

**Charakterisierung einer Familie von Pry-Proteinen
in *Candida albicans***

**Von der Fakultät Energie-, Verfahrens- und Biotechnik
der Universität Stuttgart
zur Erlangung der Würde eines
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
genehmigte Abhandlung**

Vorgelegt von

Marc Röhm

aus Stuttgart

Hauptberichter:

Prof. Dr. H. Brunner

Mitberichter:

Prof. Dr. D. Wolf

Tag der mündlichen Prüfung:

27. Oktober 2010

Institut für Grenzflächenverfahrenstechnik der Universität Stuttgart

2010

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	6
Zusammenfassung	9
Summary	10
Einleitung	11
1 <i>Candida albicans</i> als Humanpathogen – Epidemiologie und Therapie.....	12
2 <i>Candida albicans</i> – Biologie	16
3 Virulenzmechanismen von <i>Candida albicans</i>	28
3.1 Morphogenese	29
3.2 Sezernierte Proteine.....	31
3.3 Zelloberflächenmoleküle.....	33
4 Pry-Proteine in <i>Candida albicans</i>	36
5 Ziel dieser Arbeit.....	40
Material und Methoden	41
1 Chemikalien	41
2 Enzyme	41
3 Reaktions-Kits.....	41
4 Kulturmedien.....	42
5 Pufferlösungen.....	44
6 Oligonukleotide.....	45
7 Plasmide	47
8 Bakterienstämme.....	48
9 <i>Candida albicans</i> -Stämme	49
10 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> -Stämme	51
11 Humane Zell-Linien.....	51
12 Allgemeine Methoden.....	52
12.1 Datenbanken und Datenverarbeitung	52
12.2 Kultivierung von Bakterienstämmen.....	53
12.3 Kultivierung von <i>C. albicans</i>	53
12.4 Transformation.....	54
12.4.1 Transformation von <i>E. coli</i>	54
12.4.2 Transformation von <i>C. albicans</i>	54
12.5 Methoden für die Analyse von DNA.....	56
12.5.1 Klonierung	56
12.5.2 Plasmidisolation aus <i>E. coli</i>	56
12.5.3 Präparation genomischer DNA aus <i>C. albicans</i>	56
12.5.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	57
12.5.5 Nachweis spezifischer DNA-Sequenzen über <i>Southern Blot</i> -Analyse	58
12.6 Methoden für die Analyse von RNA.....	60
12.6.1 Isolierung von Gesamt-RNA aus <i>C. albicans</i>	60
12.6.2 Nachweis spezifischer RNA-Sequenzen über <i>Northern Blot</i> -Analyse	61

12.6.3	Nachweis spezifischer mRNA-Sequenzen über quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR)	62
12.7	Methoden für die Analyse von Proteinen	64
12.7.1	Gewinnung von Rohextrakten aus Hefe	64
12.7.2	Trichloressigsäure-Präzipitation von Proteinen	64
12.7.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) von Proteinen	65
12.7.4	Färbung von Proteinen	66
12.7.5	Nachweis spezifischer Proteine über <i>Western Blot</i> -Analyse	67
13	Spezielle Methoden	68
13.1	Promotoranalyse <i>RBE1</i>	68
13.2	Filtertests	69
13.3	Heterologe Expression von <i>EFG1</i> in <i>E. coli</i>	70
13.4	Herstellung polyklonaler Antikörper gegen Efg1p	71
13.5	Bindungsstudien (Electrophoretic Mobility Shift Assays, EMSAs)	73
13.6	Lokalisation von Rbe1p und Rbt4p in <i>C. albicans</i> - Sekretomanalysen	75
13.7	Heterologe Expression von <i>RBE1</i> und <i>RBT4</i> in <i>S. cerevisiae</i>	77
13.8	Protease-Versuche	78
13.9	Deletion von <i>RBE1</i> und <i>RBT4</i> in <i>C. albicans</i>	78
13.10	Überexpression von <i>RBE1</i> in <i>C. albicans</i>	80
13.11	Adhäsions- und Invasionstests	80
13.11.1	Quantitative Adhäsionstests	81
13.11.2	Invasionstests	82
13.11.3	Zytotoxizitätstests	83
13.12	Paarungsversuche	84
13.13	Virulenzstudien	85
14	Methoden für die <i>de novo</i> -Identifikation spezifisch Promotor-bindender Proteine	85
14.1	Gewinnung von Kernproteinen aus <i>C. albicans</i>	85
14.2	Anreicherung DNA-bindender Proteine mittels Heparin-Affinitätschromatographie	87
	Ergebnisse	88
1	Die Pry-Proteinfamilie in <i>Candida albicans</i>	88
	<i>Strukturelle Charakteristika der Pry-Proteine</i>	89
	<i>Phylogenetische Verwandtschaftsbeziehungen der Pry-Proteine in Pilzen</i>	91
2	Transkriptionelle Regulation der <i>PRY</i> -Gene in <i>Candida albicans</i>	96
2.1	Expression von <i>RBE1</i> und <i>RBT4</i>	96
2.2	Expression aller Mitglieder der <i>PRY</i> -Familie in <i>C. albicans</i>	99
	<i>Regulation der PRY-Gene in Blastosporen versus Hyphen</i>	99
	<i>Kinetik der Regulation der PRY-Gene in frühen Stadien der Hyphenbildung</i>	101
	<i>Regulation der PRY-Gene in white- versus opaque-Zellen</i>	102
3	Promotoranalyse des <i>PRY</i> -Gens <i>RBE1</i>	107
3.1	Identifikation eines <i>RBE1</i> -Minimalpromotors	107
	<i>Konstruktion der Reporterplasmide</i>	107
3.2	Identifikation der regulatorischen Domänen innerhalb des <i>RBE1</i> -Minimalpromotors	111
	<i>Identifikation der Aktivierungsdomäne des RBE1-Minimalpromotors</i>	112
	<i>Identifikation der Reprimierungsdomäne des RBE1-Minimalpromotors</i>	113

3.3	Bindung heterolog exprimierter Transkriptionsfaktoren an die regulatorischen Domänen des <i>RBE1</i> -Promotors	115
	<i>Heterologe Expression von Efg1p</i>	120
	<i>Bindungsstudien mit rekombinantem Efg1p</i>	123
	<i>Bindungsstudien mit rekombinantem Tec1p</i>	125
4	Funktionelle Charakterisierung von Rbe1p und Rbt4p.....	127
4.1	Lokalisation von Rbe1p und Rbt4p in <i>C. albicans</i> -vergleichende Sekretomanalysen	127
4.2	Protease-Assays mit heterolog exprimiertem Rbe1p und Rbt4p	131
	<i>Heterologe Expression von Rbe1p und Rbt4p in S. cerevisiae</i>	133
	<i>Protease-Assays</i>	136
	<i>Spaltungsversuche</i>	138
4.3	Deletion von <i>RBE1</i> und <i>RBT4</i> in <i>C. albicans</i>	139
	<i>Konstruktion der Einzel-Deletions- und Reversionsstämme für RBE1 und RBT4</i>	140
	<i>Konstruktion der Doppel-Deletions- und Reversionsstämme für RBE1 und RBT4</i>	143
4.4	Phänotypische Charakterisierung der <i>RBE1</i> - und <i>RBT4</i> -Deletionsstämme.....	144
	<i>Wachstumsbedingungen</i>	144
	<i>Adhäsion in vitro</i>	145
	<i>Invasion in vitro</i>	147
	<i>Zytotoxizitätstests</i>	148
	<i>Beteiligung von Rbe1p und Rbt4p an der Paarung von C. albicans</i>	150
	<i>Virulenzstudien in vivo</i>	153
	<i>Transkriptionelle Regulation der PRY-Gene in den Deletionsstämmen</i>	155
	Diskussion	157
1.	Eine neue Familie von Pry-Proteinen in <i>C. albicans</i>	158
2.	Die Familie der <i>PRY</i> -Gene wird während der Morphogenese von <i>C. albicans</i> differentiell reguliert.....	159
3.	Der Minimalpromotor von <i>RBE1</i> besitzt eine Länge von 1 kb und beinhaltet eine aktivierende und eine reprimierende Domäne.....	165
4.	Regulatorische Domänen innerhalb des <i>RBE1</i> -Minimalpromotors weisen konservierte Bindemotive für Regulatoren der Morphogenese und der Paarung auf	166
5.	Die Pry-Proteine Rbe1p und Rbt4p sind sekretierte Proteine in <i>C. albicans</i>	170
6.	Die Pry-Proteine Rbe1p und Rbt4p besitzen keine proteolytische Aktivität	172
7.	Die Pry-Proteine Rbe1p und Rbt4p sind nicht an der Pheromon-vermittelten Ausbildung von Paarungsstrukturen beteiligt.....	177
8.	Die <i>PRY</i> -Gene <i>RBE1</i> und <i>RBT4</i> sind in einem klinischen <i>C. albicans</i> -Isolat nicht an der Filamentierung sowie der Adhäsion und Invasion <i>in vitro</i> beteiligt.....	180
9.	Die <i>PRY</i> -Gene <i>RBE1</i> und <i>RBT4</i> zeigen in einem klinischen Isolat von <i>C. albicans</i> einen synergistischen Virulenzphänotyp.....	183
10.	Mögliche Funktionen der Pry-Proteine bei der systemischen Infektion in <i>C. albicans</i>	184
	Literaturverzeichnis	187
	Anhang	211
	Eine Methode zur <i>de novo</i> -Identifikation spezifisch Promotor-bindender Proteine	228
	Danksagung	236
	Lebenslauf.....	237
	Publikationen	238
	Erklärung	239

Abkürzungsverzeichnis

5-FOA	5-Fluororotsäure (<i>5-Fluoroorotic acid</i>)
°C	Grad Celsius
μ	mikro
Ac	Acetat
ALS	<i>Agglutinin-Like Sequence</i>
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
b (bp)	Basen (Basenpaare)
bidest.	bidestilliert
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BSA	Bovine serum albumin (Rinderserumalbumin)
CAP	Chloramphenicol
Can	<i>Candida</i>
cDNA	komplementäre DNA
ChIP	Chromatin-Immunopräzipitation
CRISP	<i>Cysteine-rich secretory proteins</i>
Da	Dalton
dCTP	Desoxycytidin-5`-triphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DDT	1,4-Dithiothreitol
DNA	Desoxyribonukleinsäure (Acid)
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ESI	Elektrospray-Ionisierung
EtOH	Ethanol
FRE	<i>Filamentation and invasion Response Element</i>
FRT	<i>FLP Recognition Target</i>
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
h	Stunde
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
kb	Kilobasen (10 ³ Basenpaare)
KLH	<i>keyhole limpet</i> Hämocyanin
Konz.	Konzentration
l	Liter
<i>lacZ</i>	<i>β</i> -Galaktosidase-Gen
LB	Luria Bertani (Medium)
LDH	Laktatdehydrogenase
M	Molare Konzentration [mol/l]
mA	Milli-Ampère
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MAT	<i>Mating Type</i>
MEM Alpha	Minimal Essential Medium Alpha nach Eagle

min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolare Konzentration [mmol/l]
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
mRNA	messenger RNA
MALDI	<i>Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization</i>
MS	Massenspektrometrie
MTL	<i>Mating Type-Like</i>
N	Normale Konzentration [mol/l]
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
nm	Nanometer
OD	Optische Dichte
ORF	<i>Open reading frame</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PEG	Polyethylenglykol
PKA	Proteinkinase A
pmol	pikomolare Konzentration [pmol/l]
PMSF	Phenylmethyl-Sulfonylfluorid
PR	<i>Pathogenesis-related</i>
PRE	<i>Pheromone Response Element</i>
PRY	<i>Pathogenesis-related in yeast</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qRT-PCR	quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure (Acid)
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SC	<i>Synthetic complete</i> (Medium)
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSC	<i>Saline sodiumcitrate</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA
<i>Taq</i>	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TCA	Trichloressigsäure
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TFA	Trifluoressigsäure
TOF/TOF	<i>Tandem Time-of-Flight</i>
U	Unit, Enzymeinheit
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolettes Licht
V	Volt
v/v	<i>volume per volume</i>
WT	Wildtyp
w/v	<i>weight per volume</i>
YCB	<i>Yeast Carbon Base</i> , Hefe-Kohlenstoff-Basis
YNB	<i>Yeast Nitrogen Base</i> , Hefe-Stickstoff-Basis
YPD	<i>Yeast extract – peptone – dextrose</i> (Medium)

Ein- und Dreibuchstabencodes für Aminosäuren

A	Ade	Adenin
C	Cys	Cystein
D	Asp	Aspartat
E	Glu	Glutamat
F	Phe	Phenylalanin
G	Gly	Glycin
H	His	Histidin
I	Iso	Isoleucin
K	Lys	Lysin
L	Leu	Leucin
M	Met	Methionin
N	Asn	Asparagin
P	Pro	Prolin
Q	Gln	Glutamin
R	Arg	Arginin
S	Ser	Serin
T	Thr	Threonin
V	Val	Valin
W	Trp	Tryptophan
Y	Tyr	Tyrosin

Zusammenfassung

Die Mitglieder der Superfamilie der CAP-Proteine sind ubiquitär verbreitet und zeichnen sich durch eine konservierte zentrale Domäne aus, die ihnen eine außerordentlich stabile dreidimensionale Struktur verleiht und die den strukturellen Anforderungen extrazellulär wirkender Proteine entspricht. Der Grad der Sequenz- und Strukturhomologien dieser Proteine deutet auf einen ähnlichen Wirkmechanismus hin, die molekulare Funktion der CAP-Proteine ist bis heute jedoch unklar.

In dieser Arbeit wurde eine bisher nicht beschriebene Familie von CAP-Proteinen in *Candida albicans* identifiziert und deren Mitglieder funktionell charakterisiert. In Analogie zu *Saccharomyces cerevisiae* sollen diese als Pry-Proteine bezeichnet werden (*pathogenesis-related in yeast*). Die Pry-Proteinfamilie in *C. albicans* umfasst 5 Mitglieder, die im Zusammenhang mit der Morphogenese von *C. albicans* (Hefe – Hyphe, *white* – *opaque*) differentiell reguliert sind. Alle 5 Familienmitglieder weisen spezifische strukturelle Merkmale sekretierter Proteine auf.

Transkriptionelle Studien zeigen, dass die beiden Pry-Proteine Rbe1p und Rbt4p von den zentralen Regulatoren der Morphogenese in *C. albicans*, Efg1p und Tup1p, gegensätzlich reguliert werden. Dabei wird Rbe1p v.a. in Blastosporen und *opaque*-Zellen, Rbt4p degegen in Hyphen exprimiert. Die Promotorsequenz von *RBE1* umfasst 1039 bp und enthält eine aktivierende und eine reprimierende Domäne für die Transkription. Obwohl diese mehrere mögliche Bindestellen für Efg1p aufweisen, bindet heterolog exprimiertes Efg1p offensichtlich nicht an den *RBE1*-Promotor, so dass die Regulation von *RBE1* voraussichtlich indirekt durch Efg1p erfolgt.

Massenspektrometrische Analysen des *C. albicans*-Sekretoms weisen Rbe1p und Rbt4p als sekretierte Proteine in *C. albicans* aus. Dabei ist Rbe1p ein spezifisch von Blastosporen sekretiertes Protein, während Rbt4p ein Bestandteil des Sekretoms von Blastosporen und Hyphen ist. Die heterolog in *S. cerevisiae* exprimierten Proteine Rbe1p und Rbt4p zeigen keine für die CAP-Proteine postulierte Funktion als Protease. Deletionsstudien für *RBE1* und *RBT4* im *C. albicans*-Wildtypstamm SC5314 zeigen keinen Phänotyp auf gängigen Labormedien, sowie keine Beteiligung an der Adhäsion und Invasion humanen Epithelgewebes für *RBE1* und *RBT4*. In Kombination führt die Deletion beider Gene allerdings zu einer starken Attenuation der Virulenz in einem intravenösen Mausmodell für systemische Kandidosen. Diese tritt bei einer Deletion nur eines der beiden *PRY*-Gene nur schwach zutage, da in diesen Stämmen das jeweils andere *PRY*-Gen kompensatorisch induziert wird. Dieser synergistische Virulenzphänotyp spricht für eine ähnliche Funktion der beiden Proteine sowie für eine Regulation durch ähnliche Signalwege.

Summary

The members of the CAP superfamily of proteins are disseminated in a widespread range of organisms of all kingdoms and are characterized by a conserved central domain that accounts for an extraordinary stable three-dimensional structure, meeting the structural requirements for proteins functioning in the extracellular environment. The PR-1 (*pathogenesis-related*) subfamily of these proteins has already been described in plants as being expressed in response to challenge with pathogens. The degree of sequence and structural homologies between these proteins points to a similar mode of action, yet the molecular function of the CAP proteins is not known.

Based on database searches, we identified a similar family of proteins in *Candida albicans* comprising five members with homology to PR-1 proteins in plants. In addition to *RBE1* and *RBT4*, we could assign three yet not further characterized open reading frames, *ORF19.6200*, *ORF19.2787* as well as *ORF19.2336*, to this family of proteins. In analogy to *Saccharomyces cerevisiae*, the members of this family are termed Pry proteins (*pathogenesis-related in yeast*). Structurally, all of these proteins dispose of characteristics of secreted proteins. *RBE1* is expressed in blastospores and *opaque* cells and is downregulated in hyphae. On the contrary, *RBT4* is upregulated in hyphae compared to blastospores and downregulated in *opaque* cells. Transcript levels for the other family members are generally low under these conditions. Transcription of *RBE1* and *RBT4* is repressed by *EFG1* and *TUP1*, respectively, thus accomplishing their morphogenesis-related expression. Mass spectrometric analyses of the *C. albicans* secretome show that both Rbe1p and Rbt4p are secretory proteins in *C. albicans*. Rbe1p is secreted specifically by yeast cells, whereas Rbt4p is secreted by both yeast and hyphal cells. Single deletion mutants of *RBE1* and *RBT4* as well as the corresponding $\Delta rbe1/\Delta rbt4$ double mutant in the clinical isolate SC5314 do not show any obvious phenotype under common morphogenesis-inducing conditions. Moreover, no significant differences were found in *in vitro* adhesion and invasion assays employing different cellular epithelia in comparison to the wildtype. However, applying a mouse model for disseminated candidiasis, the $\Delta rbe1$ and $\Delta rbt4$ single deletion strains showed a moderate but significant virulence phenotype. A synergistic effect was observed in the $\Delta rbe1/\Delta rbt4$ double mutant for which virulence was strongly attenuated. Strikingly, *RBE1* transcript levels are upregulated in the $\Delta rbt4$ mutant strain and vice versa, indicating that both proteins share similar molecular functions or are implicated in similar physiological processes critical for virulence *in vivo*.

Einleitung

Pilze sind für das Leben auf der Erde von unerlässlicher Bedeutung und spielen auch im Leben des Menschen seit jeher eine große Rolle. Ihre Vertreter stellen in der Taxonomie eines der fünf Reiche des Lebens dar und umfassen über 1,5 Millionen Arten. Bis heute sind sie von großer ökonomischer und medizinischer Bedeutung. Hefepilze der Gattung *Saccharomyces* aus der Gruppe der Ascomyceten wurden schon im Altertum für die Herstellung von Bier, Wein und Brot genutzt, wobei man sich deren Fähigkeit, Zucker zu Alkohol und Kohlendioxid zu vergären, zu Nutze macht. Das Spektrum von Produkten, die mit Hilfe von Hefepilzen hergestellt werden, reicht von den oben genannten Lebensmitteln, zu denen auch der Käse zählt, bis hin zu Antibiotika, Immunsuppressiva und Impfstoffen. Aufgrund seiner großen wirtschaftlichen Bedeutung und leichten Kultivierbarkeit ist *Saccharomyces cerevisiae* der hinsichtlich seiner Biochemie und Genetik am besten erforschte Organismus und dient als Modellorganismus der Molekularbiologie.

Nur wenige Pilze sind schädlich für den Menschen. Von den etwa 300 Arten, die als Erreger von Krankheiten beim Menschen in Erscheinung treten, verursacht weniger als ein Dutzend über 90% aller Infektionen (Edmond *et al.*, 1999). Zu diesen gehören *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus fumigatus* sowie verschiedene Arten der Gattung *Candida*, insbes. *C. albicans*. Pilze können den Menschen aber auch indirekt als Erreger zahlreicher Pflanzenkrankheiten schädigen, wodurch es zu erheblichen Ernteeinbußen kommen kann. So befällt *Claviceps purpurea* als Auslöser des Mutterbrandes den Roggen oder *Ustilago maydis* als Auslöser des Beulenbrandes den Mais. Auch Schimmelpilze schaden dem Menschen durch den Befall von Lebensmitteln oder Holz oder indem sie direkt als Krankheitserreger in Erscheinung treten, etwa durch die Inhalation von Sporen oder die Bildung toxischer Substanzen, sog. Mykotoxinen. So sind die von *Aspergillus flavus* gebildeten Aflatoxine hochgradig krebserregend und leberschädigend.

Pilze als Pathogene - Mykosen

Die Klassifizierung von Pilzkrankungen – Mykosen – erfolgt nach der Eintrittsstelle in den Wirt und dem Ausmaß der dabei betroffenen Gewebe. Sie reichen von oberflächlichen Mykosen der Haut- und Schleimhäute über subkutane bis hin zu systemischen Mykosen, bei denen der ganze Organismus betroffen sein kann. Die Erreger werden in der Medizin aufgrund ähnlicher Therapien in drei Klassen eingeteilt: Dermatophyten, Hefen (Ascomyceten) und Schimmelpilze. Oberflächliche Mykosen betreffen Haare, Haut und Nägel und werden oft von Dermatophyten der drei Gattungen *Trichophyton*, *Microsporum* und *Epidermophyton* verursacht, die sich Keratin durch das Enzym Keratinase als Nahrungsquelle erschließen können. Ein weiterer Erreger von Hautkrankheiten ist der Hefepilz *Malassezia furfur*, der ein Bestandteil der Hautflora bei nahezu allen Menschen ist.

Mykosen der Schleimhäute des Mund- und Rachenraums, des Verdauungstraktes sowie der Geschlechtsorgane werden oft von Hefepilzen der Gattung *Candida* hervorgerufen (s.u.). Bei intaktem Immunsystem sind dabei i.d.R. nur die Geschlechtsorgane betroffen. So tritt bei etwa 70% aller Frauen einmal im Leben eine Vaginalkandidose auf (Fidel *et al.*, 1999). Infektionen der Schleimhäute des Verdauungstraktes - wie der Zunge oder des Rachenraums - sind meist ein Zeichen für ein geschwächtes Immunsystem. Diese Erkrankungen werden als Soor oder Kandidose bezeichnet. Subkutane Mykosen betreffen die Dermis, das Bindegewebe und die Muskeln. Sie sind i.d.R. chronisch und ihre Behandlung erfordert oft einen chirurgischen Eingriff. Systemische Mykosen sind durch einen Übertritt der Erreger in das Blutssystem und einen Befall innerer Organe gekennzeichnet. Diese Mykosen sind schwerwiegende Erkrankungen, die schwierig zu behandeln sind und zum Tode führen können. Systemische Erkrankungen können von primären Krankheitserregern verursacht werden, die meist über die Lunge in den Körper gelangen. Diese Erreger sind meist dimorph (s.u.). Zu diesen Erkrankungen gehören die Histoplasmose, die von *Histoplasma capsulatum* v.a. in Amerika, Afrika und Indonesien verursacht wird, die Coccidioido- und Paracoccidioidomykose (*Coccidioides immitis* bzw. *Paracoccidioides brasiliensis*), sowie die Blastomykose, die in Europa von *Cryptococcus neoformans* (nach *C. albicans* der häufigste humanpathogene Hefepilz) verursacht wird. In der Hauptsache sind systemische Mykosen allerdings opportunistische Erkrankungen, die nur bei einem stark geschwächten Immunsystem infolge von Operationen, Chemo- oder Antibiotikatherapie oder Erkrankungen des Immunsystems wie z.B. AIDS auftreten. Zu den opportunistischen systemischen Mykosen gehören Aspergillosen (meist verursacht durch *A. fumigatus*), Kryptokokkose oder Meningoencephalitis (ebenfalls durch *C. neoformans* verursacht), Penicilliose (*Penicillium marneffeii*) und Kandidosen, die durch verschiedene Arten der Gattung *Candida* verursacht werden.

1 *Candida albicans* als Humanpathogen – Epidemiologie und Therapie

Seit den frühen 80-iger Jahren des vergangenen Jahrhunderts haben sich Pilze als wichtige Verursacher opportunistischer Infektionen beim Menschen entwickelt. So hat sich beispielsweise die Zahl der durch Pilze verursachten Sepsisfälle in den Vereinigten Staaten zwischen 1979 und 2000 verdreifacht (Martin *et al.*, 2003). Zu diesen opportunistischen Pilzen gehören neben Hefepilzen der Gattungen *Candida* und *Cryptococcus* weitere Hefepilze, z.B. der Gattung *Trichosporon*, sowie Schimmelpilze der Gattungen *Aspergillus* und *Fusarium* und Zygomyceten (Pfaller and Diekema, 2007).

Candida albicans ist normalerweise ein harmloser Kommensale epithelialen Wirtsgewebes und wird bei bis zu 62% gesunder Individuen gefunden (Calderone, 2002; Odds, 1988). Die Kolonisierung erfolgt bei oder kurz nach der Geburt (Reef *et al.*, 1998). Der Pilz kann sich aber auch bei gesunden Individuen vermehren und Infektionen der Haut, Nägel und Schleimhäute verursachen. Solche oberflächliche Mykosen entstehen bevorzugt auf feuchten

und warmen Hautoberflächen, wie z.B. im Falle der Windeldermatitis oder der Vaginalkandidose. Ist das Immunsystem geschädigt, kann *C. albicans* allerdings lebensbedrohliche systemische Infektionen verursachen, die von einer Infektion des Blutstroms (Kandidämie) und einer anschließenden Besiedelung und Invasion von Organen gekennzeichnet sind. Von solchen Infektionen kann jedes Organsystem betroffen sein. Die Sterberate dieser Infektionen liegt bei bis zu 50% (Eggimann *et al.*, 2003; Gudlaugsson *et al.*, 2003; Wey *et al.*, 1988).

Systemische Kandidosen

Die Gattung *Candida* umfasst derzeit weit über 350 Arten, von denen über 17 als Verursacher invasiver Kandidosen beim Menschen beschrieben wurden (Hazen, 1995; Pfaller and Diekema, 2004). Über 90% der invasiven Infektionen, die durch *Candida spp.* verursacht werden, werden allerdings 5 Arten zugeschrieben: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* und *C. krusei*. Von diesen stellt *C. albicans* mit etwa 66% aller isolierten *Candida*-Arten die weltweit bei weitem häufigste Ursache invasiver Kandidosen dar, allerdings mit abnehmendem Trend zugunsten einer zunehmenden Isolation von *C. tropicalis* und *C. parapsilosis* (7,5% bzw. 7,3% aller isolierten *Candida*-Arten 2003) (Pfaller and Diekema, 2007; Pfaller *et al.*, 2005). Es gibt Hinweise, dass dies in der zunehmenden Verwendung von Azolen in der Therapie begründet ist (Sobel, 2006). Nach *C. albicans* stellt *C. glabrata* die zweithäufigste Ursache invasiver Kandidosen (12% in 2003) bzw. von Infektionen des Blutstroms dar (20% bis 24% in den USA, in Europa allerdings nur etwa 10% (2001-2004)) (Pfaller and Diekema, 2007).

In den Vereinigten Staaten stellen Arten der Gattung *Candida* die viert-häufigste Ursache von Infektionen des Blutstroms (Septikämie) des Menschen dar, die im Krankenhaus erworben werden (nosocomial). Sie sind dort für 8% bis 10% aller Septikämien verantwortlich und betreffen insgesamt jährlich zwischen 10,000 und 40,000 Patienten. Damit verursachen sie eine ähnlich große Zahl von Infektionen wie gram-negative Bakterien (Pfaller and Diekema, 2007). In Europa stellen *Candida spp.* die sechst- bis zehnt-häufigste Ursache nosocomialer Septikämien dar (Mean *et al.*, 2008). Etwa zwei Drittel dieser Kandidämien treten dabei in Intensiv- und chirurgischen Stationen auf. In Deutschland sind jährlich etwa 8.000 – 10.000 Todesfälle auf invasive Kandidosen zurückzuführen (Morschhäuser *et al.*, 1997).

