierungsphase von 4min und nach dem letzten Zyklus eine zusätzliche Elongationsphase von 7min. Die Reaktionen wurden in einem Thermocycler mit Deckelheizung durchgeführt. Die Reaktionsprodukte wurden mittels DNA-Gelelektrophorese analysiert.

Die Amplifikation von DNA-Sequenzen größer 3,0kb erfolgte mit Hilfe des „Long Range Termination Set for *Taq* Sequencing“ [Boehringer, Mannheim] entsprechend den Angaben des Herstellers.

Die Sequenzierung von DNA zur Überprüfung der korrekten Basenabfolge klonierter DNA-

Fragmente erfolgte mit Hilfe des „Thermo Sequenase dye terminator cycle sequencing pre-mix kit“ [Amersham, Braunschweig]. Die Reaktion basiert auf der Didesoxy-Kettenabbruch-Methode [87], wobei die Terminatoren mit fluoreszierenden Farbstoffen markiert sind. Der Reaktionsansatz setzte sich aus 10µM spezif. Primer, 1µg Matrizen-DNA und 8µl des „sequencing reagent pre-mix“ in einem EV von 20µl zusammen. Die DNA-Synthese erfolgte während 25 Zyklen (Denaturierung: 10sec, 96°C; Primeranlagerung: 5sec, 1°C unter primerspezif. T_m ; Elongation: 4min, 60°C) im Thermocycler. Anschließend wurde die fluoreszenzmarkierte DNA mittels Ethanol-fällung (vgl. II.2.3.1) gereinigt und für die Sequenzierung und Auswertung im „Abi Prism™ 310 Genetic Analyzer“ [Applied Biosystems, Darmstadt] in 4µl Ladepuffer resuspendiert.

II.2.3.3. Transformation von DNA

II.2.2.3.1. Transformation von *C. albicans*

Für das Einbringen von DNA in *C. albicans*-Zellen wurde die Methode der Spheroplasten-Transformation angewendet [1]. Die Herstellung von Spheroplasten erfolgte durch Animpfen von 50ml YEP-Medium mit Zellen aus einer YEP-ÜNK (vgl. II.2.1.1) und deren Inkubation bei 30°C bis zu einer Zelldichte von $2-4 \times 10^7$ Z/ml. Nach dem Ernten der gesamten Kultur (4.000rpm, 5min) wurden die Zellen jeweils einmal in H_2O_{dd} , 1M Sorbitol und SED gewaschen und in SED resuspendiert. Für den Zellwandverdau wurden 5mg/ml Zymolase zugesetzt und die Reaktion bei 30°C inkubiert, bis mindestens 90% der Zellen als Spheroplasten vorlagen (mikroskopische Kontrolle). Nach der Ernte (max. 700xg) wurden die Zellen einmal in kaltem 1M Sorbitol gewaschen und in 2ml kaltem CaST aufgenommen. Für die Transformation von 100µl Zellsuspension ($5-10 \times 10^7$ Spheroplasten) wurden 3-5µg DNA und 5mg/ml denaturierte Heringssperma-DNA zugesetzt. Die Inkubation erfolgte erst 10min und nach Zugabe von 2ml 20% PEG-Lösung weitere 10-20min bei RT. Anschließend wurden die Zellen bei 300xg pelletiert, zur Regeneration in 300µl SOS inkubiert (30-40min, 30°C) und der gesamte Ansatz in 45°C warmem Top-Agar auf CSM-URA-Platten geschichtet. Die Bebrütung der Platten erfolgte für 3-5d bei RT. Als Transformanten wurden nur die Klone gewertet, die Kolonien von einem Durchmesser >1mm bildeten.

II.2.2.3.2. Transformation von *E. coli* DH 10B, Blau-Weiß-Screening

Die bei -70°C aliquotierten kompetenten *E. coli*-Zellen (vgl. II.1.1.2) wurden auf Eis aufgetaut und pro 50µl Aliquot mit 1-100ng Plasmid-DNA vermischt. Nach 10min Inkubation auf Eis wurden die Zellen einem Hitzeschock (42°C, 40sec) unterzogen, nach weiteren 2-3min Inku-

bation auf Eis zur Regeneration in 1ml SOC-Medium aufgenommen und 1h bei 37°C kultiviert. Die Auswahl der Zellen, die rekombinante Plasmide aufgenommen hatten, erfolgte auf LB-Amp-Agar, der mit 50µl X-Gal [20mg/ml] und 10µl IPTG [200mg/ml] überschichtetet wurde. Als positive Transformanten wurden nur die Klone gewertet, die weiße Kolonien gebildet hatten.

II.2.3.4. Isolation genomischer DNA und RNA aus *C. albicans*

Die Isolation genomischer *C. albicans*-DNA für analytische Zwecke erfolgte mit Hilfe des „Microlysis“-Systems [Kisker, Mühlhausen]. Die Zellen wurden von Kolonien auf Festmedium gepickt und in 20µl Microlysis-Puffer resuspendiert. Zum Aufschluß der Zellen wurde die Zellsuspension in einem Thermocycler entsprechend dem vom Herstellers vorgegebenen Programm inkubiert. Für PCR-Analysen wurden je 5µl des Zellaufschlusses eingesetzt. Um gDNA für präparative Zwecke zu gewinnen, wurden *C. albicans*-Spheroplasten verwendet (vgl. II.2.2.3.1.). Der Zellaufschluß und die gDNA-Isolation erfolgten entsprechend den Angaben des Herstellers mit dem „Wizard[®] Genomic DNA Purification Kit“ [Promega, Mannheim].

Vor der Isolation von Gesamt-RNA [88] wurden die geernteten *C. albicans*-Zellen zweimal in 20ml DEPC-H₂O gewaschen, abzentrifugiert und das Zellsediment bis zur weiteren Verarbeitung in 1ml TES resuspendiert und eingefroren (-20°C). Zum Aufschluß der Zellen wurde die noch gefrorene Zellsuspension mit 1 Volumen Phenol (pH4,5) gemischt und während einer Inkubation von 60min bei 65°C mehrfach gevortext. Nach der darauffolgenden Zentrifugation (3.000rpm, 20min, 4°C) wurde die RNA-haltige wäßrige Phase in ein frisches Reaktionsgefäß überführt, mit dem gleichen Volumen eines Phenol(pH4,5)-Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisches [25:25:1] versetzt, kurz gevortext und für weitere 20min zentrifugiert (10.000xg, 4°C). Die wäßrige Phase wurde erneut abgenommen und zur Fällung der RNA in einem neuen Reaktionsgefäß mit 1 Volumen Isopropanol und 1/10 Volumen 3M Natriumacetat (pH5,4) gemischt. Nach einer Inkubation bei -70°C (30min) wurde die RNA pelletiert (20min, 15.000xg, 4°C), mit 70% EtOH gewaschen und nach dem Lufttrocknen bei 65°C in 50-100µl DEPC-H₂O resuspendiert. Die Aufbewahrung erfolgte bei -70°C.

II.2.3.5. Bestimmung der Konzentration und Reinheit von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung sowie die Ermittlung des Reinheitsgrades von Nukleinsäurelösungen erfolgte photometrisch mit Hilfe des „Gene Quant II RNA/DNA Calculator“ [Amersham, Braunschweig].

Für eine Konzentrationsabschätzung von DNA-Molekülen im Agarosegel wurden 5-10% der DNA-Lösung parallel zu einer definierten Menge DNA-Marker in eine Elektrophorese (vgl. II.2.3.6) eingesetzt und die Intensität ähnlich großer Fragmentbanden gegeneinander ausgewertet.

II.2.3.6. Elektrophorese von Nukleinsäuren, Gelextraktion

Zur Auftrennung von DNA-Molekülen nach ihrem Molekulargewicht wurden Gele aus 0,7% - 1,5%(w/v) Agarose in 0,5x TBE angesetzt. Die DNA-Proben wurden vor dem Auftragen auf das Gel mit 1/10 Volumen DNA-Ladepuffer versetzt. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte in 0,5x TBE bei $4-8 \text{ Vcm}^{-1}$ und wurde anschließend durch Photographieren des Gels unter UV-Licht dokumentiert. Die Extraktion von DNA-Fragmenten, die unter UV-Belichtung (langwellig) aus dem Agarosegel ausgeschnitten wurden, erfolgte mit Hilfe des "Nucleo SpinTM Extract-Kit" [Macherey-Nagel, Düren] gemäß den Angaben des Herstellers.

Die Auftrennung von RNA-Molekülen erfolgte für 3-5h bei 6 Vcm^{-1} in einem denaturierenden Agarosegel (1,1%(w/v) Agarose, 0,5x MOPS, 5%(v/v) Formaldehyd in DEPC-H₂O). Vor dem Auftragen auf das Gel wurden die RNA-Proben im Volumenverhältnis 1:1 - 1:4 mit RNA-Ladepuffer vermischt und 5min bei 65°C erhitzt. Die photographische Dokumentation erfolgte unter UV-Licht.

II.2.3.7. Southern Blot

In einem DNA-Agarosegel wurden pro Spur 10µg gespaltene DNA aufgetrennt (vgl. II.2.3.6), 10-15min in 0,2N HCl depuriniert und 45-60min in alkalischer Lösung (0,5M NaOH/1,5M NaCl) denaturiert [89]. Der Transfer der DNA auf Biotinylated B Transfer Membran 0,45µm [Pall, Dreieich] erfolgte mittels Kapillarkraft, wobei die Nukleinsäuren durch den Strom von Transferpuffer (10x SSC) aus dem Gel auf die Membran übertragen werden [1]. Nach dem Transfer üN bei RT wurde die Membran in 2x SSC gewaschen und luftgetrocknet. Für den Nachweis der DNA wurden 100ng Sonden-DNA mit Hilfe der „Ready-To-Go DNA Labelling Beads (-dCTP)“ [Amersham, Braunschweig] nach den Angaben des Herstellers radioaktiv markiert und über „ProbeQuant G-50 Micro Columns“ [Amersham, Braunschweig] aufgereinigt. Die Prähybridisierung der Membran erfolgte 1h bei 65°C in Hybridisierungspuffer [90]. Anschließend wurde die denaturierte (2-3min, 94°C) DNA-Sonde zur Membran in den Hybridisierungspuffer gegeben und üN bei 65°C hybridisiert. Das Waschen der hybridisierten Membran erfolgte je 2x 20min bei 65°C in Waschpuffer A und je 4x 20min bei 65°C in Waschpuffer B. Anschließend erfolgte die Exposition der Membran durch Auflage eines Röntgenfilms für 1-14d.

II.2.3.8. Northern Blot

Nach dem Auftrennen der RNA (10µg/Spur) in einem denaturierenden Agarosegel (vgl. II.2.3.6) wurde die RNA ohne weitere Behandlung auf eine Membran transferiert (vgl. II.2.3.7). Zur stabilen Bindung der RNA an die Membran wurde diese anschließend mit UV-Licht (1200µJ X100) bestrahlt und luftgetrocknet. Die Hybridisierung der Membran mit radioaktiv markierter DNA-Sonde (vgl. II.2.3.7) erfolgte entsprechend der Methode zur Hybridisierung von Southern Blot Membranen (vgl. II.2.3.7). Zur Quantifizierung des Expressionsniveaus eines Gens wurde dieselbe RNA mit „*housekeeping gene*“ *ACT1* hybridisiert. Das Verhältnis der Bandenintensitäten auf den erhaltenen Autoradiogrammen wurde mittels des Phosphor Imager FLA 3000G [Fuji Photo Film Europe, Düsseldorf] bestimmt und mit Hilfe der zugehörigen Software ausgewertet.

II.2.4. Infektionsversuche

II.2.4.1. Makrophageninfektion *in vitro*

Die für die Infektion von MΦ bestimmten *C. albicans* Stämme wurden aus ÜNK (vgl. II.2.1.1.1.) geerntet, zweimal in PBS_{4°C} gewaschen und die Pilzzellzahl für MOIs von 1:8 bzw. 1:16 (*C. albicans* : MΦ Verhältnis) in 50µl PBS_{4°C} eingestellt. Diese wurden den in „Glas Chamber Slides“ kultivierten Peritonealexsudat-MΦ (vgl. II.2.1.3.1.) beigefügt. Zu den vorgesehenen Zeitpunkten wurde die Infektion nach einmaligem Waschen der Zellen mit PBS_{37°C} durch Fixierung in 200µl „HistoChoice“ (15min, RT) beendet.

Für MΦ-Infektionen mit *C. albicans*-Stämmen, die Gene unter der Kontrolle des *PCKp* überexprimieren, wurden die Zellen in 10%(v/v) Click-RPMI +10%(v/v) FCS kultiviert. (Eta-blierung der Methode vgl. III.3.4.3.1).

Einige Infektionsversuche wurden mit aktivierten MΦ durchgeführt; d.h., die MΦ wurden 4h vor der Infektion mit 50ng ml⁻¹ LPS und 20ng ml⁻¹ IFN γ Medium stimuliert.

II.2.4.2. Mausinfektionen

II.2.3.2.1. Vaginalinfektion

Aus den für die Infektion bestimmten *C. albicans* Vorkulturen (vgl. II.2.1.1.1.) wurde jeweils 1ml geerntet und nach dreimaligem Waschen in 1ml PBS_{4°C} aufgenommen. Für die Injektion wurden 5x10⁴ Blastosporen in 200µl PBS_{4°C} eingestellt. Die Anzahl der lebenden Zellen wurde vor der Infektion durch Ausplattieren von sequenziell verdünntem Inokulum auf YPD-Festmedium und Auszählen der CFU nach Bebrütung (ÜN, 37°C) bestimmt.

Eine vaginale Candidose kann bei Nagetieren nur dann induziert werden, wenn sich diese im Stadium der Scheinschwangerschaft befinden [91-93]. Daher wurde jeder Maus 72h vor der Infektion 0,02mg Estradiol Valerate in 0,1ml Sesamöl subkutan injiziert. Diese Östrogenbehandlung wurde über die Dauer der Infektion alle 7d wiederholt.

In jedem Versuch wurden pro *C. albicans*-Stamm und Auswertungszeitpunkt fünf bis zehn Mäuse eingesetzt. Diesen wurde unter Ether-Betäubung je 20µl Inokulum intravaginal verabreicht. Der Verlauf der Infektion wurde durch die Bestimmung der vaginalen Pilzbelastung zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Inokulation kontrolliert [91]. Hierfür wurde bei jeder getöteten Maus eine Lavage des Vaginalkanals mit je 0,1ml PBS durchgeführt und anschließend das gesamte Vaginalgewebe präpariert. Die Lavagen und die Homogenisate der Vaginalgewebe wurden für die CFU-Bestimmung jeweils sequenziell verdünnt auf SabC-Agar ausplattiert. Das Auszählen der gewachsenen Kolonien erfolgte nach 48-72h Bebrütung bei RT. Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mittels des „Student`s *t*-Test“ durch Anwendung des „PRISM“-Programms [GraphPad Software, San Diego CA]. Werte von $P < 0.05$ (ermittelt durch „*two tailed*“ Test) wurden als signifikant erachtet.

Für die phänotypische Charakterisierung der Pilzstämme *in vivo* wurden Aliquots sowohl der Lavagen, als auch der präparierten Gewebe herangezogen. Nach Inkubation in 20% KOH zur Zersetzung des Mausgewebes und Sedimentierung der Zellen (10.000xg, 5min) wurden diese in eine Blancophor-Lösung (0,1% Blancophor P in 20% KOH) aufgenommen und floureszenz-mikroskopisch analysiert (vgl. II.2.5).

II.2.3.2.2. Systemische Infektion

Die *C. albicans* Blastosporen wurden wie vorher beschrieben (vgl. II.2.3.2.1) für die Infektion aufbereitet. Die Zellzahlen für die einzusetzenden Inokulumgrößen wurden in je 200µl PBS_{4°C} eingestellt und die CFU vor der Infektion bestimmt (vgl. II.2.3.2.1).

Die systemische Infektion der Mäuse erfolgte intravenös über die lateralen Schwanzvenen durch Injektion von 200µl Inokulum pro Maus. Je Versuch wurden pro eingesetztem *C. albicans*-Stamm acht bis zehn Mäuse infiziert. Die Auswertung erfolgte durch die Bestimmung der Überlebenszeit der Mäuse nach der Infektion. Die Überlebenskurven wurden in Anlehnung an Kaplan-Meier durch Anwendung des „PRISM“-Programms [GraphPad Software, San Diego CA] erstellt und mittels des „*log-rank*“ Test verglichen (Mantel and Haenszel, 1958). Ein *p* Wert < 0.05 wurde als signifikant erachtet.

Zur Bestimmung des *in vivo*-Phänotyps der eingesetzten *C. albicans*-Stämme wurden die

Nieren der infizierten Mäuse präpariert und nach Zersetzung und Färbung (vgl. II.2.3.2.1.) fluoreszenz-mikroskopisch untersucht (vgl. II.2.5).

II.2.5. Bilddokumentation

II.2.5.1. Aufarbeitung der Präparate

Für die Analyse von *C. albicans*-Zellen aus Flüssigkulturen wurden Aliquots der Zellsuspensionen auf Objektträger aufgetragen und ohne weitere Färbung eingedeckt. Proben aus *in vivo*-Infektionsversuchen wurden vor dem Anfertigen des Präparats mit dem optischen Aufheller Blankophor P gefärbt (vgl. II.2.3.2.1.). Die auf „Glas Slides“ fixierten Zellen von MΦ-Infektionen (vgl. II.2.4.1) wurden einer PAS-Färbung unterzogen und anschließend in „Kaisers Glyceringelatine“ [Merck, Nürnberg] eingebettet.

II.2.5.2. Mikroskopie

Die mikroskopische Auswertung erfolgte durch Aufnahme digitaler Bilder mittels einer „SPOT camera“ [Visitron Systems, Puchheim] an einem Zeiss Axiophot Mikroskop [Zeiss, Göttingen] und der Bildbearbeitung mit Hilfe der "MetaView imaging software" [release 4.6.5, Universal Imaging Corporation].

Ungefärbte und PAS-gefärbte Präparate wurden im Hellfeld aufgenommen. Blancophor-gefärbte Präparate (Färbungen vgl. II.2.5.1) wurden mittels UV-Licht (365nm) zur Fluoreszenz angeregt und unter Anwendung des „Filtersatz 2“ (Strahlenteiler: 395nm, Emmission: 420nm) [Zeiss, Göttingen] aufgenommen.

III. Ergebnisse

III.1. Expressionsanalysen: CaTEC1-regulierte hyphenspezifische Gene

Datenbankanalysen hatten ergeben, daß in den Promotoren der hyphenspezifischen Isogene *SAP4-6* zwei (*SAP4*) bzw. drei (*SAP5*, *SAP6*) TEA/ATTS Konsensus-Sequenzen (TCS) liegen. Da entsprechend zu erwarten war, daß die Expressionsmuster dieser Virulenzfaktoren nach Seruminduktion in der *catec1/catec1*-Mutante verändert sind, wurde diese in Northern Blot Analysen untersucht. Die aus dem Wildtyp-Stamm SC5314, der Mutante CaAS18 (*catec1/catec1*) und der Revertante CaAS20 (*catec1/catec1* pVEC-*CaTEC1*) isolierte RNA wurde gleichzeitig mit den Plasmiden p206 (*SAP4*-ORF), p207 (*SAP5*-ORF) und p208 (*SAP6*-ORF) hybridisiert. Wie in Abb. III-1 ersichtlich, sind die *SAP4-6* Gene in Abwesenheit von *CaTEC1* nicht mehr induzierbar (Spur 9-12), wohingegen im Wildtypstamm (Spur 1-4) und der Revertante (Spur 5-8) vergleichbare Mengen *SAP4-6* mRNA exprimiert werden [2].

Die Hybridisierung derselben RNA mit einer *EFG1*-Sonde (1,28kb *EFG1*-ORF aus pBI-HAHYD/*Bgl* II), zeigte ein gegenteiliges Ergebnis. Die zwei untersuchten Stämme CaAS18 und CaAS20 exprimierten dieselben Mengen des *EFG1*-Gens wie der Wildtyp-Stamm (Abb. III-1), was durch die Quantifizierung des *EFG1/ACT1* Expressionsverhältnisses mittels „PhosphorImager“ und der zugehörigen Software bestätigt wurde [2]. Die erhaltenen Daten lassen erkennen, daß die Expression von *EFG1* nicht von *CaTec1p* abhängig bzw. beeinflusst ist. Trotzdem ist die Expression von *EFG1* auf Wildtyp-Niveau nicht ausreichend, um die Bildung von Hyphen in Abwesenheit von *CaTEC1* zu regulieren. Dies deutet darauf hin, daß *CaTEC1* neben der Aktivierung von Virulenzfaktoren weitere regulatorische Funktionen während der Hyphenbildung übernimmt.

Für die Identifizierung weiterer, noch unbekannter *CaTEC1*-regulierter Gene von *C. albicans* wurde geplant, die Genexpression der *catec1/catec1*-Mutante und der *CaTEC1*-Revertante unter (1) hefe-favorisierenden und (2) hypheninduzierenden Bedingungen mittels „Micro Array“-Analysen vergleichend zu untersuchen. Als Voraussetzung für solche Analysen mußte ein reproduzierbares Expressionsniveau des *CaTEC1*-Gens in der Revertante gewährleistet sein. Um dies zu erreichen, sollte der Vektor pVEC-*CaTEC1* [2] stabil in den deletierten *CaTEC1*-Lokus des Stammes CaAS15 (*catec1/catec1*) [2] integriert werden. Der Vektor wurde dafür an einer *Bsu36* I-Schnittstelle in der 5'-UTR des *CaTEC1*-Gens geöffnet und über die *CaTEC1*-Flanken (5'-UTR [772bp] + *CaTEC1*-ORF + 3'UTR [1031bp] und 180bp

CaTEC1-5'UTR) durch homologe Rekombination in den deletierten *CaTEC1*-Lokus integriert (resultierender Stamm CaAS20^{int}). Um den *catec1/catec1*-Kontrollstammes zu generieren, wurde mittels *Nsi*I-Restriktion der *CaTEC1*-ORF aus dem Vektor pVEC-*CaTEC1* ausgeschnitten und das Vektorfragment über die verbleibenden *CaTEC1*-Flanken (270bp 5'UTR und 190bp 3'UTR) in das Genom von CaAS15 integriert (resultierender Stamm CaAS18^{int}). Die Bestätigung der Integrationen erfolgte auf molekularer Ebene mittels PCR und auf Zellebene in Hypheninduktionsversuchen (Daten nicht gezeigt). Außerdem wurden die Stämme in systemischen Mausinfektionsmodellen getestet. Abb. III-2 zeigt eine repräsentative Auswertung der erhaltenen Überlebenskurven. Der Vergleich zeigt, daß der Stamm CaAS18^{int} wie die bereits charakterisierte Mutante CaAS18 (*catec1/catec1* pVEC) in seiner Virulenz attenuiert ist (weiße Symbole in Abb. III-2) und daß durch das integrierte Plasmid pVEC-*CaTEC1* der Virulenzdefekt im Stamm CaAS20^{int} ebenso kompensiert wird, wie in der Revertante CaAS20 (*catec1/catec1* pVEC-*CaTEC1*) (schwarze Symbole in Abb. III-2). Damit wurden die Stämme CaAS18^{int} und CaAS20^{int} als geeignet für „Micro Array“-Analysen befunden und zur Durchführung dieser Versuche an die kooperierende Arbeitsgruppe von Steffen Rupp (Fraunhofer Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik, Stuttgart) weitergegeben. Bis zum gegenwärtigen Zeitpunkt wurden sechs Gene identifiziert, deren Expression in der Revertante nach Seruminduktion hochreguliert ist und die in Abwesenheit von *CaTEC1* nicht mehr aktiviert werden. Es handelt sich dabei um die Gene der hyphenspezifischen Zellwandproteine *HWP1* (*hyphal wall protein*) [94] und *HYR1* (*hyphally regulated*) [95], sowie die Adhärenz-vermittelnden Zelloberflächen-Proteine *ALS1,3,8* (*agglutinine-like sequence*) [96] und *ALA1* (*agglutinine-like adhesine*) [97]. Derzeit werden diese Ergebnisse in Northern Blot Analysen bestätigt.

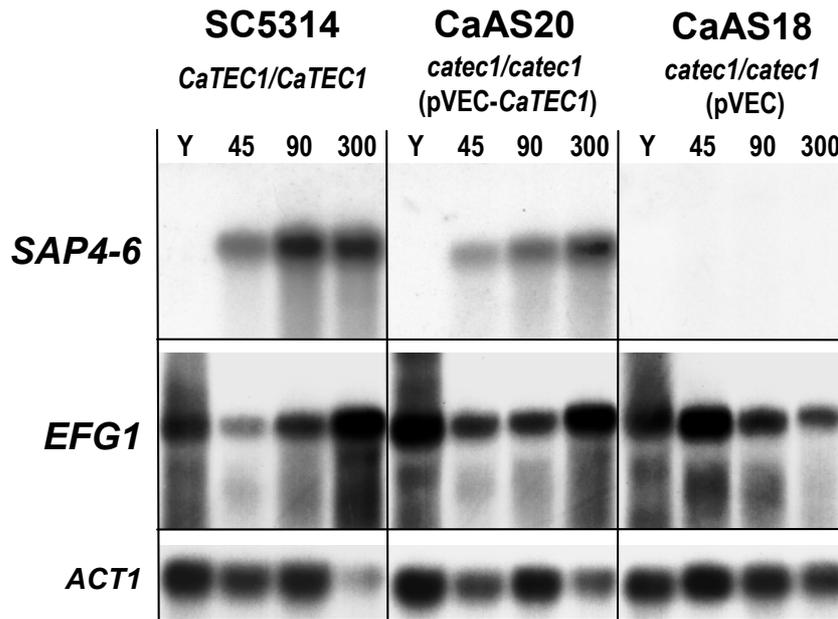


Abb. III-1: Geneexpression in der *catec1/catec1*-Mutante

Vergleich der *SAP4-6*- und der *EFG1*-Expression im Wildtyp Stamm SC5314 (Spur 1-4), der Revertante CaAS20 (Spur 5-8) und der *catec1/catec1*-Mutante CaAS18 (Spur 9-12) unter hefe-favorisierenden Bedingungen (Y) bzw. 45, 90 und 300min nach der Hypheninduktion durch Serum bei 37°C. In Abwesenheit von *CaTEC1* wird die *SAP4-6*-Expression in der Hyphephase nicht mehr aktiviert (oberes Autoradiogramm). Die *EFG1*-Expression ist in der *catec1/catec1*-Mutante hingegen unverändert (mittleres Autoradiogramm). Zur Kontrolle vergleichbarer Probenbeladung wurde dieselbe Northern Blot Membran mit *ACT1* hybridisiert (unteres Autoradiogramm).

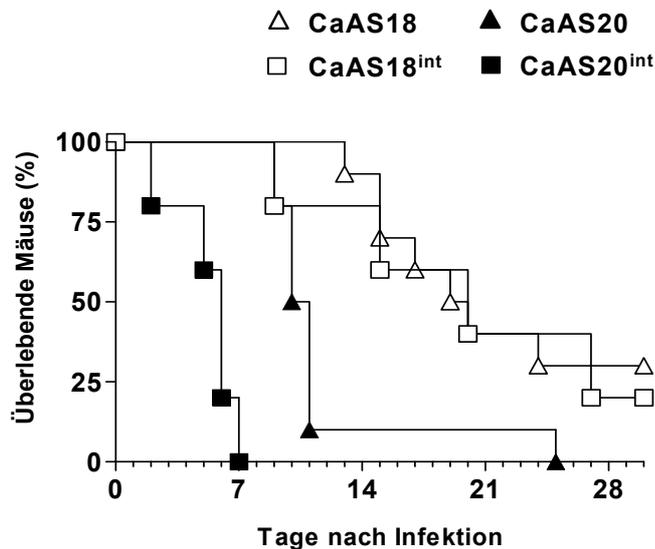


Abb. III-2: Virulenzcharakterisierung der Int-Stämmen

Virulenzassays von Balb/c-Mäusen, die mit je 1×10^6 Zellen der *catec1/catec1*-Mutanten (weiße Symbole) CaAS18^{int} (pVEC intrachromosomal) bzw. CaAS18 (pVEC extrachromosomal) oder der Revertanten-Stämme (schwarze Symbole) CaAS20^{int} (pVEC-*CaTEC1* intrachromosomal) bzw. CaAS20 (pVEC-*CaTEC1* extrachromosomal) infiziert wurden. Die Überlebenskurven zeigen, daß die Stämme nach Integration der Plasmide (Quadrate) vergleichbare Virulenzeigenschaften aufweisen, wie die Kontrollstämme mit extrachromosomalen Plasmiden (Dreiecke).

III.2. *catec1/catec1*-Mutante: Virulenzcharakterisierung

III.2.1. *in vitro*: Makrophagen-Infektion

Defekte in der Hyphenentwicklung gehen in *C. albicans*-Zellen zumeist mit dem Unvermögen einher, aus Makrophagen (M Φ) auszubrechen. Dies wurde bereits für verschiedene *C. albicans*-Mutanten, z.B. die *efg1/efg1*-Mutante [29], gezeigt. Um zu testen, ob sich die Defekte in der Hyphenbildung der *catec1/catec1*-Mutante ebenfalls auf die Fähigkeit zur Evasion aus M Φ auswirkt, wurden *in vitro* *C. albicans*-M Φ -Interaktionen untersucht. Die *catec1/catec1*-Mutante CaAS18 und die Revertante CaAS20 (*catec1/catec1* pVEC-*CaTEC1*) wurden für die Infektion von Peritonealexsudat-M Φ eingesetzt (Abb. III-3).

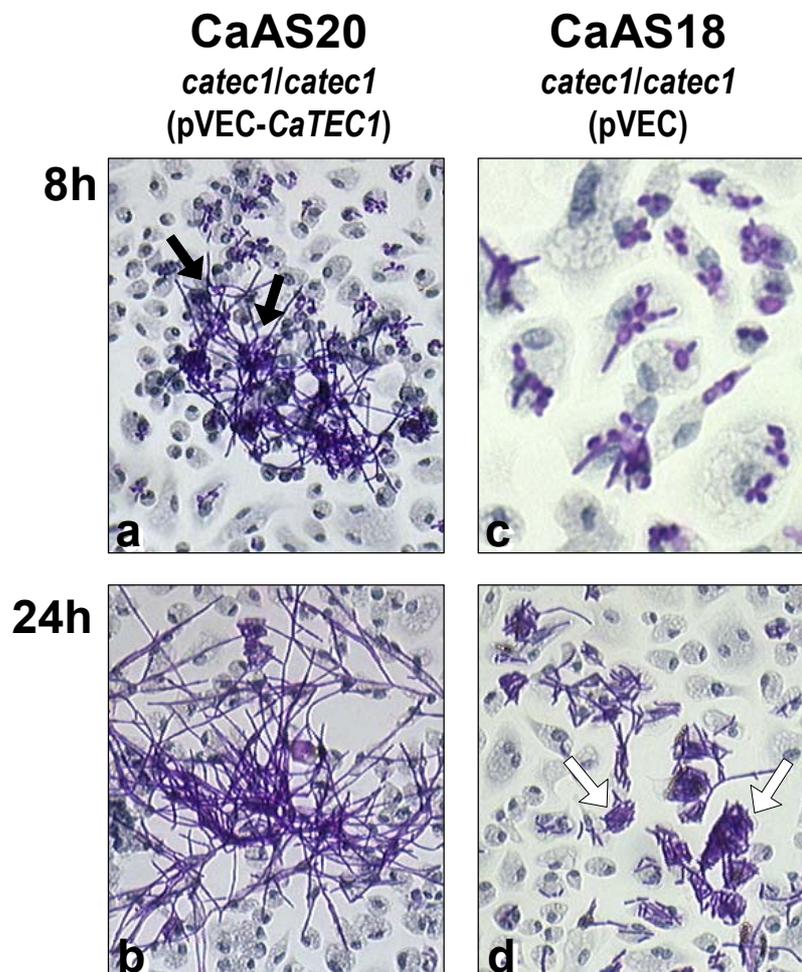


Abb. III-3: *C. albicans* - M Φ - Interaktion

Infektion von Peritonealexsudat-M Φ mit der *catec1/catec1*-Mutante CaAS18 bzw. der Revertante CaAS20 (*catec1/catec1* pVEC-*CaTEC1*) (MOI 1:16). Über die Inkubationszeit von 8h bzw. 24h entwickelten die CaAS20-Zellen Keimschläuche und lange Hyphen (a und b), die die Evasion aus den M Φ ermöglichten (schwarze Pfeile in a). Die Zellen der *catec1/catec1*-Mutante CaAS18 bildeten hingegen pseudohyphige Filamente (c) und akkumulierten in den M Φ (weiße Pfeile in d).

Während einer Infektionsdauer von 8h bildete die Revertante CaAS20 Keimschläuche, die sich zu Hyphenzellen entwickelten. Diese befähigten die Pilzzellen, aus den MΦ auszubrechen (schwarze Pfeile in Abb. III-3, a). Die Revertantenzellen entwickelten sich innerhalb von 24h unbeeinträchtigt weiter in typische Mycelien (Abb. III-3, b). Im Gegensatz dazu war die Mutante CaAS18 (*catec1/catec1* pVEC) nicht in der Lage, aus den MΦ zu entkommen. Die *catec1/catec1*-Pilzzellen häuften sich nach der Phagozytose durch die MΦ in denselben an (Abb. III-3, c; weiße Pfeile in d). Innerhalb von 24h erhöhte sich ihre Anzahl von 1,8 auf 3,9 *C. albicans*-Zellen pro MΦ. Daraus läßt sich schließen, daß *C. albicans* in Abwesenheit von *CaTEC1* in MΦ weiterleben und replizieren kann, jedoch aufgrund der Defekte in der Hyphenbildung nicht zu einem Ausbruch aus MΦ fähig ist. Das bedeutet, daß *CaTEC1* für die Evasion von *C. albicans* aus MΦ notwendig ist.

III.2.2. *in vivo*: Mausinfektionen

Um herauszufinden, ob *CaTEC1* auch für die Virulenz von *C. albicans in vivo* von Bedeutung ist, wurde untersucht, wie sich die *catec1/catec1*-Mutante in den murinen Infektionsmodellen der Vaginalinfektion und der systemischen Candidose verhält.

III.2.2.1. Vaginalinfektion

Für die Infektion des vaginalen Epithels wurden Balb/c Mäuse mit der *catec1/catec1*-Mutante CaAS18 und der Revertante CaAS20 (*catec1/catec1* pVEC-*CaTEC1*) intravaginal inokuliert und anschließend das Überleben bzw. die Replikation der Pilzzellen auf der vaginalen Haut kontrolliert. In Abb. III-4A sind zwei Auswertungen der unternommenen Versuche graphisch dargestellt. Die Anzahl der lebenden Pilzzellen (CFU), die aus dem infizierten Vaginalkanal zurückgewonnen werden konnte, war sowohl am Tag 7, als auch am Tag 14 nach der Infektion, für CaAS18 (weiße Symbole in Abb. III-4A) und CaAS20 (schwarze Symbole in Abb. III-4A) ähnlich. Die Deletion der beiden *CaTEC1*-Allele hatte demnach keinen signifikanten Effekt auf die Fähigkeit von *C. albicans*, sich auf dem vaginalen Epithel zu etablieren.

Die mikroskopische Aufarbeitung der fluoreszenzgefärbten Pilzzellen aus den Vaginallavagen zeigte weiterhin, daß beide eingesetzten Pilzstämme einen ähnlichen filamentösen Phänotyp aufweisen (Abb. III-4C; a und b). Die *in vitro* beobachteten Defekte in der Hyphenbildung der *catec1/catec1*-Mutante scheinen demnach im vaginalen Milieu nicht aufzutreten.

Diese Ergebnisse zeigen, daß *C. albicans* auch in Abwesenheit von *CaTEC1* in der Lage ist, auf der vaginalen Haut zu überleben und zu replizieren.

III.2.2.2. Systemische Infektion

Um eine systemische Infektion zu setzen, wurden Balb/c-Mäuse intravenös mit der *catec1/catec1*-Mutante CaAS18 und der Revertante CaAS20 (*catec1/catec1* pVEC-*CaTEC1*) inokuliert und anschließend der Krankheitsverlauf bzw. das Überleben der infizierten Mäuse überwacht. In Abb. III-4B ist eine repräsentative Auswertung der unternommenen Versuche dargestellt. Die Infektion mit CaAS20-Zellen resultierte im Sterben aller infizierten Mäuse innerhalb von 13d nach der Infektion (schwarze Kreise in Abb. III-4B). Dagegen überlebten 70% der Mäuse, die mit CaAS18-Zellen infiziert wurden, bis zum Abbruch des Versuches am Tag 50 nach der Infektion (weiße Kreise in Abb. III-4B). Diese Mäuse zeigten keinerlei klinische Krankheitsanzeichen (wie struppiges Fell, Gewichtsverlust, gekrümmte Haltung und Lethargie). Die statistische Analyse der beiden Überlebenskurven ergab signifikante Unterschiede ($p < 0,0001$) in der Mortalitätsrate der CaAS18- und CaAS20-infizierten Mäuse. Um ähnliche klinische Verläufe wie bei einer CaAS20-Infektion zu erzielen, mußten Inokulumgrößen von 1×10^7 CaAS18-Zellen für die Infektion eingesetzt werden (Daten nicht gezeigt).

Bei einem Vergleich der Pilzbeladung verschiedener Organe nach der intravenösen Applikation mit CaAS18 und CaAS20 zeigte sich, daß sich die Pilzzellen beider Stämme fast ausschließlich in den Nieren der infizierten Mäuse ablagern, wohingegen im Gehirn, der Milz und der Leber kaum Pilzzellen zu finden sind (Daten nicht gezeigt). Entsprechend versterben die infizierten Tiere zumeist an Nierenversagen. Die mikroskopische Aufarbeitung der fluoreszenzgefärbten Pilzzellen aus den Nieren der infizierten Mäusen zeigte, daß beide eingesetzten Pilzstämme ähnliche filamentöse Phänotypen aufweisen (Abb. III-4C; c,d und e). Genau so wie im vaginalen Milieu (vgl. III.2.2.1; Abb. III-4C, a und b) zeigt die *catec1/catec1*-Mutante im Nierengewebe eine vergleichbare Fähigkeit zur Hyphenbildung, wie die Revertante.

Daraus läßt sich schließen, daß die im Wirtsorganismus vorherrschenden Bedingungen die morphogenetische Entwicklung von *C. albicans* auch in Abwesenheit von *CaTEC1* induzieren. Trotz der Filamentation *in vivo* ist die Virulenz der *catec1/catec1*-Mutante im systemischen Modell jedoch signifikant supprimiert. *CaTEC1* scheint demnach in *C. albicans* eine äußerst wichtige Bedeutung für die Etablierung einer systemischen Infektion zu haben.

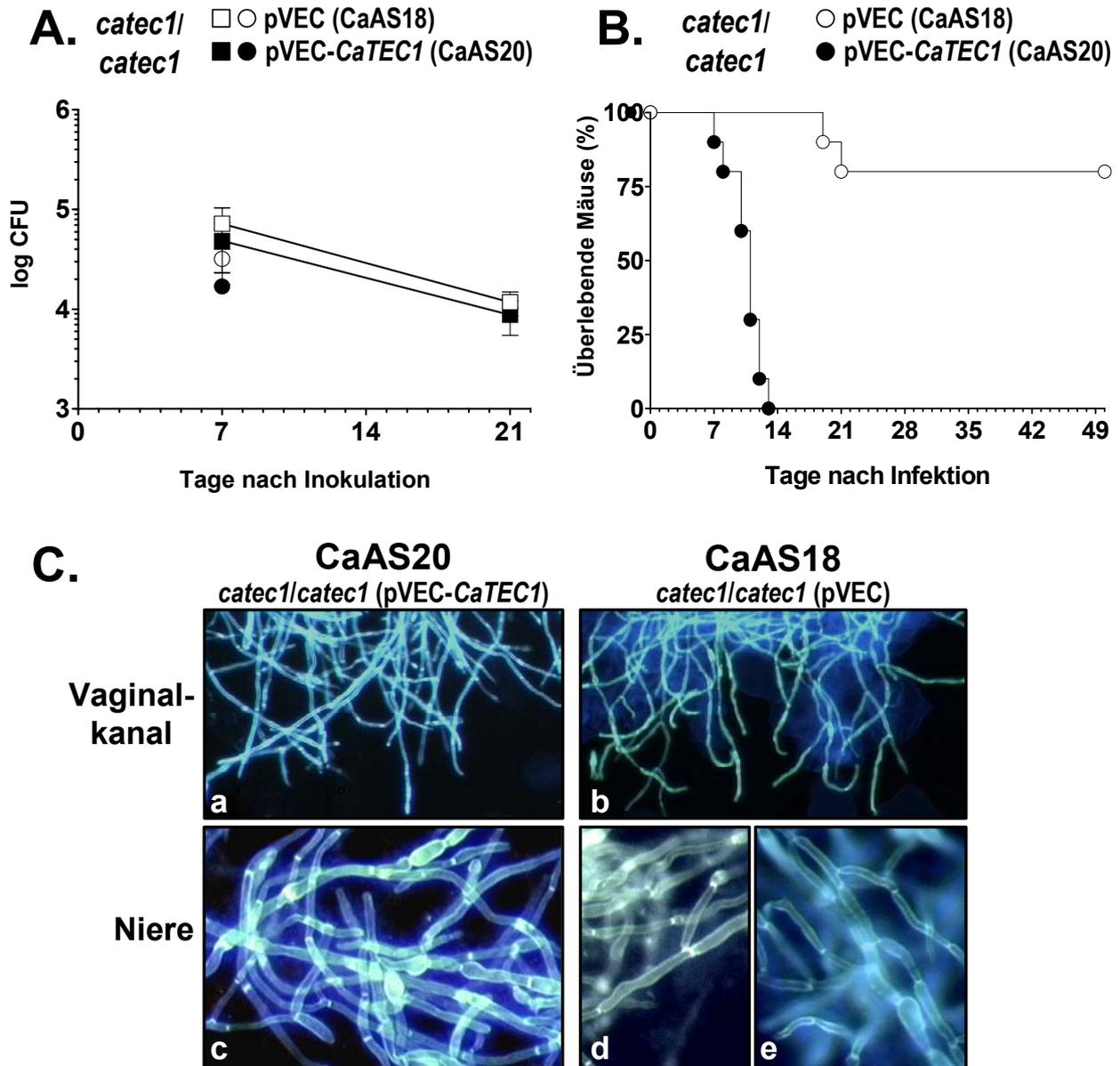


Abb. III-4: Virulenzcharakterisierung der *catec1/catec1*-Mutante

Virulenzassays von Balb/c-Mäusen, die mit der Mutante CaAS18 (*catec1/catec1* pVEC) bzw. der Revertante CaAS20 (*catec1/catec1* pVEC-CaTEC1) infiziert wurden. **A.** Pilzbelastung (log CFU) von Vaginallavagen infizierter Mäuse (n=10) am Tag 7 bzw. 21 nach Inokulation mit 5×10^4 *C. albicans*-Zellen. Die Auswertung von zwei unabhängigen Experimenten (Quadrate und Kreise) ergab, daß sich die *catec1/catec1*-Mutante (weiße Symbole) ebenso gut im Vaginalkanal etablieren kann, wie die Revertante (schwarze Symbole). **B.** Überlebenskurven von Mäusen (n=10), die mit 5×10^5 *C. albicans*-Zellen intravenös infiziert wurden. Die Virulenz der *catec1/catec1*-Mutante CaAS18 (weiße Kreise) ist im Vergleich zur Virulenz der Revertante CaAS20 (schwarze Kreise) signifikant ($p < 0,0001$) attenuiert. **C.** Fluoreszenzaufnahmen von Pilzzellen, die aus Vaginallavagen (a, b) und infizierten Nieren (c - e) isoliert wurden. Die *catec1/catec1*-Mutante CaAS18 ist *in vivo* ebenso in der Lage, Hyphen zu entwickeln (b, d und e), wie die Revertante CaAS20 (a und c).

III.3. Bestimmung der Position von CaTec1p in den morphogenetischen Signaltransduktionswegen von *C. albicans*

Die vorausgegangenen Ergebnisse zur Phänotypbestimmung der *C. albicans catec1/catec1*-Mutante zeigten, daß diese Defekte in der Hyphenbildung und Virulenz aufweist und daß *CaTEC1* offensichtlich eine wichtige Rolle bei der Regulation dieser Mechanismen übernimmt. Dementsprechend stellte sich die Frage, welche Position CaTEC1p in den Signalkaskaden der Hyphenbildung einnimmt. Um diese Frage zu beantworten wurden drei verschiedene Methoden angewendet: (1) die Phänotypen verschiedener Signalkaskadenmutanten wurden mit dem der *catec1/catec1*-Mutante verglichen, (2) die Expressionsmuster verschiedener Signaltransduktionsfaktoren wurden in der *catec1/catec1*-Mutante analysiert und ebenso die *CaTEC1*-Expression in diesen Signalkaskadenmutanten untersucht, (3) *CaTEC1* wurde in den entsprechenden Signalkaskadenmutanten überexprimiert und ebenso einzelne Faktoren der Signaltransduktionwege in der *catec1/catec1*-Mutante.

III.3.1. Phänotypvergleich verschiedener Signaltransduktionsmutanten mit dem *catec1/catec1*-Phänotyp *in vitro* und *in vivo*

Die *C. albicans cph1/cph1*-Mutante weist *in vitro* keinerlei Defekte während der seruminduzierten Hyphenbildung auf [47] und es sind keine Virulenzdefekte in Mausinfektionsmodellen nachzuweisen [29]. Die Deletion von *CaTEC1* [2] hat dagegen ähnliche Konsequenzen für die seruminduzierte Hyphenbildung und die Virulenz von *C. albicans* wie die Deletion des *RAS1* [30] oder des *EFG1*-Gens [29, 31]. Jede dieser Mutanten bildet nach der Seruminduktion *in vitro* überwiegend Pseudohyphen und ist nicht mehr in der Lage, echte Hyphen zu entwickeln. Diese Defekte hemmen in allen drei Mutanten die Evasion aus MΦ. Außerdem weisen alle drei Mutanten eine stark attenuierte Virulenz im systemischen Mausinfektionsmodell auf. Ras1p vermittelt als übergeordneter Signaltransduktionsfaktor hypheninduzierende Signale an den MAPK-Signaltransduktionweg (terminaler Transkriptionfaktor CPH1p) und an den cAMP-Signaltransduktionweg mit dem terminaler Transkriptionfaktor EFG1p [30]. Nur die Unterbrechung der cAMP-Signalkaskade durch die Deletion des *EFG1*-Gens verursacht Defekte ähnlich dem *catec1/catec1*-Phänotyp. Daraus läßt sich folgern, daß CaTec1p eine Komponente derselben Signalkaskade sein könnte, in der auch Efg1p liegt. Um diese Hypothese zu testen, wurde die Expression der entsprechenden Gene in den Signalkaskadenmutanten analysiert.

III.3.2. Expressionsanalysen

In Northern Blot Analysen wurde die *CaTEC1*-Expression nach Hypheninduktion in Mutanten untersucht, die entweder für *RAS1*, *CPH1*, *EFG1* einzeln, oder *EFG1* und *CPH1* in Kombination deletiert sind. (Abb. III-5). In Abwesenheit des *RAS1*-Gens erreichte die *CaTEC1*-Expression Wildtyp-Niveau, jedoch wurde die Transkription erst 5h nach Seruminduktion aktiviert (Abb. III-5B; Spur 1-3), während in der Revertante (*ras1/ras1* pVEC-*RAS1*) schon nach 1h eine Expression zu detektieren war (Abb. III-5B; Spur 4-6). In der *cph1/cph1*-Mutante (Abb. III-5A; Spur 13-16) war die *CaTEC1*-Expression nicht beeinträchtigt. Dagegen war die Induktion der *CaTEC1*-Transkription in Abwesenheit von *EFG1* (Abb. III-5A; Spur 5-8) ebenso wie in der *efg1/efg1 cph1/cph1*-Mutante (Abb. III-5A; Spur 9-12) nahezu abgeschaltet. Die Deletion von *EFG1* hat offensichtlich in allen getesteten genetischen Hintergründen starken Einfluß auf die *CaTEC1*-Expression. Aus diesen Ergebnissen wurde geschlossen, daß die Expression des *CaTEC1*-Gens hauptsächlich von Efg1p abhängig ist und daß CaTec1 entsprechend eine Position unterhalb von Efg1p in der cAMP-Signalkaskade einnimmt. Diese Hypothese wurde auch dadurch bestätigt, daß die *EFG1*-Expression in der *catec1/catec1*-Mutante (CaAS18) nicht beeinträchtigt ist. Dies wurde bereits im Rahmen der Charakterisierung der Mutante in Northern Blot Analysen gezeigt (vgl. III.1; Abb. III-1). Das Ergebnis zeigt, daß die Signalkaskade oberhalb von Efg1p nicht vom Fehlen des Transkriptionsfaktors CaTec1p betroffen ist. Neben Efg1p nimmt, wenn auch deutlich geringer, Ras1p Einfluß auf die *CaTEC1*-Expression. Dies zeigt die verzögerte *CaTEC1*-Aktivierung in der *ras1/ras1*-Mutante (Abb. III-5B). Um den Zusammenhang zwischen dem übergeordneten Signaltransduktionsfaktor Ras1p und dem anscheinend terminal der cAMP-Signalkaskade liegenden CaTEC1p näher zu charakterisieren, wurde die *CaTEC1*-Expression in einer *HST7*-überexprimierenden *ras1/ras1*-Mutante untersucht. Hst7p nimmt als MAP Kinase Kinase eine Position in der MAPK-Signalkaskade [44, 45, 98] ein und es wurde gezeigt, daß die *HST7*-ÜE die Morphologie- und Virulenzdefekte der *ras1/ras1*-Mutante revertiert [30]. Wie in Abb. III-5C zu sehen, wurde auch die verzögerte Aktivierung der *CaTEC1*-Transkription (5h nach Hypheninduktion) in Abwesenheit von *RAS1* (Abb. III-5C; Spur 1-3) durch die *HST7*-ÜE wieder auf 1h nach der Hypheninduktion zurückgesetzt (Abb. III-5C; Spur 4-6). Dies zeigt, daß Ras1p durch die Vermittlung von Signalen über die MAPK-Kaskade die *CaTEC1*-Expression beeinflusst. Daraus läßt sich schließen, daß CaTEC1p in diesem Signaltransduktionsweg, ebenso wie im cAMP-Weg, eine terminale Position einnimmt. Um diese Vermutung zu bestätigen, wurden die entsprechenden Signalkaskadenmutanten in Epistase-Analysen untersucht.