Neben Arten der Gattung *Candida* sind vor allem *Aspergillus spp.* die häufigsten Verursacher invasiver Infektionen bei immunkompromittierten und ernsthaft erkrankten Patienten. Dabei ist die Häufigkeit invasiver Kandidosen etwa 7 bis 15 mal höher als diejenige invasiver Aspergillosen (Mean *et al.*, 2008) und ist über das vergangene Jahrzehnt in etwa stabil geblieben (Pfaller and Diekema, 2007).

Prädisponierende Bedingungen - Risikofaktoren

Da *Candida*-Arten als Kommensalen verbreitet sind, müssen Kandidosen als opportunistische Erkrankungen betrachtet werden, die bestimmte, prädisponierende Faktoren erfordern.

Der wichtigste dieser Faktoren ist eine stets zunehmende Zahl immunkompromittierter Individuen, verursacht durch eine Schädigung der natürlichen Schleimhaut- bzw. Hautbarrieren (Wunden, Operationen, intravaskuläre oder Harn-Katheter), Defekte in der Zahl und Funktion von Neutrophilen oder der Zell-vermittelten Immunität, metabolische Funktionsstörungen und Altersextreme (< 1 und > 70 Jahre). Der zunehmende Einsatz von Breitspektrum-Antibiotika, zytotoxische Chemotherapie und Transplantationen erhöhen das Risiko opportunistischer Pilzerkrankungen (Segal *et al.*, 2006). Auch gilt bereits eine Besiedelung von Haut- und Schleimhäuten durch *Candida spp.* als wichtiger Risikofaktor für invasive Kandidosen (Pittet *et al.*, 1994).

Diagnose

Die Diagnose oberflächlicher Kandidosen erfolgt mittels Gram-Färbung von Präparaten unterschiedlicher Materialien. *C. albicans* erscheint dabei als grampositive Hefe, oft können auch grampositive Pseudohyphen beobachtet werden.

Die klinischen Symptome invasiver Kandidosen sind dagegen oft völlig unspezifisch. Das erste Stadium aller invasiven Kandidosen ist ein Übertreten des Organismus in die Blutbahn. Da dies aber nicht immer entdeckt wird, ist die Erkrankung eines Organs oft das erste Anzeichen für eine invasive Kandidose. Bei Patienten mit hohem Erkrankungsrisiko ist Fieber oft der einzige Hinweis auf invasive Kandidosen. Bei Chirurgiepatienten mit invasiver Kandidose wird häufig auch eine fortschreitende Sepsis mit Multi-Organversagen beobachtet. Hinweise für akutere Formen invasiver Kandidosen sind daher unerklärbares Fieber oder Sepsis, die nicht auf Breitspektrum-Antibiotika ansprechen.

Aus diesen Gründen ist die Diagnose invasiver Pilzinfektionen schwierig und erfolgt oft verzögert, wodurch die Sterberate bei invasiven Kandidosen hoch bleibt. Blutkulturen sind nicht sensitiv genug und zeigen erst spät ein positives Resultat (Morris *et al.*, 1996; Reiss and Morrison, 1993). Radiologische Signale erscheinen ebenfalls erst spät im Verlauf der Infektion. Daher werden Methoden, die nicht auf Kulturen basieren, als sensitive und spezifische Alternativen entwickelt. Durch diese sollen Pilzmetabolite, Antigene, Antikörper oder die DNA der Pilze nachgewiesen werden. In klinischen Studien erwiesen sich serologische Tests für den Nachweis von Komponenten der pilzlichen Zellwand wie Mannan, Galaktomannan oder β -(1,3)-D-Glukan oder Antikörper gegen diese Antigene als vielversprechend (Mean *et al.*, 2008).

Therapie

Prävention und Prophylaxe: Die Prävention nosocomialer Kandidämien sollte ebenso wie die anderer nosocomialer Infektionen zunächst die grundlegenden Strategien zur Aufrechterhaltung der Krankenhaushygiene umfassen (Diekema and Pfaller, 2004). Dazu gehört zum einen eine verbesserte Handhygiene des klinischen Personals (Ethanol und Chlorhexidin töten *Candida spp.* effektiv ab), wodurch eine Besiedelung von Patienten durch *Candida* vermieden werden kann, zum zweiten optimiertes Anbringen venöser Katheter und drittens die Kontrolle der Gabe antimikrobieller Agenzien. Eine Anti-Pilz-Prophylaxe kann bei Neutropenie effektiv sein. Azol-Prophylaxe auf Intensivstationen kann unter bestimmten Bedingungen das Risiko invasiver Kandidosen vermindern (Pfaller and Diekema, 2007).

Von den wenigen heute bekannten Antimykotika kommen v.a. die folgenden Substanzklassen bei Behandlung dokumentierter *Candida*-Infektionen zum Einsatz:

Polyene: Zu den Polyenen gehören Nystatin und Amphotericin B. Polyene binden an Ergosterol in der Zellmembran von Pilzen, wodurch deren Integrität zerstört wird. Dabei entstehen Poren in der Zellmembran, wodurch es zum Austritt von Kaliumionen kommt, was letztlich zum Zelltod führt. Amphotericin B-Desoxycholat war für Jahrzehnte die Standardtherapie für invasive Pilzinfektionen. Es wird jedoch oft schlecht toleriert und ist Nieren-toxisch. Lipid-Formulationen von Amphotericin B zeigen eine bessere Tolerierbarkeit. Trotz seiner breiten Wirksamkeit gegen *Candida*-Arten gibt es jedoch zunehmend Hinweise auf eine verringerte Wirksamkeit gegen bestimmte Arten (u.a. *C. glabrata* und *C. krusei*) (Pappas *et al.*, 2004; Spellberg *et al.*, 2006). Nystatin aus *Streptomyces noursei* war im Jahre 1948 das erste entwickelte Antimykotikum. Es wurde von Elizabeth Lee Hazen am New York State Department of Health in Zusammenarbeit mit Rachel Fuller Brown in Albany entwickelt und patentiert und nach diesem Institut benannt (*NY STATE Dept. of Health*). Nystatin gelangt nicht in den Blutkreislauf und wird zur Behandlung oberflächlicher Haut- und Schleimhautinfektionen sowie zur Prophylaxe bei Patienten mit erhöhtem Risiko einer Pilzinfektion, welches bei einer Erkrankung durch AIDS oder bei der Chemotherapie gegeben ist, eingesetzt.

Triazole: In den 1970-iger und 1980-iger Jahren wurden Azole (Miconazol, Ketoconazol, Fluconazol und Itraconazol) als alternative Therapeutika für die Behandlung von Kandidosen entwickelt. Triazole wirken durch die Hemmung der Ergosterol-Biosynthese fungistatisch (durch Hemmung der Lanosterol 14- α -Demethylase, Erg11p, einem Schlüsselenzym der Ergosterol-Biosynthese) und sind bei vergleichbarer Effektivität zu Amphotericin B besser tolerierbar. Fluconazol ist eines der am häufigsten verwendeten Agenzien gegen *Candida*-Infektionen. Allerdings ist weltweit eine zunehmende Resistenz von „nicht-*albicans*“ *Candida*-Arten gegen Azole zu verzeichnen (Bassetti *et al.*, 2006; Pfaller *et al.*, 2005). Voriconazol stellt dabei eine neue Option zur intravenösen Therapie von Kandidosen dar.

Itraconazol und Posaconazol haben sich als effektiv bei der Behandlung oropharyngaler Kandidosen erwiesen (Vazquez *et al.*, 2006; Wilcox *et al.*, 1997).

Echinocandine: Echinocandine sind eine neue Klasse parenteraler Antimykotika. Sie wirken durch Hemmung der Synthese von β -(1,3)-D-Glukan der pilzlichen Zellwand. Alle drei verfügbaren Echinocandine (Anidulafungin, Caspofungin und Micafungin) zeigen fungistatische Wirkung gegen die meisten *Candida*-Arten, einschließlich Azol-resistenter Arten. Sie sind sehr effektiv und dabei nur gering toxisch (Pfaller and Diekema, 2007).

Die Problematik bei der Entwicklung neuer Antimykotika besteht einerseits in der zunehmenden Selektion resistenter Pilzstämme durch die verbreitete Anwendung von Antimykotika in der Medizin und der Landwirtschaft. Resistenzmechanismen von Pilzen sind: eine verringerte Aufnahme von Antimykotika durch eine Veränderung der Zellwand, verstärkter Export der entsprechenden Substanzen aus der Zelle durch Überexpression von Transportproteinen, sowie die Mutation oder Überexpression der Zielstruktur der Antimykotika (Akins, 2005; de Micheli *et al.*, 2002). Auf der anderen Seite besteht eine große Ähnlichkeit zwischen dem Zellaufbau und zellulären Prozessen von *C. albicans* und dem Menschen, die beide zur Gruppe der Eukaryonten gehören. Durch übereinstimmende Zielstrukturen von Antimykotika in beiden Organismen kann es so zu unerwünschten Nebenwirkungen kommen. Die Herausforderung besteht daher in der Identifikation essentieller pilzspezifischer Angriffspunkte für neue Therapeutika. Dabei wäre es von Vorteil, wenn die entsprechenden Antimykotika nicht notwendigerweise eine fungizide Wirkung haben, sondern den Pilz in seiner avirulenten und kommensalen Form blockieren, da sonst ein Selektionsdruck ausgeübt wird, der wiederum die Resistenzbildung fördert.

2 *Candida albicans* – Biologie

C. albicans wurde wissenschaftlich erstmals 1839 beschrieben (Langenbeck, 1839). Zwischen 1841 und 1844 wurde der Pilz in drei unabhängigen Arbeiten als Ursache von Mundsoor bei Neugeborenen beschrieben. Diese Erkrankung ist schon seit über 2000 Jahren bekannt und wurde schon von Hippokrates (460 – ca. 370 a. C.) erwähnt. Es handelt sich dabei um eine Infektion der Mundschleimhaut durch *C. albicans*, wobei sich Filamente des Pilzes zwischen den Epithelzellen ausbreiten (Barnett, 2008). Erste Zeichnungen von *C. albicans* und der verschiedenen Zellformen, die der Pilz ausbilden kann, wurden nebst einer detaillierten Beschreibung des Organismus, der damals als *Oidium albicans* bezeichnet wurde, 1853 von Charles-Philippe Robin veröffentlicht (Robin, 1853; Abb. 1).

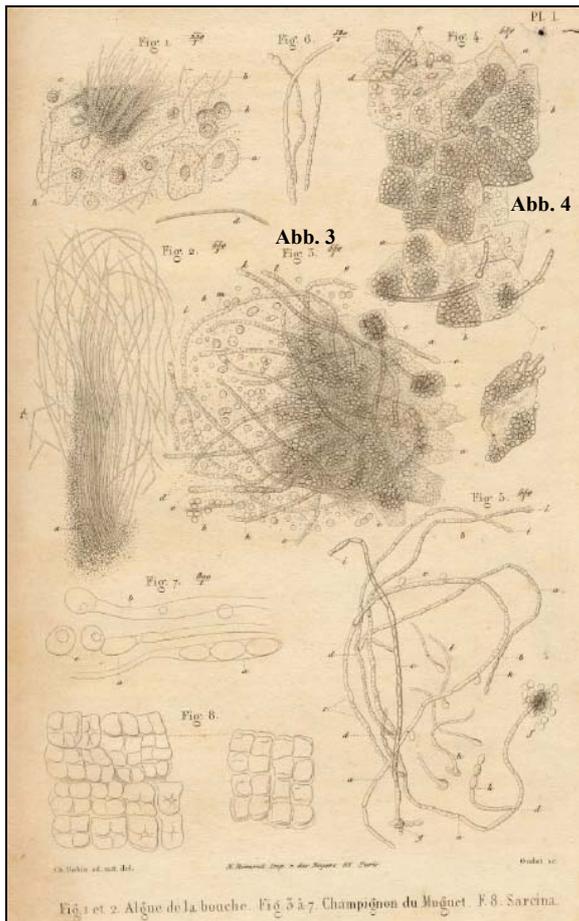


Abb. 1. Die erste veröffentlichte Zeichnung von *Candida (Oidium) albicans*-Zellformen (Charles-Philippe Robin, 1853). Abb. 3 und 4 zeigen von *C. albicans* infizierte Bereiche des Epithels des Mundschleimhaut; Abbildung aus (Barnett, 2008).

Candida albicans findet sich im Gegensatz zur Mehrheit der Pilze, die auch andere menschliche Krankheitserreger einschließt, gewöhnlich nicht in der Umwelt, wie im Boden oder sich zersetzendem organischem Material. Stattdessen vermehrt sich der Pilz hauptsächlich als Kommensale zahlreicher warmblütiger Tiere (Calderone, 2002; Odds, 1988). Sein Hauptreservoir sind dabei der gastro-intestinale sowie der uro-genitale Trakt (Kirsch *et al.*, 1990; Odds, 1988). *C. albicans* ist fakultativ anaerob und C-heterotroph.

Taxonomisch wird *Candida albicans* anhand vergleichender Sequenzuntersuchungen, wie dem Vergleich von rDNA-Sequenzen, dem Stamm der *Ascomyceten* (Schlauchpilze) und dort der Ordnung *Saccharomycetales* zugerechnet, derselben Ordnung, der auch *Saccharomyces cerevisiae* angehört (Petersen *et al.*, 2000).

C. albicans besitzt ein diploides Genom aus acht Chromosomenpaaren. Mit einer haploiden Genomgröße von etwa 14,3 Megabasen, die 6197 potenzielle offene Leserahmen von 100 Aminosäuren Länge oder mehr beinhalten, ist das Genom etwas größer als das von *Saccharomyces cerevisiae* (<http://candidagenome.org>). Die beiden Organismen sind nah verwandt und teilen über 60% orthologe Gene (Rossignol *et al.*, 2008). Es wird angenommen, dass sich ihre Entwicklung aus einem gemeinsamen Vorgänger vor etwa 235 Millionen Jahren getrennt hat (Taylor and Berbee, 2006).

Populationsgenetische Studien, die vor allem mit klinischen Isolaten von *C. albicans* durchgeführt wurden, identifizierten 5 Hauptkladen, die die Hauptzahl der getesteten Isolate umfassen (Odds *et al.*, 2007; Soll and Pujol, 2003). Das klinische Isolat SC5314, welches auch in dieser Arbeit für molekulargenetische und biochemische Studien verwendet wurde, fällt dabei in die erste Klade, der größten Gruppe miteinander verwandter Stämme. Der Hauptanteil experimenteller Grundlagenforschung basiert auf Stämmen aus dieser Gruppe und das Genom von SC5314 war das erste Genom eines humanpathogenen Pilzes, welches sequenziert wurde (Jones *et al.*, 2004; Braun *et al.*, 2005; verfügbar unter <http://candidagenome.org>).

Die Vermehrung von *C. albicans* erfolgt unter den meisten Bedingungen asexuell (Pujol *et al.*, 1993), dabei zeigt *C. albicans* als diploider Organismus jedoch ein hohes Maß an Heterozygotität (Poulter, 1987). Populationsgenetische Studien klinischer Isolate zeigen, dass die Vermehrung von *C. albicans* im Wirt hauptsächlich klonal erfolgt, mit nur wenigen Hinweisen auf genetische Rekombination zwischen verschiedenen Stämmen (Anderson *et al.*, 2001; Graser *et al.*, 1996; Tavanti *et al.*, 2005). Es kann aber gelegentlich zur Rekombination zwischen DNA-Haplotypen (Odds *et al.*, 2007), mitotischen Crossing-over (Poulter, 1987) und Ploidieveränderungen aufgrund von Chromosomenverlust oder –umbildung kommen (Selmecki *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2005). Neuere Untersuchungen liefern jedoch Hinweise für häufige Rekombination zwischen klinischen Isolaten (Odds *et al.*, 2007).

Paarung in C. albicans

C. albicans galt lange als asexuelle Hefe, welche nur als oligat diploider Organismus existieren kann und wurde daher den *Fungi imperfecti* zugeordnet. Mittlerweile ist allerdings ein effizienter Paarungsmechanismus in *C. albicans* beschrieben worden. Bei diesem können diploide Zellen unterschiedlichen Paarungstyps miteinander paaren, wobei tetraploide Stämme entstehen (Hull *et al.*, 2000; Magee and Magee, 2000). Eine Paarung erfolgt bei *C. albicans* sowohl unter Laborbedingungen wie auch in der natürlichen Umgebung des Organismus, den verschiedenen Nischen des Säugetierwirtes (Dumitru *et al.*, 2007; Hull *et al.*, 2000; Lachke *et al.*, 2003; Magee and Magee, 2000). *C. albicans* verfügt über einen singulären Paarungs-Lokus, mit großen Homologien zu demjenigen von *S. cerevisiae*, welcher in Form zweier Allele existiert (*MTLa* und *MTLa*, für *mating type like*) (Hull and Johnson, 1999). Der Paarungsmechanismus von *C. albicans* unterscheidet sich von demjenigen anderer Pilze durch einen dafür erforderlichen epigenetischen Wechsel der Zellform. Bei diesem wechseln die normalerweise vorherrschenden weißen (*white*) Zellen zur Paarungs-kompetenten *opaque*-Zellform (Miller and Johnson, 2002; Slutsky *et al.*, 1987). Diese ungewöhnliche Regulation der Paarung ist neben *C. albicans* bisher nur für die nah verwandte Hefe *Candida dubliniensis* beschrieben worden (Pujol *et al.*, 2004). Beide Zellformen werden über viele Generationen

stabil weitervererbt wobei der Wechsel zwischen beiden zufällig und selten geschieht, etwa mit einer Häufigkeit eines Wechsels bei 10^4 Zellteilungen (Rikkerink *et al.*, 1988).

Der *MTL*-Lokus bestimmt den Paarungstyp (*MTLa* oder *MTL α* bzw. kurz *a* oder α) und steuert die sexuelle Vermehrung. Er kodiert für zwei Homeodomänproteine ($\alpha 1$ und $\alpha 2$), die in Zellen des Paarungstyps *a*/ α - den die meisten klinischen Isolate von *C. albicans* aufweisen - wahrscheinlich als Heterodimer den Transkriptionsfaktor *WOR1* reprimieren, welcher der hauptsächliche positive Regulator der *opaque*-Form ist. Auf diese Weise wird der Wechsel von der physiologischen *white*- zur Paarungs-kompetenten *opaque*-Zellform blockiert (Huang *et al.*, 2006; Miller and Johnson, 2002; Srikantha *et al.*, 2006; Zordan *et al.*, 2006). Nur Zellen, die homozygot für den *MTL*-Lokus sind, können aufgrund der fehlenden Repression von *WOR1* zur *opaque*-Zellform wechseln. Die stabile Aufrechterhaltung des *opaque*-Status wird, einmal induziert, durch ein Netzwerk positiver Feedback-Schleifen, welche in der Aktivierung von *WOR1* resultieren, auf Transkriptionsebene für viele Generationen aufrecht-erhalten (Zordan *et al.*, 2007).

Opaque-Zellen unterscheiden sich von den weißen Blastosporen deutlich in Größe, Form und Farbe. Dabei weisen *opaque*-Zellen etwa die drei-fache Größe von *white*-Zellen auf und sind leicht gebogen. Kolonien dieser Zellen sind auf Festmedium größer und flacher als diejenigen von *white*-Zellen und erscheinen in ihrer Farbe eher grau (Slutsky *et al.*, 1987) (Abb. 2). Ferner unterscheiden sich *opaque*-Zellen von weißen Zellen in ihrer Wechselwirkung mit dem Wirt, wobei sie geeigneter für Infektionen der Haut und weiße Zellen besser geeignet für Infektionen des Blutstroms erscheinen (Kvaal *et al.*, 1999; Kvaal *et al.*, 1997).

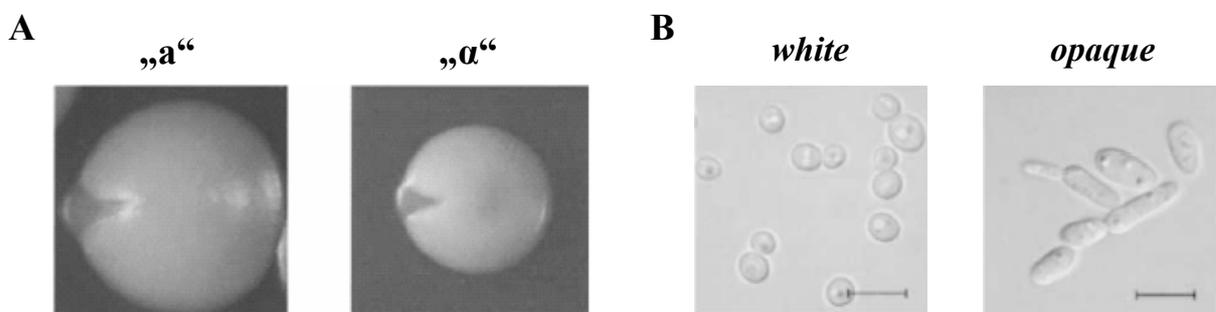


Abb. 2. White- und opaque-Zellen von *C. albicans*. **A.** Sektoren von *opaque*-Zellen in Kolonien weißer Blastosporen der Paarungstypen *a* und α des *C. albicans*-Stammes CA14. **B.** DIC-Mikroskopie von *white*- und *opaque*-Zellen nach Kultivierung von Zellen der betreffenden Sektoren des Paarungstyps *a* auf SC-Medium bei 25°C; Maßstabsbalken: 10 μ m; Abbildung aus (Miller and Johnson, 2002).

Der Paarungsvorgang wird bei *C. albicans* vergleichbar mit *S. cerevisiae* durch eine von Paarungshormonen induzierte Signalkaskade gesteuert. Beide Organismen nutzen dabei einen konservierten MAP-Kinase-Signalweg (Chen *et al.*, 2002a; Magee *et al.*, 2002). Zellen der beiden Paarungstypen (*a* oder α) sezernieren Paarungs-Pheromone, die durch Bindung an entsprechende Rezeptoren auf die Zellen entgegengesetzten Paarungstyps wirken. Die Pheromone induzieren bei potenziellen Paarungspartnern morphologische und physiologische Veränderungen sowie Änderungen des Zellzyklus und bereiten diese so auf die Zell- und die anschließenden Kernfusion vor (Bardwell, 2005). Bei den Pheromonen handelt es sich um

sezernierte Peptide bzw. Lipopeptide. In *S. cerevisiae* produzieren Zellen der beiden Paarungstypen *MAT α* und *MATa* strukturell unterschiedliche Pheromone. *MAT α* -Zellen sezernieren einfache Peptide, während *MATa*-Zellen ein prenyliertes Peptidpheromon produzieren, welches einen Farnesylrest am C-Terminus trägt (Caldwell *et al.*, 1995; Naider and Becker, 2004). *C. albicans* verfügt ebenfalls über zwei Gene, die für α - bzw. α -Pheromone kodieren (*MFA1* bzw. *MFA1*). Dabei kodieren beide Gene Vorläuferproteine, die wahrscheinlich auf eine ähnliche Weise wie in *S. cerevisiae* – zu den reifen Peptidhormonen prozessiert werden. Bei α -Pheromon handelt es sich ebenfalls um einfache Peptide von 13 bzw. 14 Aminosäuren Länge, die Struktur von α -Pheromon wurde als prenyliertes Peptid von 14 Aminosäuren Länge vorhergesagt (Bennett *et al.*, 2003; Dignard *et al.*, 2007; Lockhart *et al.*, 2003b; Panwar *et al.*, 2003). Die von den *opaque*-Zellen der beiden Paarungstypen produzierten Pheromone induzieren bei *opaque*-Zellen des entgegengesetzten Paarungstyps polarisiertes Wachstum von Paarungsfortsätzen (*mating projections*) in Mixturen beider Zelltypen (Lockhart *et al.*, 2003a). Dieser Effekt konnte ebenfalls für ein dem reifen Pheromon entsprechendes synthetisches α -Pheromon nach Zugabe zu Kulturen von α -Zellen, sowie indirekt für α -Pheromon bei α -Zellen gezeigt werden (Bennett *et al.*, 2003; Lockhart *et al.*, 2003a; Yi *et al.*, 2008).

Im Laufe der Paarung kommt es nach chemotropischer Annäherung und Verschmelzung der Paarungsfortsätze zur Zellfusion von Zellen entgegengesetzten Paarungstyps und nach Bildung der Zygote zur Karyogamie, wodurch tetraploide Zellen des Paarungstyps a/α entstehen (Bennett *et al.*, 2005; Lockhart *et al.*, 2003a) (Abb. 3).



Abb. 3. Ausbildung von Paarungsstrukturen und Zellfusion bei *opaque*-Zellen von *C. albicans*.

A. Paarungsstrukturen in Mischkulturen von Zellen der Paarungstypen *MTLa* und *MTLa*. **B.** Paarungsstrukturen nach Zugabe von α -Pheromon zu Zellen des Paarungstyps *MTLa*. **C.** Paarungsstrukturen bei Zellen des Paarungstyps *MTLa* durch indirekt zugeführtes α -Pheromon (sog. *transwell assay*). **D.** Zellfusion von Zellen der Paarungstypen *MTLa* und *MTLa* (Färbung mit Calcofluor White); Abbildungen aus (Lockhart *et al.*, 2003a) (**A, D**) und (Yi *et al.*, 2008) (**B, C**).

Ein Meiose-ähnlicher Vorgang bei der Reduktion der Chromosomenzahl ist bei *C. albicans* trotz des Vorhandenseins verschiedener Gene, die in verwandten Pilzarten spezifisch an der Meiose beteiligt sind, allerdings noch nicht beschrieben worden (Tzung *et al.*, 2001). Die tetraploiden Stämme können auf zufällige aber geordnete Weise Chromosomen verlieren, wodurch der diploide Status wiederhergestellt und der parasexuelle Zyklus vollendet wird. Dabei entstehen Nachkommen mit rekombinierter Zusammensetzung der Chromosomen sowie Rekombinationen zwischen homologen Chromosomen (Bennett and Johnson, 2003; Forche *et al.*, 2008; Hull *et al.*, 2000; Magee and Magee, 2000) (Abb. 4).

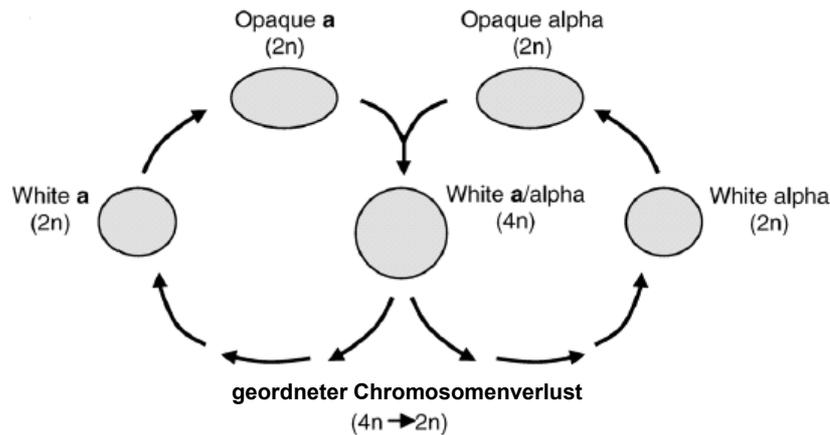


Abb. 4. Der parasexuelle Paarungszyklus von *C. albicans*. Weiße Zellen der Paarungstypen a und α müssen einen Wechsel des Phänotyps zu *opaque*-Zellen vollziehen, um miteinander paaren zu können. Bei der Paarung entsteht eine tetraploide Zelle des Paarungstyps a/ α . Der diploide Status kann durch einen zufälligen, jedoch geordneten Chromosomenverlust wieder hergestellt werden; Abbildung aus (Forche *et al.*, 2008).

Ein parasexueller Zyklus könnte für *C. albicans*, der normalerweise als Kommensale warmblütiger Säugetiere auftritt, zwei große Vorteile gegenüber einer konventionellen sexuellen Vermehrung haben: zum einen ist der parasexuelle Fortpflanzungsmechanismus unpräzise, wobei Nachkommen mit großen Variationen des Karyotyps entstehen. Dies führt auch zur Entstehung aneuploider Stämme, bei denen das Vorhandensein von drei Chromosomen größere genetische und damit phänotypische Diversität bewirkt. Dies kann z.B. zu einer verstärkten Resistenz gegen Antimykotika beitragen (Perepnikhatka *et al.*, 1999; Selmecki *et al.*, 2006). Ein weiterer Vorteil des parasexuellen Zyklus könnte in der Umgehung der Sporulation, die normalerweise bei der sexuellen Vermehrung von Ascomyceten auftritt, bestehen. Da Sporen sehr starke Antigene sind, könnte das Vermeiden der Sporenbildung die Entstehung genetischer Diversität erleichtern, ohne das Überleben von *C. albicans* in seinem natürlichen Lebensraum zu gefährden (Nielsen and Heitman, 2007; Forche *et al.*, 2008).

Morphogenese

Organismen aus der Gruppe der Pilze wachsen v.a. auf zwei Arten: durch hyphales Wachstum, bei dem durch kontinuierliches Spitzenwachstum eine lang gestreckte Zellröhre entsteht, in welcher einzelne Zellen im Allgemeinen durch Septen begrenzt sind. Dem gegenüber steht das hefeförmige Wachstum, bei dem diskrete Zellen Tochterzellen ausbilden, die sich typischerweise von der Mutterzelle trennen. Die meisten Pilze wachsen hyphal. Auch unsere Speisepilze bestehen aus Ansammlungen filamentöser Hyphen. Hefewachstum kommt in der Natur seltener vor, tritt aber bei ökonomisch bedeutenden und daher wissenschaftlich gut untersuchten Organismen wie z.B. *Saccharomyces cerevisiae* auf.

Einige Pilze sind jedoch nicht auf eine bestimmte Wachstumsart beschränkt, wie z.B. die obligat hyphalen *Aspergillus nidulans* oder *Neurospora crassa*, sondern können abhängig von

den herrschenden Umweltbedingungen sowohl hefe- als auch hyphenförmig wachsen. Diese Pilze nennt man dimorph. *C. albicans* zählt als Krankheitserreger des Menschen zu den am besten untersuchten Organismen dieser Gruppe. Seine Fähigkeit, sehr rasch reversibel von einzelligem zu hyphalem Wachstum zu wechseln, ist charakteristisch. Dieser Vorgang wird auch als Morphogenese bezeichnet. Da *C. albicans* eine Reihe verschiedener Zellformen annehmen kann, die spezifische zelluläre Funktionen erfüllen, trifft auf diesen Pilz allerdings eher der Begriff pleomorph anstelle von dimorph zu (Cutler, 1991). Zu diesen unterschiedlichen Zellformen gehören neben echten Hyphen auch Pseudohyphen, die in Zellkultur und Infektionen häufig mit Hefen und Hyphen ko-existieren, sich aber fundamental von diesen unterscheiden (Sudbery *et al.*, 2004). Hefeförmige Zellen, die einen Durchmesser von etwa 4 - 6 μm besitzen, können zur Bildung echter Hyphen angeregt werden, wobei sich zunächst Keimschläuche entwickeln, die sich durch apikales Wachstum mit anschließender Septenbildung verlängern. Die Septen trennen dabei die einzelnen Zellkerne voneinander. Pseudohyphen wachsen dagegen durch unipolare Sprossung, bei denen sich Tochterzellen zu langgestreckten Zellen entwickeln, die mit der Mutterzelle verbunden bleiben. Weitere morphologische Formen von *C. albicans* sind die bereits beschriebene *opaque*-Form, die charakteristisch für Paarungs-kompetente Zellen ist, sowie die Chlamydospore, eine dickwandige Zellform, die unter ungünstigen Wachstumsbedingungen gebildet wird. Bei Infektionen des Menschen dominieren die hefe- und hyphenförmigen Wachstumsformen (Abb. 5; (Ernst, 2000a)).

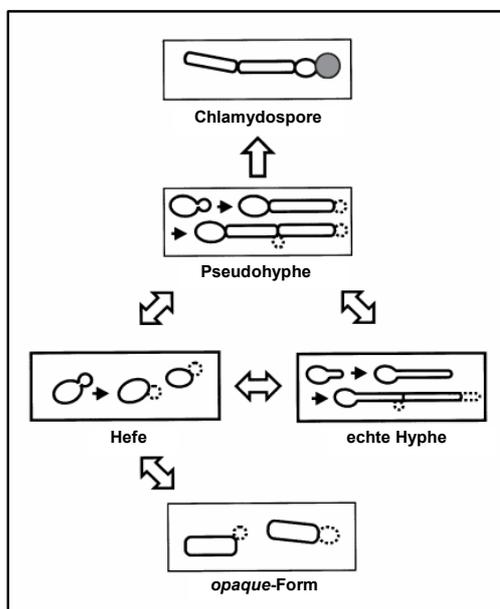


Abb. 5. Morphologische Formen von *Candida albicans*.
Abbildung verändert nach (Ernst, 2000a).

Unter Laborbedingungen lassen sich die unterschiedlichen Morphologien durch eine geeignete Wahl der Wachstumsbedingungen induzieren. Viele dieser Bedingungen entsprechen den Bedingungen, wie sie im Wirtsgewebe von Säugetieren gegeben sind. Während das hefeförmige Wachstum bei 30°C in Vollmedium vorherrschend ist, lässt sich hyphales Wachstum schon durch eine Erhöhung der Temperatur auf 37°C, die der

Körpertemperatur des Menschen entspricht, induzieren. Weitere Induktoren von Hyphenwachstum sind v.a. Serum in einer Konzentration von 5-20%, sowie N-Acetylglukosamin, Prolin, Stickstoffmangel und bestimmte menschliche Hormone (Bramley *et al.*, 1991; Cassone *et al.*, 1985; Caticha *et al.*, 1992; Kinsman *et al.*, 1988; Land *et al.*, 1975; Liu *et al.*, 1994; Odds, 1988). Der extrazelluläre pH-Wert spielt ebenfalls eine Rolle bei der Induktion der Morphogenese. So fördert ein neutraler pH-Wert von etwa 6,5 das hyphale Wachstum, während ein pH-Wert kleiner 6,5 dieses blockiert und die Zellen nur in der Hefeform wachsen (Buffo *et al.*, 1984). Diese Induktoren haben bei *S. cerevisiae* keinen Effekt auf die Morphogenese, mit Ausnahme des Stickstoffmangels, der bei *S. cerevisiae* im Gegensatz zu *C. albicans* pseudohyphales Wachstum auslöst (Gimeno *et al.*, 1992).

Regulation der Morphogenese

Signalwege, die die Morphogenese von *C. albicans* regulieren, konnten über die Identifizierung homologer Proteine in *S. cerevisiae*, die dort die Bildung von Pseudohyphen regulieren, identifiziert werden. Obwohl zahlreiche Proteine beschrieben wurden, die an der Regulation der Morphogenese in *C. albicans* beteiligt sind, sind funktionelle Zusammenhänge nur für zwei Signalwege bekannt (zusammengefasst in: Berman, 2006; Biswas *et al.*, 2007; Liu, 2001; Abb. 6).

Bei dem ersten dieser Signalwege handelt es sich um einen MAP-Kinase-Signalweg (*mitogen activated protein kinase*). MAP-Kinasen sind bei Eukaryonten konserviert und ermöglichen die Anpassung an sich verändernde Umweltbedingungen durch die Vermittlung externer Signale an die Transkriptionsmaschinerie. Sie bestehen in ihrem Kern aus einem Modul dreier Kinasen, die sich als Folge eines stimulierenden Signals in einer Phosphorylierungskaskade nacheinander aktivieren. Die letzte der MAP-Kinasen (MAPK) vermittelt das Signal in der Regel an Transkriptionsfaktoren, die eine spezifische adaptive Antwort erzeugen. MAP-Kinase-Signalwege sind in *S. cerevisiae* an mindestens fünf verschiedenen Prozessen beteiligt. Dazu gehören die Adaptation an Stress (HOG-Signalweg), die Paarung, vegetatives und invasives Wachstum (STE- (*sterile*), Invasions- und SVG- (*sterile vegetative growth*) Signalweg) und die Zellintegrität (PKC1-vermittelter Signalweg) (Alonso-Monge *et al.*, 2009; Monge *et al.*, 2006; Roman *et al.*, 2007). Dabei unterscheiden sich die Signalwege in der Identität der jeweils aktivierten MAP-Kinasen. Bei der Regulation des vegetativen und invasiven Wachstums (der Pseudohyphenbildung) und der Pheromonantwort handelt es sich dabei um die p21-aktivierte Kinase (PAK) Ste20p (*C. albicans*-Homolog: Cst20p) sowie die Kinasen Ste11p (Hst11p), Ste7p (Hst7p) und Kss1p (Cek1p) (Kohler and Fink, 1996; Leberer *et al.*, 1996; Csank *et al.*, 1998). Die Signalkaskade mündet in dem Transkriptionsfaktor Ste12p (Cph1p), der durch die MAP-Kinase Kss1p (Cek1p) aktiviert wird (Liu *et al.*, 1994) und die verschiedenen Prozesse kontrolliert. Bei der Paarung haploider Zellen induziert Ste12p die Expression Pheromon-induzierter Gene durch kooperative Bindung – entweder als Homodimer oder als Heterodimer mit dem Transkriptionsfaktor Mcm1p - an mind. zwei

Bindungsstellen, sog. *pheromone responsive elements* (PRE), in den Promotoren der entsprechenden Zielgene (Dolan *et al.*, 1989; Errede and Ammerer, 1989; Hagen *et al.*, 1991). Bei der Induktion von Pseudohyphen in diploiden Zellen und invasiven Wachstums in haploiden Zellen bindet Ste12p zusammen mit dem Transkriptionsfaktor Tec1p an die sog. FRE-Elemente (*filamentation and invasion response elements*), die sich aus einem PRE und einer Tec1p-Bindestelle zusammensetzen (Madhani and Fink, 1997). Die Elemente dieses Signalweges in *C. albicans* (die Kinasen Cst20p, Hst11p, Hst7p und Cek1p) konnten mit Hilfe von Epistasie-Experimenten identifiziert werden (Kohler and Fink, 1996; Leberer *et al.*, 1996; Liu *et al.*, 1994; Malathi *et al.*, 1994). Die Proteinphosphatase Cpp1p dient als negativer Regulator dieser Kaskade (Brown and Gow, 1999; Csank *et al.*, 1997).

Der Cek1p-Signalweg ist in *C. albicans* an mindestens drei Prozessen beteiligt: Der Regulation filamentösen Wachstums, der Paarung, sowie möglicherweise der Kontrolle des Zellwandaufbaus unter basalen Bedingungen (Chen *et al.*, 2002a; Csank *et al.*, 1998; Kohler and Fink, 1996; Leberer *et al.*, 1996; Magee *et al.*, 2002; Roman *et al.*, 2005). Trotz der großen Übereinstimmung in den Elementen des Cek1p-MAP-Kinase-Signalwegs in *C. albicans* und *S. cerevisiae* spielen sie bei der Regulation filamentösen Wachstums eine unterschiedliche Rolle. So führt eine Deletion der Komponenten dieses Signalweges in *C. albicans* nur zu geringen Defekten bei der Hyphenbildung, während dies bei *S. cerevisiae* zu einer nahezu vollständigen Hemmung der Pseudohyphenbildung führt (Kohler and Fink, 1996; Leberer *et al.*, 1996; Lo *et al.*, 1997). Die Filamentierungsdefekte treten in *C. albicans* nur unter bestimmten Induktionsbedingungen auf (Stickstoffmangel auf Festmedium). Die durch Serum induzierte Hyphenbildung ist dabei nicht betroffen (Liu *et al.*, 1994). Allerdings zeigen derart veränderte *C. albicans*-Stämme eine verringerte Virulenz (Csank *et al.*, 1998). Ferner wird der Transkriptionsfaktor Tec1p in *C. albicans* im Gegensatz zu *S. cerevisiae* nicht von dem Ste12p-Homolog Cph1p reguliert (Leberer *et al.*, 1996), sondern von den basischen Helix-Loop-Helix-Proteinen Efg1p und Cph2p (Lane *et al.*, 2001a). Tec1p gehört zur Klasse der TEA/ATTS-Transkriptionsfaktoren und ist in *C. albicans* ebenfalls an der Regulation der Hyphenbildung und Virulenz beteiligt (Schweizer *et al.*, 2000).

Der zweite Signalweg, der pseudohyphales Wachstum in *S. cerevisiae* reguliert, ist ein in Abhängigkeit des intrazellulären cAMP-Spiegels aktivierter Proteinkinase A- (PKA-) Signalweg. Die isoformen katalytischen Untereinheiten der Proteinkinase A, Tpk1p, Tpk2p und Tpk3p, werden durch einen erhöhten cAMP-Spiegel in der Zelle aktiviert. cAMP bindet dabei an die regulatorische Untereinheit Bcy1p, die darauf hin von der katalytischen Untereinheit dissoziiert (Pan and Heitman, 1999). Die so aktivierten Proteinkinase-Isoformen regulieren die an der Pseudohyphenbildung beteiligten Transkriptionsfaktoren Sok2p, Phd1p und Sfl1p (Gimeno and Fink, 1994; Robertson and Fink, 1998; Ward *et al.*, 1995). *C. albicans* besitzt nur zwei Isoformen der Proteinkinase A, Tpk1p und Tpk2p, die unterschiedliche Funktionen wahrnehmen. So reguliert Tpk1p die Hyphenbildung auf Festmedium, Tpk2 aber die Hyphenbildung in Flüssigmedium (Bockmuhl *et al.*, 2001; Cassola *et al.*, 2004; Sonneborn *et al.*, 2000). Beide Proteinkinasen regulieren in *C. albicans* die Aktivität des Transkriptionsfaktors Efg1p, dem Homolog von Phd1p in *S. cerevisiae*

(Stoldt *et al.*, 1997). Efg1p besitzt eine konservierte DNA-Bindedomäne mit einer vorausgesagten basischen Helix-Loop-Helix-Struktur (Dutton *et al.*, 1997; Stoldt *et al.*, 1997). Efg1p gehört zur Familie der APSES-Transkriptionsfaktoren, die morphogenetische Prozesse in Ascomyceten regulieren, i.d.R. den reversiblen Übergang zwischen einer sphärischen und einer filamentösen Zellform. APSES-Proteine binden als Dimere an die DNA und regulieren so die Genexpression (Stoldt *et al.*, 1997). Weitere Mitglieder dieser Familie sind Phd1p und Sok2p in *S. cerevisiae* (Gimeno and Fink, 1994; Ward *et al.*, 1995), Asm1p, das die Reifung von Ascosporen in *Neurospora crassa* stimuliert (Aramayo *et al.*, 1996), sowie StuA, das die Konidiophorenbildung in *Aspergillus nidulans* reguliert (Miller *et al.*, 1992). Ein weiteres Mitglied dieser Familie in *C. albicans* ist Efh1p, ein transkriptioneller Aktivator, der an der Regulation der von Efg1p regulierten Prozesse beteiligt ist (Doedt *et al.*, 2004) (Abb. 6)

Efg1p ist ein zentraler Regulator zahlreicher zellulärer Prozesse in *C. albicans*. In Bezug auf die Regulation des Dimorphismus ist Efg1p für die Bildung echter Hyphen, die Ausbildung von Chlamydosporen sowie die Aufrechterhaltung der *white*-Zellform im Zusammenhang mit dem Wuchsformwechsel zwischen den Paarungs-kompetenten *opaque*-Zellen und der vegetativen *white*-Form erforderlich (Lo *et al.*, 1997; Sonneborn *et al.*, 1999a; Sonneborn *et al.*, 1999b; Stoldt *et al.*, 1997; Zordan *et al.*, 2007).

So kommt Efg1p eine Schlüsselrolle in der Regulation filamentösen Wachstums, wie auch der Virulenz von *C. albicans* zu. Je nach vorherrschenden Umweltbedingungen übernimmt der Transkriptionsfaktor dabei eine positive oder eine negative Funktion bei der Regulation der Morphogenese. So ist Efg1p für die Hyphenbildung unter normalen Induktionsbedingungen wie der Anwesenheit von Serum oder N-Acetylglucosamin im Wachstumsmedium erforderlich (Lo *et al.*, 1997; Stoldt *et al.*, 1997), wohingegen *C. albicans* beim Wachstum in einer Matrix in Abwesenheit von Efg1p hyper-filamentöses Wachstum zeigt (Brown *et al.*, 1999; Riggle *et al.*, 1999; Sonneborn *et al.*, 1999b). Ferner ist Efg1p an der Regulation des Metabolismus beteiligt, wobei unter normaler (Luft-) Sauerstoffkonzentration die Glykolyse induziert und Atmungsketten-Aktivitäten blockiert werden, während unter reduzierten Sauerstoffkonzentrationen, wie sie im menschlichen Körper z.B. im Darm oder innerhalb von Zellen herrschen, andere Gene, wie solche der Stressantwort, spezifisch von Efg1p reguliert werden (Doedt *et al.*, 2004; Setiadi *et al.*, 2006).

In *S. cerevisiae* wird der PKA-Signalweg durch einen G-Protein gekoppelten Rezeptor, Gpr1p, und das G-Protein Gpa2p aktiviert (Kubler *et al.*, 1997; Lorenz and Heitman, 1997). Homologe dieser Proteine gibt es auch in *C. albicans* und die Aktivierung des PKA-Signalwegs erfolgt auch hier über Gpr1p. Die Rolle von Gpa2p ist noch genauer zu definieren, es gibt aber Hinweise, dass Gpa2p sowohl als Aktivator des PKA-Signalweges wie auch als Aktivator des Cek1p-MAP-Kinase-Signalweges fungiert (Maidan *et al.*, 2005; Miwa *et al.*, 2004), sowie ein Teil des Cek1p-MAP-Kinase-Signalweges ist. Dabei fungiert Gpa2p im Komplex mit Gpr1p zum einen als Nährstoff-Sensor, der das filamentöse Wachstum von *C. albicans* reguliert (Sanchez-Martinez and Perez-Martin, 2002), zum

anderen spielt Gpa2p aber auch eine Rolle in der Nährstoff-kontrollierten Pheromonantwort - und somit bei der Paarung - von *C. albicans* (Bennett and Johnson, 2006).

In *C. albicans* werden sowohl der MAP-Kinase- wie auch der Proteinkinase A-Signalweg analog zu *S. cerevisiae* über das kleine G-Protein Ras1p aktiviert (Gimeno *et al.*, 1992; Leberer *et al.*, 2001). Die Vermittlung der Signale erfolgt über die GTPase Cdc42p, die hochaffin an die Kinase Cst20p bindet (Su *et al.*, 2005), bzw. die Adenylatzyklase Cdc35p (Rocha *et al.*, 2001; Ushinsky *et al.*, 2002). Diese moduliert im Zusammenspiel mit der Phosphodiesterase Pde2p, welche für die Hydrolyse von cAMP verantwortlich ist, den intrazellulären cAMP-Spiegel (Jung and Stateva, 2003; Rocha *et al.*, 2001).

Weitere positive Regulatoren der Morphogenese in *C. albicans* sind die Transkriptionsfaktoren Cph2p und Rim101p. Rim101p ist an der Regulation filamentösen Wachstums unter alkalischen pH-Bedingungen – wie sie z.B. im Blutstrom herrschen - beteiligt und für die Ausbildung der vollen Virulenz bei systemischen Infektionen im Mausmodell erforderlich (Davis *et al.*, 2000a). So reguliert Rim101p die pH-abhängige Expression der beiden Zellwandproteine Phr1p und Phr2p, die beide in verschiedenen Wirtsnischen für die Virulenz von *C. albicans* erforderlich sind (De Bernardis *et al.*, 1998; Ghannoum *et al.*, 1995; Davis *et al.*, 2000b; Ramon *et al.*, 1999). Das basische Helix-Loop-Helix-Protein Cph2p ist an der Regulation des Transkriptionsfaktors Tec1p beteiligt, konnte selbst aber noch keinem Signalweg eindeutig zugeordnet werden (Lane *et al.*, 2001b).

Eine negative Regulation des Dimorphismus erfolgt über den generellen Repressor Tup1p, der über die DNA-bindenden Proteine Nrg1p, Mig1p oder Rfg1p an die DNA rekrutiert wird (Braun and Johnson, 1997; Braun *et al.*, 2001; Murad *et al.*, 2001a; Murad *et al.*, 2001b; Zaragoza *et al.*, 2000). Diese verhindern zusammen mit dem Ko-Repressor Tup1p die Expression Hyphen-spezifischer Gene während des Hefewachstums. Die Expression dieser Gene erfolgt während der Induktion filamentösen Wachstums durch die Aufhebung der Repression (Kadosh and Johnson, 2005) (Abb. 6).

Der Proteinkinase A- und der Cek1p-vermittelte MAP-Kinase-Signalweg wirken parallel und tragen gemeinsam zur Hyphenbildung und der Virulenz bei, da eine Deletion der beiden Transkriptionsfaktoren Efg1p und Cph1p zu einem Verlust der Fähigkeit zur Filamentierung *in vitro* führt und derart veränderte *C. albicans*-Stämme im systemischen Infektionsmodell avirulent sind (Lo *et al.*, 1997). Allerdings deuten neuere Erkenntnisse darauf hin, dass auch diese Stämme *in vivo* lokalisierte Infektionen verursachen können (Chen *et al.*, 2006) sowie in einem spezifischen Tiermodell Filamente bilden können (Riggle *et al.*, 1999). Dies deutet auf das Vorhandensein zusätzlicher Signalwege hin, die bei einer Infektion *in vivo* die Filamentierung regulieren.

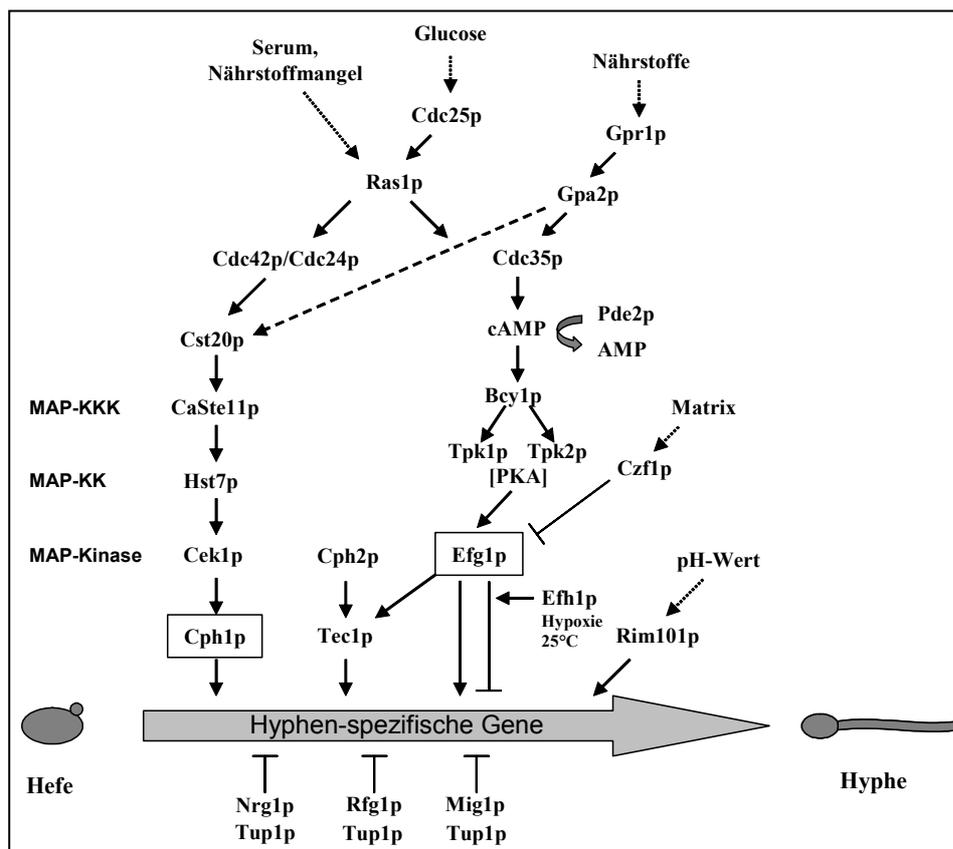


Abb. 6. Regulation der Morphogenese in *C. albicans*. Abbildung nach (Liu, 2001).

Die Zellwand von *C. albicans*

Die Zellwand ist diejenige Komponente des Pilzes, die als erstes mit den Zellen des Wirtes in Kontakt tritt, die wichtige antigene Faktoren trägt, die verantwortlich für die Adhäsionseigenschaften ist und die in Wechselwirkung mit dem Wirt tritt. Die Zellwand ist eine kohärente Struktur kovalent und nicht-kovalent verknüpfter Bestandteile, die die Zelle gegen physikalische, chemische und biologische Eingriffe schützt, sowie der Zelle ihre spezifische Morphologie verleiht. Die Hauptbestandteile der Zellwand von *C. albicans* sind Kohlehydrate (etwa 80-90%). Dazu gehören verzweigte β -1,3- und β -1,6-verknüpfte Glukosepolymere (β -Glukane, 47 - 60%), Chitin (0,6 - 9%), sowie kovalent an die Zellwandproteine gebundene Mannosepolymere (Mannoproteine, 6 - 25%) und ein geringer Anteil Lipide (1 - 7%). Die Mannosepolymere sind entweder durch N-glykosidische Bindungen über Asparagin oder über O-glykosidische, alkali-lösliche Bindungen an Serin- oder Threoninreste mit den Proteinen verknüpft (Chaffin, 2008; Chaffin *et al.*, 1998).

Die Zellwand ist aus verschiedenen Schichten aufgebaut, deren innerste Schicht aus Chitinmikrofibrillen mit kovalent verknüpften β -1,3- und β -1,6-Glukanketten sowie einigen Mannoproteinen besteht. Die β -1,3-Glukanketten bilden ein stabiles dreidimensionales Netzwerk,

das über kurze, verzweigte β -1,6-Glukanketten miteinander und an Chitin geknüpft ist. In der äußeren Oberfläche der Zellwand sind verschiedene Mannoproteine angereichert (Abb. 7).

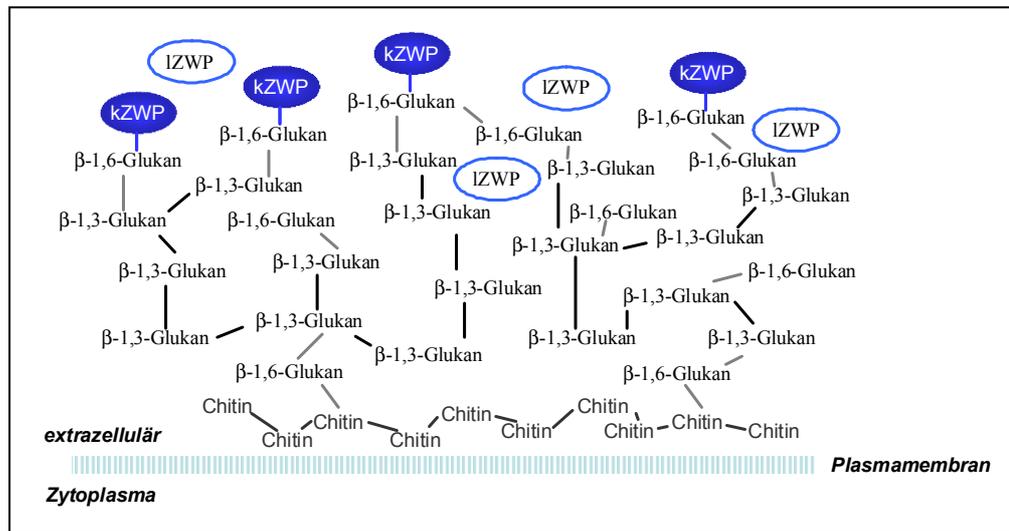


Abb. 7. Zellwand-Aufbau in *C. albicans*. Vereinfachte schematische Übersicht über die Zusammensetzung der Zellwand von *C. albicans*. Anteile der jeweiligen Bestandteile: Chitin - zwischen 0,6 und 9%, β -Glukan gesamt - etwa 47-60%, Mannose und Protein – zwischen 6 und 25%; kZWP: kovalent gebundenes Zellwandprotein, IZWP: lösliches (nicht-kovalent gebundenes) Zellwandprotein; Abb. nach C. Urban, Fraunhofer IGB, Stuttgart.