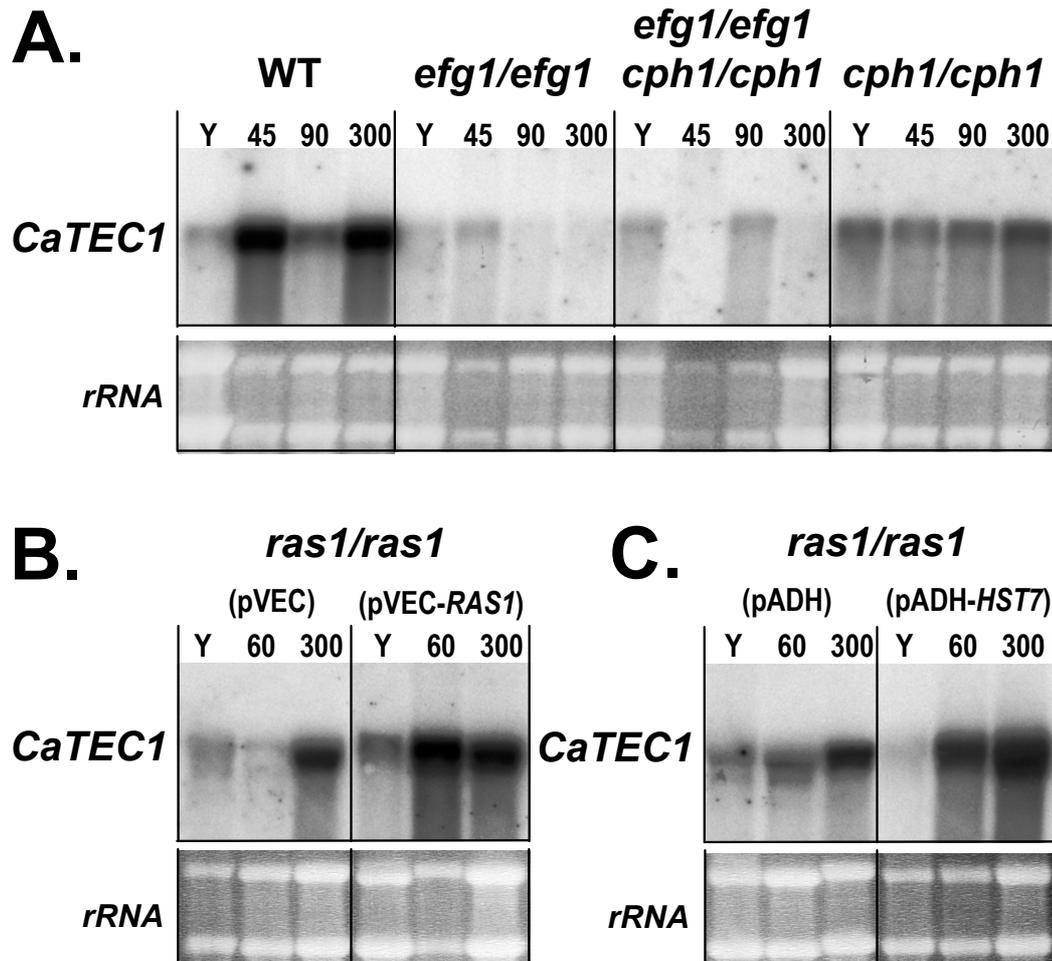


Abb. III-5: *CaTEC1*-Expressionsanalysen in Signalkaskadenmutanten

Vergleich der *CaTEC1*-Expressionsmuster in verschiedenen Signalkaskadenmutanten von *C. albicans* (Genotypen über Autoradiogramm angegeben) unter hefe-favorisierenden Bedingungen (Y) bzw. 45, 90 und 300min (in A.) oder 60 und 300min (in B. und C.) nach der Hypheninduktion durch Serum bei 37°C. Die Hybridisierung der isolierten RNA erfolgte mit einer *CaTEC1*-Sonde. Die EtBr-gefärbten Banden der ribosomalen RNA (*rRNA*) dienten als Kontrollen gleicher Probenbeladung. **A.** Die Aktivierung der *CaTEC1*-Expression infolge Seruminduktion ist in der *efg1/efg1*-Mutante und der *efg1/efg1 cph1/cph1*-Mutante inhibiert, wohingegen die *CPH1*-Deletion die *CaTEC1*-Expression nicht beeinträchtigt. **B.** Die Induktion der *CaTEC1*-Expression findet in der *ras1/ras1*-Mutante im Vergleich zur Revertante (*ras1/ras1* pVEC-RAS1) verzögert statt. **C.** Diese Verzögerung (vgl. B.) wird durch die Überexpression von *HST7* in der *ras1/ras1*-Mutante wieder revertiert.

III.3.3. Epistase-Analysen

Die Epistase-Analyse ist eine geeignete und gebräuchliche Methode, um die Funktion von Genen in *C. albicans* zu untersuchen. Eine wichtige Voraussetzung für diese Analysen ist ein regulierbarer Promotor, der eine kontrollierte Expression des nachgeschalteten Gens vermittelt. Für die Überexpression (ÜE) von *CaTEC1* in *C. albicans* wurde daher der Promotor des

transkriptionell regulierten *PCK1*-Gens [84] ausgewählt. *PCK1* codiert für ein Enzym der Glukoneogenese und der *PCK1*-Promotor (*PCKp*) ist daher in Anwesenheit von Glukose reprimiert. Nach seiner Aktivierung unter Glukosefreien Bedingungen (in Medien mit anderen Kohlenstoffquellen, vgl. III.3.3.1.2.) vermittelt der *PCKp* ein hohes Transkriptionsniveau (Faktor >100) des nachgeschalteten Gens. Über die genauen Mechanismen der Regulation ist derzeit noch wenig bekannt. Es wird jedoch in Bezug auf Sequenzhomologien zum gut charakterisierten *S. cerevisiae PCK1* [99] postuliert, daß die Repression und Aktivierung des *PCKp* über Bindung von spezif. Proteinen an regulatorische Sequenzen kontrolliert wird [84]. Ein weiterer wichtiger Punkt für die Auswahl des *PCKp* als ÜE-vermittelnder Promotor war, daß dieser nicht durch Signale der Hefe→Hyphe-Transition beeinflusst wird.

III.3.3.1. *CaTEC1*-Überexpressionsvektor: Klonierung, Funktionsanalyse und Systemetablierung *in vitro*

III.3.3.1.1. Klonierung des *CaTEC1*-Überexpressionsvektors p*PCKp-CaTEC1*

Für eine kontrollierte Expression wurde das *CaTEC1*-Gen hinter den regulierbaren *PCK1*-Promotor (vgl. III.3.3.1) in das Plasmids p*PCKp* kloniert. p*PCKp* wurde generiert, indem aus dem Vektor pBI-HAHD (freundlicherweise von J. Ernst (Düsseldorf) zur Verfügung gestellt) nach einer *Bgl* II-Restriktion das ca. 12kb große *PCKp*-Vektorfragment aufgereinigt und anschließend religiert wurde. Dieser Vektor diente in den Überexpressionsversuchen als Leervektorkontrolle. Mittels PCR wurde unter Verwendung der Oligonukleotide TEC1ORF.03 und TEC1ORFUTR.02 der gesamte ORF (2,2kb) und ca. 1kb der angrenzenden 3'UTR des genomischen *CaTEC1*-Gens amplifiziert. Das erhaltene 3,28kb Fragment wurde mit *Bam*HI verdaut und in die kompatible *Bgl* II-Schnittstelle des Plasmids p*PCKp* direkt hinter den *PCK*-Promotor kloniert, um den *CaTEC1*-Überexpressionsvektor p*PCKp-CaTEC1* zu generieren.

III.3.3.1.2. Funktionsanalyse des Vektors p*PCKp-CaTEC1* und Etablierung des Überexpressionssystems *in vitro*

Um das Funktionieren des Vektors p*PCKp-CaTEC1* zu testen wurde dieser in die uridinauxotrophe *catec1/catec1*-Mutante CaAS15 [2] transformiert (resultierender Stamm: CaAS35). Infolge einer *PCKp*-kontrollierten Expression des *CaTEC1*-Gens sollte der Phänotyp der *catec1/catec1*-Mutante revertiert werden. Als Kontrolle dienten CaAS15-Zellen, die mit dem Leervektor p*PCKp* transformiert wurden (resultierender Stamm CaAS34), sowie die Stämme CaAS18 (*catec1/catec1* pVEC) und CaAS20 (*catec1/catec1* pVEC-*CaTEC1*). Da der *PCKp* durch Glukose reprimiert wird, mußte diese im Überexpressionsmedium durch andere Koh-

lenstoffquellen, wie z.B. Succinat oder Casaminsäuren (SCAA) [84] ersetzt werden. Die Stämme wurden daher parallel in 2% Succinat-Medium und 2% SCAA-Medium bei (1) 30°C oder (2) 37°C in Anwesenheit von 10%(v/v) FCS inkubiert. Das Succinat-Medium wurde daraufhin als ungeeignet beurteilt, da die Zellen aller Stämme unter den untersuchten Bedingungen deformierten und zu Aggregaten verklumpten. In Anwesenheit von SCAA hingegen entwickelten sich die Zellen der Kontrollstämme CaAS18 und CaAS20 morphologisch wie zuvor für etablierte Kulturbedingungen beschrieben [2]. Des weiteren bildeten die pPCK ρ -*CaTEC1*-transformierten *catec1/catec1*-Zellen in SCAA-Medium unter allen untersuchten Bedingungen echte Hyphen (Abb. III-6; b und d). Die mit dem Kontrollvektor pPCK ρ transformierten Zellen wiesen hingegen den typischen *catec1/catec1*-Phänotyp auf. Sie wuchsen unter hefe-favorisierenden Bedingungen als Blastosporen (Abb. III-6; a) und bildeten unter hyphe-favorisierenden Bedingungen Pseudohyphen aus (Abb. III-6; c). Damit wurde die Funktionalität des pPCK ρ -*CaTEC1* bestätigt und im Folgenden alle Epistase-Analysen in SCAA-Medium unter (1) hefe-favorisierenden Bedingungen bei 30°C und (2) hyphe-favorisierenden Bedingungen bei 37°C in Anwesenheit von 10%(v/v) FCS durchgeführt.

III.3.3.2. *In vitro*: *CaTEC1*-Überexpression im WT und in Signalkaskadenmutanten

Während der PCK ρ -kontrollierten *CaTEC1*-Expression in der *catec1/catec1*-Mutante (vgl. III.3.3.1.2) fiel bereits auf, daß nicht nur unter hypheninduzierenden, sondern auch unter hefe-favorisierenden Bedingungen eine Hyphenentwicklung in den pPCK ρ -*CaTEC1*-transformierten Zellen stattgefunden hat (Abb. III-6; b und d). Auch in Wildtyp-Zellen, die mit dem pPCK ρ -*CaTEC1* transformiert wurden, konnte infolge der kontrollierten *CaTEC1*-Expression unter hefe-favorisierenden Bedingungen Hyphenbildung induziert werden (Abb. III-6; f). Dies deutet darauf hin, daß CaTEC1p an sich ausreichend ist, um auch in Abwesenheit der stringenten hypheninduzierenden Signale Temperaturerhöhung auf 37°C und Anwesenheit von Serum in *C. albicans* Filamentation zu aktivieren. Da die nach Seruminduktion gebildeten Hyphen der mit dem Leervektor pPCK ρ transformierten WT-Zellen (Abb. III-6; g) morphologisch nicht von denen des *CaTEC1*-überexprimierenden WT (Abb. III-6; h) zu unterscheiden sind, kann ebenfalls gefolgert werden, daß die durch Überexpression entstandenen unphysiologisch hohen Mengen an CaTEC1p in der Zelle die Hyphenbildung nicht beeinträchtigen.

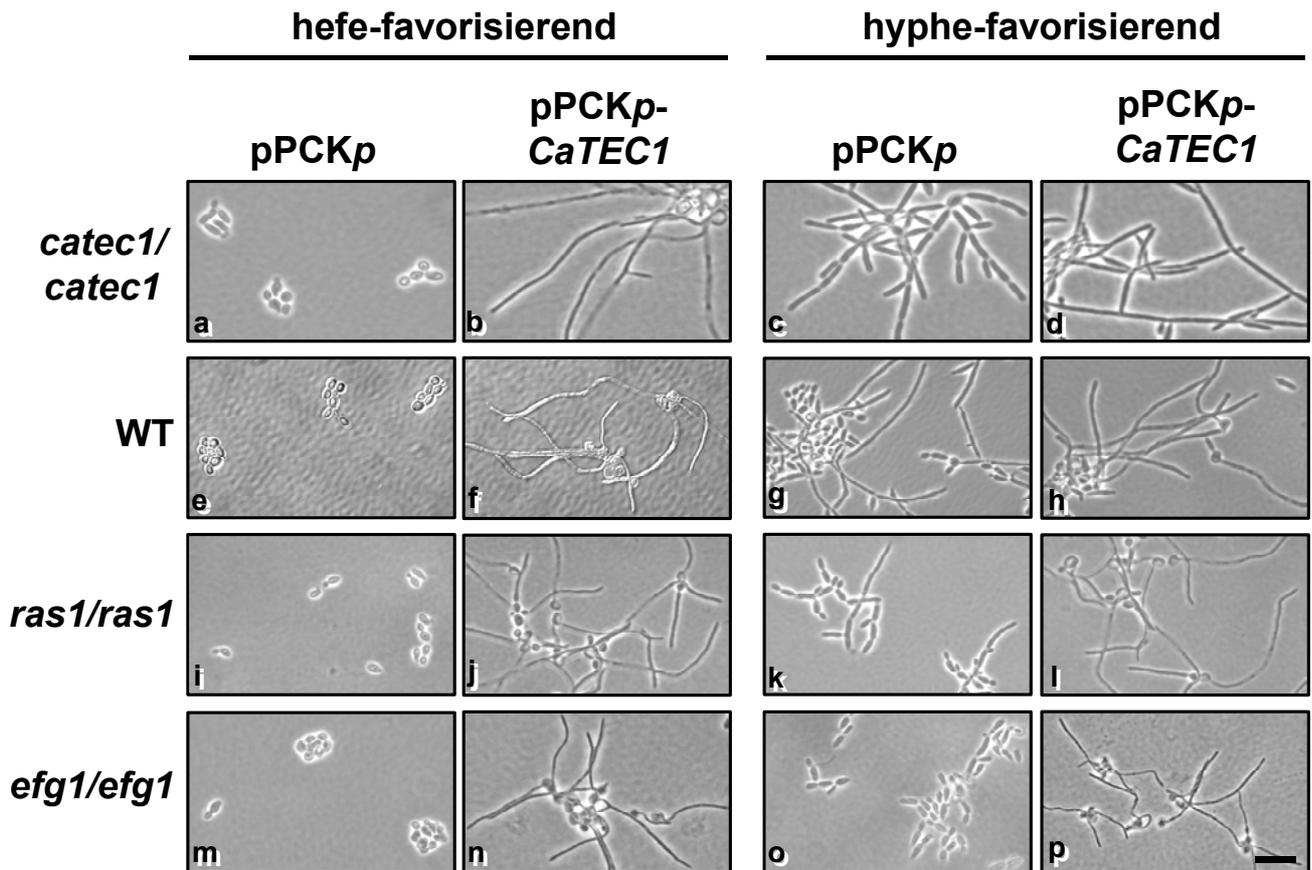


Abb. III-6: *CaTEC1*-Überexpression in Signalkaskadenmutanten

Die Auswirkung der *CaTEC1*-Expression auf die morphologische Entwicklung ausgewählter Stämme (Genotypen links der Mikroskopaufnahmen angegeben) wurde unter hefe- und hyphe-favorisierenden Bedingungen *in vitro* untersucht (Inkubationsbedingungen und Vektor-Status sind über den Mikroskopaufnahmen aufgeführt; Maßstab entspricht 10µm). Die Reversion des *catec1/catec1*-Phänotyps (c) nach Transformation mit pPCKp-*CaTEC1* (d) zeigt, daß der Überexpressionsvektor im etablierten *in vitro*-System funktioniert. Die durch die *CaTEC1*-Überexpression nicht beeinträchtigte Hyphenbildung des Wildtyp-Stammes (g und h) zeigt, daß unphysiologisch hohe Mengen *CaTEC1*p diese morphologische Entwicklung nicht stören. In den Signalkaskadenmutanten *ras1/ras1* (k) und *efg1/efg1* (o) wurden die Defekte in der Hyphenbildung durch die *CaTEC1*-Überexpression kompensiert (l und p). In allen untersuchten Stämmen induzierte die *CaTEC1*-Überexpression unter hefe-favorisierenden Bedingungen Hyphenbildung (b, f, j, n). Die Transformation mit pPCKp hatte hingegen unter allen untersuchten Bedingungen keinen Effekt auf die morphologische Entwicklung.

Daraufhin wurden uridinauxotrophe *C. albicans ras1/ras1*-, *efg1/efg1*- und *cph1/cph1*-Zellen mit pPCKp-*CaTEC1* oder dem Leervektor pPCKp transformiert und deren morphologische Entwicklung unter hefe- und hyphe-favorisierenden Bedingungen untersucht. Solange die Zellen in glukosehaltigem Flüssigmedium vorkultiviert wurden (PCKp reprimiert; vektorvermittelte *CaTEC1*-Expression inaktiv) konnten keine Unterschiede zwischen den pPCKp-*CaTEC1*- und den pPCKp-transformierten Zellen festgestellt werden. Nach einem Transfer in glukosefreies

SCAA-Medium (PCK ρ dereprimiert; vektorvermittelte *CaTEC1*-Expression aktiv) zeigten sich jedoch deutliche morphologische Unterschiede. Wie in Abb. III-6 zu erkennen, wurden die Phänotypen sowohl der pPCK ρ -*CaTEC1*-transformierten *ras1/ras1*- (Abb. III-6; k und l) als auch der *efg1/efg1*-Mutante (Abb. III-6; o und p) unter hyphe-favorisierenden Bedingungen revertiert. Die Mutanten entwickelten wieder echte Hyphen. Die mit dem Leervektor pPCK ρ transformierten isogenen Mutanten wiesen dagegen die typischen Defekte in der serum-induzierten Hyphenbildung auf und bildeten pseudohyphige Filamente. Da die *cph1/cph1*-Mutante in serumhaltigen Medien an sich keinen Phänotyp zeigt [47], konnten nach kontrollierter *CaTEC1*-Expression auch keine Unterschiede festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Unter hefe-favorisierenden Bedingungen wurde in allen untersuchten Mutanten durch die PCK ρ -kontrollierte *CaTEC1*-Expression Filamente gebildet. Diese glichen in ihrer Morphologie, der Anordnung der Septen und dem Verzweigungsmuster den von pPCK ρ -*CaTEC1*-transformierten Wildtypzellen gebildeten Hyphen.

Diese Ergebnisse zeigen, daß durch die induzierte Expression von *CaTEC1* die Hyphenbildung von *C. albicans* in Abwesenheit sowohl der hypheninduzierenden Signale (Serum, 37°C), als auch der übergeordneten Signaltransduktionsfaktoren Ras1p, Cph1p und Efg1p, das Programm der Hyphenentwicklung ausgeführt werden kann.

Durch diese Ergebnisse wurde die Hypothese, daß *CaTEC1*p eine Position unterhalb von Ras1p, Cph1p und Efg1p in den Signalkaskaden der Hyphenbildung einnimmt, weiter bekräftigt. Außerdem konnte durch die kontrollierte Überexpression der terminalen Signalkaskadenkomponenten *CPH1* und *EFG1* in der *catec1/catec1*-Mutante keine Reversion des *catec1/catec1*-Phänotyp erreicht werden (Abb. III-7). Dies weist zusätzlich darauf hin, daß diese Faktoren oberhalb von *CaTEC1*p in den Signaltransduktionswegen positioniert sind.

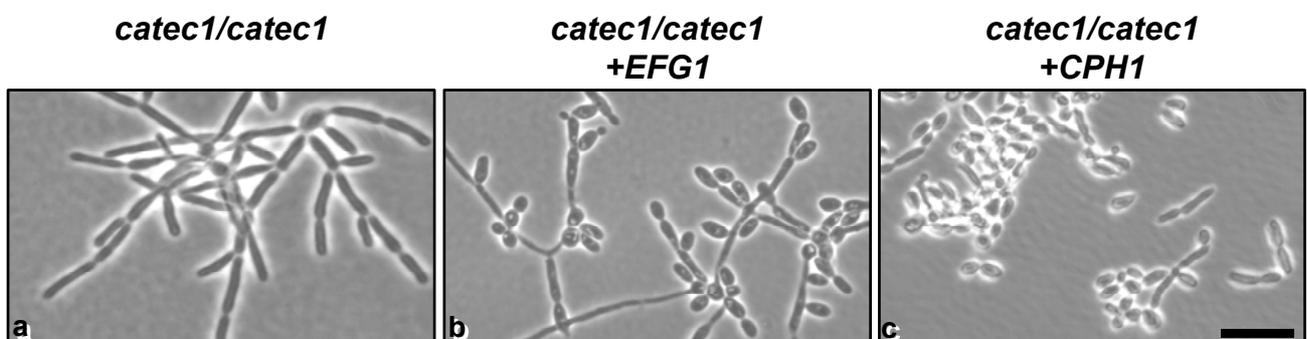


Abb. III-7: *EFG1*- und *CPH1*-Überexpression in der *catec1/catec1*-Mutante

Durch die plasmidvermittelte Überexpression von *EFG1* (b) und *CPH1* (c) unter hyphe-favorisierenden Bedingungen *in vitro*, konnten die Defekte in der Hyphenbildung der *catec1/catec1*-Mutante (a) nicht kompensiert werden. (Maßstab entspricht 10 μ m).

III.3.3.3. *In vivo*: *CaTEC1*-Überexpression im systemischen Mausinfektionsmodell

III.3.3.3.1. Funktionsanalyse des Überexpressionsvektors im systemischen Mausmodell

Um das Funktionieren des Vektors pPCKp-*CaTEC1* unter *in vivo*-Bedingungen zu untersuchen, wurden Balb/c-Mäuse mit den Stämmen CaAS34 (*catec1/catec1* pPCKp) und CaAS35 (*catec1/catec1* pPCKp-*CaTEC1*) intravenös infiziert. Bei einer vektorvermittelten *CaTEC1*-Expression sollten die Virulenzdefekte der *catec1/catec1*-Mutante kompensiert werden. Wie aus Abb. III-8A ersichtlich, verstarben die Mäuse, die mit der pPCKp-*CaTEC1*-transformierten *catec1/catec1*-Mutante (CaAS35) infiziert wurden in Abhängigkeit der Inokulumgröße innerhalb von 15 bzw. 34d (schwarze Symbole in Abb. III-8). Trotz Infektion mit der höchsten Inokulumgröße starben von den Mäusen, die mit dem pPCKp-transformierten Kontrollstamm (CaAS34) infiziert waren, nur 33% innerhalb des untersuchten Zeitraums von 38d (weiße Symbole in Abb. III-8). Die statistische Analyse der beiden Überlebenskurven von CaAS34 und CaAS35 (Inokulumgröße 2×10^6) ergab einen signifikanten Unterschied ($p < 0,002$). Die PCKp-kontrollierte *CaTEC1*-Expression findet demzufolge *in vivo* statt und der Vektor pPCKp-*CaTEC1* kann für Epistaseversuche unter *in vivo*-Infektionsbedingungen herangezogen werden.

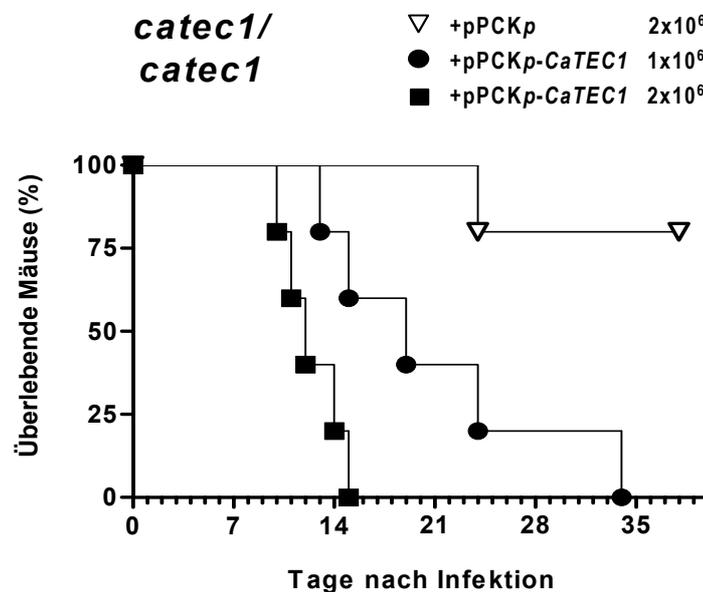


Abb. III-8: Funktionsanalyse des *CaTEC1*-Überexpressionsvektors *in vivo*

Überlebenskurven von Balb/c-Mäusen ($n=5$), die mit der pPCKp-transformierten *catec1/catec1*-Mutante (weiße Dreiecke) bzw. der pPCKp-*CaTEC1*-transformierten *catec1/catec1*-Mutante (schwarze Symbole) infiziert wurden (Inokulumgrößen vgl. Legende). Die Transformation mit pPCKp bewirkte keine Veränderung des *catec1/catec1*-Phänotyps. Durch den Vektor pPCKp-*CaTEC1* werden hingegen die Virulenzdefekte der *catec1/catec1*-Mutante kompensiert. Die vektorvermittelte *CaTEC1*-Überexpression findet demzufolge *in vivo* statt.

III.3.3.3.2. Infektionsversuche

Die *C. albicans cph1/cph1*-Mutante weist keine Virulenzdefekte im systemischen Mausinfektionsmodell auf [29]. Die Deletion des *EFG1*-Gens verursacht dagegen eine Attenuation der Virulenz und diese wird hauptsächlich auf die Defekte dieser Mutante bei der Hyphenbildung *in vitro* zurückgeführt [29]. Durch die kontrollierte Expression des *CaTEC1*-Gens in der *efg1/efg1*-Mutante konnte die Hyphenbildung restauriert werden (vgl. III.3.3.2; Abb. III-6). Daher sollte durch Infektion von Balb/c-Mäusen mit der pPCKp-*CaTEC1*-transformierten *efg1/efg1*-Mutante kontrolliert werden, ob auch die Virulenzdefekte dieser Mutante durch die *CaTEC1*-Überexpression kompensiert werden können.

In Abb. III-9A sind die Überlebenskurven der infizierten Mäuse dargestellt. Wurde die mit pPCKp-*CaTEC1* transformierte *efg1/efg1*-Mutante für die Infektion eingesetzt, waren am Tag 77 nach Infektion 75% der Mäuse verstorben (schwarze Kreise in Abb. III-9A). Von den Mäusen, die mit der pPCKp-transformierten Mutante infiziert wurden, erlagen hingegen nur 33% der Infektion (weiße Kreise in Abb. III-9A). Die attenuierte Virulenz der *efg1/efg1*-Mutante scheint demnach durch die *CaTEC1*-Überexpression verstärkt zu werden.

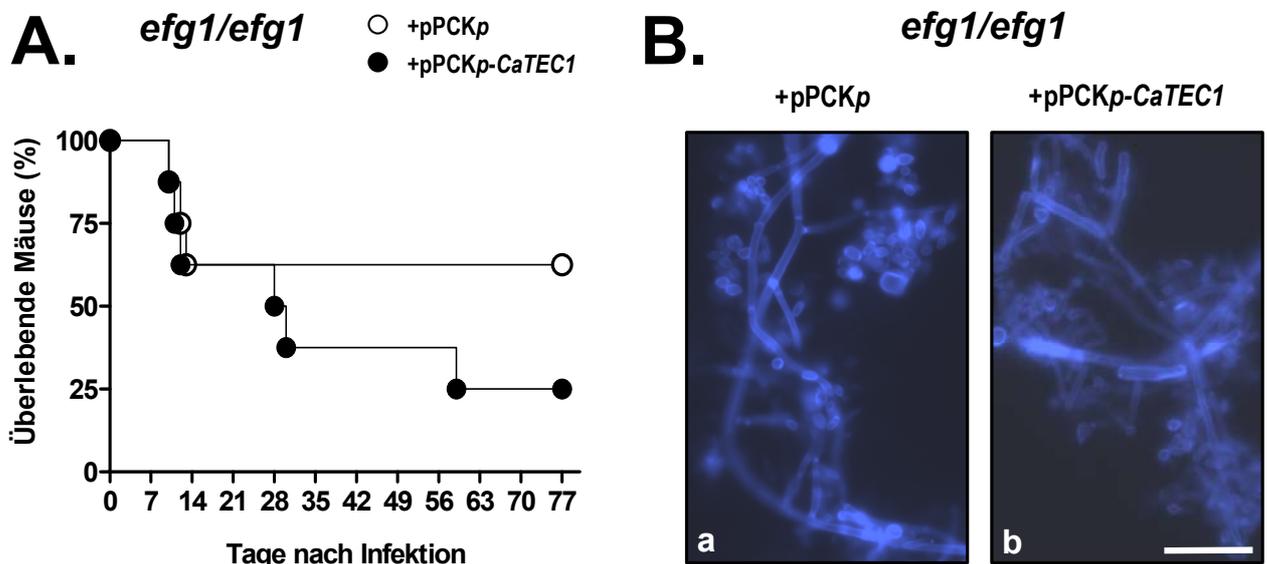


Abb. III-9: *CaTEC1*-Überexpression in der *efg1/efg1*-Mutante *in vivo*

Virulenzassays von Balb/c-Mäusen, die mit 1×10^6 Zellen der pPCKp-transformierten *efg1/efg1*-Mutante (weiße Kreise) bzw. der pPCKp-*CaTEC1*-transformierten *efg1/efg1*-Mutante (schwarze Kreise) infiziert wurden.

A. Überlebenskurven der infizierten Mäuse (n=10). Die attenuierte Virulenz der *efg1/efg1*-Mutante wird durch die vektorvermittelte *CaTEC1*-Überexpression wieder verstärkt. **B.** Fluoreszenzaufnahmen der Pilzzellen, die aus den infizierten Nieren isoliert wurden. Die *efg1/efg1*-Mutante (pPCKp-transformiert) ist *in vivo* in der Lage, Hyphen zu entwickeln (a) und diese Hyphenbildung wird durch die *CaTEC1*-Überexpression nicht beeinträchtigt (b). (Maßstab entspricht 10µm).

Wie schon für die *catec1/catec1*-Mutante beschrieben (vgl. III.2.2.2) [2] konnte auch im Rahmen dieses Versuches gezeigt werden, daß aus infizierten Nieren isolierte *efg1/efg1*-Mutantenzellen *in vivo* Hyphen entwickeln können (Abb. III-9B; a). Diese Filamentbildung wurde durch die Überexpression von *CaTEC1* nicht beeinträchtigt (Abb. III-9B: b).

III.3.4. *CaTEC1*-induzierte Filamentation und Virulenzreaktivierung in der *efg1/efg1 cph1/cph1*-Doppelmutante

In Abwesenheit von *EFG1* weist *C. albicans in vitro* eine defekte Hyphenbildung auf und die Virulenz der *efg1/efg1*-Mutante ist *in vivo* attenuiert [29]. Die zusätzliche Deletion von *CPH1* resultierte in einer Mutante (Stamm HLC54), die als nichtfilamentös und avirulent beschrieben wurde [29]. Aufgrund vorausgegangener Daten [2] und den hier vorgestellten Ergebnissen kann für *CaTEC1* eine Rolle als zentraler Regulator von filamentations- und virulenzaktivierenden Signalen postuliert werden. Um dieses Postulat zusätzlich zu untermauern, wurde die Auswirkung der *CaTEC1*-Überexpression auf die morphologische Entwicklung und die Virulenz der stark beeinträchtigten *efg1/efg1 cph1/cph1*-Doppelmutante (HLC54) untersucht.

III.3.4.1. Beschreibung der Phänotypvarianten *CaAS25sm* und *CaAS25^{wr}*

III.3.4.1.1. Kolonie- und Zellmorphologie

Für die Überexpression von *CaTEC1* in der *efg1/efg1 cph1/cph1* Mutante wurden Zellen des Stammes HLC54^{ura⁻} (uridinauxotrophes Derivat vom Elternstamm HLC54, der uns freundlicherweise von G.R. Fink (Boston) zur Verfügung gestellt wurde) mit pPCKp-*CaTEC1* oder dem Leervektor pPCKp transformiert. Für erste Phänotypcharakterisierungen wurden die erhaltenen Stämme *CaAS24* (transformiert mit pPCKp) und *CaAS25* (transformiert mit pPCKp-*CaTEC1*) auf verschiedenen Medien kultiviert. Auf glukosefreiem SCAA-Agar (PCKp dereprimiert; vektorvermittelte *CaTEC1*-Expression aktiv) bildete der Kontrollstamm *CaAS24* erhabene, glatte, glänzende, scharf abgegrenzte Kolonien (Abb. III-10A; h). Die *CaAS25*-Zellen hingegen filamentierten infolge der PCKp-induzierten *CaTEC1*-Expression und die entstehenden Kolonien wuchsen in den Agar ein (Abb. III-10A; b und d). Die Agarinvasion des Stammes *CaAS25^{wr}* erfolgte dabei tiefer als die des Stammes *CaAS25sm*, dessen Filamente nur oberflächlich in den Agar einwuchsen. Auf dem glukosehaltigen Vollmedium YPD (PCKp reprimiert; vektorvermittelte *CaTEC1*-Expression inaktiv) konnten unerwarteterweise zwei Koloniemorphologien der unabhängigen pPCKp-*CaTEC1*-Transformanten unterschieden werden. $25 \pm 5\%$ (Mittelwert \pm Standardabweichung aus drei unabhängigen Transformationen) der

Transformanten bildeten auf YPD-Agar flache, matte Kolonien, die Falten aufwarfen (repräsentativer Klon CaAS25^{wr}, Abb. III-10A; c). Die restlichen pPCKp-CaTEC1-Transformanten bildeten glatte, glänzende Kolonien (repräsentativer Klon CaAS25sm, Abb. III-10A; a) wie der pPCKp-transformierte Kontrollstamm CaAS24 (Abb. III-10A; g). Die Koloniemorphologien der pPCKp-CaTEC1-Transformanten waren erblich, denn die wiederholte Subklonierung von CaAS25^{wr} resultierte ausschließlich in faltigen Kolonien, während CaAS25sm-Subklone ausschließlich glatte Kolonien bildeten.

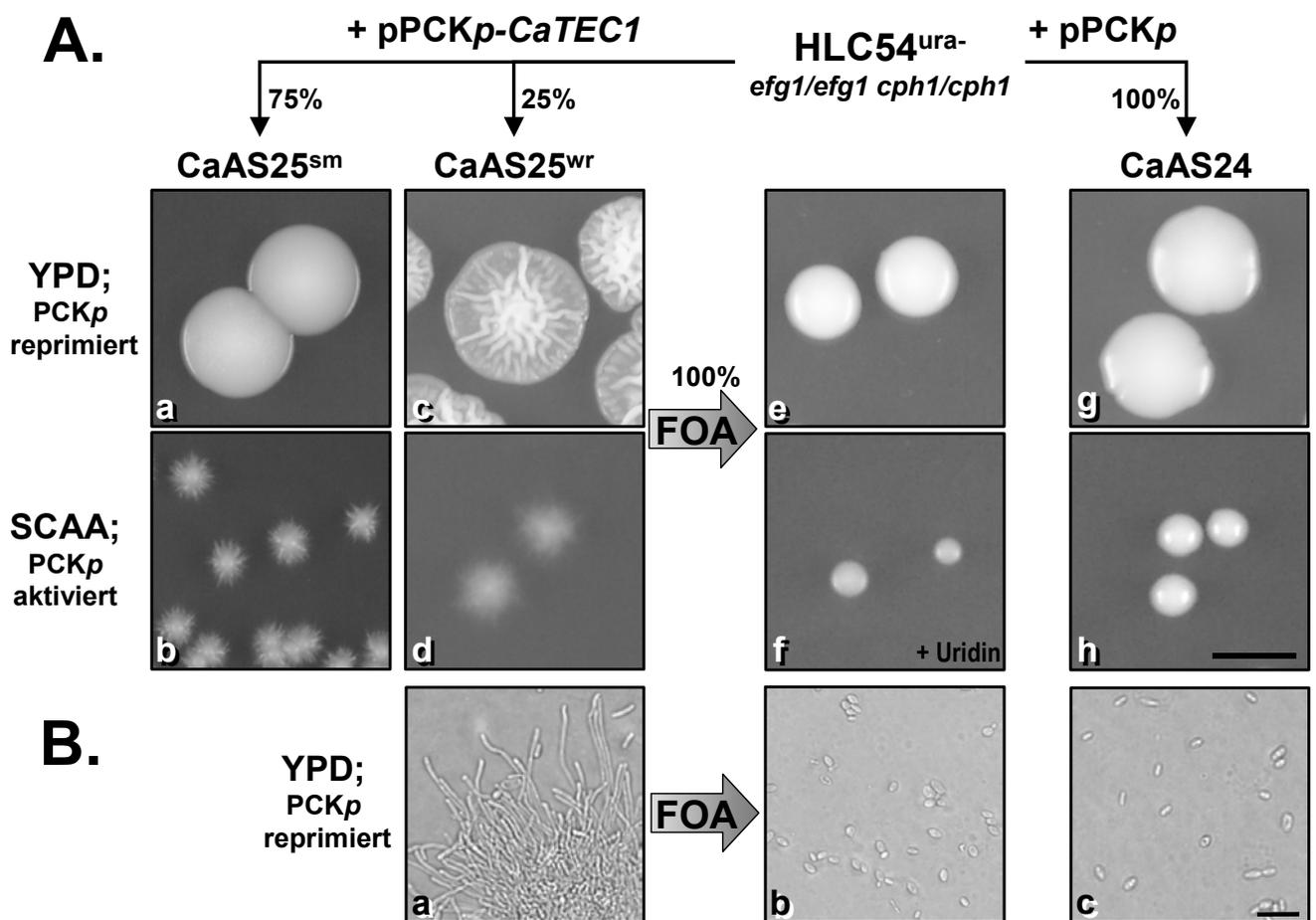


Abb. III-10: Charakterisierung der Phänotypvarianten

Morphologische Untersuchung der HLC54^{ura-}-Derivate CaAS24 (pPCKp-transformiert) und der pPCKp-CaTEC1-transformierten Phänotypvarianten CaAS25sm (75% der Transformanten) und CaAS25^{wr} (25% der Transformanten). **A.** CaAS25^{wr} wächst unter PCKp-aktivierenden Bedingungen auf SCAA-Medium tiefer in den Agar ein als CaAS25sm (b und d). Die faltige Koloniemorphologie des Stammes CaAS25^{wr} unter PCKp-reprimierenden Bedingungen auf glukosehaltigem YPD-Medium (c) wird durch die Deletion des Vektors pPCKp-CaTEC1 mittels FOA-Selektion (grauer Pfeil) eliminiert (e). Der Kontrollstamm CaAS24 (transformiert mit dem leeren Kontrollvektor pPCKp) zeigt keinen Phänotyp (g und h). (Maßstab entspricht 10µm). **B.** Mikroskopische Untersuchung des Stammes CaAS25^{wr}. CaAS25^{wr} bildet unter PCKp-reprimierenden Bedingungen auf glukosehaltigem YPD-Medium Filamente (a). Diese Fähigkeit geht mit der Deletion des Vektors pPCKp-CaTEC1 mittels FOA-Selektion (grauer Pfeil) verloren (b). (Maßstab entspricht 10µm).

Für eine weitere Charakterisierung der pPCK ρ -CaTEC1-transformierten *efg1/efg1 cph1/cph1* Mutante mußte zunächst ausgeschlossen werden, daß die faltige Koloniemorphologie auf zufällig oder durch die Transformation verursachte Mutationen im Genom des Elternstammes HLC54^{ura^r} zurückzuführen ist, sondern durch den transformierten Vektor pPCK ρ -CaTEC1 verursacht wurde. Daher wurden erneut uridinauxotrophe Derivate desselben HLC54-Stammes (Quelle: G.R. Fink, Boston) mit pPCK ρ -CaTEC1 transformiert. Die resultierenden Transformanten bildeten ebenfalls Koloniemorphologie-Varianten wie zuvor beschriebenen. Auch mit pPCK ρ -CaTEC1-Transformanten eines zusätzlich untersuchten *efg1/efg1 cph1/cph1*-Stammes (Quelle: S. Rupp, Stuttgart) wurden gleiche Ergebnisse erhalten. Die parallel generierten pPCK ρ -Transformanten wiesen hingegen zu keiner Zeit faltige Kolonien auf. Dies deutete bereits darauf hin, daß die faltige Koloniemorphologie durch den Vektor pPCK ρ -CaTEC1 verursacht wurde.

Um diesem Hinweis nachzugehen, wurde der Vektor durch Selektion auf FOA-Medium wieder aus dem Stamm CaAS25^{wr} deletiert. Die Deletion des Vektors konnte durch nichtinvasives Wachstum und fehlende Filamentbildung der resultierenden Klone auf SCAA-Agar bestätigt werden (Abb. III-10A; f). Außerdem bildete nach der pPCK ρ -CaTEC1-Deletion keiner der unabhängigen Klone mehr faltige Kolonien auf YPD-Medium (Abb. III-10A; e).

Um diese Befunde auf Zellebene noch genauer zu untersuchen, wurden Zellabstriche von den auf YPD-Agar gewachsenen Kolonien mikroskopisch analysiert. Während in den CaAS24-Kolonien keine filamentösen Zellen vorzufinden waren (Abb. III-10B; c), bestanden die faltigen CaAS25^{wr}-Kolonien zu 80±10% (Mittelwert ± Standardabweichung aus drei unabhängigen Analysen) aus Hyphenzellen (Abb. III-10B; a). Nach der Deletion des Vektors pPCK ρ -CaTEC1 aus dem Stamm CaAS25^{wr} waren die Zellen nicht mehr in der Lage, Filamente auf YPD-Agar zu entwickeln (Abb. III-10B; b). Dies korrelierte mit der Inkompetenz, nach Verlust des Vektors noch faltige Kolonien zu bilden (Abb. III-10A; e). Damit konnte gezeigt werden, daß die Fähigkeit des Stammes CaAS25^{wr}, faltige Kolonien zu bilden, von der Anwesenheit des Vektors pPCK ρ -CaTEC1 abhängig ist.

III.3.4.1.2. Molekularbiologische Untersuchung der Phänotypvarianten

Die Filamentation und Bildung faltiger Kolonien auf YPD-Medium erfolgte offensichtlich nur in Gegenwart des Vektors pPCK1 ρ -CaTEC1. Jedoch zeigte nur der Stamm CaAS25^{wr}, nicht aber der ebenfalls mit dem Vektor transformierte Stamm CaAS25sm diesen Phänotyp. Um eine Erklärung für diese Unterschiede zu finden, wurden die Stämme CaAS25^{wr} und CaAS25sm in molekularbiologischen Analysen verglichen.

Northern Blot Analysen ergaben, daß im Stamm CaAS25^{wr} unter Überexpressionsbedingungen (SCAA-Medium) eine deutlich stärkere PCK*p*-kontrollierte *CaTEC1*-Expression stattfindet, als im Stamm CaAS25sm (Abb. III-11A; oberes Autoradiogramm). Die Transkription des chromosomal codierten *CaTEC1*-Gens ist in den untersuchten Stämmen aufgrund der *efg1/efg1 cph1/cph1*-Doppelmutation nicht induziert (vgl. III.3.2.; Abb. III-5A) und entsprechend wurde im Kontrollstamm CaAS24 (pPCK*p*-transformiert) keine *CaTEC1*-Expression detektiert (Abb. III-11A; oberes Autoradiogramm, Spur 1 und 2). Im Stamm CaAS25^{wr} erfolgte auch in Anwesenheit von Glukose (YPD-Medium; PCK*p* reprimiert) eine Expression des PCK*p*-kontrollierten *CaTEC1*-Gens (Abb. III-11A; unteres Autoradiogramm, Spur 3-6). Im Gegensatz dazu konnten im Stamm CaAS25sm keine *CaTEC1*-Transkripte nachgewiesen werden (Abb. III-11A; unteres Autoradiogramm, Spur 7-10). Das bedeutet, daß im Stamm CaAS25^{wr} keine vollständige Repression des PCK*p* stattfindet.

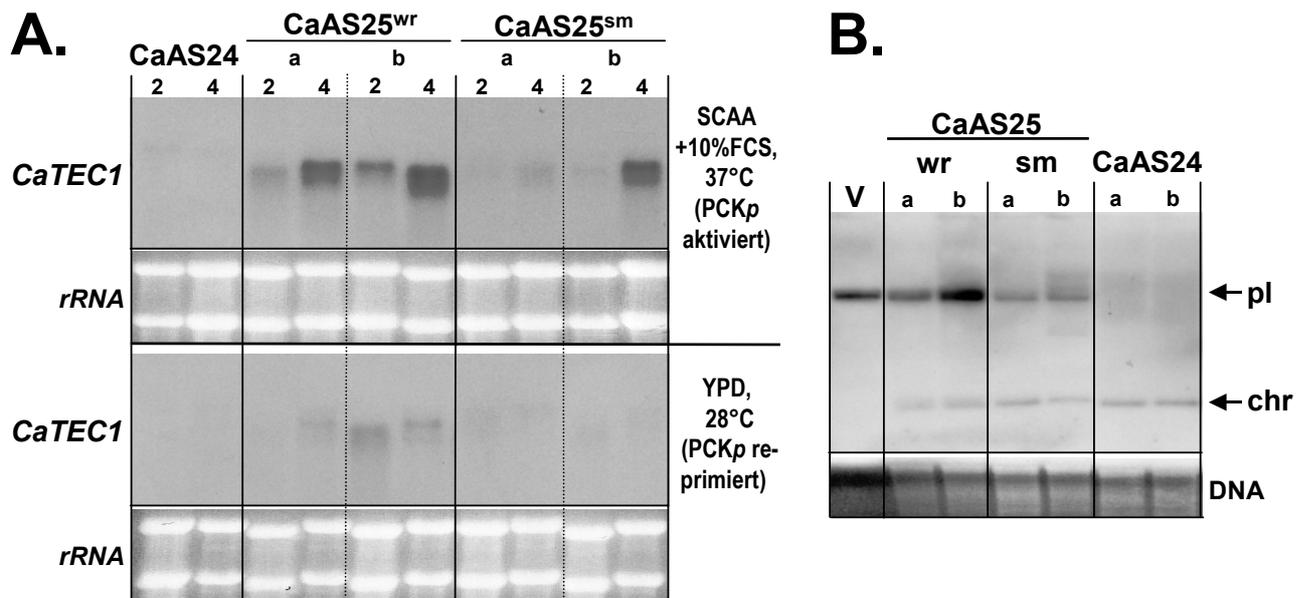


Abb. III-11: Molekularbiologische Untersuchung der Phänotypvarianten

Detektion des plasmidkodierten *CaTEC1*-Gens und von *CaTEC1*-Transkripten in den Phänotypvarianten CaAS25^{wr} und CaAS25sm (pPCK*p*-*CaTEC1*-transformiert), sowie dem Kontrollstamm CaAS24 (pPCK*p*-transformiert). Gezeigt sind jeweils zwei unabhängige Klone (a und b). **A.** Northern Blot Analyse der vektorvermittelten *CaTEC1*-Expression 2h (2) bzw. 4h (4) nach Inkubationsbeginn (10µg pro Spur; die EtBr-gefärbten Banden der ribosomalen RNA (rRNA) dienen als Kontrollen vergleichbarer Probenbeladung). CaAS25^{wr} exprimiert unter PCK*p*-aktivierenden Bedingungen auf SCAA-Medium mehr *CaTEC1* als CaAS25sm (oberes Autoradiogramm). Auch unter PCK*p*-reprimierenden Bedingungen auf glukosehaltigem YPD-Medium wird in CaAS25^{wr} *CaTEC1* exprimiert (unteres Autoradiogramm). **B.** Vergleich der Plasmidmengen mittels Southern Blot Analyse der *Nsi* I-restringierten DNA (10µg pro Spur; das EtBr-gefärbte Agarosegel (DNA) diente als Kontrolle vergleichbarer Probenbeladung). Die Pfeile markieren die Restriktionsfragmente des chromosomal (chr) und plasmidkodierten (pl) *CaTEC1*-Gens. Der *Nsi* I-restringierte Vektor pPCK*p*-*CaTEC1* wurde als Größenindikator mit aufgetragen (V). Die plasmidvermittelten *CaTEC1*-Banden sind aufgrund größerer Anzahl an Plasmidkopien in CaAS25^{wr} intensiver als in CaAS25sm.