Regulation des Zellwandaufbaus in *C. albicans*

Die oben beschriebenen Regulationswege der Morphogenese sorgen durch die kontrollierte Expression von Zelloberflächenproteinen für die adäquate Zusammensetzung der Zellwand der verschiedenen morphologischen Formen von *C. albicans*.

Für eine umfassendere Analyse der Rolle der Proteinkinase A- und Cek1p-MAP-Kinase-Signalwege bei der Regulation von Genen für Zelloberflächenproteine, wurde in vorangegangenen Studien die Regulation von 117 potenziellen Zellwandproteinen durch die Transkriptionsfaktoren Efg1p bzw. Cph1p mit Hilfe von DNA-Microarrays auf der transkriptionellen Ebene untersucht (Sohn *et al.*, 2003). Potenzielle Zellwandproteine wurden dabei anhand der oben aufgeführten strukturellen Merkmale ausgewählt. Dabei zeigte sich eine Hauptrolle für Efg1p bei der Induktion und bei der Repression von Zellwandgenen sowohl während des hefe- als auch während des hyphenförmigen Wachstums von *C. albicans*, während Cph1p dabei nur eine untergeordnete Rolle zukommt.

3 Virulenzmechanismen von *Candida albicans*

Als Virulenzfaktoren primärer Krankheitserreger wurden ursprünglich Proteine definiert, die von Genen kodiert werden, die sich auf sog. Pathogenitätsinseln im Genom pathogener enterischer Bakterien befinden. Für *C. albicans*, einen opportunistischen Krankheitserreger,

gibt es mehrere Definitionen für echte Virulenzfaktoren, wie z.B. „alle Eigenschaften, die für die Krankheitserregung erforderlich sind“ (Furman and Ahearn, 1983), oder „Bestandteil eines Pathogens, welcher den Wirt schädigt“ (Casadevall and Pirofski, 2001). Als Humanpathogen dient *Candida albicans* als Modellorganismus für die Untersuchung der Virulenzmechanismen eukaryontischer Pilze.

Die Pathogenese von *C. albicans* ist ein komplexes Zusammenspiel zwischen dem Status des Immunsystems und spezifischen Virulenzfaktoren dieses Mikroorganismus (Calderone, 2002; Calderone and Fonzi, 2001). Als opportunistischer Krankheitserreger verfügt *C. albicans* über eine Reihe von Faktoren, deren Zusammenspiel es ihm ermöglicht, seine Pathogenität bei einem geschwächten Immunsystem des Wirts zu entfalten. Dabei gelingt es solchen Krankheitserregern, dem Immunsystem des Wirtes zu entgehen, in der Wirtsumgebung zu überleben, sich zu vermehren, sowie neue Gewebe zu besiedeln. Im Falle von *C. albicans* ist dessen Eigenschaft, in vielen anatomisch und physiologisch stark unterschiedlichen Nischen des Wirts existieren und wachsen zu können, die Grundlage der vielfältigen klinischen Manifestationen von Infektionen mit diesem Pilz. Zu diesen Wirtsnischen gehören die Haut, der Mundraum und die Speiseröhre, der Gastrointestinal- sowie der Urogenitaltrakt, das Blutgefäßsystem sowie innere Organe. Die Organismen sind dabei nicht nur dem Konkurrenzdruck verschiedener anderer Mikroorganismen, sondern auch sehr unterschiedlichen äußeren Einflüssen wie neutralem pH-Wert, z.B. im Blutstrom, und saurem pH-Wert im Urogenitaltrakt, verschiedenen Temperaturen (Temperaturen auf der Wirtsoberfläche bzw. im Körper des Wirtes) oder der Verfügbarkeit bzw. der Abwesenheit von Sauerstoff ausgesetzt.

3.1 Morphogenese

Schwerwiegende, potenziell tödliche Pilzkrankungen werden in den meisten Fällen durch die aktive Invasion von Wirtsgewebe verursacht. Sowohl systemische als auch oropharyngale Kandidosen sind durch eine Invasion von *C. albicans* in Zellen des Wirtes charakterisiert. Bei oropharyngalen Kandidosen kommt es zur Invasion des oberflächlichen Epithels der Mundschleimhaut. Kandidosen, die sich über den Blutstrom ausbreiten, beginnen mit der Invasion des endothelialen Gewebefilms der Gefäße durch Pilzzellen, die sich im Blutstrom befinden, mit der Folge der Infektion des Tiefengewebes. Dem Dimorphismus, der Fähigkeit, zwischen verschiedenen Morphologien wie hefeförmigem, hyphalem oder pseudohyphalem Wachstum zu wechseln, wird dabei eine wichtige Bedeutung für die Virulenz von *C. albicans* zugeschrieben (Calderone, 2002; Whiteway and Oberholzer, 2004). Die einzellige Hefeform erscheint geeigneter für die Vermehrung im Wirt und der Verbreitung über die Blutbahn (Cutler, 1991). Dagegen spielen sowohl Hefezellen als auch hyphale Zellen eine Rolle bei der Besiedelung von Organen, sowie der Wechselwirkung mit dem Immunsystem des Wirtes (Gow *et al.*, 2002). Der hyphalen Zellform werden dabei zumindest zwei wichtige Funktionen zugeschrieben: zum einen bei der Adhäsion an Wirtsgewebe sowie der anschließenden

mechanischen Durchdringung von Epithelien, zum anderen bei der Zerstörung von Epithel- und Endothelzellen nach Endozytose sowie von Immunzellen des Wirtes nach Phagozytose (z.B. Neutrophile und Makrophagen) (Fradin *et al.*, 2003; Korting *et al.*, 2003; Lo *et al.*, 1997; Rubin-Bejerano *et al.*, 2003; Whiteway and Oberholzer, 2004). Durch Bindung an Zelloberflächenproteine des Wirtes sind Hyphen in der Lage, ihre eigene Endozytose durch Zellen, die normalerweise nicht phagozytotisch sind, zu induzieren (Filler *et al.*, 1995; Phan *et al.*, 2000; Phan *et al.*, 2007) (Abb. 8).

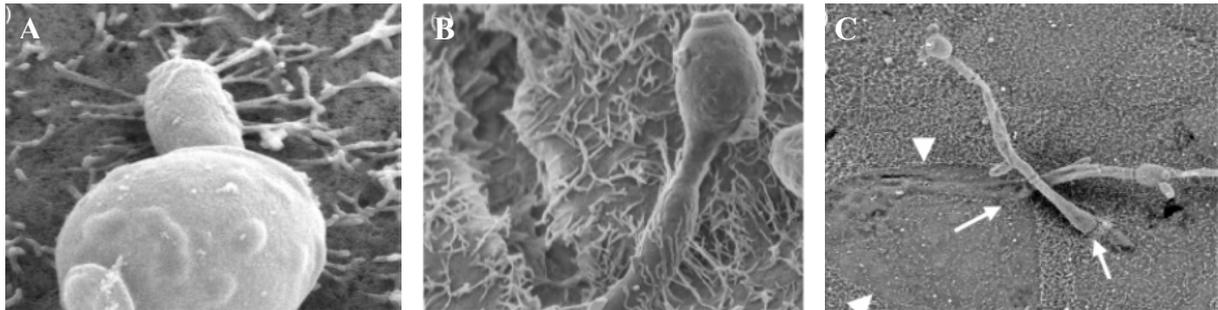


Abb. 8. Adhäsion an und Invasion in humane Epithelzellen durch *C. albicans* *in vitro*.

SEM- (*Scanning Electron Microscopy*-) Bilder *in vitro* infizierter humaner kolorektaler Adenocarcinomzellen (Caco-2) zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion; **A.** *C. albicans*-Blastospore mit beginnender Hyphenbildung nach 30 min (Massstabsbalken: 600 nm); **B.** Hyphenbildung nach 120 min (Massstabsbalken: 2 μ m); **C.** Invasion des Epithelgewebes nach 240 min (Massstabsbalken: 10 μ m); aus: (Sohn *et al.*, 2006))

Daneben gibt es Hinweise, dass auch Hefezellen an der beginnenden Invasion von Wirtsgewebe beteiligt sein können (Pope and Cole, 1982; Ray and Payne, 1988). So verfügen Hefezellen möglicherweise über ein eigenes Repertoire an Virulenzfaktoren, wie z.B. spezifisch sekretierte Aspartylproteasen (Hube and Naglik, 2001).

Die Bedeutung der Morphogenese für die Virulenz bleibt jedoch umstritten. Zwar sind Stämme, die durch die Deletion von Regulatoren des Dimorphismus (wie Efg1p/Cph1p oder Tup1p) in ihrer Fähigkeit zur Morphogenese defekt und entweder in der hefeförmigen oder einer filamentösen Form blockiert sind, in Modellsystemen für invasive Kandidosen weniger virulent (Braun and Johnson, 1997; Lo *et al.*, 1997; Riggle *et al.*, 1999; Rocha *et al.*, 2001; Whiteway and Oberholzer, 2004). Jedoch sind während des Wuchsformwechsels ko-regulierte Faktoren – wie u.a. Adhäsine oder sekretierte Enzyme (Proteasen, Lipasen, s.u.) – entscheidend an der Pathogenität von *C. albicans* beteiligt, ohne selbst einen Einfluss auf die Morphogenese auszuüben (Braun and Johnson, 2000; Braun *et al.*, 2001; Gow *et al.*, 2002; Hube, 1996; Kumamoto and Vines, 2005; Saville *et al.*, 2003; Sundstrom, 2002; Whiteway and Oberholzer, 2004) (Abb. 9).

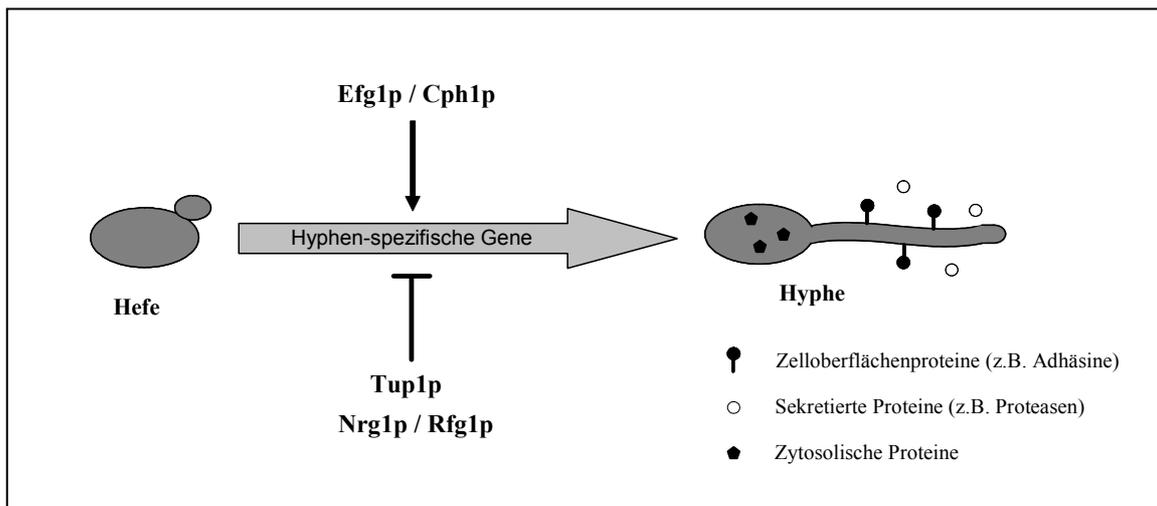


Abb. 9. Expression von Virulenzfaktoren bei der Morphogenese von *Candida albicans*. (adaptiert nach (Kumamoto and Vines, 2005))

Die gleichzeitige Expression von Genen, die die Morphogenese kontrollieren und solchen, die für Virulenzfaktoren kodieren, erschwert die Beurteilung der Bedeutung der Fähigkeit zur Hyphenbildung *per se* bei der Virulenz von *C. albicans* (Gow *et al.*, 2002; Kobayashi and Cutler, 1998; Liu, 2002). Ferner stellen bei den meisten dimorphen Pilzen, die als Krankheitserreger des Menschen auftreten (wie z.B. *Histoplasma capsulatum*, *Penicillium marneffe* oder *Blastomyces dermatitides*), im Gegensatz zu *C. albicans* Hefezellen die invasive Zellform dar, die durch Sprossung in infiziertes Gewebe einwachsen, während der Pilz außerhalb des Wirtes als filamentöse Form existiert (Gow *et al.*, 2002). Daher ist filamentöses Wachstum nicht zwingend mit der Invasion von Gewebe verbunden.

Gene, die sowohl für die Hyphenbildung wie auch für die Virulenz von *C. albicans* erforderlich sind, aber weder die Expression anderer in Hyphen co-regulierter Gene, noch das Wachstum von Hefezellen beeinflussen, würden die Bedeutung der Fähigkeit zur Hyphenbildung für die Virulenz von *C. albicans* unterstreichen. Ein derartiges Gen ist das Hyphen-spezifische Cyclin *HGCI* (Zheng *et al.*, 2004). Deletionsstämme für *HGCI* sind nicht mehr in der Lage, Hyphen zu bilden und zeigen eine stark reduzierte Virulenz im Mausmodell. Dabei ist die Expression einiger Hyphen-spezifischer Virulenzfaktoren unverändert, so dass die geringe Virulenz des Deletionsstammes für eine Bedeutung des Hyphenwachstums an sich bei der Virulenz spricht.

3.2 Sezernierte Proteine

Pathogene Pilze, einschließlich *C. albicans*, sezernieren verschiedene hydrolytische Enzyme wie Proteinasen, Phospholipasen und Lipasen, deren extrazelluläre Aktivität zur Pathogenese von Infektionen beitragen können, indem sie Zellmembranen und extrazelluläre Matrices des Wirtes zerstören und so der Ausbreitung und Gewebeinvasion des Pathogens dienen oder indem sie Makromoleküle des Wirtes als Nahrungsquelle erschließen. *In silico*-Analysen des

Candida albicans-Genoms hinsichtlich der Gesamtheit möglicher sekretierter Proteine - des Sekretoms - resultiert in 283 möglichen sekretierten Proteinen, die sich durch eine N-terminale Signalsequenz, aber nicht durch Transmembrandomänen oder über potenzielle Sequenzen für das anfügen eines Glykosylphosphatidylinositol- (GPI-) Restes (ω -Spaltstelle, der bei Pilzen entweder zur kovalenten Verankerung in der Zellwand oder zur Bindung an die Plasmamembran dient, auszeichnen (Lee *et al.*, 2003). Wie bei anderen Eukaryonten verfügen auch in *C. albicans* Proteine, die in den klassischen Sekretionsweg gelangen sollen, über eine N-terminale, hydrophobe Signalsequenz (Martoglio and Dobberstein, 1998). Obwohl auch einige Proteine ohne Signalsequenz den extrazellulären Bereich erreichen, wird der Hauptteil löslicher sekretierter Protein in *C. albicans* wahrscheinlich über den allgemeinen Sekretionsweg transportiert.

Zu den sekretierten Proteinen, denen eine Rolle bei der Virulenz und Pathogenität von *C. albicans* zugeschrieben wird, gehören:

sekretierte Aspartylproteasen (SAPs): einzelne Mitglieder dieser zehn Gene umfassenden Familie werden in verschiedenen Stämmen und unter verschiedenen Umweltbedingungen differentiell sekretiert (Hube and Naglik, 2001). Die Mehrheit der sekretierten Proteinasen von *C. albicans* gehören bis dato dieser Familie an (Naglik *et al.*, 2004). Ferner wurden sekretierte Serin-, und Metalloproteasen durch entsprechende enzymatische Aktivitäten in Kulturüberständen klinischer Isolate postuliert (dos Santos *et al.*, 2006). Es wird angenommen, dass die verschiedenen Isoenzyme der Aspartylprotease-Familie unterschiedliche Rollen während einer Infektion spielen, so z.B. beim Abbau von Gewebebarrieren zur Erleichterung von Adhäsion und Invasion, dem Abbau von Zellen und Molekülen des Verteidigungssystems des Wirtes oder dem Erschließen von Nahrungsmolekülen (Naglik *et al.*, 2003). Es wurde gezeigt, dass Einzeldelationen von Sap1p-Sap3p, von denen Sap1p und Sap3p in Paarungs-kompetenten *opaque*-Zellen exprimiert sind und Sap2p, welches v.a. in Hefezellen exprimiert wird, sowie induziert ist, wenn Proteine als einzige Stickstoffquelle im Medium vorhanden sind, sowie eine Deletion von Sap4p-Sap6p, welche während des hyphalem Wachstums exprimiert werden, zu einer reduzierten Virulenz von *C. albicans* im systemischen Mausmodell führen (Hube *et al.*, 1997; Sanglard *et al.*, 1997). Im Gegensatz zu den anderen Mitgliedern der Familie werden Sap9p und Sap10p wahrscheinlich nicht sekretiert, sondern sind in der Zellmembran oder -wand verankert, wo sie u. a. eine Rolle bei der Adhäsion an Epithelgewebe spielen (Albrecht *et al.*, 2006).

extrazelluläre Phospholipasen (Ghannoum, 2000; Niewerth and Korting, 2001): *C. albicans* sekretiert eine Reihe von Phospholipasen, wie Lysophospholipase, Transacylase und Phospholipase B (Plb1p), wobei letztere eine Rolle bei der systemischen Infektion im Mausmodell spielt (Leidich *et al.*, 1998). Phospholipasen spielen möglicherweise eine Rolle beim Durchdringen der Zellmembranen des Wirts, sowie bei den Adhäsionseigenschaften von *C. albicans* (Barrett-Bee *et al.*, 1985; Price and Cawson, 1977; Pugh and Cawson, 1977).

sekretierte Lipasen: *C. albicans* verfügt über eine Proteinfamilie von 10 Lipasen (Lip1p-Lip10p), deren Aktivität *C. albicans* die Fähigkeit verleiht, ausschließlich Fette als Kohlenstoffquelle zu nutzen. Einige dieser Gene werden auch bei der systemischen Infektion in Mäusen exprimiert, wobei deren lipolytische Aktivität eine Rolle bei der Virulenz spielen könnte (Hube *et al.*, 2000).

3.3 Zelloberflächenmoleküle

Zelloberflächenproteine verleihen den verschiedenen Zellformen von *C. albicans* spezifische Eigenschaften der Zelloberfläche. Als solche treten sie mit den Zellen des Wirtes in direkten Kontakt, sind verantwortlich für die Adhäsionseigenschaften der Zelloberfläche und in der Lage, die Immunantwort des Wirtes zu modulieren, indem sie mit phagozytierenden Zellen in Kontakt treten oder antigene Eigenschaften aufweisen. Damit sind sie entscheidend an der Pathogenität des Organismus beteiligt (Chaffin, 2008; Chaffin *et al.*, 1998).

Zelloberflächenproteine zeichnen sich wie die sekretierten Proteine strukturell durch ein hydrophobes Sekretionsmotiv aus, sind meist glykosyliert und besitzen weitere spezifische Merkmale, wie interne Sequenzwiederholungen. Proteine, die in der Zellwand oder -membran gebunden werden sollen, verfügen darüber hinaus über C-terminale Sequenzen, die das Anfügen eines Glykosylphosphatidylinositol-Restes (GPI-Anker) zur kovalenten Verankerung an die β -1,6-Glukane in der Zellwand oder zur Bindung an die Plasmamembran vermitteln. Die Glykosylierung von Zelloberflächenproteinen erfolgt entweder durch N-glykosidische Bindungen über Asparagin oder über O-glykosidische, alkali-lösliche Bindungen an Serin- oder Threoninreste durch Mannosepolymere (Chaffin *et al.*, 1998). Anhand dieser Kriterien wurden 104 potenzielle Zellwandproteine in *C. albicans* identifiziert (De Groot *et al.*, 2003). Darüber hinaus wurden durch massenspektrometrische Analysen auch einige nicht-glykosylierte Proteine in der Zellwand von *C. albicans* nachgewiesen (Pitarch *et al.*, 2002; Urban *et al.*, 2003).

Zelloberflächenproteine werden anhand ihrer Bindung an das Zuckergerüst der Zellwand in zwei Klassen unterteilt: nicht-kovalent gebundene und kovalent gebundene Zelloberflächenproteine. Zur letzteren Klasse gehören die GPI-Zellwandproteine, Pir-Proteine (*proteins with internal repeats*) ohne GPI-Anker, die stark O-glykosyliert und über eine bis jetzt unbekannte, alkali-sensitive Bindung an β -1,6-Glukan gebunden sind, sowie über Disulfidbrücken an andere Proteine gebundene Mannoproteine (Ruiz-Herrera *et al.*, 2006). Nicht-kovalent gebundene Zelloberflächenproteine sind über hydrophobe und ionische Wechselwirkungen und Wasserstoffbrücken in der Zellwand gebunden.

Zelloberflächenproteine sind nicht notwendigerweise an die Zellwand oder -membran gebunden. Je nach Wachstumsbedingung können manche von ihnen mit der Oberfläche assoziiert sein oder in den extrazellulären Raum sekretiert werden.

Adhäsine

Zu den gut charakterisierten Zelloberflächenmolekülen gehört eine Reihe von Proteinen, die die Bindung an Wirtszellen oder Liganden von Wirtszellen vermitteln, die sog. Adhäsine (Chaffin *et al.*, 1998; Hostetter, 1994). Die Adhäsion von *C. albicans* an Zellen des Wirtsepithels ist ein essentieller erster Schritt für die Kolonisation und Infektion des Wirtes. Adhäsine binden z.B. an Bestandteile der extrazellulären Wirtsmatrix, wie Fibronectin, Laminin und Kollagen I und IV, oder an Zuckerreste, wie Fukose oder die Blutgruppenantigene auf der Oberfläche der Wirtszellen (Brassart *et al.*, 1991; Cameron and Douglas, 1996). Die Mehrzahl der bisher beschriebenen Adhäsine gehört zur Klasse der GPI-abhängigen Zellwandproteine. Diese besitzen eine N-terminale Signalsequenz, einen potenziellen GPI-Anker und sind stark glykosyliert (Sundstrom, 2002). Zu ihnen gehören u.a.:

- Hwp1p (*hyphal wall protein 1*): ein Mannoprotein, das in der Zellwand an den Spitzen apikal wachsender Hyphen verankert ist. Es fungiert als Substrat epithelialer Transglutaminasen und spielt so durch die Bildung kovalenter Verknüpfungen eine Hauptrolle bei der Adhäsion von *C. albicans* an menschliche Mundepithelzellen (Staab *et al.*, 1999). Die Deletion von *HWP1* führt zu einer verminderten Adhäsion an Epithelzellen, sowie einer verminderten Infektionsfähigkeit im Tiermodell (Sundstrom *et al.*, 2002).

- die *ALS*-Genfamilie (*agglutinin-like sequence*): diese setzt sich aus acht glykosylierten, mittels GPI-Ankers an das β -1,6-Glukan in der Zellwand verknüpften, großen Zelloberflächen-Proteinen zusammen (Als1p: 1260 AS), die sich durch eine starke Homologie zueinander auszeichnen (Hoyer, 2001). Die Gene der *ALS*-Familie werden unter verschiedenen physiologischen Bedingungen wie der Wachstumsform oder –phase differentiell exprimiert. Die Proteine der Familie zeigen Sequenzhomologie zu α -Agglutinin, das bei der Paarung von *S. cerevisiae* für die Zell-Zell-Erkennung erforderlich ist (Lipke *et al.*, 1989) und einige von ihnen vermitteln als Adhäsine die Bindung von *C. albicans* an Zelloberflächen des Wirtes (Fu *et al.*, 2002; Sheppard *et al.*, 2004).

Der *ALS*-Proteinfamilie kommt eine besondere Bedeutung sowohl bei der Adhäsion von *C. albicans* an das Wirtsgewebe sowie der folgenden Invasion in die Zellen des Wirtes zu. Sowohl Als1p als auch Als3p vermitteln eine Bindung von *C. albicans* an epitheliale sowie auch endotheliale Zellen des Menschen. Beide Proteine finden sich auf der Oberfläche von Hyphen. So handelt es sich bei Als3p um ein Invasin, welches durch die Nachahmung von Cadherinen auf den Zelloberflächen des Wirtes in der Lage ist, u.a. an N-Cadherin endothelialer Zellen sowie an E-Cadherin oraler Epithelzellen zu binden und so die Endozytose von *C. albicans* durch Zellen des Wirtes zu induzieren (Phan *et al.*, 2007).

Weitere Zelloberflächenproteine sind die pH-regulierten Proteine Phr1p und Phr2p. Dies sind Glykoproteine, die in der Zellmembran verankert sind und in Abhängigkeit des pH-Wertes des umgebenden Mediums reguliert werden (Muhlschlegel and Fonzi, 1997; Saporito-Irwin *et*

al., 1995). Dabei wird Phr1p bei einem pH-Wert von 5,5 oder höher und Phr2 bei einem pH-Wert unter 5,5 exprimiert. Phr1p ist essentiell für die Ausbildung systemischer Infektionen im Mausmodell und Deletionsstämme für Phr1p zeigen einen morphogenetischen Defekt bei einem pH-Wert von 7,5, der dem pH-Wert des Blutes von Säugetieren entspricht. Umgekehrt ist Phr2p essentiell für die Virulenz in einem vaginalen Infektionsmodell (pH 4) (De Bernardis *et al.*, 1998; Ghannoum *et al.*, 1995). *PHR1* und *PHR2* sind damit Beispiele für Gene, die in Abhängigkeit von den Bedingungen der jeweiligen Nische des Wirtes reguliert werden und so eine Anpassung an unterschiedliche Umweltbedingungen erlauben.

Zelloberflächenproteine und Morphogenese in C. albicans

Gene, die für Zelloberflächenmoleküle kodieren, werden von den zentralen Regulatoren der Morphogenese von *C. albicans* differentiell reguliert. So kommt es bei der Induktion von Hyphen zur Expression einiger weniger spezifischer Zelloberflächenproteine, die an der Virulenz von *C. albicans* beteiligt sind. Zu diesen gehören neben Proteinen der Zellwand, wie Adhäsinen der *ALS*-Familie (Als1p und Als3p), Hwp1p und das mit diesem verwandte Rbt1p, sowie Ece1p, dessen Funktion unbekannt ist (Braun and Johnson, 2000; Chen *et al.*, 2002b; Fu *et al.*, 2002; Hoyer *et al.*, 1998; Lane *et al.*, 2001a), auch sekretierte Proteine, wie z.B. die Aspartylproteasen Sap4p - Sap6p (Hube *et al.*, 1997; Sanglard *et al.*, 1997).

Die Expression der meisten dieser Gene ist abhängig von dem zentralen Morphogenese-Regulator Efg1p (Argimon *et al.*, 2007; Sharkey *et al.*, 1999). Zu den von Efg1p regulierten Genen gehört auch *RBT4*, das für ein potenzielles Zelloberflächenprotein mit unbekannter Funktion kodiert und das als essentieller Virulenzfaktor von *C. albicans* in einem Mausmodell für systemische Kandidosen sowie für das invasive Wachstum in einem Korneamodell für die Invasion von Wirtsgewebe *in vivo* beschrieben wurde (Braun *et al.*, 2000). *RBT4* wird in Hefezellen durch den generellen Repressor Tup1p reprimiert (*RBT4 = repressed by TUP1*) und in Hyphen in Abhängigkeit von Efg1p exprimiert (Braun *et al.*, 2000; Braun and Johnson, 2000). Ein weiteres potenzielles Zelloberflächenprotein, Rbe1p, welches Homologien zu Rbt4p aufweist, wird im Gegensatz zu Rbt4p durch Efg1p reprimiert (*RBE1 = repressed by EFG1*). Rbe1p ist das am stärksten exprimierte potenzielle Zelloberflächenprotein in einem Deletionsstamm für Efg1p (Sohn *et al.*, 2003). Die molekulare Funktion von Rbe1p ist aber ebenfalls unbekannt. Bezüglich ihrer Regulation sind die beiden Proteine möglicherweise Beispiele für Faktoren, deren differentielle Repression einen Hinweis auf eine Zellzyklus-spezifische Funktion gibt.