Die Repression des *PCKp* in Anwesenheit von Glukose wird höchstwahrscheinlich durch die Bindung von spezif. Proteinen an regulatorische Sequenzen kontrolliert wird (vgl. III.3.3) [84]. Entsprechend wurde gefolgert, daß die anwesenden Repressormoleküle zwar im Stamm *CaAS25sm*, nicht aber im Stamm *CaAS25^{wr}* ausreichen, um alle vektorcodierten *PCK1*-Promotoren abzusättigen. Demzufolge müssten im Stamm *CaAS25^{wr}* größere Kopienzahlen des *pPCK1p-CaTEC1*-Vektors vorliegen, als im Stamm *CaAS25sm*. Diese Hypothese konnte mittels Southern Blot durch Vergleich der Intensität der detektierten Vektorbanden bestätigt werden. Im Stamm *CaAS25^{wr}* (Abb. III-11B, Spur 2 und 3) konnte ein deutlich stärkeres Signal, entsprechend einer höherer Anzahl an Plasmidkopien nachgewiesen werden, als im Stamm *CaAS25sm* (Abb. III-11A, Spur 4 und 5).

Aufgrund dieses Resultats wurden die Stämme *CaAS25sm* und *CaAS25^{wr}* als repräsentative Stämme für mittlere und hohe *PCKp*-vermittelte *CaTEC1*-Expression berücksichtigt und die weiteren Epistase-Analysen mit diesen Stämmen und dem Kontrollstamm *CaAS24* (keine *PCKp*-vermittelte *CaTEC1*-Expression) durchgeführt.

III.3.4.2. *CaTEC1*-induzierte Filamententwicklung in der nichtfilamentösen *efg1/efg1 cph1/cph1*-Mutante

Die vorangegangenen Analysen der Phänotypvarianten *CaAS25^{wr}* und *CaAS25sm* hatten bereits darauf hingewiesen, daß eine *PCKp*-kontrollierte *CaTEC1*-Expression in der *efg1/efg1 cph1/cph1*-Mutante HLC54 Filamententwicklung induziert (vgl. III.3.4.1.1.; Abb. II-10B, a). Um diesen Beobachtungen nachzugehen, wurden die Stämme *in vitro* mittels der etablierten Epistase-Methode genauer untersucht. Solange die Zellen in glukosehaltigem Flüssigmedium vorkultiviert wurden (*PCKp* reprimiert; *CaTEC1*-Expression inaktiv), konnten keine Unterschiede zwischen den *CaAS25^{wr}*-, *CaAS25sm*-, und den *CaAS24*-Zellen festgestellt werden. Nach einem Transfer in glukosefreies SCAA-Medium (*PCKp* dereprimiert; *CaTEC1*-Expression aktiv) wurden jedoch deutliche morphologische Unterschiede sichtbar. Die mit dem Leervektor *pPCKp* transformierten Zellen (*CaAS24*) waren unter hyphe-favorisierenden Bedingungen (Serum, 37°C) wie ihr Progenitor HLC54 nicht in der Lage, Hyphen zu bilden (Abb. III-12; b). Die mit dem *pPCKp-CaTEC1* transformierten Zellen (*CaAS25^{wr}* und *CaAS25sm*) entwickelten dagegen in Gegenwart von Serum Filamente (Abb. III-12; d und f). Der Grad der Entwicklung schien dabei vom Expressionsniveau des *PCKp*-kontrollierten *CaTEC1* abhängig zu sein. Nur *CaAS25^{wr}* (hohe *CaTEC1*-Expression) war in der Lage, echte Hyphen auszubilden (Abb. III-12; f), während die von *CaAS25sm* (mittlere *CaTEC1*-Expression) gebildeten Filamente eher pseudohyphige Strukturen aufwiesen (Abb. III-12; d). Völlig unabhängig vom

Expressionsniveau induzierte die kontrollierte *CaTEC1*-Expression in beiden Stämmen Hyphenbildung unter hefe-favorisierende Bedingungen (Abb. III-12; c und e).

Diese Ergebnisse zeigen, daß durch die induzierte Expression von *CaTEC1* in *C. albicans*-Zellen trotz dem Fehlen hypheninduzierender Signale (Serum, 37°C) und den essentiellen Signaltransduktionsfaktoren Efg1p und Cph1p, das Programm der Hyphenentwicklung aktiviert und durchgeführt werden kann

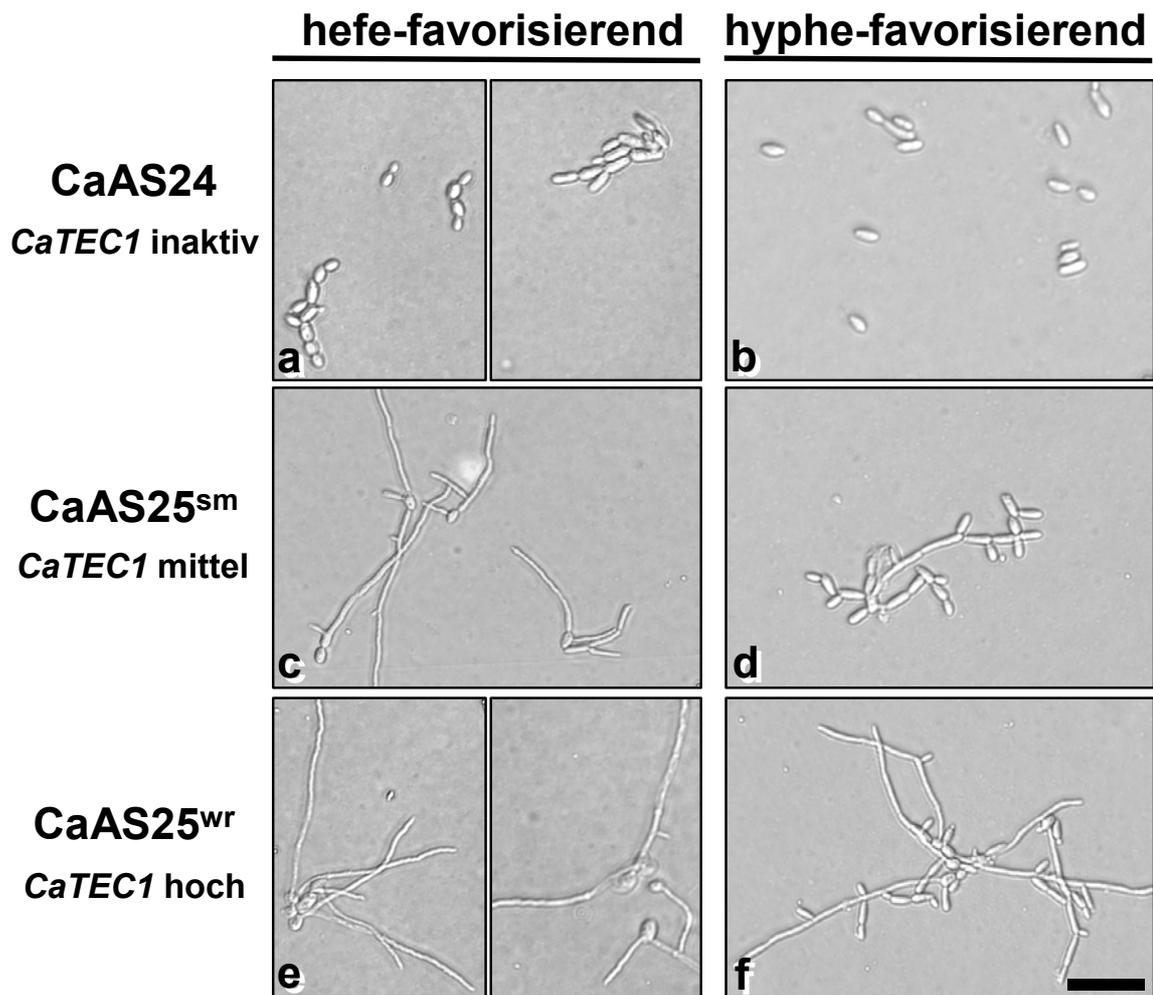


Abb. III-12: *CaTEC1*-Überexpression in der *efg1/efg1 cph1/cph1*-Mutante *in vitro*

Die Auswirkung der *CaTEC1*-Expression auf die morphologische Entwicklung der nichtfilamentösen *efg1/efg1 cph1/cph1*-Mutante wurde unter hefe- und hyphe-favorisierenden Bedingungen *in vitro* untersucht (Inkubationsbedingungen sind über, Stämme und *CaTEC1*-Expressionsniveau links von den Mikroskopaufnahmen angegeben; Maßstab entspricht 10µm). Der Kontrollstamm CaAS24 (pPCKp-transformiert) ist auch unter stringenten hyphen-induzierenden Bedingungen (Serum, 37°C) nicht in der Lage, Filamente zu entwickeln (b). Dieser Defekt wird in den Stämmen CaAS25sm und CaAS25^{wr} durch die pPCKp-*CaTEC1*-vermittelte Überexpression von *CaTEC1* kompensiert (d und f). Die *CaTEC1*-Überexpression induziert in Abwesenheit von *EFG1* und *CPH1* sogar unter hefe-favorisierenden Bedingungen Hyphenbildung (c und e).

III.3.4.3. Virulenzreaktivierung in der *efg1/efg1 cph1/cph1*-Mutante in *in vitro*- und *in vivo*-Infektionsversuchen

III.3.4.3.1. *In vitro*: Makrophageninfektion

Defekte in der Hyphenentwicklung stehen in guter Korrelation zum Unvermögen von *C. albicans*, aus M Φ auszubrechen. Dies wurde für verschiedene Signalkaskadenmutanten, darunter auch für die nichtfilamentöse *efg1/efg1 cph1/cph1*-Mutante HLC54, gezeigt [29]. Durch *CaTEC1*-Überexpression konnte in dieser Mutante wieder Filamententwicklung induziert werden. Entsprechend stellte sich die Frage, ob diese *CaTEC1*-induzierte Filamentbildung die *efg1/efg1 cph1/cph1*-Mutante wieder zur Evasion aus M Φ befähigt.

Um die Interaktion von *C. albicans* mit M Φ zu untersuchen, wurden die Infektionen bisher in Click-RPMI +10%(v/v) FCS durchgeführt (vgl. II.2.4.1). Da dieses Medium jedoch 1500mg/l Glukose enthält, findet eine *CaTEC1*-Überexpression unter der Kontrolle des glukosereprimierten *PCKp* nicht statt (vgl. III.3.3). Für die Epistase-Analysen unter *in vitro*-Infektionsbedingungen mußte deshalb ein geeignetes Medium mit niedrigeren Glukosekonzentrationen gefunden werden. Deswegen wurden die Stämme CaAS34 (*catec1/catec1 pPCKp*) und CaAS35 (*catec1/catec1 pPCKp-CaTEC1*) bei 37°C in verschiedenen DMEM-Medien (1000mg/L Glukose) inkubiert [84], die jeweils mit 10%(v/v) FCS versetzt waren. In keinem der getesteten DMEM-Medien konnte eine Reversion des *catec1/catec1*-Phänotyps beobachtet werden. D.h. der Vektor *pPCKp-CaTEC1* ist in diesen Medien nicht funktionell. Alternativ wurde daher in PBS titriertes Click-RPMI-Medium untersucht (alle Verdünnungsstufen wurden mit 10%(v/v) FCS versetzt). Bei Verdünnungen $\leq 10\%$ (v/v) Click-RPMI, entsprechend Glukosekonzentrationen von $\leq 150\text{mg/l}$, wurde der *catec1/catec1*-Phänotyp durch die *PCKp*-induzierte *CaTEC1*-Expression revertiert (Daten nicht gezeigt). Da auch murine Peritonealexsudat-M Φ unter diesen *in vitro* Bedingungen uneingeschränkt überleben, adherieren und phagozytieren konnten, wurden die Folgenden *C. albicans*-M Φ -Interaktionen in 10%(v/v) Click-RPMI +10%(v/v) FCS durchgeführt.

Murine Peritonealexsudat-M Φ wurden mit den HLC54^{ura} Derivaten CaAS25^{wr} oder CaAS24 infiziert. Wie in Abb. III-13A zu erkennen, konnten nur die *pPCKp-CaTEC1*-transformierten Zellen des Stammes CaAS25^{wr} Hyphen bilden und aus den M Φ ausbrechen (Abb. III-13A; schwarze Pfeile in a). Die *pPCKp*-transformierten CaAS24-Zellen waren vergleichbar ihrem Elternstamm HLC54 nicht in der Lage, Filamente zu entwickeln und akkumulierten nach der Phagozytose in den M Φ (Abb. III-13A; weiße Pfeile in d).

In einem Parallelversuch wurden die Modellstämme für mittlere (CaAS25sm) und für hohe

CaTEC1-Expressionsniveau ($CaAS25^{wr}$) miteinander verglichen. Es zeigte sich, daß beide Stämme zur Filamentbildung und zur Evasion aus $M\Phi$ in der Lage waren (Abb. III-13B). Dabei befanden sich jedoch die $CaAS25^{wr}$ -Zellen zu den untersuchten Zeitpunkten in einem wesentlich fortgeschritteneren Stadium der hyphenvermittelten Evasion (Abb. III-13B; schwarzer Pfeil), als die Zellen des Stammes $CaAS25^{sm}$ (Abb. III-13B; grauer Pfeil).

Diese Ergebnisse zeigen, daß die Expression von *CaTEC1* ausreicht, um Filamente auszubilden, die die Evasion von *C. albicans* aus $M\Phi$ auch in Abwesenheit von *EFG1* und *CPH1* ermöglichen.

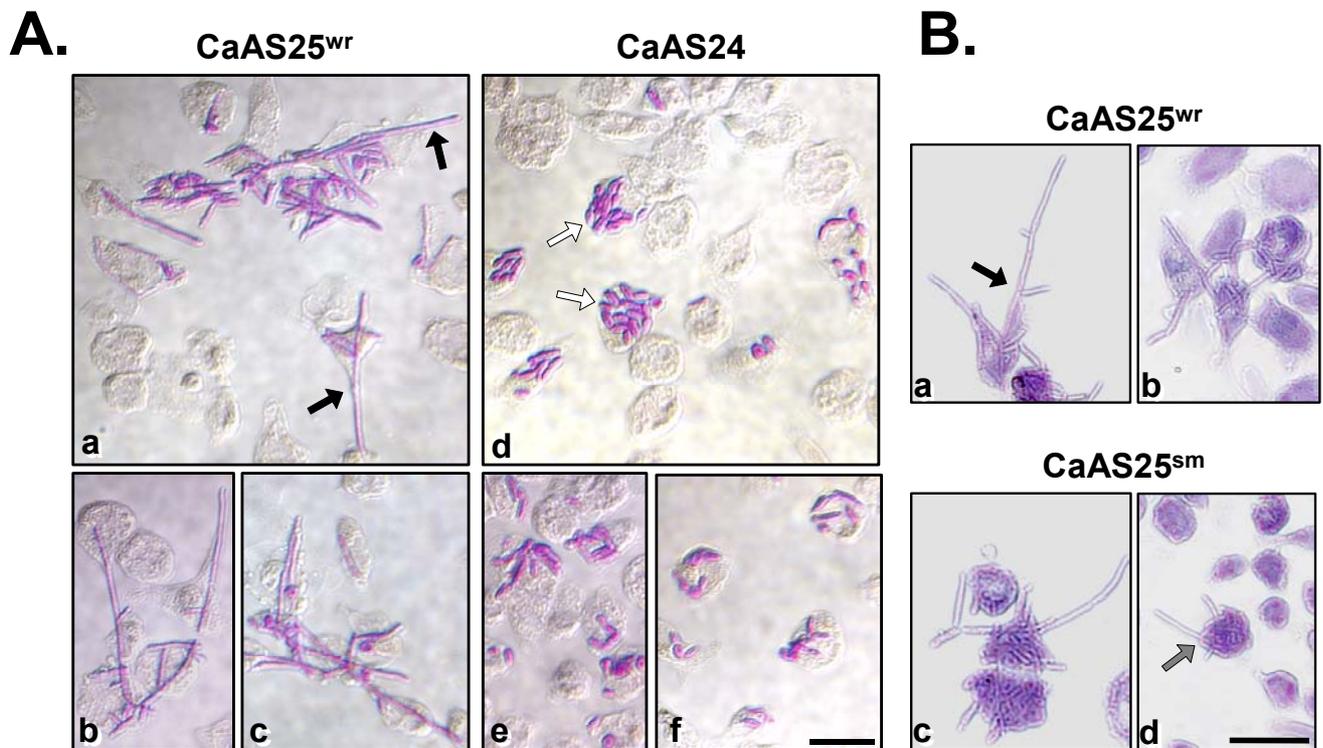


Abb. III-13: *C. albicans* - $M\Phi$ - Interaktion

Infektion von Peritonealexsudat- $M\Phi$ (MOI 1:8) mit den HLC54^{ura⁻}-Derivaten CaAS24 (pPCK ρ -transformiert) und den pPCK ρ -*CaTEC1*-transformierten Phänotypvarianten $CaAS25^{sm}$ und $CaAS25^{wr}$. Die Mikroskopaufnahmen zeigen repräsentative Pilzzellen nach 8h Inkubation (Maßstäbe entsprechen jeweils 10 μ M). **A.** Ergebnisse zweier unabhängiger Experimente (Exp. 1: a und d; Exp. 2 b, c und e, f). Die $CaAS25^{wr}$ -Zellen entwickeln lange Filamente (a - c), die die Evasion aus den $M\Phi$ ermöglichen (schwarze Pfeile in a). Die Zellen des Kontrollstammes CaAS24 (d - f) akkumulieren hingegen nach der Phagozytose in den $M\Phi$ (weiße Pfeile in d). **B.** Die *CaTEC1*-überexprimierenden Stämme $CaAS25^{wr}$ und $CaAS25^{sm}$ sind beide zur Filamentbildung und Evasion aus $M\Phi$ in der Lage. Die $CaAS25^{wr}$ -Zellen befinden sich jedoch zu den untersuchten Zeitpunkten in einem wesentlich fortgeschritteneren Stadium der hyphenvermittelten Evasion (schwarzer Pfeil in a) als die Zellen des Stammes $CaAS25^{sm}$ (grauer Pfeil in d).

III.3.4.3.2. *In vivo*: Mäuseinfektionen

In den vorausgegangenen Versuchen wurde gezeigt, daß die *CaTEC1*-Überexpression die *in vivo* attenuierte Virulenz der *efg1/efg1*-Mutanten verstärkte (vgl. III.3.3.3.2.) und der *efg1/efg1 cph1/cph1*-Doppelmutante die Evasion aus M Φ *in vitro* ermöglichte (vgl. III.3.4.3.1.). Entsprechend sollte die Auswirkung der *CaTEC1*-Überexpression *in vivo* auf die Virulenz der im systemischen Mausmodell avirulenten *efg1/efg1 cph1/cph1*-Mutante [29] untersucht werden.

III.3.4.3.3. Vaginalinfektion

Für die Charakterisierung der HLC54^{ura}-Derivate CaAS24 (transformiert mit pPCKp) und CaAS25^{wf} (transformiert mit pPCKp-*CaTEC1*) auf dem vaginalen Epithel wurden Balb/c-Mäuse mit diesen Stämme intravaginal infiziert und anschließend das Überleben bzw. die Replikation der Pilzzellen im Vaginalkanal kontrolliert. In Abb. III-14A sind die Auswertungen von drei unabhängigen Infektionen graphisch dargestellt. Beide Stämme konnten sich auf der vaginalen Haut etablieren. Jedoch war die Anzahl der lebenden Pilzzellen (CFU), die aus dem infizierten Vaginalkanal zurückgewonnen werden konnten, in allen Veruchen sowohl am Tag 5, als auch am Tag 10 nach der Inokulation, für den Kontrollstamm CaAS24 (weiße Symbole in Abb. III-14A) signifikant höher ($p < 0,01$) als für den *CaTEC1*-überexprimierenden Stamm CaAS25^{wf} (schwarze Symbole in Abb. III-14A).

Eine mögliche Erklärung für dieses unerwartete Ergebnis konnte sein, daß die Zellen des Stammes CaAS25^{wf} durch die *CaTEC1*-Überexpression verstärkt in das Vaginalgewebe eindringen und daher mittels Lavage weniger Zellen zurückgewonnen werden können, als von dem nichtinvasiven Kontrollstamm CaAS24. Um diese Möglichkeit abzuklären, wurden die CFU aus den Vaginallavagen mit den CFU aus den präparierten Vaginalgeweben verglichen (Daten nicht gezeigt). Die erhaltenen Werte zeigten jedoch, daß das Vaginalgewebe jeweils niedriger mit Pilzzellen beladen war, als die Lavage. Das bedeutete, daß weder Stamm CaAS24 noch CaAS25^{wf} ins vaginale Gewebe einwächst. Folglich repliziert Stamm CaAS24 auf dem vaginalen Epithel stärker als Stamm CaAS25^{wf}.

In einem Langzeitversuch zeigte sich jedoch, daß CaAS24 trotz initialer Etablierung am Tag 28 nach Inokulation nicht mehr im Vaginalkanal nachweisbar war. CaAS25^{wf} konnte hingegen während des gesamten Infektionszeitraums im Vaginalkanal überleben (Daten nicht gezeigt).

Die mikroskopische Aufarbeitung der fluoreszenzgefärbten Pilzzellen aus der Vaginallavage zeigte, daß der Kontrollstamm CaAS24 im vaginalen Milieu Filamente entwickelt (Abb. III-15; e-g). Diese waren morphologisch nicht von den des Stammes CaAS25^{wf} gebildeten Filamenten zu unterscheiden.

III.3.4.3.4. Systemische Infektionen

Lo und Mitarbeiter konnten zeigen, daß die *efg1/efg1 cph1/cph1*-Mutante HLC54 in einem murinen systemischen Infektionsmodell sogar bei Inokulation von 1×10^7 Zellen avirulent ist [29]. Gleiche Ergebnisse wurden erhalten, wenn im Rahmen der hier durchgeführten Epistase-Analysen der Kontrollstamm CaAS24 (transformiert mit pPCK ρ) für die systemische Infektion (Inokulum 1×10^7 Pilzzellen) von Balb/c-Mäusen eingesetzt wurde (Abb. III-14B, weiße Dreiecke). Im Gegensatz dazu erlagen die mit CaAS25^{wr}-Zellen (transformiert mit pPCK ρ -*CaTEC1*) inokulierten Balb/c-Mäuse in Abhängigkeit von der eingesetzten Dosis (1×10^6 , 5×10^6 , oder 1×10^7 Pilzzellen) innerhalb von 21-24d der Infektion (Abb. III-14B, schwarze Symbole).

Ein Vergleich der Organbelastung infizierter Nieren (Inokulum 1×10^6 Pilzzellen) zeigte, daß die CaAS24-Zellen innerhalb von 19d nach Infektion aus dem Organ abgeräumt waren, während sich der Stamm CaAS25^{wr} im Nierengewebe etablieren konnte (Abb. III-14C). Im Rahmen dieses Versuches konnte auch durch Ausplattieren des Homogenisats auf Selektivmedium ein Verlust der transformierten Vektoren pPCK ρ und pPCK ρ -*CaTEC1* unter *in vivo*-Bedingungen ausgeschlossen werden (Abb. III-14C).

Der Grad der Virulenzreaktivierung in der *efg1/efg1 cph1/cph1*-Mutante scheint durch die Höhe des plasmidvermittelten *CaTEC1*-Expressionsniveaus bedingt zu sein. Dies ließ sich aus den Ergebnissen eines weiteren Infektionsversuches schließen, in dem verschiedene Klone der Stämme CaAS25^{wr} und CaAS25sm in gleicher Infektionsdosis (1×10^6 Zellen) eingesetzt wurden. Hier war nur CaAS25^{wr} (hohe *CaTEC1*-Expression) in der Lage, eine tödlichen Kandidose zu verursachen (Abb. III-14D; schwarze Symbole), während die durch CaAS25sm (mittlere *CaTEC1*-Expression) reaktivierte Virulenz nicht bis auf Wildtyp-Niveau ausgeprägt war (Abb. III-14D; weiße Symbole).

Bei der mikroskopischen Untersuchung der aus den infizierten Nieren isolierten Pilzzellen stellte sich heraus, daß die als nichtfilamentös beschriebene *efg1/efg1 cph1/cph1*-Mutante (HLC54) [29] und entsprechend auch der Kontrollstamm CaAS24 *in vivo* zur Entwicklung von Filamenten fähig sind (Abb. III-15; a-d). Diese Filamentbildung ist durch die *CaTEC1*-ÜE in den Stämmen CaAS25^{wr} und CaAS25sm nicht beeinträchtigt.

Zusammenfassend läßt sich aus diesen Ergebnissen schließen, daß die *CaTEC1*-Expression in der avirulenten *efg1/efg1 cph1/cph1*-Mutante ausreichend ist, um deren Virulenz im systemischen Infektionsmodell zu reaktivieren.

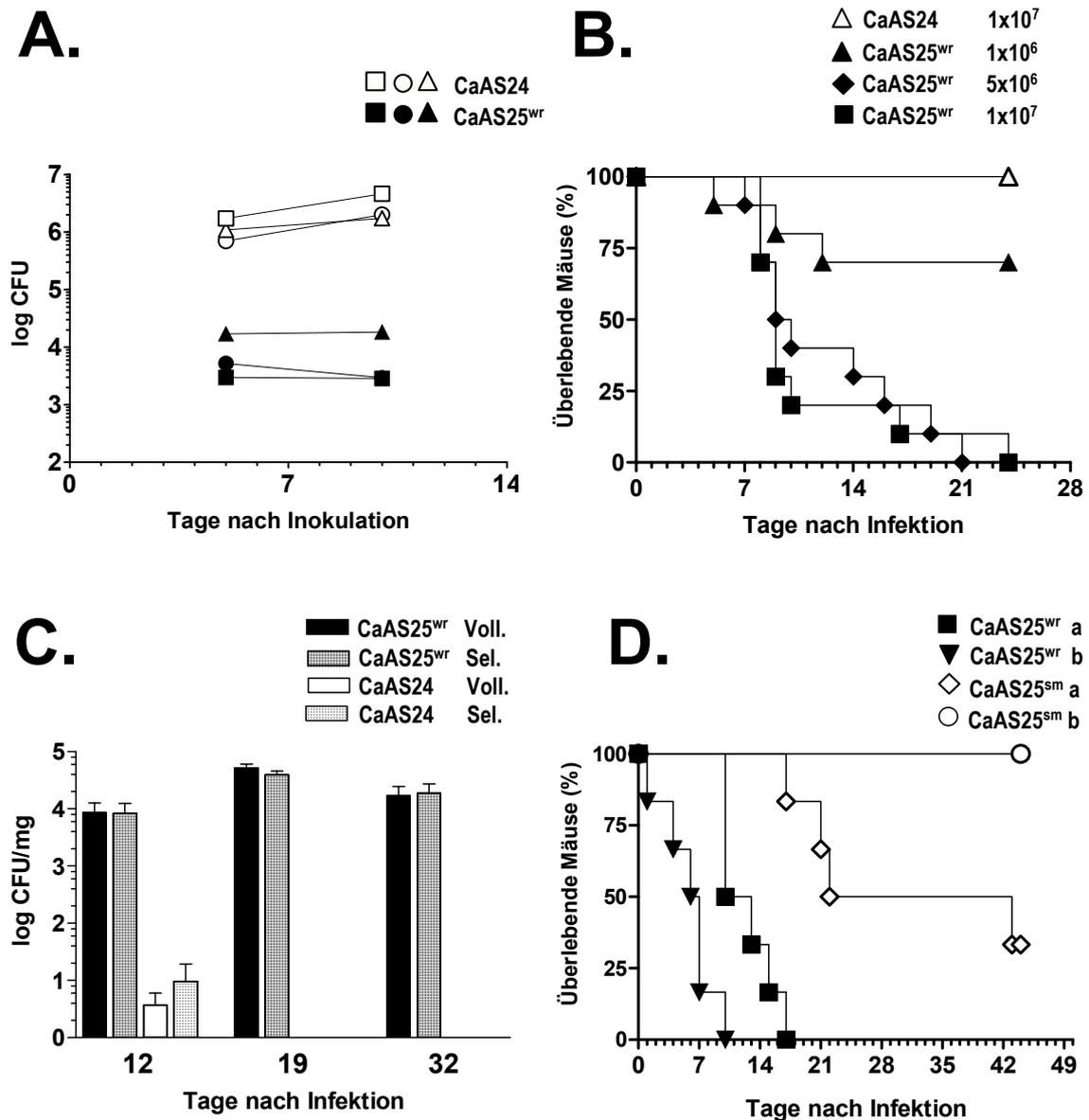


Abb. III-14: CaTEC1-Überexpression in der *efg1/efg1 cph1/cph1*-Mutante *in vivo*

Virulenzassays von Balb/c-Mäusen, die mit den Stämmen CaAS24 (pPCK ρ -transformiert) und den pPCK ρ -CaTEC1-transformierten Phänotypvarianten CaAS25sm und CaAS25^{wr} infiziert wurden. **A.** Pilzbelastung (log CFU) von Vaginallavagen infizierter Mäuse (n=5) am Tag 5 bzw. 10 nach Inokulation mit 5×10^4 *C. albicans*-Zellen. Die Auswertung von drei unabhängigen Experimenten (Quadrat, Kreise und Dreiecke) zeigte, daß der Kontrollstamm CaAS24 (weiße Symbole) nach der Etablierung im Vaginalkanal signifikant ($p < 0,01$) besser replizierte als der CaTEC1-überexprimierende Stamm CaAS25^{wr} (schwarze Symbole). **B.** Überlebenskurven von Mäusen (n=10), die mit 1×10^6 (schwarze Dreiecke), 5×10^6 (schwarze Rauten) oder 1×10^7 (schwarze Quadrate) CaAS25^{wr}- bzw. 1×10^7 CaAS24-Zellen intravenös infiziert wurden. Durch die CaTEC1-Überexpression (Stamm CaAS25^{wr}, schwarze Symbole) wird die Virulenz der *efg1/efg1 cph1/cph1*-Mutante (Kontrollstamm CaAS24, weiße Dreiecke) reaktiviert. **C.** Pilzbelastung (log CFU/mg) von Nieren intravenös infizierter Mäuse (n=3) am Tag 12, 19 bzw. 32 nach Inokulation mit 1×10^6 *C. albicans*-Zellen. CaAS25^{wr}-Zellen (schwarze Balken) waren im Gegensatz zu CaAS24-Zellen (weiße Balken) zu allen untersuchten Zeitpunkten nachzuweisen. Die CFU-Bestimmung auf Vollmedium (Voll.; einfarbige Balken) ergab keine signifikanten Unterschiede zu den auf Selektivmedium (Sel.; gepunktete Balken) erhaltenen Werten. **D.** Überlebenskurven von Mäusen (n=5), die mit unabhängigen Klonen (a und b) der CaTEC1-überexprimierenden Stämme CaAS25^{wr} und CaAS25sm intravenös infiziert wurden. Die Reaktivierung der Virulenz ist in den CaAS25^{wr}-Stämmen (schwarze Symbole) wesentlich ausgeprägter als in den CaAS25sm-Stämmen (weiße Symbole).

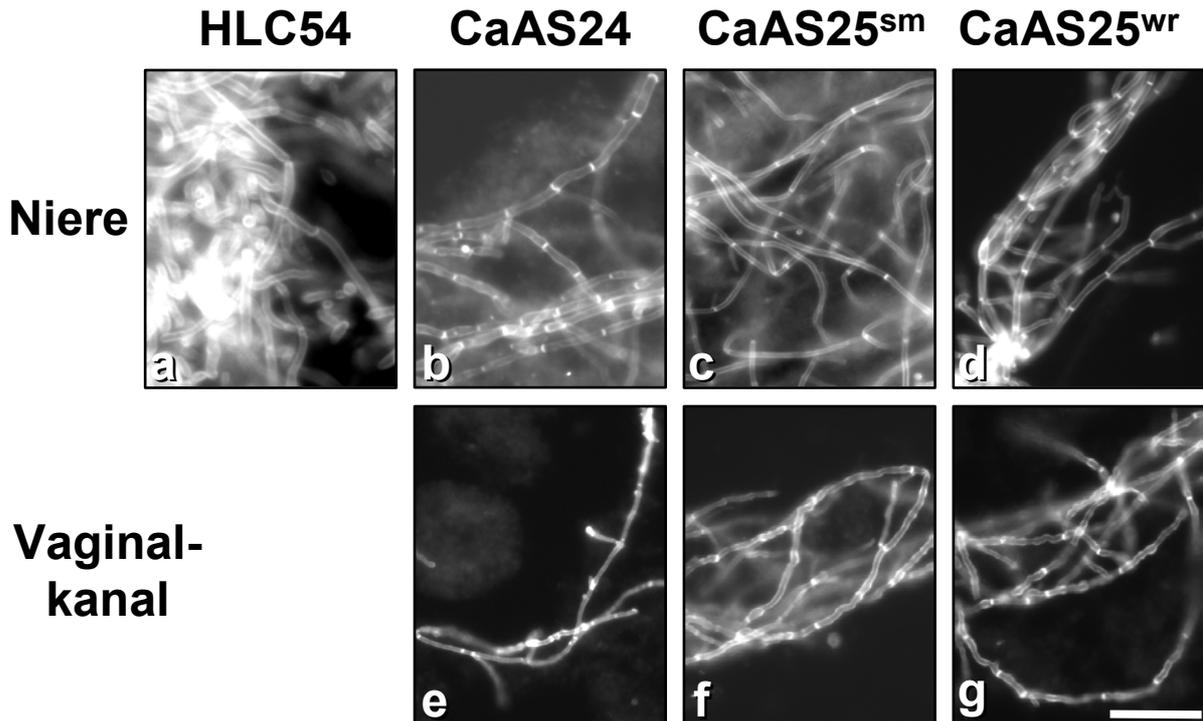


Abb. III-15: Morphologie der Phänotypvarianten *in vivo*

Floureszenzaufnahmen von Pilzzellen, die aus infizierten Nieren (a-d) und Vaginallavagen (e-g) isoliert wurden. Die *efg1/efg1 cph1/cph1*-Mutante HLC54 (a) und der Kontrollstamm CaAS24 (transformiert mit pPCKp) (b und e) sind *in vivo* in der Lage, Filamente zu entwickeln. Diese morphologische Entwicklung wird durch die Überexpression von *CaTEC1* in den Stämmen CaAS25sm (c und f) und CaAS25^{wr} (d und g) nicht beeinträchtigt.

III.3.5. Virulenzverstärkung von *C. albicans* durch *CaTEC1*-Überexpression

Die postulierte Rolle von *CaTEC1* als zentraler Regulator von virulenzaktivierenden Signalen in *C. albicans* konnte in den vorausgegangenen Versuchen bestätigt werden. Eine über Wildtyp-Niveau erhöhte Expression eines solchen Regulators müßte in einer verstärkten Expression von virulenzaktivierenden Faktoren und damit in einer gesteigerten Virulenz resultieren. Um diese Hypothese für *C. albicans* zu überprüfen, wurden Balb/c-Mäuse mit dem pPCKp-transformierten (CaAS34) bzw. dem pPCKp-*CaTEC1*-transformierten WT-Stamm (CaAS35) intravenös infiziert. Die Auswertung der Überlebenskurven der systemischen Infektionen (Abb. III-16A und B) ergab, daß sich die mittlere Überlebenszeit der Mäuse um $65 \pm 2\%$ (Mittelwert \pm Standardabweichung aus zwei unabhängigen Experimenten) verkürzte, wenn sie mit dem *CaTEC1*-überexprimierenden WT-Stamm (schwarze Kreise in Abb. III-16A und B) statt mit dem Kontrollstamm (weiße Kreise in Abb. III-16A und B) infiziert wurden.

Dieses Ergebnis zeigt, daß durch die Überexpression von *CaTEC1* die Virulenz des allgemein in Laboratorien gebräuchlichen Wildtyp-Stammes CAI-4 gesteigert werden kann und unterstreicht zusätzlich die Bedeutung von CaTec1p als essentieller Virulenzregulator in der Pathogenität von *C. albicans*.

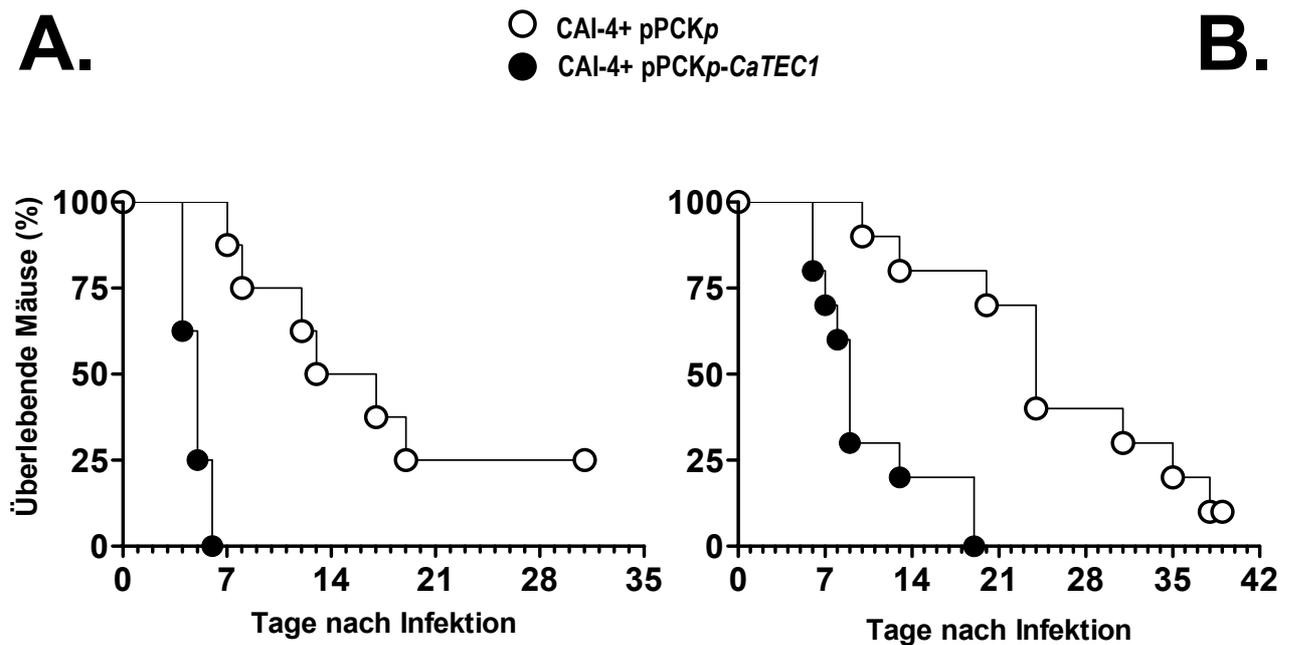


Abb. III-16: *CaTEC1*-Überexpression im Wildtyp-Stamm CAI-4 *in vivo*

Virulenzassays von Balb/c-Mäusen, die entweder mit dem pPCKp-transformierten (weiße Kreise) oder dem *CaTEC1*-überexprimierenden (pPCKp-*CaTEC1*-transformierten; schwarze Kreise) Wildtyp-Stamm CAI-4 intravenös infiziert wurden. **A.** und **B.** zeigen die Überlebenskurven der Mäuse aus zwei unabhängigen Experimenten mit gleicher Inokulumgröße (1×10^6 Pilzzellen) und unterschiedlicher Anzahl an Versuchstieren (A: n=8; B: n=10). Die Virulenz des Wildtypstammes wird durch die Überexpression von *CaTEC1* verstärkt.

IV. Diskussion

IV.1. Der *C. albicans* TEA/ATTS-Transkriptionsfaktor CaTec1p

CaTEC1 ist das vierte in Pilzen identifizierte Mitglied der Familie der TEA/ATTS-Transkriptionsfaktoren neben *AbaAp* aus *Aspergillus nidulans* [68], *AbaAp* aus *Penicillium marneffei* [100] und *Tec1p* aus *Saccharomyces cerevisiae* [65]. *CaTec1p* komplementiert die Deletion des *S. cerevisiae* *Tec1p* in Bezug auf die Aktivierung des *FLO11*-Gens und die Filamentbildung [2]. Daraus kann auf eine hohe funktionelle Homologie zwischen *Tec1p* und *CaTec1p* geschlossen werden.

Um die Expression pseudohyphespezifischer Gene und das invasive Wachstum zu induzieren, interagiert *Tec1p* in *S. cerevisiae* mit dem durch die MAPK-Kaskade aktivierten Transkriptionsfaktor *Ste12p* [48, 66]. Ob in *C. albicans* eine vergleichbare Interaktion zwischen dem durch den MAPK-Signaltransduktionsweg aktivierten *Ste12p*-Homolog *Cph1p* [47] und *CaTec1p* stattfindet, um die Aktivierung hyphenspezifischer Gene zu gewährleisten, konnte bisher nicht abschließend geklärt werden. In den Promotoren der hyphenspezifischen *C. albicans*-Gene *SAP4*, *SAP5* und *SAP6* befinden sich sowohl Bindestellen für *Cph1p* (PRE) als auch für *CaTec1p* (TCS-Elemente). Im Unterschied zu den FRE-Elementen in den Promotoren pseudohyphenspezifischer Gene von *S. cerevisiae* [48] liegen diese PRE- und TCS-Sequenzen in *C. albicans* jedoch nicht unmittelbar nebeneinander [1]. Sie bilden also kein typisches FRE-Element, das die Bindung eines putativen *Cph1p*/*CaTec1p*-Komplexes begünstigen würde. Gegen eine Interaktion von *CaTec1p* und *Cph1p* spricht außerdem, daß (1) die heterologe Expression von *CaTEC1* in der *S. cerevisiae* *tec1/tec1*-Mutante keine Aktivierung der Gene initiiert, deren Transkription eine Interaktion von *CaTec1p* mit *Ste12p* voraussetzt [2] und daß (2) die Deletionen von *CPH1* bzw. *CaTEC1* sehr unterschiedliche Auswirkungen auf die seruminduzierte Hyphenbildung und die Virulenz von *C. albicans* haben. Während die *cph1/cph1*-Mutante unter diesen Bedingungen keinen Phänotyp aufweist [29, 47] ist die *catec1/catec1*-Mutante nicht mehr in der Lage, *in vitro* Hyphen zu entwickeln und ihre Virulenz ist signifikant attenuiert [2]. Die funktionelle Homologie vom *C. albicans* *CaTec1p* zum *S. cerevisiae* *Tec1p* in *S. cerevisiae* liegt demnach darin, daß beide an der Regulation der morphogenetischen Entwicklung beteiligt sind, jedoch scheinen die Mechanismen dieser Regulation der beiden TEA/ATTS-Transkriptionsfaktoren unterschiedlich zu sein.

Die Anordnungen von mehreren regulatorischen Elementen, die die Aktivierung eines Gens durch verschiedene Transkriptionsfaktoren erlaubt, wurde auch in den Promotoren anderer

hyphenspezifischer Genen von *C. albicans* identifiziert [101]. Zum Beispiel befinden sich in den Promotoren von *ALS3* und *ECE1* Konsensussequenzen für die Bindung von Efg1p und CaTec1p und in den Promotoren von *HWP1*, *SAP5* und *SAP6* sogar für Efg1p, CaTec1p und Cph1p [101]. Dies deutet auf eine differenzielle oder kombinatorische Regulation der hyphenspezifischen Gene und Virulenzfaktoren von *C. albicans* über die diversen Signaltransduktionswege und deren terminalen Transkriptionsfaktoren hin.

IV.2. CaTec1p übernimmt regulatorische Funktionen bei der Virulenz von *C. albicans*

Die Virulenz von *C. albicans* ist in Abwesenheit von *CaTEC1* signifikant inhibiert. Daraus kann geschlossen werden, daß CaTec1p eine wichtige regulatorische Funktion bei der Virulenz von *C. albicans* übernimmt.

CaTec1p reguliert die Virulenz von *C. albicans* über mindestens zwei Mechanismen. Zum einen über die Aktivierung von Virulenzgenen, wie in dieser Arbeit für die Isogene der Sekretierten Aspartyl Proteinasen *SAP4*, *SAP5* und *SAP6* gezeigt wurde. Diese Proteine vermitteln wichtige Virulenzeigenschaften wie die Adhärenz von *C. albicans*-Zellen an das Wirtsgewebe [102] und mittels Degradation von extrazellulärer Matrix [103] bei der Invasion in das Wirtsgewebe [20]. Außerdem scheinen sie an der Auseinandersetzung von *C. albicans* mit Wirtsabwehrmechanismen (Phagozytische Zellen, Immunglobuline [104]) beteiligt zu sein [21]. Die Triple-Deletion dieser Gene resultiert entsprechend in einer attenuierten Virulenz [22], ebenso wie hier für die *catec1/catec1*-Mutante gezeigt, die diese Virulenzfaktoren nicht mehr exprimiert. Bezüglich dieses Mechanismus der Virulenzregulation wäre es aufschlußreich, weitere CaTec1p-regulierte Virulenzfaktoren von *C. albicans* (z.B. Adhesionsmoleküle, hydrolytische Enzyme) zu identifizieren. Für diesen Zweck wird die im Rahmen dieser Arbeit speziell generierte *catec1/catec1*-Mutante und die entsprechende Revertante in Microarray-Analysen untersucht. Die bis zum gegenwärtigen Zeitpunkt identifizierten CaTec1p-abhängigen hyphenspezifischen Gene *HWP1*, *HYR1*, *ALA1*, *ALS1* und *ALS3* werden tatsächlich als potentielle Virulenzfaktoren von *C. albicans* angesehen [33]. Dies ist ein zusätzlicher Hinweis auf die putative Virulenzregulation von CaTec1p mittels Aktivierung von Virulenzfaktoren.

Der zweite Mechanismus über den *CaTEC1* möglicherweise die Virulenz reguliert, scheint zu sein, daß es die Evasion von *C. albicans*-Zellen aus M Φ gewährleistet. Diese ist in Abwesenheit von *CaTEC1* supprimiert, was durch die defekte Hyphenbildung der *catec1/catec1*-Mu-

tante verursacht zu sein scheint, die nach der Aufnahme in die M Φ lediglich Pseudohyphen ausbildet. Derselbe Phänotyp wurde für *C. albicans*-Stämme mit Mutationen in den Signalkaskaden der Hyphenbildung, wie die Deletion von *RAS1* oder *EFG1* beschrieben.

Auch im systemischen Mausinfektionsmodell zeigen sich Parallelen zwischen diesen Mutanten. Ebenso wie in Abwesenheit von *RAS1* und *EFG1* ist die Virulenz der *catec1/catec1*-Mutante signifikant inhibiert. Erstaunlicherweise zeigt sich im Modell der murinen vaginalen Infektion ein gegenteiliges Ergebnis. Die *catec1/catec1*-Mutante ist hier in der Lage, sich auf der vaginalen Schleimhaut in vergleichbarem Maße zu etablieren und zu replizieren, wie in Anwesenheit von *CaTEC1*. Die Virulenzunterschiede von *C. albicans* in diesen beiden Modellen der Infektion lassen sich nicht durch Defekte in der morphologischen Entwicklung erklären, denn die *catec1/catec1*-Mutante bildet *in vivo* sowohl im infizierten Nierengewebe als auch auf dem vaginalen Epithel Hyphen. Eher denkbar ist, daß diese Differenzen auftreten, weil CaTec1p für die Evasion aus M Φ notwendig zu sein scheint. M Φ wurden als die Immunzellen beschrieben, die während der initialen Phase einer systemischen *Candida*-Infektion hauptsächlich mit den Pilzzellen interagieren [105]. Entsprechend ist zu vermuten, daß die meisten der nach intravenöser Applikation in der Niere abgelagerten *catec1/catec1*-Pilzzellen nach der Phagozytose durch die antifungalen Effektormechanismen in den M Φ abgetötet werden. Im Gegensatz dazu treffen die intravaginal verabreichten *C. albicans*-Zellen auf nur wenige M Φ und induzieren auch keine Rekrutierung dieser Phagozyten in den Vaginaltrakt [106]. Dadurch können sich auch *CaTEC1*-defiziente *C. albicans*-Zellen auf dem vaginalen Epithel etablieren.

Nichtfilamentöse *C. albicans* Mutanten wurden als avirulent beschrieben [29]. Der TEA/ATTS-Transkriptionsfaktor *CaTEC1* reguliert die seruminduzierte Hyphenbildung *in vitro*. Für diese morphologische Entwicklung *in vivo* ist *CaTEC1* jedoch offensichtlich nicht essentiell, denn die *catec1/catec1*-Mutante bildet in den infizierten Geweben Hyphen aus. Trotzdem ist *C. albicans* in Abwesenheit von *CaTEC1* annähernd avirulent. Ein mögliche Erklärung für dieses Phänomen ist, daß die Hefe-Hyphe-Transition *in vivo* *CaTEC1*-unabhängig reguliert ist, daß aber die für die Virulenz essentielle Aktivierung von Virulenzfaktoren in Abwesenheit von *CaTEC1* nicht stattfindet.