Hinweise auf die mögliche Funktion eines Proteins geben oft Sequenz- oder Strukturhomologien zu bereits beschriebenen Proteinen. So weist Rbt4p in einer zentralen Domäne Sequenzhomologien zu Proteinen auf, die in Pflanzen nach Infektionen durch Viren, Bakterien oder Pilzen induziert werden, der Familie 1 der sog. *pathogenesis related proteins* (PR-Proteine) (Antoniw *et al.*, 1980; Braun *et al.*, 2000). PR-Proteine sind die am stärksten transkriptionell induzierten Proteine, wenn Pflanzen Krankheitserregern (Pathogenen) oder anderem biotischen oder abiotischem Stress ausgesetzt sind. PR-Proteine werden mittlerweile

in 17 Familien gegliedert (PR-1 bis PR-17 (van Loon *et al.*, 2006)), von denen die PR-1-Familie eine konservierte PR-Domäne aufweist, die ebenfalls in Rbt4p konserviert ist. Proteine, die eine solche Domäne besitzen, wurden als erstes in Tabakpflanzen beschrieben, die hypersensitiv gegenüber dem Tabakmosaikvirus sind (Gianinazzi *et al.*, 1970; van Loon and van Kammen, 1970). Sie besitzen eine fungizide Wirkung und eine außerordentlich stabile drei-dimensionale Struktur (Niderman *et al.*, 1995; Stintzi *et al.*, 1993). So weist Rbt4p in der zentralen konservierten Domäne, die eine Länge von 131 Aminosäuren besitzt, 46% Sequenzidentität zu den Genprodukten von *PR1a, b* und *c* des Tabaks auf (Braun *et al.*, 2000). Homologe der PR1-Proteine werden auch in *S. cerevisiae* gefunden und wurden aufgrund ihrer Verwandtschaft zu den PR-Proteinen der Pflanzen dort als Pry-Proteine bezeichnet (*pathogenesis related in yeast*).

4 Pry-Proteine in *Candida albicans*

Ein Vergleich der *in silico* translatierten Basensequenz von *RBE1* hinsichtlich Homologien zu bereits beschriebenen Proteinen mit der Sequenz-Datenbank des *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) am *National Institute of Health* (NIH) mit Hilfe des BLAST-Programmes (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>) (Altschul *et al.*, 1997) ergibt – ebenso wie für Rbt4p - eine signifikante Homologie zur sogenannten „SCP-/PR-1“-Familie extrazellulärer Domänen für die Aminosäuren 125-252 der abgeleiteten Rbe1p-Aminosäuresequenz. Von den Mitgliedern dieser Proteinfamilie weisen P14a aus *Lycopersicon esculentum* mit 39% Sequenzidentität und 52% Homologien und das Antigen VA5 (Ag5) aus dem Gift von *Vespa vulgaris* mit 31% Sequenzidentität und 45% Homologien innerhalb dieser Domäne die größte Ähnlichkeit zu Rbe1p auf (Abb. 10).

Rbe1p	MKITNTLLNAAALLAVTEAATITKFFFASTQTLFVTQTSQTVVATKSFVE	50
P14a	-----	
VA5	-----MEISGLVYLIIIVTIID	17
Rbe1p	TIYSAPPKQLTSKTDSTSPSTSSVNSLTSSSATSIVETTTTAPSSSTLT	100
P14a	-----MGLFNISSLTCLM	14
VA5	LPYGKANNYCKIKCLKGGVHTACKYGLKPNCGNKVVVSYGLTKQEKQDI	67
	: : .	
Rbe1p	TSTISSSTASESDATPTADVEFAEELKEHNVKRALHGVPALSWSNKLA	150
P14a	VLAI FHSCEAQNS-----PQDYLAHVNDARAQVGVGPMSSWDANLA	54
VA5	LKEHNDFRQKIAR-----GLETRGNPQPQPPAKNMKNLVWVWDELA	107
	: . . : * . : **	
Rbe1p	EYAQDYANTGF---DCSNLNLKHSGGPYGEN--LAAGYMGGISPVDAWY	194
P14a	SRAQNYANS-----RAGDCNLIHSGAGENLA--KGGDFTGRAAVQLWV	96
VA5	YVAQVWANQCQYGHDTCDRDVAKYQVGNVALTGSTAAKYDDPVKLVKMW	157
	** : ** . : : * . . * . *	
Rbe1p	DEISMVD-WNNVDFT--ESTGHFTQLVWRSTTQVGCACMMMCSTAWR--QI	239
P14a	SERPSYN-YATNQCVGGKKCRHYTQVWRNSVRLGCGRARCNNGW--FI	143
VA5	DEVKDYNPKKKFSGNDFLKTGHYTMVWANTKEVCGSISKYIQEKWHKH	207
	. * : . . . * : * : * : . : * : *	
Rbe1p	TVCEYLPRGNVIGLNVTSVSGHSYFVDNVLPLK	271
P14a	S-CNYDPVGNWIGRQPY-----	159
VA5	LVCNYGPSGNFMNEELYQTK-----	227
	* : * * * * : . .	

Abb. 10. Sequenzvergleich der Proteine P14a (*Lycopersicon esculentum*), Rbe1p (*Candida albicans*) und VA5 (*Vespa vulgaris*).

Erstellt mit Hilfe des Programms ClustalW2; „*“ = identische Aminosäuren in allen Sequenzen, „:“ = konservierte Substitutionen; „.“ = semi-konservierte Substitutionen; unterstrichen: PR-1-Domäne

Die CAP-Protein-Superfamilie

Homologe der PR-1-Proteinfamilie sind ubiquitär verbreitet. Einer neueren, systematischeren Einteilung nach werden diese Proteine anhand großer Sequenzhomologien zwischen den PR-1-Proteinen, den Antigen 5-Proteinen der Insekten und den CRISP-Proteinen (*Cysteine-Rich Secretory Proteins*) aus dem männlichen Reproduktionstrakt der Säugetiere als Superfamilie der CAP-Proteine zusammengefasst (*Cysteine-rich secretory proteins, Antigen 5, and Pathogenesis-related 1 proteins*). Einer weiteren Klassifizierung nach werden diese Proteine auch unter dem Namen SCP-Proteinfamilie zusammengefasst (*sperm coating glycoprotein family*, Pfam: PF00188; <http://pfam.sanger.ac.uk>). Allen Proteinen, die unter diese Klassifizierung fallen, sind vier Signatursequenzen gemeinsam (CAP1 - CAP4), die sich in einem strukturell konservierten Bereich mit einer Größe zwischen 17 und 21 kDa, der sog. CAP-Domäne befinden (Gibbs *et al.*, 2008). Das Vorhandensein dieser Sequenzmotive ist charakteristisch für die CAP-Proteine und definiert die Proteinfamilie.

Die CAP-Familie ist in allen Reichen von Archaea über Bakterien bis hin zu Eukaryonten weit verbreitet. Ein Homologievergleich mit der zentralen konservierten CAP-Domäne identifiziert derzeit 1281 CAP-Proteine in 427 Arten (Archaea: 8 Arten, Bakterien: 213 Arten, Eukaryonten: 216 Arten; (Gibbs *et al.*, 2008)). Die weite Verbreitung dieser Proteine spricht für eine Beteiligung an fundamentalen biologischen Prozessen. Die phylogenetischen und strukturellen Verwandtschafts-Beziehungen der CAP-Proteine können dahingehend interpretiert werden, dass sich diese Protein-Superfamilie von einem gemeinsamen Vorfahren her entwickelt hat (Abb. 11) (Szyperski *et al.*, 1998).

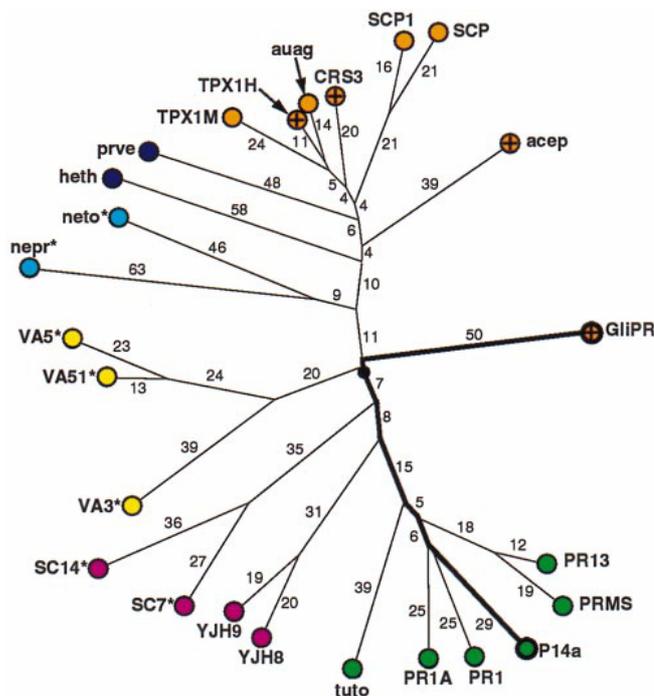


Abb. 11. Die Superfamilie der CAP-Proteine.

Genetische Abstammungsverhältnisse von 26 Mitgliedern der Proteinfamilie. Abbildung aus (Szyperski *et al.*, 1998); orange: Säugetiere, grün: Pflanzen; lila: Pilze, gelb: Insekten, hellblau: Nematoden, dunkelblau: andere Vertebraten; Bsp.: P14a (*Lycopersicon esculentum*), GliPR (*Homo sapiens*), VA5 (*Vespula vulgaris*); Ziffern: „accepted point mutation (PAM) distances“

Die starke Konservierung der 4 Sequenzmotive innerhalb der CAP-Domäne, die in einer konservierten Tertiärstruktur resultiert, sowie das Vorhandensein einiger hydrophober Aminosäuren innerhalb eines vorgeschlagenen aktiven Zentrums, weist auf einen ähnlichen molekularen Wirkmechanismus dieser Proteine hin (Szyperski *et al.*, 1998). Die meisten CAP-Proteine sind sekretiert und besitzen eine extrazelluläre endokrine oder parakrine Funktion. CAP-Proteine sind beteiligt an Prozessen wie der Regulation der Signaltransduktion durch Ionenkanalsteuerung oder Aktivierung von Rezeptoren, der Modifikation anderer Proteine, z.B. im Zusammenhang mit der Remodellierung der extrazellulären Matrix oder der zellulären Adhäsion, entweder als Proteasen oder Protease-Inhibitoren (Karihaloo *et al.*, 2005; Pohl *et al.*, 2000); als Tumorsuppressor- oder Proto-onkogene in Geweben wie der Prostata und in der Zell-Zell-Adhäsion bei der Befruchtung (Gibbs *et al.*, 2008). Die Tertiärstruktur der CAP-Domäne ist bei den daraufhin bisher untersuchten CAP-Proteinen ähnlich und wird durch Wasserstoff- und (mit Ausnahme von GAPR-1) Disulfidbrücken stabilisiert, wodurch den CAP-Proteinen die für sekretierte Proteine erforderliche thermale, proteolytische und pH-Stabilität verliehen wird (Fernandez *et al.*, 1997). Abgesehen von den konservierten Bereichen hat sich die CAP-Domäne im Laufe der Evolution stark diversifiziert, wodurch sich der biologische Kontext der Funktion der CAP-Proteine durch die mögliche Erkennung anderer Zielstrukturen ebenfalls stark verbreitert hat.

Im weitesten Sinne werden CAP-Proteine in drei verschiedenen Zusammenhängen gefunden: (i) als normaler Bestandteil einer Zelle oder eines Gewebes; (ii) als hoch-reguliert bei Krankheiten; (iii) als durch einen Fremdorganismus für einen toxischen oder immunevasiven Effekt eingebracht (Gibbs *et al.*, 2008).

CRISP-Proteine finden sich vor allem im männlichen Reproduktionstrakt der Säugetiere, sowie im Giftsekretionstrakt vieler Schlangen, Eidechsen und anderer Vertebraten (Gibbs *et al.*, 2008; Yamazaki and Morita, 2004).

Die immunogenen Proteine der Antigen 5- (Ag5-) Familie, zu denen auch das oben aufgeführte VA5 der Wespen zählt, bilden eine Hauptklade der CAP-Superfamilie. Sie stellen die häufigsten Proteine im Giftsekretionstrakt stechender Insekten dar, wurden allerdings auch in *D. melanogaster* sowie im sekretierten Speichel sich von Blut ernährenden Zecken und Fliegen gefunden. Dort wird ihnen eine Funktion in der Unterdrückung des Immunsystems des Wirts oder der Blutgerinnung zugeschrieben (Ribeiro and Francischetti, 2003).

Die verschiedenen Familien der PR-Proteine in Pflanzen sind ein Teil der Hypersensitivitäts-Reaktion nach der Infektion mit Pathogenen. Von ihnen werden die Mitglieder der PR-1-Familie am stärksten induziert und stellen bis zu 10% des Gesamtproteingehalts infizierter Blätter dar (Cornelissen *et al.*, 1986). Obwohl sie in Tabak nach Infektion mit dem Tabakmosaikvirus als erstes gefunden wurden, besitzen sie keine antivirale, sondern eine fungizide Wirkung (Niderman *et al.*, 1995). Diese wird möglicherweise über eine Hemmung extrazellulärer β -1,3-Glukanase-Aktivität vermittelt (Riviere *et al.*, 2008). Die Expression der PR-1-Proteine ist aber auch in nicht-infizierten Teilen der Pflanzen erhöht, was ihnen eine mögliche Funktion bei der erworbenen systemischen Resistenz-Antwort (*SAR* – *systemic*

acquired resistance), die analog zur erworbenen Resistenz von Säugern ist, zuweist (Ryals *et al.*, 1994). PR-1-Proteine werden auch in unterschiedlichen Entwicklungsstadien und Geweben von Pflanzen exprimiert (van Loon *et al.*, 2006). So übernehmen die Mitglieder dieser Proteinfamilie in Pflanzen, wie bei Säugetieren, verschiedene Funktionen, abhängig vom Kontext ihrer Expression (Gibbs *et al.*, 2008).

Die CAP-Proteine der Säugetiere können in neun Unterfamilien gruppiert werden. Beim Menschen und in der Maus finden sie sich in den meisten Geweben. Ihnen wird dort eine signifikante Rolle bei der Reproduktion, der Entwicklung, der Immunfunktion sowie bei Erkrankungen, wie speziellen Krebsformen, Schädigungen der Nerven und Herzversagen zugeschrieben (für eine Übersicht über die Strukturen und biologischen Funktionen der CAP-Proteine in Säugetieren, siehe: Gibbs *et al.*, 2008).

Pry-Proteine in S. cerevisiae

Homologievergleiche in der *Saccharomyces cerevisiae*-Genbank – als dem am besten charakterisierten einzelligen Pilz (<http://www.yeastgenome.org>) - mit der potenziellen Aminosäuresequenz von Rbe1p ergeben drei Proteine, die eine Homologie zu PR-1- bzw. CAP-Proteinen aufweisen. Diese wurden Pry1p-Pry3p, für *pathogenesis-related in yeast*, benannt (Tab. 1).

Tab. 1. Pry-Proteine in *S. cerevisiae*

Pry-Proteine in <i>S. cerevisiae</i>		
Gen	Genprodukt	Sequenzidentität in der CAP-Domäne von Rbe1p
YJL079C (<i>PRY1</i>)	Pry1p (299 AS)	58%
YKR013W (<i>PRY2</i>)	Pry2p (329 AS)	52%
YJL078C (<i>PRY3</i>)	Pry3p (882 AS)	52%

Strukturell verfügen alle drei Pry-Proteine in *S. cerevisiae* über eine hydrophobe Signalsequenz, die charakteristisch für sekretorische Proteine ist. Das Genprodukt von *PRY3* verfügt ferner über eine interne Region, die reich an den Aminosäuren Serin und Threonin ist, an denen Glykosylierungen erfolgen können, sowie über Sequenzen für das Anfügen eines Glykosylphosphatidylinositol-Restes (GPI-Anker) am C-Terminus zur kovalenten Verankerung in der Zellwand. Pry3p gilt daher als potenzielles Zellwandprotein (Caro *et al.*, 1997; Hamada *et al.*, 1998a; Hamada *et al.*, 1998b; Yin *et al.*, 2005), während Pry1p und Pry2p nachweislich sekretiert sind (Terashima *et al.*, 2002).

Die molekulare Funktion der Pry-Proteine in *S. cerevisiae* ist ebenfalls unbekannt. In

genomweiten Deletionsanalysen führt die Deletion von *PRY1* in einem filamentösen Stamm (Σ 1278b) zu einer verminderten Filamentierung und dem Verlust invasiven Wachstums (Jin *et al.*, 2008). *PRY2* ist an der Resistenz gegen hyperosmotischen Stress in Gegenwart von 1 M NaCl beteiligt (Yoshikawa *et al.*, 2009). Die Pheromon-induzierte Repression von *PRY3* durch den Transkriptionsfaktor Ste12p, der in *S. cerevisiae* die Pheromonantwort vermittelt, ist für eine effiziente Paarung erforderlich (Bickel and Morris, 2006), während eine Deletion keinen Einfluss auf die Paarungseffizienz hat oder diese sogar steigert (Entian *et al.*, 1999). Die zelluläre Lokalisation der von *PRY1-PRY3* ist unklar, eine Deletion hat keinen Einfluss auf die Vitalität der Hefezellen (Giaever *et al.*, 2002).

5 Ziel dieser Arbeit

Ziel dieser Arbeit war die Identifikation einer bisher nicht beschriebenen Familie von Pry-Proteinen in *Candida albicans*, sowie die funktionelle Charakterisierung ihrer Mitglieder hinsichtlich Expression, Regulation und Virulenz. Dafür sollte die Expression der einzelnen Gene der Pry-Proteine in *C. albicans* sowie die Regulation der Familienmitglieder während verschiedener morphogenetischer Prozesse auf transkriptioneller Ebene analysiert werden. Für die Analyse der Regulation auf molekularer Ebene sollten Promotoranalysen sowie Bindungsstudien mit Hilfe biochemisch angereicherter DNA-bindender Proteine sowie heterolog exprimierter Transkriptionsfaktoren (Efg1p, Tec1p) an regulatorische Promotorfragmente beispielhaft für die ganze Familie an Rbe1p durchgeführt werden. Ferner sollte eine mögliche Funktion dieser Proteine bei der Morphogenese, der Adhäsion und Invasion von Wirtsgewebe, sowie für die Virulenz von *C. albicans in vitro* und *in vivo* durch die Konstruktion von Deletionsstämmen für einzelne Mitglieder der Pry-Familie untersucht werden. Für Hinweise auf eine mögliche Funktion der Pry-Proteine in unterschiedlichen zellulären Prozessen sollten die konstruierten Stämme umfassend phänotypisch charakterisiert werden. Die Lokalisation von Rbe1p und Rbt4p in *C. albicans* sollte mit Hilfe verschiedener Methoden untersucht werden. Ferner sollte durch die heterologe Expression der beiden Proteine Rbe1p und Rbt4p in *Saccharomyces cerevisiae* rekombinante Proteine hergestellt und mit diesen biochemische Analysen für eine Identifikation möglicher molekularer Funktionen der Pry-Proteine in *C. albicans* durchgeführt werden.

Material und Methoden

1 Chemikalien

Chemikalien wurden, wenn nicht anders vermerkt, von folgenden Firmen bezogen: Bio-Rad (München), Carl Roth (Karlsruhe), Dianova (Hamburg), GE Healthcare (Freiburg), Invitrogen (Karlsruhe), Sigma-Aldrich (Schnelldorf), VWR (Darmstadt: Merck, Fluka, Riedel-de Haen). Das verwendete Wasser wurde, wenn nicht anders vermerkt, aus einer Millipore-Anlage entnommen und autoklaviert.

2 Enzyme

Tab. 2. Für allgemeine Methoden verwendete Enzyme

Enzym	Firma, Bezugsquelle
Restriktionsenzyme, Antarctic Phosphatase, T4-DNA Ligase, T4-Polynukleotidkinase	New England Biolabs (NEB), Frankfurt a.M.
Shrimp Alkaline Phosphatase, RNase A	Roche Diagnostics GmbH
Taq-DNA-Polymerase	L. Schalwyk, ICRF, London (Pluthero, 1993)
Pfu-DNA-Polymerase	Stratagene (Agilent Technologies)

3 Reaktions-Kits

Tab. 3. Verwendete Reaktionskits

Kit	Firma
QIAquick® PCR Purification Kit	Qiagen GmbH, Hilden
QIAquick® Gel Extraction Kit	
QIAprep® Spin Miniprep Kit	
RNeasy® Mini/Midi Kit	
Ni-NTA Fast Start Kit	
RNA 6000 Nano Kit	Agilent Technologies, Böblingen
Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Sample Kit	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
NucleoBond® Plasmid-Isolationskit PC 2000	Macherey-Nagel GmbH, Düren
PRIME-IT® II Random Primer Labeling Kit	Stratagene (Agilent Technologies)

4 Kulturmedien

Tab. 4. Kulturmedien für Hefen und Bakterien

Medium	Bestandteile	Konzentration
YPE-Medium	Hefeextrakt	10 g/l
	(Bacto-) Pepton (Difco)	20 g/l
YPD-Medium	YPE-Medium	
	Glucose	2 g/l
SC-Medium	Hefe-Stickstoff-Basis(YNB, Difco)	1,5 g/l
	(NH ₄) ₂ SO ₄	5 g/l
	AS-Mix*	2 g/l
	Adenin	0,3 mM
	Uracil	0,2 mM
	Histidin	0,3 mM
	Leucin	1,6 mM
	Tryptophan	0,4 mM
SC –ura-Medium	wie SC-Medium, jedoch ohne Uracil	
YNB-Medium	Hefe-Stickstoff-Basis (YNB, Difco)	1,5 g/l
	(NH ₄) ₂ SO ₄	5 g/l
YCB-BSA-Medium	Hefe-Kohlenstoff-Basis (YCB, Difco)	23,4 g/l
	Rinderserumalbumin (BSA)	4 g/l
	Uridin	0,5 mM
	pH-Wert	4,0
LB-Medium	Hefeextrakt	5 g/l
	Pepton	10 g/l
	NaCl	5 g/l
Rich-Medium	Hefeextrakt	5 g/l
	Trypton	10 g/l
	NaCl	5 g/l
	Glucose	2 g/l

*: jeweils 10 g Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, Ile, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Tyr, Val + 1 g PABA (Guthrie and Fink, 1991; Guthrie and Fink, 2002)

Medien wurden in 2-facher Konzentration angesetzt und je nach Verwendungszweck in als Flüssigmedium mit H₂O bzw. für Festmedium mit 4% Agar in H₂O auf die einfache Konzentration verdünnt (Endkonz. Agar: 20 g/l) und mit 40%-iger Glukoselösung auf eine Endkonzentration von 2 g Glukose/l eingestellt.

Medien für die phänotypische Charakterisierung veränderter *C. albicans*-Stämme**Tab. 5.** Medien mit Zusätzen für die phänotypische Charakterisierung der $\Delta rbe1/\Delta rbt4$ Deletions- und *RBE1*-Überexpressionsstämme

Medium	Zusammensetzung bzw. Zusätze	Konzentration
YPD-Medium	Amphotericin B	0,3 µg/ml
	Fluconazol	0,5 µg/ml, 1 µg/ml
YPD-Medium	H ₂ O ₂	0,1 mM, 0,5 mM, 1 mM, 2 mM, 4 mM, 5 mM
	DTT	5 mM, 10 mM, 15 mM, 20 mM
	Diamid	0,5 mM, 1 mM, 2 mM
	Paraquat	10 mM, 15 mM
	Cu ²⁺	100 µM und 10 mM
	Cadmium	100 µM
	ZnCl ₂	3 mM
	Kongorot, Calcofluor White	0,1 mg/ml, 0,5 mg/ml, 1mg/ml, 1,5 mg/ml
	Koffein	5 mM, 10 mM, 15 mM
YNB-Medium	Succinat	jeweils 2% Endkonzentration
	Maltose	
	Galaktose	
	Laktose	
	EtOH	
MEM-Alpha Medium (α -MEM)	Zellkulturmedium mit L-Glutamin, Desoxyribo-/Ribo-Nukleotiden, ohne NaHCO ₃	10,17 g/l
	(Gibco Life Technologies GmbH, Karlsruhe) NaHCO ₃	2,2 g/l
Medium mit Serum	YPD-Medium	1-fach
	fötale Kälberserum	10% (v/v)
SLAD-Medium	YNB ohne AS und (NH ₄) ₂ SO ₄ (Difco)	0,67%
	(NH ₄) ₂ SO ₄	50 µM
	Agar (5 mal gewaschen mit H ₂ O)	
Spider-Medium (Liu <i>et al.</i> , 1994)	Nähr-Bouillon (Difco)	10 g/l
	D-Mannit	10 g/l
	K ₂ HPO ₄	2 g/l
Medium 199	Zellkulturmedium (Gibco Life Technologies GmbH, Karlsruhe)	9,5 g/l
	NaHCO ₃	2,2 g/l
Medium nach Lee (Lee <i>et al.</i> , 1975)	NaCl	5,0 g/l
	MgSO ₄ ·7 H ₂ O	0,2 g/l
	(NH ₄) ₂ SO ₄	5,0 g/l
	K ₂ HPO ₄	2,5 g/l
	L-Leucin	1,3 g/l

	L-Lysin	1,0 g/l
	L-Alanin	0,5 g/l
	L-Phenylalanin	0,5 g/l
	L-Prolin	0,5 g/l
	L-Threonin	0,5 g/l
	L-Methionin	0,1 g/l
	L-Ornithin	0,0714 g/l
	L-Arginin	0,0714 g/l
	Glukose	12,5 g/l
	pH-Wert	6,8
	Biotin	0,001 g/l
	ZnSO ₄	100 µM
SS-Medium (Lane <i>et al.</i> , 2001a)	Hefe-Stickstoff-Basis (YNB, Difco)	0,0425%
	(NH ₄) ₂ SO ₄	0,125%
	Succinat	2%
	pH-Wert	6,5 (10 N NaOH)
SSH-Medium (Khan <i>et al.</i> , 2005)	<i>Sunflower Seed Husk Agar</i>	
	Sonnenblumensamenhülsen	0,2 g/ml H ₂ O
	Glukose	1 g/l
	pH-Wert	5,5
	Agar (Difco)	1,4 %
YPS-Medium	YPE-Medium	1-fach
	Saccharose	2%
	Agar	1%

Für die Herstellung von Agarplatten aus Spider-Medium wurde 2,7 % Agar in Wasser verwendet, der mehrere Male in Wasser gewaschen worden war (Endkonzentration: 1,35%).

- Hypoxie:

Für Wachstum unter microaerophilen Bedingungen wurden etwa 400 Zellen einer exponentiell wachsenden Kultur auf YPS-Festmedium ausplattiert und nach Antrocknen mit flüssigem YPS-Medium überschichtet bzw. direkt mit 10 ml flüssigem YPS-Medium gemischt (Brown *et al.*, 1999).

5 Pufferlösungen

Die Herstellung von Puffer- und Stammlösungen für allgemeine Methoden erfolgte nach Standardprotokollen (Ausubel *et al.*, 1989; Sambrook *et al.*, 1989). Spezielle Pufferlösungen sind unter den jeweiligen Kapiteln des Methodenteils aufgeführt.

Tab. 6. Pufferlösungen

Puffer	Bestandteile	Konzentration
TE-Puffer	Tris HCl, pH 8,0	10 mM
	EDTA	1 mM
PBS-Puffer, pH 7,4	NaCl	140 mM
	KCl	3 mM
	Na ₂ HPO ₄	10 mM
	KH ₂ PO ₄	1,8 mM
PBST-Puffer	PBS-Puffer	
	Tween 20	0,05%
TAE-Puffer (50x)	Tris-Acetat	2 M
	EDTA	50 mM
SSC-Puffer (20x), pH 7,0	NaCl	3 M
	Na-Citrat	300 mM

6 Oligonukleotide

Kürzere Oligonukleotide bis 40 bp wurden von der MWG Biotech AG (Ebersberg) bezogen. Längere Oligonukleotide ab 50 bp für die Transformation mittels PCR-Produkten stammen von der Thermo Electron GmbH, Ulm.

Tab. 7. Oligonukleotide für den *MTL*-Lokus, die Northern Blot-Analyse der *PRY*-Familienmitglieder und die Ligation von *RP10* in pAU36

Gen	Oligonukleotid	Basensequenz (5'-3')	Produkt
<i>MTLalpha2</i>	Ca_MTLalpha2_for	CACATCTGGAGGCACTCTTTG	423 bp
	Ca_MTLalpha2_rev	GGTCTTTTTGCAGATACGGA	
<i>MTLa1</i>	CaMTLa1_for	CATACCCAAACTCTTTATTTGGG	673 bp
	CaMTLa1_rev	CACCCACCTTCAACCTCCTCGTTTTTTCC	
<i>RBE1</i>	RBE1_ORF_for_No	CCCAAAGTAGTCAAACCGTTG	257 bp
	RBE1_ORF_rev_No	AACATCGGCGGTAGGTGTAG	
<i>RBT4</i>	RBT4_a_ORF_for_No	TACTGCTGCCATTTTTGCTG	272 bp
	RBT4_a_ORF_rev_No	CATTACCACCATCAGCATCG	
<i>ORF19.6200</i>	CaPRY1_a_ORF_for_No	TTCCTTCAATCTTTCCGGTTA	250 bp
	CaPRY1_a_ORF_rev_No	TTGGCTGAGAATCCGACTTT	
<i>ORF19.2787</i>	CaPRY2_a_ORF_for_No	CGAATGTTCATTCTGCTCCA	268 bp
	CaPRY2_a_ORF_rev_No	TCACTATCACTTCTCCAAAGAAA	
<i>ORF19.2336</i>	CaPRY3_ORF_for_No	TGGAAGTGGAACCCTCTACAA	271 bp
	CaPRY3_ORF_rev_No	ATGGGCAGATAACCAAAAGC	
<i>ACT1</i>	act1_for	TTTCCAAGTGGGACGATA	202 bp
	act1_rev	TCTTGGACAAATGGTTGG	

<i>RP10</i>	RP10_for_KpnI	GGGGTACCCAAGTACAACATGGCTGTCTG	
	RP10_rev_KpnI	GGGGTACCTTATCCCTTAAACAGATTCTAAAAC	858 bp
<i>RP10</i>	RP10_for_KpnI	GGGGTACCCAAGTACAACATGGCTGTCTG	
	RP10_rev_XhoI	CCGCTCGAGTTATCCTTAAACAGATTCTAAAAC	859 bp
<i>RP10</i>	RP10_for_XhoI	CCGCTCGAGCAAGTACAACATGGCTGTCTG	
	RP10_rev_KpnI	GGGGTACCTTATCCCTTAAACAGATTCTAAAAC	859 bp
	T3	ATTAACCCTCACTAAAGGGA	
	T7	GTAATACGACTCACTATAGGGC	

Tab. 8. Oligonukleotide für Herstellung von Promotorfragmenten von *RBE1* und *ALS3*

Fragment	Oligonukleotid	Basensequenz (5'-3')	Produkt
	RBE1p_pa_for_PstI	AACTGCAGAGTTGTAGTAGCGAGTGGAAAG	
0,5 kb	RBE1p_pa_revI_XhoI	CCGCTCGAGGCATTCAATCTATCACTCCGTGT	534 bp
1 kb	RBE1p_pa_revII_XhoI	CCGCTCGAGTGGAACAAGTGGAAACAAAAA	1039 bp
DLI	RBE1p_del_forI_SacII	GCCGCGGACAATCCAGAAAACAAAAATAAA	638 bp
DLII	RBE1p_del_forII_SacII	GCCGCGGCATGATCTGGAAGTAGACCTAA	435 bp
DLIII	RBE1p_del_forIII_SacII	GCCGCGGCAAGGATAGGAGAAAATATAATAAA	261 bp
DRI	RBE1p_del_revI_SacII	GCCGCGGGAATTCACCAACGGTTGCAT	178 bp
DRII	RBE1p_del_revII_SacII	GCCGCGGTAAAGTGTGTTTTTAAACAATAGATAC	401 bp
DRIII	RBE1p_del_revIII_SacII	GCCGCGGCCACAAGTCTCCCATTCATCA	604 bp
DRIV	RBE1p_del_revIV_XhoI	CCGCTCGAGCTTTGTATCTGTTTTTGATTCTTGC	778 bp
RI	RBE1_FragI_for_Eco	GGAATTCAGATGCAACCGTTGGTGAAT	
	[RBE1_FragI_rev_BglII	GAAGATCTTTTATTTTTGTTTCTGGATTGT	267 bp]
		(funktioniert in PCR nicht so gut)	
	RBE1_FragI_rev_B_BglIII	GAAGATCTTTGTTTCTGGATTGTAAAGTGTG	260 bp
		(Evaluiert: zeigt selbes Shift-Verhalten wie altes Fragment)	
RIV	RBE1_Frag4_for_Eco	GGAATTC AATCAAAAACAGATACAAAGCAAGG	
	RBE1_Frag4_rev_Bgl	GAAGATCTAAGAAGGAATGGAACAAGTGGA	290 bp
Pro <i>ALS3</i> (Leng <i>et al.</i> , 2001)	ALS3pro_Leng_for	AATTCAAAGACTTGATATTATTAATTTAG	
	ALS3pro_Leng_rev	ATGAAAGTCTAGCAAATGCATC	91 bp
Leng +Ebox	Leng_Ebox_for	AGAGATGCATTTGCTAGAGATGCATTTGCTAGACTT	
	Leng_Ebox_rev	AAGTCTAGCAAATGCATCTCTAGCAAATGCATCTCT	36 bp
Leng -Ebox	Leng_ohne_Ebox_for	AGAGATGTGCCGATTAGAGATGTGCCGATTAGACTT	
	Leng_ohne_Ebox_rev	AAGTCTAATCGGCACATCTCTAATCGGCACATCTCT	36 bp

Tab. 9. Oligonukleotide für die Deletion und Reversion von *RBE1* und *RBT4*, die Southern Blot-Analyse sowie die Markierung und heterologe Expression in *S. cerevisiae*

Fragment	Oligonukleotid	Basensequenz (5'-3')	Prod.
<i>RBE1</i> -FR1	RBE1_FR1_for_ApaI RBE1_FR1_rev_XhoI	GCTC <u>GGGCC</u> CATGCCACAAGTCTCCCATTC CCGC <u>CTCGAG</u> AAACAGATGCAACCGTTGGT	455 bp
<i>RBE1</i> -FR2	RBE1_FR2_for_NotI RBE1_FR2_rev_SacII	ATAAGAATGCGGCCGCATTTGCACCCAAAAGTAAGC TCC <u>CCGCGG</u> CCACCACCAACTCTTGGAAT	497 bp
<i>RBT4</i> -FR1	RBT4_FR1_for_ApaI RBT4_FR1_rev_XhoI	GCTC <u>GGGCC</u> CCCTCAAACGTCGCACAAAAA CCGC <u>CTCGAG</u> TGGAAAGTTCGAAAGTTTGAAAG	496 bp
<i>RBT4</i> -FR2	RBT4_FR2_for_NotI RBT4_FR2_rev_SacII	ATAAGAATGCGGCCGCATGATTTATTAGTCCATGTCCTT G TCC <u>CCGCGG</u> GAGATCAGGAAGCTCGGGAAT	526 bp
<i>RBE1</i> -Rev	RBE1_ORF_for_XhoI	CCG <u>CTCGAG</u> TACTTTAAAGGTGGCAAGACG	
<i>RBT4</i> -Rev	RBT4_ORF_rev_Xho	CCGC <u>CTCGAG</u> TATTGTGGTCTCAAGACATTTTC	
<i>RBE1</i> -Sonde	2767_E12	TTTAAAGGTGGCAAGACG	
<i>RBT4</i> -Sonde	2767_H6	GCCTCAGCAGAACTTCA	
	pSFS1/2_SAT1_for	GTGAAGTGTGAAGGGGAGA	
	pSFS2_MAL2_rev	CGTGGTTTCAGTGGCTACAA	
<i>RBE1</i> -ÜExp	RBE1_ORF_rev_XhoI RBE1_ORF_for_BamHI	CCG <u>CTCGAG</u> ATGAAGATAACAAATACTTTACTTAATGC CGGGAT <u>CC</u> TTACTTTAAAGGTGGCAAGACG	
<i>RBE1</i> -GFP	2519forward 2519reverse	TAATGTCATTGGTTTGAATGTCACCTCAGGACAC TCATACTTIGTTGACAACGTCTTGCCACCTTAA <u>AGATGTCTAAAGGTGAAGAATTA</u> GAAAATATAAAAAACACAATGAAGAACTGAA ATACATCATCATCAAATTAATCTTTCTTTTTTTT TTA <u>CGCCAGGGTTTTCC</u> CAGTCACGA	
<i>RBT4</i> -GFP	RBT4_C_term_GFP_for RBT4_C_term_GFP_rev	TGGTAACGTTATGGGTACTGATCCAAAGACTGG TAAATCTTATATGGCTGAAAATGTCTTGAGACCA <u>CAAATGTCTAAAGGTGAAGAATTA</u> GATAAAAAATAAATCTAAAGGGGGGAGGAAGGT AGGACATGGACAAGGACATGGACTAATAAATCAT TTA <u>CGCCAGGGTTTTCC</u> CAGTCACGA	
<i>RBE1</i> _pYES	RBE1_pYES_for_BamHI RBE1_pYES_rev_XhoI	CGGGAT <u>CC</u> ATGAAGATAACAAATACTTTACTTAATGC CCG <u>CTCGAG</u> CTTTAAAGGTGGCAAGACGTT	
<i>RBT4</i> _pYES	RBT4_pYES_for_BamHI RBT4_pYES_rev_XhoI	CGGGAT <u>CC</u> AAAAATGAAGTTTCTCAAGTTGCCA CCG <u>CTCGAG</u> TGTGGTCTCAAGACATTTTCA	

jeweils unterstrichen: Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme bzw. des Vektors für die Markierung der

7 Plasmide

Tab. 10. In dieser Arbeit verwendete und hergestellte Plasmide

Plasmid	Bakterienstamm	Referenz, Bezugsquelle
pAU36		(Uhl and Johnson, 2001a)
pCaEXP		(Care <i>et al.</i> , 1999)
pSFUI	B4039	(Morschhauser <i>et al.</i> , 1999)
pSFUI- $\Delta rbe1$ -FR1/2		Diese Arbeit
pSFUI-FR1-RBE1/FR2		Diese Arbeit
pSFS1A, pSFS2A	B4091, B4092	(Reuss <i>et al.</i> , 2004)
pSFS1A- $\Delta rbe1$ -FR1/2		diese Arbeit
pSFS2A- $\Delta rbe1$ -FR1/2		diese Arbeit
pSFS1A-FR1-RBE1/FR2		diese Arbeit
pSFS1A- $\Delta rbt4$ -FR1/2		diese Arbeit
pSFS2A- $\Delta rbt4$ -FR1/2		diese Arbeit
pSFS1A-FR1-RBT4/FR2		diese Arbeit
pMAL-c2X		NEB (Frankfurt)
pMAL-c2X-EFG1		diese Arbeit
pYES2/CT		Invitrogen (Karlsruhe)
pYES2/CT-RBE1		diese Arbeit
pYES2/CT-RBT4		diese Arbeit
pAU36-RP10		diese Arbeit
pAU36- <i>invRP10</i>		diese Arbeit
pAU-RP10- $\Delta ProACT1$		diese Arbeit
pAU- <i>invRP10</i> - $\Delta ProACT1$		diese Arbeit
pAU-RP10- <i>ProRBE1</i> [534bp] <i>lacZ</i>		diese Arbeit
pAU-RP10- <i>ProRBE1</i> [1039bp] <i>lacZ</i>		diese Arbeit
pAU-RP10- <i>ProRBE1</i> [del -179 to -401] <i>lacZ</i>		diese Arbeit
pAU-RP10- <i>ProRBE1</i> [del -402 to -604] <i>lacZ</i>		diese Arbeit
pAU-RP10- <i>ProRBE1</i> [del -605 to -778] <i>lacZ</i>		diese Arbeit
pAU-RP10- <i>ProRBE1</i> [del -779 to -1039] <i>lacZ</i>		diese Arbeit
pAU-RP10- <i>ProACT1</i> -RBE1- $\Delta lacZ$		diese Arbeit

8 Bakterienstämme

Tab. 11. Verwendete Bakterienstämme

Stamm	Genotyp	Bezugsquelle
SURE [®] Competent Cells	e14-(McrA-) $\Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)171$ <i>endA1 supE44 thi-1 gyrA96 relA1 lac recB recJ sbcC umuC::Tn5</i> (Kan ^r) <i>uvrC</i> [F' <i>proAB lacI^qZAM15 Tn10</i> (Tet ^r)]	Stratagene (Agilent Technologies)
TB1	F ⁻ <i>ara</i> $\Delta(lac-proAB)$ [$\Phi 80dlac$ $\Delta(lacZ)M15$] <i>rpsL</i> (Str ^R) <i>thi hsdR</i>	NEB (Frankfurt)
DH5 α	F ⁺ [$\Phi 80$ ($\Delta lacZ$) M15] $\Delta(lacZYA-argF)$ <i>U169 recA1 endA1 hsdR17 r_k⁻ m_k⁺ supE44 thi-1 gyrA relA</i>	Invitrogen (Karlsruhe); (Hanahan, 1983) (Woodcock <i>et al.</i> , 1989)

9 *Candida albicans*-Stämme

Für genetische Veränderungen von *C. albicans* wurden i.d.R. drei, mindestens aber zwei unabhängig veränderte Stämme konstruiert. Für die Analysen des *RBE1*-Promotors wurden mind. 4 unabhängig transformierte Stämme konstruiert.

Tab. 12. In dieser Arbeit verwendete und hergestellte *C. albicans*-Stämme

Stamm	Genotyp	Ausgangsstamm	Quelle
SC5314	Wildtyp		(Gillum <i>et al.</i> , 1984)
CAI4	<i>ura3::1 imm434/ura3::1 imm434</i>	SC5314	(Fonzi and Irwin, 1993)
HLC52	<i>ura3::1 imm434/ura3::1 imm434</i> <i>efg1::hisG/efg1::hisG-URA3-hisG</i>	CAI4	(Lo <i>et al.</i> , 1997)
HLC67	<i>ura3::1 imm434/ura3::1 imm434 efg1::hisG/efg1::hisG</i>	CAI4	(Lo <i>et al.</i> , 1997)
BCa2-10	<i>ura3::1 imm434/ura3::1 imm434</i> <i>tup1::hisG/tup1::p405-URA3 ura3/ura3</i>	CAI4	(Braun and Johnson, 1997)
CaAS12	<i>ura3::1 imm434/ura3::1 imm434</i> <i>tec1::hisG/tec1::hisG-URA3-hisG</i>	CAI4	(Schweizer <i>et al.</i> , 2000)
Can100	<i>ura3::1 imm434/ura3::1 imm434 (URA3)</i>	CAI4	(Saunders, 2000)
RSC1	<i>MTLa/MTLa</i>	SC5314	diese Arbeit
RSC2	<i>MTLa/MTLa</i>	SC5314	diese Arbeit
RSC3	<i>MTLa/MTLa rbe1::FRT/rbe1::FRT rbt4::FRT/rbt4::FRT</i>	MRC27	diese Arbeit
RSC4	<i>MTLa/MTLa RBE1::FRT/rbe1::FRT RBT4::FRT/rbt4::FRT</i>	MRC31	diese Arbeit
RSC5	<i>MTLa/MTLa rbe1::FRT/rbe1::FRT rbt4::FRT/rbt4::FRT</i>	MRC27	diese Arbeit
RSC6	<i>MTLa/MTLa RBE1::FRT/rbe1::FRT RBT4::FRT/rbt4::FRT</i>	MRC31	diese Arbeit
MRC1	<i>ura3::1 imm434/ura3::1 imm434 ProACT1::pAU36</i>	CAI4	diese Arbeit
MRC2	<i>ura3::1 imm434/ura3::1 imm434 rp10::pAU36</i>	CAI4	diese Arbeit
MRC3	<i>ura3::1 imm434/ura3::1 imm434 rp10::inv pAU36</i>	CAI4	diese Arbeit
MRC4	<i>ura3::1 imm434/ura3::1 imm434 rp10::pAU ohne ProACT1</i>	CAI4	diese Arbeit
MRC5	<i>ura3::1 imm434/ura3::1 imm434 rp10:: inv pAU ohne ProACT1</i>	CAI4	diese Arbeit
MRC6	<i>ura3::1 imm434/ura3::1 imm434 rp10::ProRBE1[534bp]lacZ</i>	CAI4	diese Arbeit
MRC7	<i>ura3::1 imm434/ura3::1 imm434</i> <i>rp10::ProRBE1[1039bp]lacZ</i>	CAI4	diese Arbeit
MRC8	<i>ura3::1 imm434/ura3::1 imm434 efg1::hisG/efg1::hisG</i> <i>rp10::ProRBE1[534bp]lacZ</i>	HLC67	diese Arbeit
MRC9	<i>ura3::1 imm434/ura3::1 imm434 efg1::hisG/efg1::hisG</i> <i>rp10::ProRBE1[1039bp]lacZ</i>	HLC67	diese Arbeit
MRC10	<i>ura3::1 imm434/ura3::1 imm434</i> <i>rp10::ProRBE1[del -179 to -401]lacZ</i>	CAI4	diese Arbeit
MRC11	<i>ura3::1 imm434/ura3::1 imm434</i> <i>rp10::ProRBE1[del -402 to -604]lacZ</i>	CAI4	diese Arbeit
MRC12	<i>ura3::1 imm434/ura3::1 imm434</i> <i>rp10::ProRBE1[del -605 to -778]lacZ</i>	CAI4	diese Arbeit

MRC13	<i>ura3::1 imm434/ura3::1 imm434 rp10::ProRBE1[del -779 to -1039]lacZ</i>	CAI4	diese Arbeit
MRC14	<i>ura3::1 imm434/ura3::1 imm434 efg1::hisG/efg1::hisG rp10::ProRBE1[del -179 to -401]lacZ</i>	HLC67	diese Arbeit
MRC15	<i>ura3::1 imm434/ura3::1 imm434 efg1::hisG/efg1::hisG rp10::ProRBE1[del -402 to -604]lacZ</i>	HLC67	diese Arbeit
MRC16	<i>ura3::1 imm434/ura3::1 imm434 efg1::hisG/efg1::hisG rp10::ProRBE1[del -605 to -778]lacZ</i>	HLC67	diese Arbeit
MRC17	<i>ura3::1 imm434/ura3::1 imm434 efg1::hisG/efg1::hisG rp10::ProRBE1[del -779 to -1039]lacZ</i>	HLC67	diese Arbeit
MEC1	<i>ura3::1 imm434/ura3::1 imm434 rp10::pAU-ProAct1-RBE1</i>	CAI4	diese Arbeit
MEC2	<i>ura3::1 imm434/ura3::1 imm434 efg1::hisG/efg1::hisG RBE1/rbe1::URA3-FLIP</i>	HLC67	diese Arbeit
MEC3	<i>ura3::1 imm434/ura3::1 imm434 efg1::hisG/efg1::hisG RBE1/rbe1::FRT</i>	HLC67	diese Arbeit
MEC4	<i>ura3::1 imm434/ura3::1 imm434 efg1::hisG/efg1::hisG rbe1::URA3-FLIP/rbe1::FRT</i>	HLC67	diese Arbeit
MEC5	<i>ura3::1 imm434/ura3::1 imm434 efg1::hisG/efg1::hisG rbe1::FRT/rbe1::FRT</i>	HLC67	diese Arbeit
MEC6	<i>ura3::1 imm434/ura3::1 imm434 efg1::hisG/efg1::hisG RBE1::URA3-FLIP/rbe1::FRT</i>	HLC67	diese Arbeit
MEC8	<i>ura3::1 imm434/ura3::1 imm434 efg1::hisG/efg1::hisG RBE1::FRT/rbe1::FRT</i>	HLC67	diese Arbeit
MEC9	<i>RBE1/rbe1::SAT1-FLIP</i>	SC5314	diese Arbeit
MEC10	<i>RBE1/rbe1::FRT</i>	MEC9	diese Arbeit
MEC11	<i>rbe1::SAT1-FLIP /rbe1::FRT</i>	MEC10	diese Arbeit
MEC12	<i>rbe1::FRT/rbe1::FRT</i>	MEC11	diese Arbeit
MEC13	<i>RBE1::SAT1-FLIP/rbe1::FRT</i>	MEC12	diese Arbeit
MEC14	<i>RBE1::FRT/rbe1::FRT</i>	MEC13	diese Arbeit
MRC18	<i>RBT4/rbt4::SAT1-FLIP</i>	SC5314	diese Arbeit
MRC19	<i>RBT4/rbt4::FRT</i>	MRC18	diese Arbeit
MRC20	<i>rbt4::SAT1-FLIP /rbt4::FRT</i>	MRC19	diese Arbeit
MRC21	<i>rbt4::FRT/rbt4::FRT</i>	MRC20	diese Arbeit
MRC22	<i>RBT4::SAT1-FLIP/rbt4::FRT</i>	MRC21	diese Arbeit
MRC23	<i>RBT4::FRT/rbt4::FRT</i>	MRC22	diese Arbeit
MRC24	<i>rbt4::FRT/rbt4::FRT RBE1/rbe1::SAT1-FLIP</i>	MRC21	diese Arbeit
MRC25	<i>rbt4::FRT/rbt4::FRT RBE1/rbe1::FRT</i>	MRC24	diese Arbeit
MRC26	<i>rbt4::FRT/rbt4::FRT rbe1::SAT1-FLIP/rbe1::FRT</i>	MRC25	diese Arbeit
MRC27	<i>rbt4::FRT/rbt4::FRT rbe1::FRT/rbe1::FRT</i>	MRC26	diese Arbeit
MRC28	<i>rbt4::FRT/rbt4::FRT RBE1::SAT1-FLIP/rbe1::FRT</i>	MRC27	diese Arbeit
MRC29	<i>rbt4::FRT/rbt4::FRT RBE1::FRT/rbe1::FRT</i>	MRC28	diese Arbeit
MRC30	<i>RBT4::FRT/rbt4::FRT RBE1/rbe1::SAT1-FLIP</i>	MRC23	diese Arbeit
MRC31	<i>RBT4::FRT/rbt4::FRT RBE1/rbe1::FRT</i>	MRC30	diese Arbeit
MRC32	<i>RBT4::FRT/rbt4::FRT rbe1::SAT1-FLIP/rbe1::FRT</i>	MRC31	diese Arbeit
MRC33	<i>RBT4::FRT/rbt4::FRT rbe1::FRT/rbe1::FRT</i>	MRC32	diese Arbeit

MRC34	<i>RBT4::FRT/rbt4::FRT RBE1::SAT1-FLIP/rbe1::FRT</i>	MRC33	diese Arbeit
MRC35	<i>RBT4::FRT/rbt4::FRT RBE1::FRT/rbe1::FRT</i>	MRC34	diese Arbeit
MRC36	<i>ura3::1 imm434/ura3::1 imm434 RBE1/RBE1-GFP_N-term-URA3</i>	CAI4	diese Arbeit
MRC37	<i>ura3::1 imm434/ura3::1 imm434 RBE1/RBE1-GFP_C-term-URA3</i>	CAI4	diese Arbeit
MRC38	<i>ura3::1 imm434/ura3::1 imm434 RBT4/RBT4-GFP_N-term-URA3</i>	CAI4	diese Arbeit
MRC39	<i>ura3::1 imm434/ura3::1 imm434 RBT4/RBT4-GFP_C-term-URA3</i>	CAI4	diese Arbeit

„*URA3-FLIP*“ bzw. „*SAT1-FLIP*“ steht für die Integration der Deletionskassette, „*FRT*“ steht für die 34 bp lange Erkennungssequenz der *FLP*-Rekombinase der Plasmide pSFU1 und pSFS1/2, die nach Entfernen der Deletionskassette im Genom verbleibt

10 *Saccharomyces cerevisiae*-Stämme

Tab. 13. In dieser Arbeit verwendete und hergestellte *S. cerevisiae*-Stämme

Stamm	Genotyp	Quelle
INVSc1	<i>his3Δ1/his3Δ1 leu2/leu2 trp1-289/trp1-289 ura3-52/ura3-52</i>	Invitrogen
RSY1	<i>his3Δ1/his3Δ1 leu2/leu2 trp1-289/trp1-289 ura3-52/ura3-52 pYES2/CT</i>	diese Arbeit
RSY2	<i>his3Δ1/his3Δ1 leu2/leu2 trp1-289/trp1-289 ura3-52/ura3-52 pYES2/CT::RBE1</i>	diese Arbeit
RSY3	<i>his3Δ1/his3Δ1 leu2/leu2 trp1-289/trp1-289 ura3-52/ura3-52 pYES2/CT::RBT4</i>	diese Arbeit

11 Humane Zell-Linien

Tab. 14. Human-Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung	Quelle
A431	vulvo-vaginale Karzinom-Zelllinie (ATCC: CRL-1555)	(Giard <i>et al.</i> , 1973)
Caco-2	colorektale Adenokarzinom-Zelllinie (ATCC: HTB-37)	(Fogh <i>et al.</i> , 1977)
TR146	Plattenepithelkarzinom-Zelllinie	Imperial Cancer Research Technology, London, UK

12 Allgemeine Methoden

Standardtechniken der Molekularbiologie und Biochemie wurden nach den Protokollen von Ausubel *et al.* und Sambrook *et al.* durchgeführt (Ausubel *et al.*, 1989; Sambrook *et al.*, 1989).

12.1 Datenbanken und Datenverarbeitung

Die in dieser Arbeit verwendeten Gensequenzen entstammen dem Assembly 19 der *Candida* Genomdatenbank (<http://www.candidagenome.org>), sowie der Redundanz-freien Sequenz-Datenbank des *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), deren BLAST-Algorithmen (*Basic Local Alignment Search Tool*) auch für Sequenz- und Homologievergleiche unterschiedlicher DNA- und Proteinsequenzen, Identifikation struktureller Verwandtschaften, sowie für Genomanalysen verwendet wurden.

Homologievergleiche zweier Nukleotid- oder Aminosäuresequenzen erfolgten mit Hilfe des Programmes „*BLAST 2 Sequences*“ des NCBI (Tatusova and Madden, 1999) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/bl2seq/wblast2.cgi>).

Homologievergleiche mehrerer Sequenzen erfolgten mittels des Programmes „*ClustalW2*“ (Larkin *et al.*, 2007) (z.B.: <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2>).

Die Analyse von DNA-Sequenzen hinsichtlich möglicher Bindestellen von Transkriptionsfaktoren erfolgte mit Hilfe des Programmes „*MatInspector*“ (Cartharius *et al.*, 2005) (Genomatix GmbH; <http://www.genomatix.de>).