Ein der *catec1/catec1*-Mutante analoger Phänotyp wurde für die *efg1/efg1*-Mutante beschrieben. In Abwesenheit von *EFG1* ist *C. albicans* nicht mehr in der Lage, *in vitro* Hyphen zu bilden [29, 31] und aus M Φ auszubrechen [29]. Die Virulenz der *efg1/efg1*-Mutante ist im systemischen Infektionsmodell ebenfalls attenuiert [29], obwohl sie *in vivo* keine Defizienzen in der morphologischen Entwicklung aufweist, wie im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden

konnte. Diese Daten deuteten bereits darauf hin, daß CaTec1p entweder (1) unabhängig von Efg1p an der morphogenetischen Regulation und der Virulenz von *C. albicans* beteiligt ist, oder (2) in demselben Signaltransduktionsweg liegt, wie Efg1p. Die Ergebnisse der durchgeführten *EFG1*-Expressionanalyse erhärteten diese Hypothese. Die *EFG1*-Transkriptionsniveaus sind im Vergleich zum Wildtyp in der *catec1/catec1*-Mutante unverändert. Angewendet auf Punkt (2) der Hypothese würde dieses Resultat bedeuten, daß CaTec1p im cAMP-Signaltransduktionsweg unterhalb von Efg1p agiert. Die Kenntnis über die Position von CaTec1p in den Signalkaskaden der Hyphenbildung könnte weiterführend dazu beitragen, die Bedeutung dieses TEA/ATTS-Transkriptionsfaktors für die Regulation der Hyphenbildung und Virulenz von *C. albicans* besser beurteilen zu können. Daher wurden im Rahmen dieser Arbeit entsprechende Versuche durchgeführt.

IV.3. Die morphogenetischen Signaltransduktionswege von *C. albicans* konvergieren auf CaTec1p

Die Vermittlung hypheninduzierender Signale über Ras1p, über die MAPK-Kaskade auf Cph1p und über den cAMP-Signaltransduktionsweg auf Efg1p führt zur Aktivierung der morphogenetischen Entwicklung und zur Expression von Virulenzgenen in *C. albicans*. Dies scheint ein essentieller Prozeß für die Pathogenität von *C. albicans* zu sein [29-31, 59]. Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde die Rolle des TEA/ATTS-Transkriptionsfaktors CaTec1p, der offensichtlich regulatorische Funktionen bei der Hyphenbildung und Virulenz von *C. albicans* übernimmt, in diesem Prozeß bestimmt werden. Zu diesem Zweck wurden *CaTEC1*-Expressions- und Epistaseanalysen durchgeführt.

Aufgrund der unveränderten *EFG1*-Expression in der *catec1/catec1*-Mutante wurde bereits postuliert, daß CaTec1p in den Signalkaskaden der Hyphenbildung entweder unabhängig oder unterhalb von Efg1p in der cAMP-Signalkaskade agiert (vgl. IV.2). Die zweite Hypothese (CaTec1p unterhalb von Efg1p) konnte dadurch bestätigt werden, daß (1) die seruminduzierte Aktivierung der *CaTEC1*-Expression in Abwesenheit von *EFG1* sehr stark reduziert ist, (2) die Überexpression von *CaTEC1* in der *efg1/efg1*-Mutante die Defekte der Hyphenbildung und die der Virulenz dieser Mutante kompensiert und (3) die Überexpression von *EFG1* den Phänotyp der *catec1/catec1*-Mutante nicht revertiert.

Weitere Ergebnisse bestärkten jedoch auch die Hypothese, daß CaTec1p in einen Efg1p-unabhängigen Signaltransduktionsweg eingeordnet werden kann. Neben Efg1p nimmt, wenn auch in geringerem Maße, Ras1p Einfluß auf die *CaTEC1*-Expression. Zwar erreicht die

CaTEC1-Transkription in der *ras1/ras1*-Mutante letztendlich Wildtyp-Niveau, jedoch ist die Aktivierung der *CaTEC1*-Expression in Abwesenheit von Ras1p deutlich verzögert. Außerdem werden die morphogenetischen Defekte der *ras1/ras1*-Mutante durch die Überexpression von *CaTEC1* kompensiert, wodurch CaTec1p eine Position unterhalb von Ras1p zugesprochen werden kann.

Durch die Überexpression von *HST7*, einer Komponente der MAPK-Kaskade, in der *ras1/ras1*-Mutante wurde die Verzögerung der *CaTEC1*-Aktivierung wieder supprimiert. Dies zeigt, daß auch Signale, die über die MAPK-Kaskade vermittelt werden, auf *CaTEC1* eine Auswirkung haben. Die Deletion von *CPH1* (terminaler Transkriptionsfaktor des MAPK-Signaltransduktionsweges) beeinträchtigt die Aktivierung der *CaTEC1*-Transkription an sich nicht und auch der *catec1/catec1*-Phänotyp kann durch die Überexpression von *CPH1* nicht revertiert werden. Trotzdem ist ein Einfluß von Cph1p auf *CaTEC1* nicht ausgeschlossen. Zum einen ist der charakteristische Abfall des *CaTEC1*-Expressionsniveaus 90min nach der Seruminduktion in der *cph1/cph1*-Mutante nicht mehr detektierbar. Vor allem aber führt erst die zusätzliche Deletion von *CPH1* in der *efg1/efg1*-Mutante zur vollständigen Abschaltung der *CaTEC1*-Aktivierung.

Diese Ergebnisse zeigen, daß die verschiedenen hypheninduzierenden Signale, die über Ras1p, die MAPK-Kaskade oder den cAMP-Signaltransduktionsweg übermittelt werden, terminal in CaTec1p konvergieren, um die Expression hyphenspezifischer Gene zu aktivieren. Parallel zu dieser Arbeit wurden ähnliche Ergebnisse in Bezug auf die Übermittlung hyphe-induzierender Signale unter serumfreien Bedingungen gewonnen [101]. Lane und Mitarbeiter konnten zeigen, daß auch nährstoffbedingte Signale, wie z.B. Stickstoffmangel, über den MAPK- und den cAMP-Signaltransduktionsweg terminal auf CaTec1p vermittelt werden. Weiterhin wurde von dieser Arbeitsgruppe ein neuer, Efg1- und Cph1p-unabhängiger Signaltransduktionsweg in *C. albicans* beschrieben, der ebenfalls hypheninduzierende Signale unter serumfreien Bedingungen über den Transkriptionsfaktor Cph2p auf *CaTEC1* übertragen soll [107]. Allerdings scheint dieser Transkriptionsfaktor bei der stringenten seruminduzierten Hyphenbildung irrelevant zu sein. Dies deutet darauf hin, daß Cph2p auch keinen Einfluß auf die Virulenz von *C. albicans* nimmt.

Die morphogenetische Entwicklung und die Virulenz unter physiologisch relevanten Bedingungen *in vitro* (Anwesenheit von Serum, 37°C) und unter Wirtsbedingungen *in vivo* sind die Schwerpunkte, für die die Rolle von CaTec1p im Rahmen der hier durchgeführten Arbeit untersucht wurde. Bisher galten die terminalen Transkriptionsfaktoren Cph1p und Efg1p als wichtigste Regulatoren der Hyphenbildung und Virulenz von *C. albicans*, denn die *efg1/efg1*

cph1/cph1-Mutante wurde als nichtfilamentös und avirulent beschrieben [29]. In der hier vorlegten Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, daß CaTec1p einen zentralen Knotenpunkt am Ende dieser Signaltransduktionswege darstellt. Die definitive Bedeutung dieses TEA/ATTS-Transkriptionsfaktors für die morphologische Entwicklung von *C. albicans in vitro* wurde jedoch erst dadurch richtig deutlich, daß durch die Überexpression von *CaTEC1* die Unterbrechung der Signaltransduktion in der *efg1/efg1 cph1/cph1*-Mutante aufgehoben wurde und infolgedessen diese nichtfilamentöse Mutante wieder Hyphen entwickelte. Die Ausprägung der wiederhergestellten Filamentation war dabei vom *CaTEC1*-Expressionsniveau abhängig, denn nur im Stamm CaAS25^{wr} (hohe *CaTEC1*-Expression) erfolgte eine vollendete Ausbildung echter Hyphen infolge Seruminduktion, während der Stamm CaAS25sm (mittlere *CaTEC1*-Expression) lediglich Pseudohyphen entwickelte. Dessen ungeachtet wurde in Abwesenheit von *EFG1* und *CPH1* durch die *CaTEC1*-Überexpression sogar unter hefefavorisierenden Bedingungen Hyphenbildung induziert.

IV.4. CaTEC1 reaktiviert die Virulenz der *efg1/efg1 cph1/cph1*-Mutante

Wie bereits beschrieben ist ein wichtiger Aspekt der Wirtsabwehr von Säugetieren gegen *C. albicans* die Präsenz von professionellen phagozytischen Zellen wie Makrophagen und deren antifungale Aktivität (vgl. IV.2). Die Depletion der M Φ führt in einem murinen Infektionsmodell zu einem verstärkten klinischen Verlauf der gesetzten systemischen Kandidose [105]. *C. albicans*-Zellen die Defekte in der Hyphenbildung aufweisen, sind wesentlich anfälliger gegenüber der Phagozytose durch M Φ und können meist nicht mehr aus diesen ausbrechen [108]. Diese Mutanten sind daher in systemischen Infektionsmodellen oftmals weniger virulent. Die durch *CaTEC1* induzierte Hyphenbildung in der *efg1/efg1 cph1/cph1*-Mutante befähigt diese, nach der Phagozytose *in vitro* wieder zur Evasion aus den M Φ . Folglich wird auch dieser wichtige Mechanismus der *C. albicans*-Pathogenität Cph1p- und Efg1p-unabhängig durch CaTec1p reguliert.

Die *efg1/efg1 cph1/cph1*-Mutante ist im systemischen Mausinfektionsmodell avirulent [29]. Die Charakterisierung der *catec1/catec1*-Mutante zeigte bereits, daß CaTec1p eine essentielle Funktion bei der Virulenz von *C. albicans* ausübt (vgl. IV.2). Die Ergebnisse der Epistasen-Analysen von *CaTEC1* in der nichtfilamentösen *efg1/efg1 cph1/cph1*-Mutante *in vivo*, unterstreichen dessen wichtige Rolle für die Pathogenität von *C. albicans* noch darüberhinaus. Denn CaTec1p aktiviert, ungeachtet der Blockade beider morphogenetischer Signaltransduktionswege durch Deletion von *EFG1* und *CPH1*, die Virulenz von *C. albicans* im systemi-

schen Mausinfektionsmodell. Dies bedeutet, daß der TEA/ATTS-Transkriptionsfaktors CaTec1p einzig und allein für die Expression der Virulenz von *C. albicans* gegenüber seinem Wirt ausreichend ist.

Die Aktivierung der Virulenz durch CaTec1p war in den durchgeführten Infektionen vom *CaTEC1*-Expressionsniveau abhängig. Denn die systemische Infektion mit CaAS25^{wf} (hohe Expression) resultierte in einer stärkeren Reduktion der Überlebenszeit infizierter Mäuse, als die systemische Infektion mit CaAS25sm (mittlere Expression). Nach der intravaginalen Inokulation replizierte der Stamm CaAS25^{wf} zwar langsamer, war aber im Gegensatz zum Stamm CaAS25sm wesentlich länger im Vaginalkanal nachweisbar. Dies deutet darauf hin, daß CaTec1p außer im systemischen auch im vaginalen Infektionsmodell Einfluß auf die Virulenz nimmt. Diese Situation wurde bisher nur selten in Studien mit diesen Infektionsmodelle beschrieben und zeigt, daß es sinnvoll ist, Mutanten- und Wildtypstämme in verschiedenen Infektionsmodellen zu untersuchen.

IV.5. Morphogenese und Virulenz

Die Fähigkeit, Hyphen zu bilden, wird als wichtige Voraussetzung für die Virulenz von *C. albicans* angesehen. Mutanten die *in vitro* Defekte in dieser morphogenetischen Entwicklung aufweisen, zeigen oftmals auch Virulenz-Defizienzen. Beispiele hierfür sind Stämme mit Mutationen in den Signalkaskaden der Hyphenbildung, wie die *ras1/ras1*- [30, 59], die *efg1/efg1* [29, 31] und die *catec1/catec1*-Mutante (vgl. III.2), die alle in ihrer Virulenz attenuiert sind. Am deutlichsten wurde dieser Zusammenhang allerdings anhand der *in vitro* nichtfilamentösen *efg1/efg1 cph1/cph1*-Mutante beschrieben, die sich in systemischen Mausinfektionsmodellen als gänzlich avirulent darstellte [31]. Im Rahmen der hier vorgelegten Arbeit konnte gezeigt werden, daß die *catec1/catec1*-, die *efg1/efg1*-Mutante und sogar die *efg1/efg1 cph1/cph1*-Mutante während einer Mausinfektion *in vivo* durchaus zur Bildung von Hyphen imstande sind. Durch diese Daten werden ähnliche Ergebnisse ergänzt, die *in vivo* in einem „Piglets“-Zungeninfektionsmodell ebenfalls Filamentbildung der *efg1/efg1 cph1/cph1*-Mutante zeigen [109].

Die Differenzen in der morphologische Entwicklung von *C. albicans*-Mutanten *in vitro* und *in vivo* können höchstwahrscheinlich dadurch erklärt werden, daß *C. albicans in vivo* im Wirtorganismus deutlich stärkeren und komplexeren Signalen ausgesetzt ist, als unter den artifiziellen *in vitro* Kulturbedingungen. Des weiteren ist es wahrscheinlich, daß diese Signale *in vivo* alternativ über Efg1p- und Cph1-unabhängige Transduktionswege weitergeleitet werden können, um den für die Etablierung im Wirt essentiellen Prozeß der Filamentbildung sicher

zu gewährleisten. Entsprechend scheint es unbedingt erforderlich, den Zusammenhang zwischen der Hyphenbildung *in vitro* und der Virulenz *in vivo* von *C. albicans* neu zu beurteilen. Denn auch wenn die Entwicklung von Filamenten für die Virulenz von *C. albicans* effektiv notwendig ist, ist sie offensichtlich alleine nicht ausreichend für eine erfolgreiche Infektion. Diese erfordert unbedingt die zusätzliche Expression von Virulenzfaktoren. Die Aktivierung von Virulenzfaktoren erfolgt nach Weiterleitung induzierender Signale über die morphogenetischen Signaltransduktionswege durch Efg1p und Cph1p. Entsprechend sind *efg1/efg1 cph1/cph1*-Mutanten avirulent, obwohl sie *in vivo* Filamente bilden.

IV.6. Die Rolle des TEA/ATTS-Transkriptionsfaktors CaTec1p bei der Hyphenbildung und Virulenz von *C. albicans*

Durch induzierte Expression von *CaTEC1* wird in *C. albicans* sogar in Abwesenheit der übergeordneten Signaltransduktionskomponenten Efg1p und Cph1p Virulenz aktiviert. Dies impliziert, daß die *Efg1p/Cph1p*-abhängige Hyphenbildung deshalb so außerordentlich wichtig für die Virulenz von *C. albicans* ist, weil während dieses Prozesses *CaTEC1* exprimiert wird. Entsprechend wäre die Avirulenz der *efg1/efg1 cph1/cph1*-Mutante aus dem Fehlen der *CaTEC1*-Expression ableitbar, denn in dieser Mutante können einige für die Virulenz essentielle CaTec1p-abhängige Prozesse nicht mehr aktiviert werden. Die wichtigste Funktion von CaTec1p ist dabei anscheinend die Aktivierung von CaTec1p-responsiven Promotoren und damit die Expression der notwendigen Virulenzgene. Außerdem könnte das synthetisierte *CaTEC1*-Produkt nach Freisetzung ins Zytoplasma weitere regulatorische oder stabilisierende Funktionen in Stoffwechsel- oder Signalübertragungsprozessen übernehmen, die *C. albicans* zu einem optimierten Widerstand gegen die Abwehrreaktionen des Wirtes verhelfen.

Auf jeden Fall ist die Aktivität von CaTec1p nicht nur absolut ausreichend, um in einigen unabhängigen *C. albicans*-Mutanten die Virulenz zu restaurieren, sondern verstärkt außerdem die Virulenz eines allgemein etablierten *C. albicans* Wildtyp-Laborstammes. Dies konnte noch für kein anderes Genprodukt von *C. albicans* beschrieben werden. Bemerkenswerterweise erfüllt *CaTEC1* mit diesen Eigenschaften die Bedingungen der molekularen Koch'schen Postulate [18]. Diese wurden aufgestellt, um die Bedeutung eines Gens, bzw. dessen Produkt, für die Pathogenese infolge der Infektion mit dem getragenden Organismus zu untersuchen. Darauf bezogen ist CaTec1p die am weitesten terminal lokalisierte Komponente eines Signaltransduktionsweges in *C. albicans*, der für die Expression von Viru-

lenz in seinem Säugetier-Wirt unbedingt notwendig ist.

Virulenz ist einer von diversen Wegen, sich an spezifische Umweltbedingung anzupassen und zu überleben. Solche Anpassungen werden in Pilzen, wie auch in höheren Eukaryonten durch Transkriptionsfaktoren kontrolliert. Im Falle von *C. albicans* entwickelte sich die *CaTEC1*-abhängige Virulenz auf der Basis der Genregulation durch TEA/ATTS-Transkriptionsfaktoren. Diese wurde wahrscheinlich im Rahmen der Phylogenie deshalb konserviert, weil sie besonders erfolgreich war. In *C. albicans* übernimmt der TEA/ATTS-Transkriptionsfaktor CaTec1p nach seiner Aktivierung in der frühen Phase der Hyphenbildung anscheinend eine zentrale Rolle. Seine Funktion ist offenbar, spezifische Signale, die über die verschiedenen morphogenetischen Signaltransduktionswege vermittelt werden, zu integrieren und zu verstärken. Dadurch wird die Expression CaTec1-responsiver Gene kontrolliert, die entweder die morphogenetische Entwicklung *in vitro* bestimmen, oder während einer systemischen *C. albicans*-Infektion *in vivo* für die Evasion aus MΦ und die Virulenz entscheidend sind (Abb. IV-1).

Die hier gezeigten Daten weisen dem TEA/ATTS-Transkriptionsfaktor CaTec1p eine wesentliche Rolle in der Pathogenese von *C. albicans* zu und geben damit neuen Aufschluß über die molekularen Mechanismen der Virulenzregulation eines bedeutenden humanpathogenen Pilzes. Die sorgfältige molekulare und funktionelle Charakterisierung von CaTec1p auf Proteinebene und ein detailliertes Verständnis der Regulation des *CaTEC1*-Gens sind neben der Identifizierung weiterer, bis jetzt noch unbekannter CaTec1p-regulierter Gene die wichtigsten Ziele, um ein genaues Bild der CaTec1p-vermittelten Virulenzregulation zu erhalten. Die Aufklärung dieses Mechanismus wäre nicht nur als Angriffspunkt für die Entwicklung neuer Antimycotica gegen *C. albicans* interessant, es könnten auch neue Einblicke in die Virulenzmechanismen anderer humanpathogener Pilze gewonnen werden, die ebenfalls TEA/ATTS-Transkriptionsfaktoren exprimieren, wie z.B. *Aspergillus fumigatus* oder *Penicillium marneffe*.

hypheninduzierende Signale

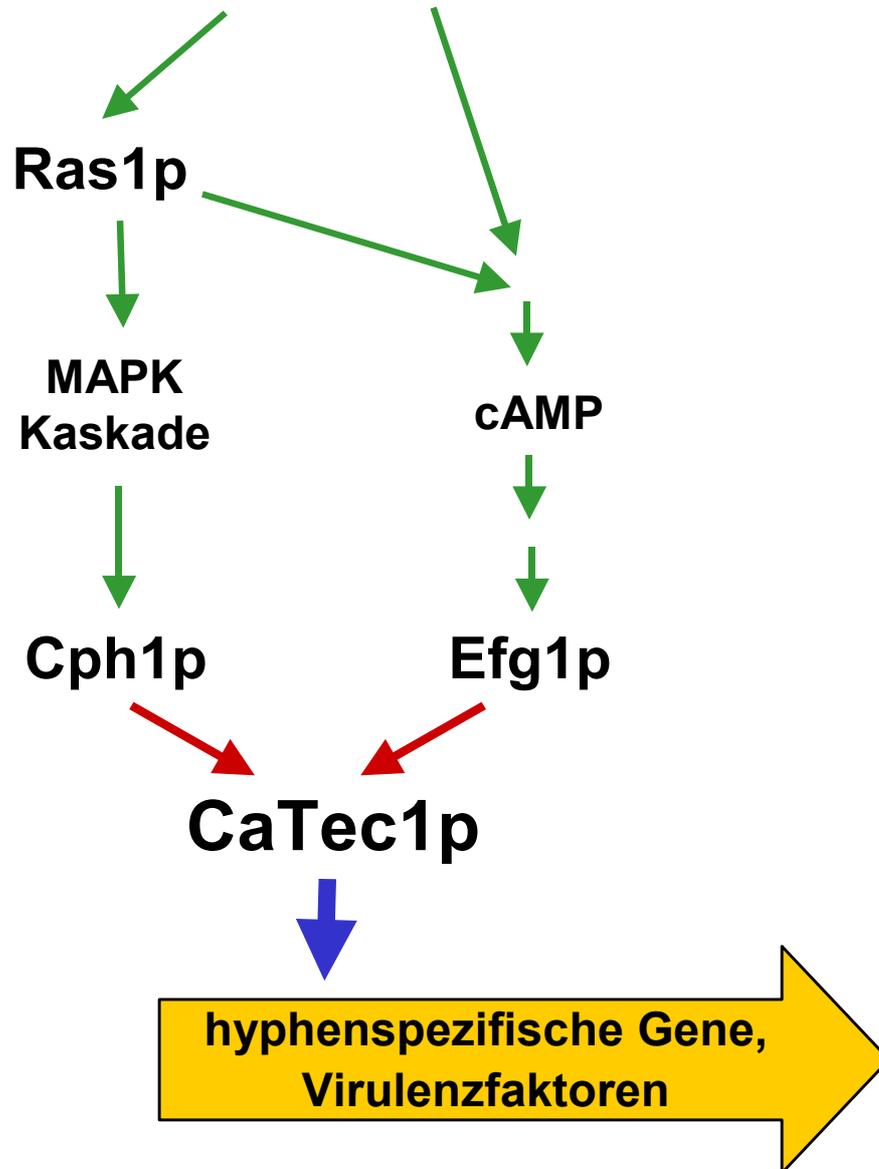


Abb. IV-1: Rolle von *CaTEC1* für die Hyphenbildung und Virulenz von *C. albicans*

Hypheninduzierende Signale werden in *C. albicans* über Ras1p, den Cph1p-abhängigen MAPK-Signaltransduktionsweg und den Efg1p-abhängigen cAMP-Weg vermittelt (grüne Pfeile). CaTec1p nimmt eine terminale Position in diesen beiden Signaltransduktionswegen ein. Das bedeutet, die beiden Signaltransduktionswege konvergieren in CaTec1p (rote Pfeile). Die verschiedenen hypheninduzierenden Signale müssen erst auf CaTec1p übertragen werden, um die Aktivierung der Expression (blauer Pfeil) hyphenspezifischer Gene und Virulenzfaktoren zu gewährleisten (gelber Pfeil). Damit übernimmt CaTec1p eine integrale Rolle bei der Regulation der Hyphenbildung und Virulenz von *C. albicans*.

Literaturverzeichnis

1. Schweizer, A. (2000). Bedeutung des TEA/ATTS-Transkriptionsfaktors CaTec1p für die Hyphenbildung von *Candida albicans*. Diplomarbeit.
2. Schweizer, A., Rupp, S., Taylor, B. N., Röllinghoff, M. & Schröppel, K. (2000). The TEA/ATTS transcription factor CaTec1p regulates hyphal development and virulence in *Candida albicans*. *Mol Microbiol* **38**, 435-45.
3. 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 *Candida albicans*: frequency of occurrence and antifungal susceptibility in the SCOPE Program. *Diagn Microbiol Infect Dis* **31**, 327-32.
4. Taylor, B. N., Harrer, T., Pscheidl, E., Schweizer, A., Röllinghoff, M. & Schröppel, K. (2003). Surveillance of nosocomial transmission of *C. albicans* in an intensive care unit by DNA fingerprinting. *Journal of Hospital Infection*, in press.
5. Odds, F. C. (1988). History. *Candida and Candidiasis*. London, United Kingdom: Bailliere Tindal, pp. 1-6.
6. Calderone, R. A. (2001). *Candida and Candidiasis*. 2ed. Washington, D.C.: ASM Press.
7. Garbino, J., Kolarova, L., Rohner, P., Lew, D., Pichna, P. & Pittet, D. (2002). Secular trends of candidemia over 12 years in adult patients at a tertiary care hospital. *Medicine (Baltimore)* **81**, 425-33.
8. Sudbery, P. E. (2001). The germ tubes of *Candida albicans* hyphae and pseudohyphae show different patterns of septin ring localization. *Mol Microbiol* **41**, 19-31.
9. Odds, F. C. (1988). Morphogenesis in *Candida* with special reference to *Candida albicans*. *Candida and Candidiasis*. Philadelphia: Bailliere Tindal, pp. 42-59.
10. Money, N. P. (2001). Biomechanics of invasive hyphal growth. *The Mycotica VIII*. Edited by Howard, R.J., Gow, N.A.: Berlin, Springer-Verlag, 3-17.
11. Gow, N. A. (1997). Germ tube growth of *Candida albicans*. *Curr Top Med Mycol* **8**, 43-55.
12. Sherwood, J., Gow, N. A., Gooday, G. W., Gregory, D. W. & Marshall, D. (1992). Contact sensing in *Candida albicans*: a possible aid to epithelial penetration. *J Med Vet Mycol* **30**, 461-9.
13. Hube, B. & Naglik, J. (2001). *Candida albicans* proteinases: resolving the mystery of a gene family. *Microbiology* **147**, 1997-2005.
14. Cutler, J. E. (1991). Putative virulence factors of *Candida albicans*. *Annu Rev Microbiol* **45**, 187-218.
15. Schaffner, A., Davis, C. E., Schaffner, T., Markert, M., Douglas, H. & Braude, A. I. (1986). *In vitro* susceptibility of fungi to killing by neutrophil granulocytes discriminates between primary pathogenicity and opportunism. *J Clin Invest* **78**, 511-24.
16. Calderone, R. & Sturtevant, J. (1994). Macrophage interactions with *Candida*. *Immunol Ser* **60**, 505-15.
17. Morrison, R. P. & Cutler, J. E. (1981). *In vitro* studies of the interaction of murine phagocytic cells with *Candida albicans*. *J Reticuloendothel Soc* **29**, 23-34.
18. Falkow, S. (1988). Molecular Koch's postulates applied to microbial pathogenicity. *Rev Infect Dis* **10** Suppl 2, S274-6.
19. Hube, B., Monod, M., Schofield, D. A., Brown, A. J. & Gow, N. A. (1994). Expression of seven members of the gene family encoding secretory aspartyl proteinases in *Candida albicans*. *Mol Microbiol* **14**, 87-99.

20. Felk, A., Kretschmar, M., Albrecht, A., Schaller, M., Beinhauer, 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**, 3689-700.
21. Borg-von Zepelin, M., Beggah, S., Boggian, K., Sanglard, D. & Monod, M. (1998). The expression of the secreted aspartyl proteinases Sap4 to Sap6 from *Candida albicans* in murine macrophages. *Mol Microbiol* **28**, 543-54.
22. Sanglard, D., Hube, B., Monod, M., Odds, F. C. & Gow, N. A. (1997). A triple deletion of the secreted aspartyl proteinase genes *SAP4*, *SAP5*, and *SAP6* of *Candida albicans* causes attenuated virulence. *Infect Immun* **65**, 3539-46.
23. Monod, M., Togni, G., Hube, B. & Sanglard, D. (1994). Multiplicity of genes encoding secreted aspartic proteinases in *Candida* species. *Mol Microbiol* **13**, 357-68.
24. Ibrahim, A. S., Mirbod, F., Filler, S. G., Banno, Y., Cole, G. T., Kitajima, Y., Edwards, J. E., Jr., Nozawa, Y. & Ghannoum, M. A. (1995). Evidence implicating phospholipase as a virulence factor of *Candida albicans*. *Infect Immun* **63**, 1993-8.
25. 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**, 362-74.
26. Hoyer, L. L. (2001). The *ALS* gene family of *Candida albicans*. *Trends Microbiol* **9**, 176-80.
27. Sundstrom, P. (1999). Adhesins in *Candida albicans*. *Curr Opin Microbiol* **2**, 353-7.
28. Odds, F. C. (1994). *Candida* species and virulence. *ASM News* **60**, 313-318.
29. Lo, H. J., Kohler, J. R., DiDomenico, B., Loeberberg, D., Cacciapuoti, A. & Fink, G. R. (1997). Nonfilamentous *C. albicans* mutants are avirulent. *Cell* **90**, 939-49.
30. Leberer, E., Harcus, D., Dignard, D., Johnson, L., Ushinsky, S., Thomas, D. Y. & Schröppel, 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**, 673-87.
31. 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**, 1982-91.
32. Gow, N. A., Brown, A. J. & Odds, F. C. (2002). Fungal morphogenesis and host invasion. *Curr Opin Microbiol* **5**, 366-71.
33. Liu, H. (2001). Transcriptional control of dimorphism in *Candida albicans*. *Curr Opin Microbiol* **4**, 728-35.
34. Brown, A. J. & Gow, N. A. (1999). Regulatory networks controlling *Candida albicans* morphogenesis. *Trends Microbiol* **7**, 333-8.
35. Ernst, J. F. (2000). Regulation of dimorphism in *Candida albicans*. *Contrib Microbiol* **5**, 98-111.
36. Brown, A. J. (2002). *Candida and Candidiasis*. Washington, D.C.: ASM Press **2002**, 95-106.
37. El Barkani, A., Kurzai, O., Fonzi, W. A., Ramon, A., Porta, A., Frosch, M. & Mühlischlegel, F. A. (2000). Dominant active alleles of *RIM101* (*PRR2*) bypass the pH restriction on filamentation of *Candida albicans*. *Mol Cell Biol* **20**, 4635-47.
38. 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**, 4753-61.

39. Braun, B. R. & Johnson, A. D. (1997). Control of filament formation in *Candida albicans* by the transcriptional repressor *TUP1*. *Science* **277**, 105-9.
40. 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. (2001). *NRG1* represses yeast-hypha morphogenesis and hypha-specific gene expression in *Candida albicans*. *Embo J* **20**, 4742-52.
41. Gimeno, C. J., Ljungdahl, P. O., Styles, C. A. & Fink, G. R. (1992). Unipolar cell divisions in the yeast *S. cerevisiae* lead to filamentous growth: regulation by starvation and *RAS*. *Cell* **68**, 1077-90.
42. Mirbod, F., Nakashima, S., Kitajima, Y., Cannon, R. D. & Nozawa, Y. (1997). Molecular cloning of a Rho family *CDC42Ca* gene from *Candida albicans* and its mRNA expression changes during morphogenesis. *J Med Vet Mycol* **35**, 173-9.
43. Ushinsky, S. C., Harcus, D., Ash, J., Dignard, D., Marcil, A., Morschhäuser, J., Thomas, D. Y., White-way, M. & Leberer, E. (2002). *CDC42* is required for polarized growth in human pathogen *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* **1**, 95-104.
44. 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**, 13223-8.
45. Leberer, E., Harcus, D., Broadbent, I. D., Clark, K. L., Dignard, D., Ziegelbauer, K., Schmidt, A., Gow, N. A., Brown, A. J. & Thomas, D. Y. (1996). Signal transduction through homologs of the Ste20p and Ste7p protein kinases can trigger hyphal formation in the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 13217-22.
46. Csank, C., Schröppel, K., Leberer, E., Harcus, D., Mohamed, O., Meloche, S., Thomas, D. Y. & White-way, M. (1998). Roles of the *Candida albicans* mitogen-activated protein kinase homolog Cek1p in hyphal development and systemic candidiasis. *Infect Immun* **66**, 2713-21.
47. Liu, H., Kohler, J. & Fink, G. R. (1994). Suppression of hyphal formation in *Candida albicans* by mutation of a *STE12* homolog. *Science* **266**, 1723-6.
48. Madhani, H. D. & Fink, G. R. (1997). Combinatorial control required for the specificity of yeast MAPK signaling. *Science* **275**, 1314-7.
49. Roberts, R. L. & Fink, G. R. (1994). Elements of a single MAP kinase cascade in *Saccharomyces cerevisiae* mediate two developmental programs in the same cell type: mating and invasive growth. *Genes Dev* **8**, 2974-85.
50. 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**, 5273-9.
51. Braun, B. R. & Johnson, A. D. (2000). *TUP1*, *CPH1* and *EFG1* make independent contributions to filamentation in *Candida albicans*. *Genetics* **155**, 57-67.
52. Lengeler, K. B., Davidson, R. C., D'Souza, C., Harashima, T., Shen, W. C., Wang, P., Pan, X., Waugh, M. & Heitman, J. (2000). Signal transduction cascades regulating fungal development and virulence. *Microbiol Mol Biol Rev* **64**, 746-85.
53. Leng, P., Lee, P. R., Wu, H. & Brown, A. J. (2001). Efg1, a morphogenetic regulator in *Candida albicans*, is a sequence-specific DNA binding protein. *J Bacteriol* **183**, 4090-3.
54. Rocha, C. R., Schröppel, K., Harcus, D., Marcil, A., Dignard, D., Taylor, B. N., Thomas, D. Y., White-way, 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**, 3631-43.

55. Sonneborn, A., Böckmühl, 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**, 386-96.
56. Kataoka, T., Powers, S., McGill, C., Fasano, O., Strathern, J., Broach, J. & Wigler, M. (1984). Genetic analysis of yeast *RAS1* and *RAS2* genes. *Cell* **37**, 437-45.
57. Kataoka, T., Broek, D. & Wigler, M. (1985). DNA sequence and characterization of the *S. cerevisiae* gene encoding adenylate cyclase. *Cell* **43**, 493-505.
58. Mösch, H. U., Kubler, E., Krappmann, S., Fink, G. R. & Braus, G. H. (1999). Crosstalk between the Ras2p-controlled mitogen-activated protein kinase and cAMP pathways during invasive growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **10**, 1325-35.
59. Feng, Q., Summers, E., Guo, B. & Fink, G. (1999). Ras signaling is required for serum-induced hyphal differentiation in *Candida albicans*. *J Bacteriol* **181**, 6339-46.
60. Chen, J., Zhou, S., Wang, Q., Chen, X., Pan, T. & Liu, H. (2000). Crk1, a novel Cdc2-related protein kinase, is required for hyphal development and virulence in *Candida albicans*. *Mol Cell Biol* **20**, 8696-708.
61. Liu, H., Styles, C. A. & Fink, G. R. (1993). Elements of the yeast pheromone response pathway required for filamentous growth of diploids. *Science* **262**, 1741-4.
62. Company, M., Adler, C. & Errede, B. (1988). Identification of a Ty1 regulatory sequence responsive to *STE7* and *STE12*. *Mol Cell Biol* **8**, 2545-54.
63. Dolan, J. W., Kirkman, C. & Fields, S. (1989). The yeast *STE12* protein binds to the DNA sequence mediating pheromone induction. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 5703-7.
64. Laloux, I., Jacobs, E. & Dubois, E. (1994). Involvement of SRE element of Ty1 transposon in *TEC1*-dependent transcriptional activation. *Nucleic Acids Res* **22**, 999-1005.
65. Laloux, I., Dubois, E., Dewerchin, M. & Jacobs, E. (1990). *TEC1*, a gene involved in the activation of Ty1 and Ty1-mediated gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*: cloning and molecular analysis. *Mol Cell Biol* **10**, 3541-50.
66. Baur, M., Esch, R. K. & Errede, B. (1997). Cooperative binding interactions required for function of the Ty1 sterile responsive element. *Mol Cell Biol* **17**, 4330-7.
67. Burglin, T. R. (1991). The TEA domain: a novel, highly conserved DNA-binding motif. *Cell* **66**, 11-2.
68. Andrianopoulos, A. & Timberlake, W. E. (1994). The *Aspergillus nidulans abaA* gene encodes a transcriptional activator that acts as a genetic switch to control development. *Mol Cell Biol* **14**, 2503-15.
69. Hwang, J. J., Chambon, P. & Davidson, I. (1993). Characterization of the transcription activation function and the DNA binding domain of transcriptional enhancer factor-1. *Embo J* **12**, 2337-48.
70. Jacquemin, P., Hwang, J. J., Martial, J. A., Dolle, P. & Davidson, I. (1996). A novel family of developmentally regulated mammalian transcription factors containing the TEA/ATTS DNA binding domain. *J Biol Chem* **271**, 21775-85.
71. Kaneko, K. J. & DePamphilis, M. L. (1998). Regulation of gene expression at the beginning of mammalian development and the TEAD family of transcription factors. *Dev Genet* **22**, 43-55.
72. Simmonds, A. J., Liu, X., Soanes, K. H., Krause, H. M., Irvine, K. D. & Bell, J. B. (1998). Molecular interactions between Vestigial and Scalloped promote wing formation in *Drosophila*. *Genes Dev* **12**, 3815-20.
73. Campbell, S., Inamdar, M., Rodrigues, V., Raghavan, V., Palazzolo, M. & Chovnick, A. (1992). The *scalloped* gene encodes a novel, evolutionarily conserved transcription factor required for sensory organ differentiation in *Drosophila*. *Genes Dev* **6**, 367-79.

74. Dutton, J. R., Johns, S. & Miller, B. L. (1997). StuAp is a sequence-specific transcription factor that regulates developmental complexity in *Aspergillus nidulans*. *Embo J* **16**, 5710-21.
75. Mirabito, P. M., Adams, T. H. & Timberlake, W. E. (1989). Interactions of three sequentially expressed genes control temporal and spatial specificity in *Aspergillus* development. *Cell* **57**, 859-68.
76. Gavrias, V., Andrianopoulos, A., Gimeno, C. J. & Timberlake, W. E. (1996). *Saccharomyces cerevisiae* *TEC1* is required for pseudohyphal growth. *Mol Microbiol* **19**, 1255-63.
77. 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**, 1257-69.
78. 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**, 161-71.
79. 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**, 179-82.
80. Fonzi, W. A. & Irwin, M. Y. (1993). Isogenic strain construction and gene mapping in *Candida albicans*. *Genetics* **134**, 717-28.
81. Hanahan, D., Jessee, J. & Bloom, F. R. (1991). Plasmid transformation of *Escherichia coli* and other bacteria. *Methods Enzymol* **204**, 63-113.
82. Navarro-Garcia, F., Perez-Diaz, R. M., Magee, B. B., Pla, J., Nombela, C. & Magee, P. (1995). Chromosome reorganization in *Candida albicans* 1001 strain. *J Med Vet Mycol* **33**, 361-6.
83. Dunn, J. J. & Studier, F. W. (1983). Complete nucleotide sequence of bacteriophage T7 DNA and the locations of T7 genetic elements. *J Mol Biol* **166**, 477-535.
84. Leuker, C. E., Sonneborn, A., Delbruck, S. & Ernst, J. F. (1997). Sequence and promoter regulation of the *PCK1* gene encoding phosphoenolpyruvate carboxykinase of the fungal pathogen *Candida albicans*. *Gene* **192**, 235-40.
85. Boeke, J. D., Trueheart, J., Natsoulis, G. & Fink, G. R. (1987). 5-Fluoroorotic acid as a selective agent in yeast molecular genetics. *Methods Enzymol* **154**, 164-75.
86. Birnboim, H. C. (1983). A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. *Methods Enzymol* **100**, 243-55.
87. Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. & Struhl, K. (1987). *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley and Sons, New York.
88. Artman, M., Fry, M. & Engelberg, H. (1966). The preparation and characterization of ribonucleic acid obtained by direct phenol extraction of intact cells of *Escherichia coli* from low ionic environment. *Biochem Biophys Res Commun* **25**, 49-53.
89. Southern, E. M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* **98**, 503-17.
90. Church, G. M. & Gilbert, W. (1984). Genomic sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**, 1991-5.
91. Fidel, P. L., Jr., Lynch, M. E. & Sobel, J. D. (1993). *Candida*-specific cell-mediated immunity is demonstrable in mice with experimental vaginal candidiasis. *Infect Immun* **61**, 1990-5.
92. Ryley, J. F. & McGregor, S. (1986). Quantification of vaginal *Candida albicans* infections in rodents. *J Med Vet Mycol* **24**, 455-60.

93. Sobel, J. D., Muller, G. & McCormick, J. F. (1985). Experimental chronic vaginal candidosis in rats. *Sabouraudia* **23**, 199-206.
94. Staab, J. F. & Sundstrom, P. (1998). Genetic organization and sequence analysis of the hypha-specific cell wall protein gene *HWP1* of *Candida albicans*. *Yeast* **14**, 681-6.
95. 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**, 5353-60.
96. 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**, 451-9.
97. Gaur, N. K. & Klotz, S. A. (1997). Expression, cloning, and characterization of a *Candida albicans* gene, *ALA1*, that confers adherence properties upon *Saccharomyces cerevisiae* for extracellular matrix proteins. *Infect Immun* **65**, 5289-94.
98. Clark, K. L., Feldmann, P. J., Dignard, D., Larocque, R., Brown, A. J., Lee, M. G., Thomas, D. Y. & Whiteway, M. (1995). Constitutive activation of the *Saccharomyces cerevisiae* mating response pathway by a MAP kinase kinase from *Candida albicans*. *Mol Gen Genet* **249**, 609-21.
99. Proft, M., Grzesitza, D. & Entian, K. D. (1995). Identification and characterization of regulatory elements in the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene *PCK1* of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* **246**, 367-73.
100. Borneman, A. R., Hynes, M. J. & Andrianopoulos, A. (2000). The *abaA* homologue of *Penicillium marneffeii* participates in two developmental programmes: conidiation and dimorphic growth. *Mol Microbiol* **38**, 1034-47.
101. 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**, 48988-96.
102. Watts, H. J., Cheah, F. S., Hube, B., Sanglard, D. & Gow, N. A. (1998). Altered adherence in strains of *Candida albicans* harbouring null mutations in secreted aspartic proteinase genes. *FEMS Microbiol Lett* **159**, 129-35.
103. Morschhäuser, J., Virkola, R., Korhonen, T. K. & Hacker, J. (1997). Degradation of human subendothelial extracellular matrix by proteinase-secreting *Candida albicans*. *FEMS Microbiol Lett* **153**, 349-55.
104. Rüchel, R. (1986). Cleavage of immunoglobulins by pathogenic yeasts of the genus *Candida*. *Microbiol Sci* **3**, 316-9.
105. Qian, Q., Jutila, M. A., Van Rooijen, N. & Cutler, J. E. (1994). Elimination of mouse splenic macrophages correlates with increased susceptibility to experimental disseminated candidiasis. *J Immunol* **152**, 5000-8.
106. Saavedra, M., Taylor, B., Lukacs, N. & Fidel, P. L., Jr. (1999). Local production of chemokines during experimental vaginal candidiasis. *Infect Immun* **67**, 5820-6.
107. Lane, S., Zhou, S., Pan, T., Dai, Q. & Liu, H. (2001). The basic helix-loop-helix transcription factor Cph2 regulates hyphal development in *Candida albicans* partly via *TEC1*. *Mol Cell Biol* **21**, 6418-28.
108. Marcil, A., Harcus, D., Thomas, D. Y. & Whiteway, M. (2002). *Candida albicans* killing by RAW 264.7 mouse macrophage cells: effects of *Candida* genotype, infection ratios, and gamma interferon treatment. *Infect Immun* **70**, 6319-29.
109. Riggle, P. J., Andrutis, K. A., Chen, X., Tzipori, S. R. & Kumamoto, C. A. (1999). Invasive lesions containing filamentous forms produced by a *Candida albicans* mutant that is defective in filamentous growth in culture. *Infect Immun* **67**, 3649-52.

Abkürzungsverzeichnis

Allgemein gebräuchliche Abkürzungen und Maßeinheiten sind nicht gesondert aufgeführt.

ADHp	ADH (<i>alcohol dehydrogenase promoter</i>)-Promotor
Amp	Ampicillin
Amp ^r	Ampicillinresistenz
ARS	<i>autonomously replicating sequence</i>
AS	Aminosäure, -n
bp	Basenpaar, -e
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serumalbumine</i>)
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
cDNA	Komplementäre DNA (<i>complementary DNA</i>)
CFU	Koloniebildende Einheiten (<i>colony forming units</i>)
Ci	Curie
cpm	Ereignisse pro Minute (<i>counts per minute</i>)
CSM-URA	<i>complete supplement mixture w/o uridine</i>
dATP	2-Desoxy-Adenosin-5-Triphosphat
dCTP	2-Desoxy-Cytidin-5-Triphosphat
DEPC	Diethyl-pyrocbonat
dGTP	2-Desoxy-Guanosin-5-Triphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	2-Desoxy-Nukleosid-5-Triphosphat
DTT	Dithiothreitol
dTTP	2-Desoxy-Thymidin-5-Triphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EK	Endkonzentration
EtBr	Ethidiumbromid
EV	Endvolumen
FCS	Fötale Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
FRE	<i>filamentation and invasion response element</i>
FOA	1,2,3,6-Tetrahydrogen-2,6-Dioxi-5-Flour-4-Pyrimidinkarboxylsäure (<i>5-fluoroorotic acid</i>)
g	Erdbeschleunigung
gDNA	Genomische DNA
H ₂ O _{dd}	doppelt destilliertes Wasser
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid
kb	Kilobasenpaar, -e

LB	Luria Broth
MΦ	Makrophagen
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase, -n
MOI	Infektionsverhältnis (<i>multiplicity of infection</i>)
MOPS	3-N-Morpholinopropansulfonsäure
ORF	Offener Leserahmen (<i>open reading frame</i>)
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCK _p	PCK (<i>phosphoenolpyruvate carboxykinase</i>)- Promotor
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PEG	Polyethylenglykol
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
PRE	<i>pheromone response element</i>
RNase A	Ribonuklease A
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rotations per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
SCAA	Medium supplementiert mit Casamino Säuren (<i>casamino acids</i>)
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SRE	Ste12p <i>response element</i>
TCS	TEA/ATTS Konsensus Sequenz
TE	Tris-EDTA
TEA/ATTS	TEF-1, Tec1p, AbaAp/AbaAp, TEF-1, Tec1p, <i>scalloped</i>
T _m	Schmelztemperatur
U	Einheit,-en (<i>unit,-s</i>)
ÜE	Überexpression
ÜEV	Überexpressionsvektor
üN	über Nacht
ÜNK	Übernachtkultur
URA3	Oritidin 5-phosphatdecarboxylase
UTR	Nichttranslatierte Gensequenz (<i>untranslated region</i>)
UV	Ultraviolett
v/v	Volumenprozent
w/v	Gewichtsprozent
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Chlor-4-Brom-3-Indolyl-β-D-Galaktosid
YNB	<i>yeast nitrogen base</i>
Z	Zelle,-n

Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. M. Röllinghoff für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit am Institut für Klinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene durchführen zu können, sowie für sein Interesse und die unterstützenden Worte zur Aufregungsbewältigung bei Vorträgen.

Weiterhin Danke ich Herrn HD Dr. M. Dahl für seine Betreuung seitens der naturwissenschaftlichen Fakultät. Vor allem aber, weil er mir durch seine ruhige souveräne Art immer die notwendige Sicherheit vermittelt hat.

Ebenso möchte ich Herrn PD Dr. J. Stülke danken, daß er die Betreuung seitens der Naturwissenschaftlichen Fakultät so kurzfristig und unkompliziert übernommen hat.

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. K. Schröppel für die Überlassung des Themas zur Anfertigung dieser Doktorarbeit, für seine Unterstützung bei der Planung und Auswertung der Versuche und für die Betreuung seitens des Instituts für Klinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene.

Ganz spezielle „Dankeschöns“ möchte ich meinen Mitarbeitern aus der Arbeitsgruppe für die hilfreiche und tatkräftige Unterstützung aussprechen. Besonders Barbara Bodendorfer, die mich immer zur richtigen Zeit in die dringend notwendigen Kaffeepausen entführt und mit Kinder-, Hunde- und Höchststadtgeschichten für erholsames Abschalten zwischendurch gesorgt hat. Brad N. Taylor für diesen gemeinsamen Ausflug in die Welt der Doktoranden und das Zusammenhalten in allen dazugehörigen Abenteuern. Außerdem Christine Blechner für die Regulierung jeglicher Chaoszustände und Katrin Sprößer für die freundschaftliche fränkisch-schwäbische Zusammenarbeit.

Außerdem danke ich Hasso Schüler für die Hilfestellung bei diversen PC- und Labortechnikproblemen und allen anderen Mitarbeitern des Instituts für die gute Zusammenarbeit.

Schließlich bedanke ich mich von ganzem Herzen bei denen, die mir während meiner Promotion zur Seite gestanden haben. Bei Angela und Papa, daß ich immer auf ihre ermutigenden Vorhersagen und Unterstützung vertrauen konnte. Bei Mama, daß sie mir unüberwindbar scheinende Berge in zu bewältigende Hügel aufgeteilt und vor jedem Anstieg noch einen kleinen Motivations-Schups gegeben hat. Bei meinem TOM, daß er mit mir durch alle Höhen geflogen ist und in allen Tiefen neue Thermik gefunden hat. Und bei meinem Andjaschatz, die mir bei Bedarf spontex den Biotopfrust in ☺ umgewandelt hat.

Lebenslauf

Name: Schweizer
Vorname: Anja Simone
Geburtsdatum: 20.02.1975
Geburtsort: Heilbronn-Neckargartach
Familienstand: ledig
Nationalität: deutsch

Schulbildung:

09/1981 – 07/1985 Grund- und Hauptschule Flein
09/1985 – 07/1994 Justinus-Kerner-Gymnasium Heilbronn
07/1994 Allgemeine Hochschulreife

Hochschulausbildung:

11/1994-02/2000 Studium der Biologie an der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg, Hauptfach Mikrobiologie
02/2000 Biologie Diplom
Diplomarbeit am Institut für Klinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene, Erlangen.
Thema: Bedeutung des TEA/ATTS-Transkriptionsfaktors CaTec1p für die Hyphenbildung von *Candida albicans*
03/2000-07/2003 Promotion am Institut für Klinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene an der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg.
Thema: Die Rolle des TEA/ATTS-Transkriptionsfaktors CaTec1p für die Hyphenbildung und Virulenz von *Candida albicans*