Die Analyse von Proteinsequenzen hinsichtlich konservierter funktioneller und struktureller Bereiche erfolgte mit folgenden Programmen:

- Signalsequenzen, Glykosylierungen und Transmembrandomänen: SignalP 3.0-, NetOGlyc 3.1- und TMHMM 2.0-Server des *Center for Biological Sequence Analysis* der TU Dänemark (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>; <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc>; <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM>, (Krogh *et al.*, 2001)).
- Sequenzen für das potentielle Anfüge eines Glykosylphosphatidylinositol- (GPI-) Ankers (ω -Spaltstelle) für die kovalente Verankerung in der Zellwand bzw. -membran: *big-PI Fungal Predictor*, http://mendel.imp.ac.at/gpi/fungi_server.html, (Eisenhaber *et al.*, 2004)
- konservierte Domänen: Prosite-Datenbank des *ExPASy Proteomics Server* (<http://www.expasy.ch/prosite>) (Gasteiger *et al.*, 2003; Hulo *et al.*, 2008)

Die Analyse von DNA-Sequenzen hinsichtlich geeigneter Oligonukleotidsequenzen für die PCR erfolgte soweit nicht anders angegeben mit Hilfe des „*Primer3*“-Programmes des *Whitehead Institute for Biomedical Research* (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/input.htm>).

DNA-Sequenzen wurden mit Hilfe des Programmes „Clone Manager 5“ (Scientific & Educational Software) für die Restriktionsanalyse untersucht.

Die Auswertung der Daten der real time-PCR erfolgte mittels der *LightCycler®480 Software* (Version 1.2 und 1.5, Roche Diagnostics).

DNA-Sequenzierungen wurden bei der Firma GATC Biotech, Konstanz, durchgeführt.

12.2 Kultivierung von Bakterienstämmen

Die Kultivierung von Bakterien erfolgte bei 37°C in Vollmedium (LB-Medium, Tab. 4). Festmedien enthielten eine Endkonzentration von 2% Agar. Die Selektion Plasmid-kodierter Antibiotika-Resistenz erfolgte in Gegenwart von 100 µg/ml Ampicillin bzw. 50 µg/ml Chloramphenicol. Dauerkulturen von Bakterien wurden in 50% Glycerin bei -80°C aufbewahrt.

12.3 Kultivierung von *C. albicans*

Wachstum als Blastosporen und Hyphen

C. albicans-Stämme wurden als Dauerkulturen in 30% Glycerin bei -80°C, bzw. kurzfristig auf Agarplatten bei 8°C gehalten. Vorkulturen wurden aus den jeweiligen Dauerkulturen in YPD-Medium (optional: 0,1 mM Uridin) angeimpft und bei 30°C über Nacht bei 180 Upm geschüttelt. Für das Wachstum in Induktionsmedium wurden die Kulturen 1:100 verdünnt bzw. zu einer optischen Dichte (OD₆₀₀) von 0,1 angeimpft. Für Blastosporen-Wachstum wurden die Zellen bei 30°C inkubiert, zur Induktion von Hyphen wurden die Stämme bei 37°C in Hyphen-induzierendem Medium kultiviert.

Herstellung von Hemi- bzw. Homozygotität bezüglich des Paarungs-Lokus und Wachstum als opaque-Zellen

- YNB-Sorbose-Medium:

Hefe-Stickstoff-Basis (YNB, Difco), ohne AS und (NH ₄) ₂ SO ₄	1,7 g/l
(NH ₄) ₂ SO ₄	5 g/l
L-Sorbose	20 g/l

Für das Wachstum in der *opaque*-Form wurde zunächst Hemizygotität für den Paarungs- (*MTL*-) Locus durch Wachstum auf Sorbose als Kohlenstoffquelle hergestellt. Dieses Medium selektiert für den Verlust einer Kopie von Chromosom 5, auf welchem sich der *MTL*-Locus befindet (Janbon *et al.*, 1998; Magee and Magee, 2000; Rustchenko *et al.*, 1994). Die betreffenden Stämme wurden dafür auf YNB-Sorbose-Medium (2% Agar) ausgestrichen und für etwa 7 Tage bei 37°C inkubiert. Kolonien, die nach dieser Zeit gewachsen waren, wurden

für 2 Tage bei 30°C auf YPD-Medium kultiviert. Größere Kolonien wurden nach dieser Zeit auf YPD-Medium subkultiviert. Man geht davon aus, dass bei Kolonien, die schneller wachsen, das verbleibende Chromosom 5 dupliziert ist und diese daher homozygot für den *MTL*-Lokus sind (Janbon *et al.*, 1998). Der Paarungstyp dieser Stämme (*MTLa* oder *MTL α*) wurde mittels PCR, die jeweils spezifische Gene des α - bzw. des Alpha-Lokus detektiert, sowie *Southern Blot*-Analyse untersucht (Oligonukleotide: Ca_MTLalpha2_for und Ca_MTLalpha2_rev für den *MTL*-Lokus *MTL α 2* (*ORF19.10708*) und CaMTLa1_for und CaMTLa1_rev für *MTLa1* (*ORF19.3201*); Sequenzen: Tab. 7; Daten nicht gezeigt).

Für die Gewinnung von *opaque*-Zellen wurden Stämme des Paarungstyps *MTLa* bzw. *MTL α* aus Dauerkulturen auf SC-Medium ausgestrichen und für 5 Tage bei Raumtemperatur kultiviert. Einzelne Kolonien dieser Stämme wurden in H₂O verdünnt und jeweils etwa 20 bis 30 Zellen auf SC-Medium (mind. 20 Platten) ausgestrichen und für 7 Tage wiederum bei Raumtemperatur kultiviert. Sektoren oder Kolonien von *opaque*-Zellen, die sich nach dieser Zeit gebildet hatten, wurden in flüssigem SC-Medium über Nacht bei Raumtemperatur geschüttelt, lichtmikroskopisch auf ihre Zellform hin untersucht und direkt für entsprechende Versuche verwendet, erneut auf SC-Medium vereinzelt oder nach Ernte durch Zentrifugation als Dauerkulturen bei -80°C aufbewahrt. Aus diesen Dauerkulturen können *opaque*-Kulturen durch Kultivierung auf bzw. in SC-Medium bei Raumtemperatur gewonnen werden.

12.4 Transformation

12.4.1 Transformation von *E. coli*

Die Transformation von *E. coli*-Stämmen erfolgte nach den Protokollen von Mandel und Higa sowie Cohen *et al.* (Cohen *et al.*, 1972; Higa and Mandel, 1970).

100 μ l chemisch kompetente *E. coli*-Zellen wurden auf Eis aufgetaut, 20 μ l eines Ligationsansatzes oder 1 μ l einer 1:1000-Verdünnung eines Plasmids zugegeben und 20 min auf Eis inkubiert. Dann erfolgte 1 min Hitzeschock bei 42°C und 5 min Inkubation auf Eis. Nach Zugabe von 900 μ l LB-Medium wurden die Zellen 45 min bei 37°C geschüttelt, 10 s abzentrifugiert und 900 μ l Flüssigkeit wieder abgenommen. Der Niederschlag wurde in der verbleibenden Flüssigkeit resuspendiert und auf einer LB-Agarplatte mit 100 μ g/ml Ampicillin und ausplattiert. Diese wurde über Nacht bei 37°C inkubiert.

12.4.2 Transformation von *C. albicans*

Elektroporation

Die Transformation von PCR-Produkten bzw. aus Plasmiden ausgeschnittener DNA-Kassetten in *C. albicans* erfolgte mittels Elektroporation nach dem Protokoll von Reuss (Reuss *et al.*, 2004).

Eine YPD-Vorkultur von *C. albicans* wurde 10^4 -fach in 50 ml YPD-Medium verdünnt und über Nacht bei 30°C geschüttelt. Die Zellen wurden bei einer OD_{600} zwischen 1,6 und 2,2 geerntet (2000 Upm für 5 min, Megafuge, Heraeus) und in 8 ml Wasser resuspendiert. Nach Zugabe von 1 ml TE-Puffer, pH 7,5 und 1 ml 1 M Lithiumacetat, pH 7,5 wurden die Zellen für 1 Stunde und nach Zugabe von 250 μ l 1 M DTT für weitere 30 min bei 30°C geschüttelt. Nach Zugabe von 40 ml H₂O wurden die Zellen wie oben bei 4°C zentrifugiert und anschließend mit 25 ml eiskaltem H₂O und 5 ml 1 M Sorbitol gewaschen. Nach Verwerfen des Überstandes wurden die kompetenten Zellen im verbleibenden Sorbitol resuspendiert. 40 μ l der Zellsuspension wurden in zuvor mit 0,5%-iger Natrium-Hypochloritlösung und 70% EtOH gewaschenen Küvetten für die Elektroporation überführt, 7,5 μ l und 15 μ l zu transformierende DNA zugegeben (etwa 0,75 μ g bzw. 1,5 μ g geschnittenes Plasmid bzw. das betreffende Volumen PCR-Produkt) und für 10 min auf Eis inkubiert. Nach der Elektroporation (MicroPulser™, Bio-Rad GmbH, München) wurden die Zellen in 1 ml eiskaltem 1 M Sorbitol aufgenommen, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, für 2 min bei 2000 Upm zentrifugiert (Biofuge, Eppendorf), in 1 ml YPD-Medium aufgenommen und für 4 Stunden bei 30°C inkubiert. Nach Zentrifugation wie oben wurden 900 μ l der Überstandes abgenommen, die Zellen in den verbleibenden 100 μ l resuspendiert und auf Selektionsmedium ausgestrichen. Nach Inkubation bei 30°C über Nacht, wurden Kolonien resistenter Zellen erneut auf Selektionsmedium ausgestrichen.

Lithium-Acetat-Methode

- 10-fach Lithiumacetat-Puffer: Lithiumacetat 1 M
 Tris HCl, pH 8,0 100 mM
 EDTA 10 mM
- 50% PEG 3350 (Sigma) (w/v) in 1-fach Lithiumacetat-Puffer

Bei Stämmen, die sich mittels Elektroporation nicht oder nur schwierig transformieren ließen, wurde eine modifizierte Lithium-Acetat-Methode für die Transformation verwendet (Braun and Johnson, 1997), wobei die Zellen nach Zugabe der zu transformierenden DNA über Nacht bei 30°C rotiert wurden.

Etwa 10 μ g der Transformationskassetten wurden für die Transformation mittels der Lithium-Acetat-Methode verwendet. Bei Verwendung von PCR-Produkten für die Transformation wurden 100 μ l PCR-Produkt direkt transformiert bzw. 500 μ l bis 1000 μ l PCR-Produkt vereinigt, mit Chloroform extrahiert, mit Ethanol gefällt, anschließend in 100 μ l H₂O oder TE-Puffer aufgenommen und der gesamte Ansatz für die Transformation verwendet.

10 ml YPD-Medium/0,5 mM Uridin wurden 1:100 mit einer Vorkultur angeimpft ($OD_{600nm} \sim 0,05$) und die Kultur bis zu einer OD_{600nm} von ca. 0,2-0,3 wachsen gelassen. Dann wurden die Zellen 2 min bei 836 x g (2000 Upm, Biofuge, Heraeus) zentrifugiert, der Niederschlag mit Lithiumacetat-Puffer gewaschen und die Zellen anschließend in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Es wurden 10 μ l denaturierte Salmon Sperm DNA, sowie die DNA für die

Transformation zugegeben und die Zellen für 30 min bei 30°C rotiert. Dann wurden 0,7 ml 50% PEG in Lithiumacetat-Puffer zugegeben und die Zellen über Nacht bei 30°C rotiert. Am nächsten Tag erfolgte Hitzeschock durch Inkubation der Zellen für 1 h bei 42°C im Wasserbad. Dann wurden die Zellen wie oben zentrifugiert, mit 1 ml TE-Puffer gewaschen, im Rest des verworfenen Überstandes aufgenommen und auf Selektionsmedium ausplattiert. Nach Inkubation bei 30°C für 3 bis 4 Tage wurden Kolonien transformierter Zellen erneut auf Selektionsmedium ausgestrichen.

12.5 Methoden für die Analyse von DNA

12.5.1 Klonierung

Für die Herstellung von Plasmiden wurden diese, sowie das zu inserierende DNA-Fragment (Insert) in jeweils 50 µl Gesamtvolumen mit Hilfe von Restriktionsenzymen über Nacht sowie am folgenden Tag noch einmal für 2 Stunden mit bis zu 16 U Enzym geschnitten. Die Reaktionen wurden bei 37°C inkubiert, soweit nicht anders vom Hersteller angegeben.

Dephosphorylierung der Plasmide erfolgte durch Zugabe von 10 U Phosphatase (Antarctic Phosphatase, NEB) für 2 Mal 20 min bei 37°C. Die Ansätze wurden dann mittels QIAquick® PCR Purification Kit (Qiagen) aufgereinigt.

Die Ligation erfolgte mit 3 U T4-DNA-Ligase in einem Volumen von 20 µl, mit einem molaren Verhältnis von ca. 1:1 und 1:10 freien Enden von Vektor zu Insert. Die Ligation wurde über Nacht bei 8°C inkubiert und dann in kompetente *E. coli*-Zellen transformiert (siehe dort). Zur Kontrolle der Ligationsprodukte wurden die wieder aus *E. coli* isolierten Plasmide für 2 Mal 2 Stunden mit denselben Enzymen geschnitten, die für die Konstruktion des Produktes verwendet wurden, um das Insert wieder herauszuschneiden. Das Ergebnis dieser Spaltung wurde mittels Gelelektrophorese überprüft (s. unten).

12.5.2 Plasmid isolation aus *E. coli*

Plasmid isolation aus *E. coli* erfolgte entweder im Mini- (5 ml Bakterienkultur, über Nacht inkubiert bei 37°C; QIAprep® Spin Miniprep Kit) oder Midimaßstab (50 ml Bakterienkultur, über Nacht inkubiert bei 37°C; Macherey-Nagel Nucleobond PC 100 Plasmid-Isolationskit). Die erhaltene Plasmid-DNA wurde in 50 bzw. 200 µl mikrobiologisch reinem Wasser aufgenommen und bei -20°C aufbewahrt.

12.5.3 Präparation genomischer DNA aus *C. albicans*

Die Isolierung chromosomaler DNA aus *C. albicans* erfolgte nach dem Protokoll von Hoffman und Winston (Hoffman and Winston, 1987).

10 ml einer Übernachtskultur von *C. albicans* wurden in 15 ml PP-Röhrchen 2 min bei 1000 x g (2000 Upm, Heraeus Megafuge 1.0) zentrifugiert und der Zelniederschlag in 0,5 ml Wasser gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen für den Zellaufschluss in 0,3 ml Hefe-Lysispuffer (100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 8,0, 1mM EDTA, 2% (v/v) Triton X-100, 1% (w/v) SDS) aufgenommen, diese Suspension in ein 2,0 ml Reaktionsgefäß (Safe-Lock, Eppendorf) überführt und dazu etwa 0,3 g Glasperlen (\varnothing : 0,25 – 0,5 mm) und 0,3 ml Roti[®]-Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) zugegeben. Der Aufschluss erfolgte durch stark einwirkende Scherkräfte während des 15 min Mischvorgangs (Vortexen) der Suspension bei 7°C. Anschließend werden die Zelltrümmer für 10 min bei 16060 x g in der Kühlzentrifuge (13000 Upm, Heraeus Biofuge Fresco) bei 4°C pelletiert und der Überstand für die Fällung der Nukleinsäuren in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß (Safe-Lock, Eppendorf) überführt. Nach Zugabe von 1 ml 100% Ethanol (-20°C) wurde die Probe gut gemischt und für mind. 1 h bei -20°C inkubiert. Präzipitierte DNA wurde für 15 min bei 16060 x g (13000 Upm, Heraeus Biofuge Fresco) bei 4°C pelletiert. Zur Degradation der noch vorhandenen RNA wurde der Niederschlag anschließend in 0,4 ml TE-Puffer resuspendiert, mit 30 µg RNaseA (Roche) versetzt. Nach 5 min Inkubation bei 37°C wurde die genomische DNA durch Zugabe von 1 ml 100%-igen Ethanol (-20°C) erneut gefällt, zentrifugiert (s.o.) und zur Entfernung noch vorhandener Salze mit 1 ml 70% EtOH (-20°C) gewaschen. Die niedergeschlagene DNA wurde für etwa 5 min bei 37°C luftgetrocknet, in 100 µl molekularbiologischem Wasser aufgenommen und für ein vollständiges Lösen für 5 min bei 65°C inkubiert.

DNA-Konzentrationen wurden photometrisch mittels Messung der Extinktion bei 260 nm (E_{260}) bestimmt. Die Berechnung der DNA Konzentration erfolgte mit einem Umrechnungsfaktor von 50 µg/ml (DNA) bzw. 40 µg/ml (RNA) für eine Extinktion von 1,0.

Zur Reinheitsbestimmung wurde der Quotient aus E_{260}/E_{280} bestimmt. Für eine ausreichende Reinheit sollte der Quotient zwischen 1,8 und 1,9 (DNA) bzw. zwischen 1,9 und 2,0 (RNA) liegen.

12.5.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

- 10-fach PCR-Puffer (NEB)
- dNTPs (Fermentas, 100 mM)
- MgCl₂ (50 mM) (Gibco Life Technologies)

Die selektive Amplifikation von DNA-Fragmenten erfolgte über Polymerase - Kettenreaktion (PCR). Die PCR-Ansätze enthielten standardmäßig ca. 200 ng genomische DNA (Plasmide: ca. 10 ng), 1-fach PCR-Puffer, 75 pmol MgCl₂, 1 pmol jedes Desoxy-Ribonukleotids, 20 pmol jedes Oligonukleotids und 20 U *Taq* DNA-Polymerase in einem Volumen von 50 µl.

Der Programmablauf war generell: 5 min bei 95°C denaturieren der Matrizen-DNA, dann 30 Zyklen von 1 min Denaturierung 95°C, 1 min Hybridisierung der Oligonukleotide, Elongation der Oligonukleotide durch die *Taq* DNA-Polymerase bei 72°C. Ein anschließender Elon-

gationsschritt bei 72°C für 5 min sollte das Auffüllen noch vorhandener Lücken gewährleisten.

Die Hybridisierungs-Temperatur für die jeweilige Reaktion wurde etwa 2°C unter der niedrigsten Schmelztemperatur der verwendeten der Oligonukleotide gewählt. Die Elongationszeit wurde der Länge des zu amplifizierenden DNA-Fragmentes angepasst. Dabei wurde von einer Synthesegeschwindigkeit der DNA-Polymerase von etwa 1000 Nukleotiden pro Minute ausgegangen.

Kolonie-PCR

Zur direkten Überprüfung von Transformanten ohne vorherige DNA-Isolation wurde eine PCR direkt aus *C. albicans*- bzw. *E. coli*-Zellen durchgeführt. Hierfür wurden Zellen in das PCR-Reaktionsgefäß übertragen, das oben beschriebene Reaktionsgemisch zugegeben und – zum Aufschluss der Zellen – der erste Denaturierungsschritt auf 10 min verlängert.

Chloroformextraktion von PCR-Produkten

Größere Volumen PCR-Produkte wurden mit Chloroform extrahiert, um ihre Konzentration zu erhöhen. Die PCR-Produkte wurden dafür in Falcon-Gefäße überführt (15 ml, Greiner Bio-One), mit einem gleich großen Volumen Chloroform versetzt und anschließend für 1 min mit dem Vortexer gemischt. Nach Zentrifugation bei etwa 3800 x g für 5 min (Heraeus Megafuge) wurde der Überstand in ein Corex-Zentrifugenröhrchen überführt und auf Eis gekühlt. Anschließend wurde die enthaltene DNA durch Zugabe des 2,5-fachen Volumens an 100% EtOH, -20°C, für 15 min bei -20°C präzipitiert. Die DNA wurde durch Zentrifugation für 20 min bei etwa 12.000 x g, 4°C, (Beckman J2-21) pelletiert und anschließend in H₂O resuspendiert.

12.5.5 Nachweis spezifischer DNA-Sequenzen über *Southern Blot*-Analyse

- 6-fach DNA-Ladepuffer: 0,25% Bromphenolblau
0,25% Xylencyanol
30% Glycerin in Wasser
- Größenstandard: 2-Log DNA Leiter (0.1–10.0 kb; NEB)
- Depurinierungspuffer: 0,25 M HCl
- Denaturierungspuffer: 1,5 M NaCl
0,5 M NaOH
- Neutralisierungspuffer: 1,5 M NaCl
0,5 M Tris-HCl, pH 7,0

Die genomische Konstitution von *C. albicans*-Stämmen wurde mittels *Southern Blot*-Analysen überprüft. Etwa 10 – 15 µg genomischer DNA wurden über Nacht mit bis zu 20 U Restriktionsenzym und am nächsten Tag noch einmal für 2 h mit 50%-80% der

- 5'-[α -³²P]-dCTP (Hartmann Analytic GmbH, Braunschweig)
- PRIME-IT[®] II Random Primer Labeling Kit (Stratagene)
- 1-fach SSC-Puffer, 0,1% SDS (w/v)

Die Herstellung radioaktiv markierter DNA-Fragmente erfolgte mittels des PRIME-IT[®] II Random Primer Labeling Kits (Stratagene). Etwa 5 μ l der entsprechenden Amplifizierungs-Reaktion wurden mit 5 μ l 9mer-Oligonukleotiden in 20 μ l Gesamtvolumen für 5 min bei 95°C inkubiert und auf Eis abgekühlt. Die Markierung der Fragmente erfolgte nach Zugabe von 5 μ l dCTP-Puffer und 25 μ Ci 5'-[α -³²P]-dCTP mittels 5 U Exo(-) Klenow-Enzym für 10 min bei 37°C. Nicht eingebaute Nukleotide wurden mittels Sephadex-Chromatographie (ProbeQuant[™] G-50 Micro Columns, GE Healthcare) abgetrennt. Die Hybridisierung der markierten DNA-Fragmente an die auf der Nylonmembran fixierten genomischen DNA-Fragmente erfolgte nach Inkubation der Nylonmembran für 1 Stunde bei 65°C mit ca. 15 ml Church-Puffer in 10 ml Church-Puffer über Nacht bei 65°C. Nach Waschen der Membran mit zwei Mal 15 ml 1-fach SSC-Puffer / 0,1% SDS (w/v) sowie ein Mal mit 0,1-fach SSC-Puffer/1% SDS (w/v) für 15 min bei 65°C erfolgte die Auswertung anhand filmloser Autoradiografie (MS Phosphorbildplatten (Fujifilm), Fluoreszenz-Laser-Scanner FLA-5100 (Fuji)).

12.6 Methoden für die Analyse von RNA

12.6.1 Isolierung von Gesamt-RNA aus *C. albicans*

Für die Gewinnung von RNA wurden die entsprechenden *C. albicans*-Stämme unter den Wachstumsbedingungen von Interesse angezogen und zum gewünschten Zeitpunkt mittels Zentrifugation geerntet (Heraeus Megafuge, 50 ml Falcon Tubes; Blastosporen: 2 min, ca. 800 x g; *opaque*-Zellen, Hyphen: 5 min, ca. 3300 x g). Nach Dekantieren des Überstandes wurden die Zellen im verbliebenen Medium resuspendiert und tropfenweise in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die so gewonnenen Zellperlen wurden bei -80°C gelagert.

Der Aufschluss tiefgefrorener Zellen von *C. albicans* erfolgte mechanisch mit einer Labor-Schwingmühle (Retsch, Typ MM 200) mittels Wolframkarbidkugeln für 2 min bei 30 Schwingungen/s. Die Wolframkarbidkugeln und die Teflon-Behälter für den Aufschluss wurden zunächst mit 0,5% Na-Hypochlorit und EtOH, 70%, gewaschen. Die Zellen und die Behälter wurden vor dem Aufschluss mit flüssigem Stickstoff gekühlt. Die anschließende RNA-Isolation erfolgte mittels des *RNeasy*[®] *Mini* bzw. *Midi Kits* (Qiagen) nach den Angaben des Herstellers. Die so gewonnene RNA wurde bei einer Konzentration von 2 M Lithiumchlorid über Nacht bei -20°C präzipitiert, gewaschen (70% EtOH), in RNase-freiem Wasser aufgenommen, aliquotiert und bei -80°C aufbewahrt. Die Konzentration der so gewonnenen RNA-Proben wurde mittels des *RNA 6000 Nano Kits* (Agilent Technologies) mit Hilfe des *Agilent 2100 Bioanalyzers* bestimmt.

12.6.2 Nachweis spezifischer RNA-Sequenzen über *Northern Blot*-Analyse

- 10-fach MOPS-Puffer: 3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure 200 mM
(pH 7,0) Na-Acetat 80 mM
EDTA 10 mM
(mit DEPC-H₂O ansetzen, vor Licht schützen)
- Farbstoffkomponente des RNA-Ladepuffers: Xylencyanol 0,25 % (w/v)
(in DEPC-H₂O ansetzen) Bromphenolblau 0,25 % (w/v)
EDTA, pH 8,0 1 mM
Glycerin 50 % (w/v)
- RNA-Ladepuffer: 10-fach MOPS-Puffer 3 µl
Formaldehyd (12,3M) 5,5 µl
Formamid 15 µl
Farbstoffkomponente 5 µl
H₂O 1,5 µl

Kontaminationen mit RNasen in den verwendeten Lösungen wurden durch Versetzen des verwendeten Wassers mit 0,1% (v/v) Diethylpyrocarbonat (DEPC), bei dem es sich um einen starken RNase-Inhibitor handelt, vermieden.

10 – 15 µg RNA wurden in einem denaturierenden 1%-igen Agarosegel entweder für 4 – 5 h bei 40 Volt, 400 mA oder für 16 h bei 12 Volt, 400 mA, elektrophoretisch aufgetrennt.

Denaturierendes Agarosegel:

1 g Agarose wurde in 72 ml DEPC- H₂O aufgeköcht und in einem Wasserbad auf 65°C abgekühlt. Daraufhin wurden (im Abzug) 10 ml 10-fach MOPS-Puffer, 18 ml 12,3 M Formaldehyd und 1,5 µl (für 5 h Laufdauer) bzw. 3 µl (für 16 h Laufdauer) Ethidiumbromid zugegeben und die Gellösung in eine zuvor mit RNase-ZAP (Sigma) gereinigte Gelkammer gegossen. Nach Erhärten des Gels wurde die Kammer in einen ebenfalls mit RNase-ZAP gereinigten Laufbehälter platziert und mit 1-fach MOPS-Puffer überschichtet.

Probenvorbereitung:

10 – 15 µg RNA in 10 µl Volumen wurden mit 30 µl Ladepuffer versetzt und zur Denaturierung für 15 min bei 55°C inkubiert. Die Proben wurden anschließend 10 s zentrifugiert und auf das Gel aufgetragen.

Qualitätsüberprüfung:

Die Qualität der präparierten RNA und deren Auftrennung im Gel wurden durch Fotografieren des Gels während UV-Belichtung überprüft. Als interne Marker dienten die durch Einlagerung von Ethidiumbromid sichtbaren Fraktionen der 28S- und der 18S-rRNA, die eine theoretische Größe von 4718 bzw. 1874 Nukleotiden aufweisen.

Die RNA aus dem Agarosegel wurde mittels Kapillarblot auf eine Nylonmembran (Hybond-N, GE Healthcare) transferiert. Als Transferpuffer diente 20-fach SSC-Puffer.

Der Transfer und die kovalente Bindung der RNA auf die Nylonmembran erfolgten unter denselben Bedingungen wie für die *Southern Blot*-Analyse (siehe dort). Bei Bedarf kann die Membran nach Einschweißen in UV-durchlässige Plastikfolie bei -80°C aufbewahrt werden.

Die Hybridisierung radioaktiv markierter DNA-Fragmenten sowie die anschließende Auswertung erfolgten analog zum *Southern Blot*-Verfahren (Kap. 12.5.5).

Oligonukleotide für die Sondenherstellung für die *Northern Blot*-Analyse der Expression der 5 PRY-Familienmitglieder in *C. albicans* wurden so gewählt, dass sie außerhalb der PR-Domäne hybridisieren und sind in Tabelle 7 zu finden.

(*RBE1*: RBE1_ORF_for_No und RBE1_ORF_rev_No, *RBT4*: RBT4_a_ORF_for_No und RBT4_a_ORF_rev_No, *ORF19.6200*: CaPRY1_a_ORF_for_No und CaPRY1_a_ORF_rev_No, *ORF19.2787*: CaPRY2_a_ORF_for_No und CaPRY2_a_ORF_rev_No, *ORF19.2336*: CaPRY3_ORF_for_No und CaPRY3_ORF_rev_No). Für die Normalisierung der aufgetragenen RNA-Mengen wurde die Expression des Actin-Gens unter den jeweiligen Bedingungen verwendet (Oligonukleotide: act1_for und act1_rev, Tab. 7).

12.6.3 Nachweis spezifischer mRNA-Sequenzen über quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR)

Die Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (*real-time PCR*, RT-PCR) beruht auf der herkömmlichen Polymerasekettenreaktion (PCR), erlaubt aber die Quantifizierung der vervielfältigten DNA durch Fluoreszenz-Messungen, die während jedes PCR-Zyklus – d.b., in Echtzeit – vorgenommen werden.

Relative und absolute Quantifizierungen in komplementäre DNA (cDNA) umgeschriebener RNA-Transkripte wurden mit Hilfe des Light Cycler® 480 Instruments (Roche) und der beiliegenden Software durchgeführt.

Synthese komplementärer DNA (cDNA)

500 ng bzw. 1000 ng RNA wurden für die Synthese der komplementären DNA mittels des *Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Sample Kit* (Roche) verwendet. Dafür wurde die RNA zunächst in Gegenwart der im Kit enthaltenen *Anchored Primer* für 10 min bei 65°C denaturiert. Die Synthese der komplementären DNA erfolgte in $20\mu\text{l}$ Reaktionsvolumen für 30 min bei 50°C , mit einem anschließenden Denaturierungsschritt von 5 min bei 85°C . Die so gewonnene komplementäre DNA wurde bei -20°C aufbewahrt.

Geeignete Kombinationen von Sonden und Oligonukletiden für die zu untersuchenden Gene wurden mit Hilfe des *Universal ProbeLibrary Assay Design Center* (<https://www.roche-applied-science.com>) erstellt (Tab. 15). Die dafür benötigten Oligonukleotide stammen von der Firma TIB Molbiol, Berlin.

Standardkurven für die Kinetiken der Amplifikation der untersuchten Gene wurden mittels Verdünnungsreihen der entsprechenden komplementären DNA für 5 Messpunkte

(Verdünnung zw. $0,5 \times 10^0$ und 1×10^{-3}) in Triplikaten oder Duplikaten mit Hilfe der *LightCycler®480 Software* erstellt.

Quantitative RT-PCR (qRT-PCR) erfolgte in 20 µl Reaktionsvolumen mit jeweils 4 pmol (200 nM) Oligonukleotid in 1-fach *Light Cycler® 480 Probes Master* und 2 µl einer Verdünnung der komplementären DNA (1:5, 1:10 oder 1:20) in Triplikaten oder Duplikaten in 96 well-Platten. Hydrolysisierungs sondens des *Universal ProbeLibrary Set, Human* (UPL-Sonden 1 – 90) sowie des *Universal ProbeLibrary Extension Set* (UPL-Sonden 91 – 165) der Firma Roche wurden in einer Endkonzentration von 200 nM verwendet.

Das Protokoll für die qRT-PCR war: 95°C für 5 min, 55 Zyklen von 95°C für 10 s, 60°C für 15 s und 72°C für 1 s mit einem abschließenden Kühlungsschritt von 40°C für 30 s. Als Negativkontrolle wurden die entsprechenden Reaktionen mit Wasser statt komplementärer DNA als Vorlage durchgeführt.

Tab. 15. Oligonukleotide und Sonden der *Universal Probe Library* (UPL; Roche) für die RT-PCR

Gen	Oligonukleotid links (5' → 3')	Oligonukleotid rechts (5' → 3')	UPL-Sonden-Nr.
<i>OP4</i> *	GCTGCCGAATACTTGAGTGA	AGTTTGAACAATCCAAGAAAGGA	139
<i>WORI</i> *	CACACTGTAATAGAAAATAAACCATCG	TCGATGCTGGAATAACATTTGA	148
<i>CZFI</i> *	ACAGAGAAGCGGCGATAAAC	TTGCTGGTACAATGGTTGTTG	62
<i>SAPI</i> *	GGTGCTTCAATCACAAGCA	CCCTTGAGGAATAGAAGTCTTGG	140
<i>EFG1</i> #	CCAGCAAACAATTCTAATCAA	TTAGATCCATTGTAATGCTGAGGT	76
<i>ALS2</i> #	GGAGGTACCGATACGGTTATCAT	ACTCGGTTGTTGTAAGTGTGG	149
<i>RBE1</i>	TGTCACCCAAACTAGTCAAACC	TGTTTTGGTGGAGCTGAATAAA	49
<i>RBT4</i>	CACCCAGACTCGTGGTGTTA	GACAGTTGCACCAACGGTAA	87
<i>ORF19.2787</i>	TCTGGATTTGGCTCTGGTTC	TGTTGTTGGATGATTGTGGAA	129
<i>ORF19.6200</i>	CCAGAATCAAAACCAAAGTCG	TTGTACTGGTGATGGTGATTGAA	102
<i>ORF19.2336</i>	AAATATGGAGAGAATTTAGCTTTTGG	TCCCCTTCATCATACCAAGC	113
<i>ENO1</i>	GTAACGTCGGTGACGAAGGT	CCAAAGCTTCCTTTGGAGTTT	50
<i>RDN18</i>	CCTTAACGAGGAACAATTGGA	TACGCTTTTGGAGCTGGAAT	66

*: *opaque*-spezifische Gene, #: *white*-spezifische Gene

Für relative Quantifizierungen der komplementären DNA-Menge eines bestimmten Genes in 2 unterschiedlichen Proben diente das Gen *ENO1* als – nicht-regulierte – Referenz für die Normalisierung der komplementären DNA-Mengen der verwendeten Proben. Dessen Amplifikation wurde jeweils im selben Experiment zu denselben beiden Bedingungen wie für die unbekanntenen Proben vorgenommen. Bei einer relativen Quantifizierung werden die Konzentrations-Verhältnisse der zu untersuchenden spezifischen DNA-Sequenz (Zielsequenz) zu einer Referenz-DNA (hier: *ENO1*, *RDN18*) unter 2 verschiedenen Bedingungen miteinander verglichen. Das Ergebnis der relativen Quantifizierung wird als das normalisierte

Verhältnis dieser beiden Konzentrations-Verhältnisse dargestellt, gibt also das Konzentrations-Verhältnis der DNA von Interesse (der Zielsequenz) in Bedingung 1 gegenüber Bedingung 2, bereinigt von Proben-internen Konzentrations-Unterschieden, an.

12.7 Methoden für die Analyse von Proteinen

12.7.1 Gewinnung von Rohextrakten aus Hefe

• 1-fach PGSK-Puffer (1 Liter):	NaH ₂ PO ₄	3,3 mM	(0,515 g)
	Na ₂ HPO ₄	49,4 mM	(8,88 g)
	NaCl	48,4 mM	(2,83 g)
	KCl	4,9 mM	(0,372 g)
	Glukose	61 mM	(11 g)

Für die Isolation zytosolischer, löslicher Proteine wurden Zellen von 10 ml Hefekultur durch Zentrifugation geerntet, in dem 10-fachen Volumen PGSK-Puffer gewaschen und in einem 1-fachen Volumen PGSK-Puffer aufgenommen. Es wurde das ebenfalls 1-fache Volumen an Gasperlen (0,25 – 0,5 mm Durchmesser) zugegeben. Die Zellen wurden mit Hilfe des Vortexers für 2 Mal 5 min in Gegenwart von Protease-Inhibitoren (Complete, Roche Diagnostics) bei 8°C aufgeschlossen. Zwischen den Aufschlüssen wurden die Ansätze für 5 min auf Eis gekühlt. Nicht-lösliche Komponenten wurden durch Zentrifugation abgetrennt (etwa 2000 x g, 10 min, 4°C). Die Überstände wurden in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und erneut zentrifugiert. Die Proteinkonzentration einer 1:10-Verdünnung der Präparationen wurde nach Bradford bei 595 nm in einem Photometer (Beckman DU-62) unter Verwendung des Bradford-Reagenz (Bio-Rad) anhand einer BSA-Eichkurve bestimmt.

12.7.2 Trichloressigsäure-Präzipitation von Proteinen

- Stammlösung: 100% Trichloressigsäure (TCA) in H₂O_{bidest}, aufbewahrt bei -20°C

Zu fällende Proteinproben wurden mit 100% (v/v) TCA auf eine Endkonzentration von 10% TCA versetzt und 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Proben für 15 min bei 4°C bei Höchstgeschwindigkeit zentrifugiert (Bsp.: Eppendorf Biofuge: 13.000 Upm = 16.060 x g). Der Überstand wurde verworfen und die präzipitierten Proteine mit 100% Aceton, -20°C gewaschen, kurz mittels Vortexer gemischt, für 5 min auf Eis gestellt und erneut wie oben zentrifugiert. Nach Abnehmen des Überstandes wurden die pelletierten Proteine für 5 min bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend in dem gewünschten Puffer aufgenommen.

12.7.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) von Proteinen

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) erfolgte nach (Laemmli, 1970) und (Sambrook *et al.*, 1989) unter Verwendung des Mini-PROTEAN® II Elektrophoresesystems (Bio-Rad, München).

- 4-fach Laemmli-Puffer (Probenpuffer):

Tris-Cl, pH 8,0	40 mM
EDTA	4 mM
SDS	4% (w/v)
Glycerin	40% (v/v)
2-Mercaptoethanol	20%
Bromphenolblau	

aliquotieren: 1ml, aufbewahren bei -20°C
- 4-fach Trenngel-Puffer:

Tris-Cl, pH 8,8	1,5 M
SDS	0,4% (w/v)
- 4-fach Sammelgel-Puffer:

Tris-Cl, pH 6,8	0,5 M
SDS	0,4% (w/v)
- Acrylamid-/Bisacrylamid-Lösung 37,5 : 1, 30% (Bio-Rad)
- Ammoniumpersulfat-Lösung (APS), 10%
- TEMED (Tetramethylethyldiamin; Bio-Rad)
- 10-fach Elektrophorese-Puffer:

Tris	250 mM
Glycin	1,92 M
SDS	1% (w/v)
- Größenstandards: BenchMark™ Protein Ladder, BenchMark™ Pre-Stained Protein Ladder (Invitrogen)

Tab. 16. Zusammensetzung der Trenngele für die SDS-PAGE (für jeweils 2 Trenngele)

	Acrylamid-/Bisacrylamid-Konzentration				
	4%	8%	10%	12%	16%
H ₂ O	7,4 ml	5,8 ml	5 ml	4,2 ml	2,6 ml
Trenngel-Puffer	3 ml	3 ml	3 ml	3 ml	3 ml
Acrylamid-/Bisacrylamid-Lösung (30%)	1,6 ml	3,2 ml	4 ml	4,8 ml	6,2 ml
APS, 10%	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
TEMED	14 µl	14 µl	14 µl	14 µl	14 µl

- Zusammensetzung für 2 Sammelgele (4%-ig): 3,03 ml H₂O, 1,25 ml Sammelgel-Puffer, 665 µl Acrylamid-/Bisacrylamid-Lösung, 50 µl APS (10%), 5 µl TEMED

Die Komponenten für die Polyacrylamid-Gele wurden in 15 ml-PP-Röhrchen durch mehrfaches invertieren gemischt. Die Zugabe der Ammoniumpersulfat-Lösung erfolgte dabei zuletzt. Jeweils 5 ml der Trenngel-Lösung wurden nach Reinigung aller Komponenten der Apparatur für das Gießen der Gele mit 70% EtOH und Zusammenbau zwischen zwei Glasscheiben gegossen und mit Wasser gesättigtem Isopropanol überschichtet. Die Geldicke betrug 1 mm. Nach Polymerisierung des Trenngels wurde dieses mit der Sammelgel-Lösung überschichtet und der Kamm für die Taschenbildung eingesetzt.

Nach Zusammenbau der Elektrophorese-Apparatur wurde 1-fach Elektrophorese-Puffer eingefüllt, bis die Gele überschichtet waren. Proteinproben wurden in einem Gesamtvolumen von 25 µl mit Probenpuffer versetzt, für 3 min bei 95°C denaturiert und anschließend aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 150 V bei konstanter Spannung für etwa 60 min (bis die Bromphenolblau-Bande des Probenpuffers aus dem Gel läuft).

12.7.4 Färbung von Proteinen

Färbeschritte erfolgten auf einem Orbitalschüttler bei 20 bis 30 Upm bei Raumtemperatur.

Silberfärbung (nach http://www.expasy.ch/ch2d/protocols/protocols_fm4.html)

- Fixierlösung I: Ethanol:Essigsäure:H₂O (40:10:50)
- Fixierlösung II: Ethanol:Essigsäure:H₂O (5:5:90)
- Inkubationslösung I: 0,5 M Natriumacetat, 1% Glutaraldehyd (v/v)
- Inkubationslösung II: 0,05% Naphthalin-Disulfonsäure (w/v) in H₂O
- Silbernitratlösung (40 ml für 1 Minigel): 0,32g AgNO₃ in 3 ml H₂O lösen (Endkonz.: 0,8% w/v); mischen mit 10 ml Lösung aus 0,5 ml Ammoniak (25%), 8,7 ml H₂O und 800 µl 10 N NaOH; mit H₂O auf 40 ml auffüllen
- Entwicklungslösung: 0,01% Natriumcitrat (w/v), 0,1% Formaldehyd (v/v)
- Stopplösung: 5% Tris (w/v), 2% Essigsäure (v/v) in H₂O

Nach der Elektrophorese wurden die Proteine in den Polyacrylamidgelen für 1 h in Fixierlösung I, anschließend für 2 h oder über Nacht in Fixierlösung II fixiert. Nach Waschen mit H₂O für 2 Mal 5 min wurden die Gele für 30 min in Inkubationslösung I transferiert und 2 Mal für 5 min in H₂O gewaschen. Für eine homogene, dunkle Färbung wurden die Gele anschließend für 2 Mal 30 min in Inkubationslösung II inkubiert, 4 Mal für 5 min in H₂O gewaschen und für 30 min in Silbernitratlösung inkubiert. Nach 2 Waschschritten mit H₂O erfolgte die Entwicklung in Entwicklungslösung, welche nach Augenschein bei guter Färbung mittels Transfer in Stopplösung abgestoppt wurde (i.d.R. nach 1 bis 5 min). Nach zweimaligem Waschen mit H₂O wurden die Gele zwischen 2 Plastikfolien geschützt gescannt und auf Filterpapier bzw. zwischen 2 zuvor gewässerten Zellophanfolien getrocknet (Bio-Rad Gel Dryer, Model 583; 65°C für 1,5 Stunden bzw. 80°C für 1 Stunde).

Coomassie-Färbung

- Färbelösung: 25% Isopropanol, 10% Essigsäure (v/v), 0,1% Coomassie Brilliant Blau R 250 in H₂O; gefiltert
- Entfärbelösung: 25% Isopropanol, 10% Essigsäure (v/v) in H₂O

Polyacrylamidgele wurden für 2 h bei Raumtemperatur in Färbelösung inkubiert, 2 bis 3 Mal gewässert, für 3 Mal 20 min in Entfärbelösung inkubiert und erneut 2 bis 3 Mal gewässert. Scannen und trocknen erfolgte wie für die Silberfärbung beschrieben.

Fluoreszenzfärbung

Die Polyacrylamidgele wurden für mind. 3 h oder über Nacht bei Raumtemperatur lichtgeschützt in 50 ml Färbelösung (SYPRO® Ruby Proteingel Färbelösung (Bio-Rad)) geschüttelt und anschließend für 30 min in Entfärbelösung (10% EtOH, 7% Essigsäure in H₂O) inkubiert. Nach Waschen in H₂O wurden die Gele nach Anregung mit UV-Licht mit einer CCD-Kamera dokumentiert (Prototyp „Camilla“, Raytest, Straubenhardt).

12.7.5 Nachweis spezifischer Proteine über *Western Blot*-Analyse

Für *Western Blot*-Analysen wurden die Proteine in Polyacrylamidgelen nach der Elektrophorese mittels Elektroblothing (Trans-Blot® Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell, Bio-Rad) auf eine PVDF-Membran (Immobilon P, Porengröße 0,45 µm, Millipore) übertragen. Die PVDF-Membran wurde dafür für 30 s in Methanol und anschließend zusammen mit Filterpapieren entsprechender Größe für 2 min in Towbin Transferpuffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20% Methanol) äquilibriert, luftblasenfrei mit dem Polyacrylamidgel in der Blot-Apparatur aufgebaut und die Proteine anschließend für 1 h mit 2,5 mA/cm² Gel transferiert.

Anschließend wurde die PVDF-Membran mit Ponceau S-Färbung auf die Übertragung der Proteine hin überprüft und freie Bindestellen mittels Inkubation in PBS-Puffer mit 5% Magermilchpulver durch langsames Schütteln für 1 h bei Raumtemperatur bzw. bei 8°C über Nacht blockiert. Anschließend wurde die Membran 3 Mal für 5 min mit PBST-Puffer gewaschen.

Für die Detektion wurden Antikörper gegen die entsprechenden Proteine oder Protein-Markierungen in PBST-Puffer mit 1% BSA verdünnt und für 1 h bei Raumtemperatur mit der PVDF-Membran inkubiert. Die Membran wurde wie oben gewaschen, für eine halbe Stunde mit einem Sekundär-Antikörper-Peroxidase-Konjugat, welcher ebenfalls in PBST-Puffer mit 1% BSA verdünnt wurde (i.d.R. 1:10.000), inkubiert und erneut gewaschen. Die Membran wurde mit Luminol entwickelt (ECL Plus Western Blotting Detection Reagents, Amersham Biosciences) und die dabei entstehende Chemilumineszenz mit einer CCD-Kamera dokumentiert (LAS-1000plus, Fujifilm). Die Belichtungszeiten betragen je nach Probe 1s bis 30s.

13 Spezielle Methoden

13.1 Promotoranalyse *RBE1*

Für Reporterstudien wurden Varianten des Plasmids pAU36 (Uhl and Johnson, 2001a) hergestellt, welches ein für die Verwendung in *C. albicans* optimiertes *lacZ*-Gen von *Streptococcus thermophilus* für das Enzym β -Galaktosidase enthält (s. Anhang).

Plasmid für die Positivkontrolle

- Oligonukleotide für die Amplifikation des *RP10*-Gens aus Plasmid pCaEXP (Care *et al.*, 1999): RP10_for_KpnI und RP10_rev_KpnI (Tab. 7)
- Oligonukleotide für die Überprüfung der Orientierung des *RP10*-Gens in den Ligationsprodukten: RP10_for_KpnI bzw. RP10_rev_KpnI und in der Plasmidsequenz hybridisierende Oligonukleotide T3 und T7 (Tab. 7).

Nach der Amplifikation und Restriktionsschnitt wurde das *RP10*-Gen in eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym *KpnI* in Plasmid pAU36 ligiert. Die erhaltenen Plasmide wurden durch Restriktionsschnitt mit den Enzymen *BglIII* und *StuI* überprüft (Daten nicht gezeigt).

Plasmid für die Negativkontrolle

Der Actin-Promotor in Plasmid pAU36 wurde durch das *RP10*-Gen in einer gerichteten Ligation in und gegen die Leserichtung über Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *KpnI* und *XhoI* ersetzt (Oligonukleotide: RP10_for_KpnI und RP10_rev_XhoI sowie RP10_for_XhoI und RP10_rev_KpnI, Tab. 7)

Die erhaltenen Plasmide wurden durch Restriktionsverdau (mit den Restriktionsenzymen *KpnI/XhoI*, *XhoI/PstI* und *StuI*) überprüft (Daten nicht gezeigt).

Plasmide für die Identifikation des *RBE1*-Minimalpromotors

Oligonukleotide für die Amplifikation von 0,5 kb und 1 kb langen Fragmenten des *RBE1*-Promotors mit Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *XhoI* und *PstI* finden sich in Tabelle 8 (*RBE1p_pa_for_PstI* und *RBE1p_pa_revI_XhoI* bzw. *RBE1p_pa_revII_XhoI*). Nach Inkubation mit *XhoI* und *PstI* wurden die Promotorfragmente in das mit denselben Enzymen geschnittene Negativ-Kontrollplasmid (s. o.) eingefügt.

Die Plasmide wurden nach Vermehrung in *E. coli*, Isolation und analytischem Restriktionsverdau (*XhoI/PstI*, *BglIII*, *StuI*) mittels *StuI*, welches im *RP10*-Gen schneidet, für die Transformation in *C. albicans* linearisiert.

Plasmide für die Deletionsanalyse des *RBE1*-Minimalpromotors

Für die Konstruktion der Plasmide mit Deletionskonstrukten des *RBE1*-Promotors wurden „linke“ 5'- (DLI bis DLIII) und „rechte“ 3'- (DRI-DRIII) Fragmente des Minimalpromotors von *RBE1* amplifiziert, die über eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym *SacII* aneinander und über Schnittstellen für *XhoI* und *PstI* gerichtet vor das *lacZ*-Gen in das Negativ-Kontrollplasmid (s.o.) eingefügt werden können.

Die Sequenzen der Oligonukleotide für die Amplifizierung der Fragmente finden sich in Tabelle 8 („linke“ Fragmente: RBE1p_pa_revII_XhoI und RBE1p_del_forI_SacII (DLI), RBE1p_del_forII_SacII (DLII) bzw. RBE1p_del_forIII_SacII (DLIII); „rechte“ Fragmente: RBE1p_pa_for_PstI und RBE1p_del_revI_SacII (DRI), RBE1p_del_revII_SacII (DRII) bzw. RBE1p_del_revIII_SacII (DRIII); Fragment DRIV wurde direkt in das Plasmid ligiert: RBE1p_pa_for_PstI und RBE1p_del_revIV_XhoI).

Die erhaltenen Plasmide wurden durch Restriktionsverdau (mit den Restriktionsenzymen *KpnI/XhoI*, *XhoI/PstI* und *StuI*) überprüft (Daten nicht gezeigt).

13.2 Filtertests

Filtertests für den Nachweis der Expression des Enzyms β -Galaktosidase durch Umsetzung des Substrates X-Gal (5-Brom-4-Chlor-3-indolyl- β -D-galactosid) wurden nach (Ausubel *et al.*, 1989), (Kap. 13.6) durchgeführt.

- Z-Puffer, pH 7 (5-fach):

NaH ₂ PO ₄	200 mM
Na ₂ HPO ₄	300 mM
KCl	50 mM
MgSO ₄	5 mM
2-Mercaptoethanol	250 mM
Triton X-100	0,001 % (v/v)
- 20 mg/ml X-Gal in DMF
- Entwicklungslösung: Z-Puffer (1-fach), 0,3 mg/ml X-Gal

Kolonien der transformierten *C. albicans*-Stämme wurden auf SC –uri-Medium bei 30°C über Nacht angezogen. Diese wurden auf Induktionsmedium (YPD, MEM Alpha), auf welches ein sterilisierter Rundfilter (#576; Schleicher & Schuell) aufgebracht worden war, replika-plattiert. Nach Wachstum über Nacht (YPD-Medium: 30°C, MEM Alpha-Medium: 37°C) waren die Kolonien auf den Filtern angewachsen. Die Filter wurden für 1 min in flüssigem Stickstoff schockgefroren und auf einen mit 2 ml Entwicklungslösung getränkten Rundfilter (#593, Schleicher & Schuell) in eine Petrischale gelegt. Diese wurde mit Parafilm® M (*American National Can*, USA) verschlossen und für 80 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 0,5 ml 1 M Na₂CO₃ für 10 min gestoppt. Die Filter mit den aufgeschlossenen Stämmen wurden anschließend getrocknet und gescannt.

13.3 Heterologe Expression von *EFG1* in *E. coli*

Folgende Oligonukleotide wurden für den Austausch eines CTG-Kodons an Position 438 des *EFG1*-Gens gegen ein TCG-Kodon, sowie die Amplifikation des Gens mit Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *EcoRI* und *BamHI* verwendet:

- (1) *EcoRI*-*Efg1*-for: GGG GAA TTC ATG TCA ACG TAT TCT ATA CCC
- (2) *BamHI*-*Efg1*-rev: GGG GGA TCC TTA CTT TTC TTC TTT GGC AAC
- (3) *Efg1*-Mut-for: TAT GGG TAT CAA TCG AAT TAT TAC CAG
- (4) *Efg1*-Mut-rev: CTG GTA ATA ATT CGA TTG ATA CCC ATA

Oligonukleotide (1) und (4) sowie (2) und (3) dienten zur Amplifikation von Teilbereichen des Gens für den Austausch des CTG-Kodons. Je 1 µl einer 1:100-Verdünnung dieser beiden Produkte wurde als Template für die Amplifikation des gesamten, mutagenisierten Gens mit den Oligonukleotiden (1) und (2) verwendet. Um eine möglichst große Sequenztreue bei der Amplifikation zu gewährleisten, wurde als Enzym für die PCR eine *Pfu*-DNA-Polymerase (Stratagene) verwendet. Nach Schneiden des erhaltenen PCR-Produktes mit *EcoRI* und *BamHI* wurde das so modifizierte *EFG1*-Gen in das Plasmid pMAL-c2X (New England Biolabs) ligiert und in den *E. coli*-Stamm TB1 transformiert (Daten nicht gezeigt).

Expression in *E. coli*

Die Expression des mutierten *EFG1*-Gens als Fusionsprotein mit dem Maltose-bindenden Protein (MBP) am N-Terminus in *E. coli*-Stamm TB1 erfolgte mit Hilfe des pMAL™ Protein Fusion and Purification Systems mit dem Expressionsvektor pMAL-c2X (New England Biolabs) nach den Angaben des Herstellers. 10 ml einer über-Nacht-Kultur des transformierten *E. coli* TB1-Stammes wurden in einem Liter Rich-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin verdünnt und nach Inkubation bei 37°C bei einer OD₆₀₀ von etwa 0,5 (2×10^8 Zellen/ml) mit 0,3 mM IPTG (Stammlösung: 0,1 M IPTG in H₂O) für 2 Stunden bei 37°C induziert. Nach Ernte der Zellen mittels Zentrifugation bei 4000 x g, 4°C, für 20 min wurden diese in 50 ml Säulenpuffer (20 mM Tris-HCl, pH 7,4, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA) mit Protease-Inhibitoren (Complete, Roche) aufgenommen und in 2 50 ml Falcon-Tubes (Greiner Bio-One) bei -20°C eingefroren. Am folgenden Tag wurden die Zellen in kaltem Wasser aufgetaut und mittels Ultraschall (Sonopuls, Bandelin; Sonotrode MS 72) im Eisbad in 8 bis 10 Zyklen von 15 s mit 10% Leistung aufgeschlossen. Unlösliche Bestandteile wurden durch Zentrifugation bei 10.000 x g, 4°C, für 35 min (Beckman J2-21, Rotor JA-20, 9000 Upm) abgetrennt. Der Überstand wurde mit einer Glaspipette abgenommen und die Proteinkonzentration nach Bradford bestimmt.

Aufreinigung mittels Amylose-Chromatographie

Etwa 2,5 ml Bettvolumen der mitgelieferten Amylosematrix (Bindekapazität: 3 mg Fusionsprotein/ml Bettvolumen) wurden in eine Polypropylensäule (Poly-Prep-Säule, Bio-Rad), welche an eine Persitalik-Pumpe (Autoclude; Modell VTM-L) angeschlossen war, überführt und mit 8 bis 10 Bettvolumen Säulenpuffer gewaschen. Die Fließgeschwindigkeit betrug für die gesamte Aufreinigung 2 ml/min. Anschließend wurde der Rohextrakt auf die Säule geladen (etwa 47 ml, Konz.: 4,5 mg/ml) und die Säule mit dem 12-fachen Bettvolumen Säulenpuffer gewaschen. An die Matrix gebundene Proteine wurden mit 10 mM Maltose in Säulenpuffer in 20 Fraktionen zu je 1 ml auf Eis eluiert. Die Fraktionen des Aufschlusses wurden mittels SDS-PAGE und *Western Blot* analysiert.

Für die späteren Bindungsexperimente wurden die Fraktionen 3 – 5 der Affinitätschromatographie vereinigt. Eine Konzentrationsbestimmung ergab eine Konzentration von etwa 170 ng Protein/ μ l. Bei einem geschätzten Anteil von etwa 60% MBP-rEfg1p voller Länge entspricht dies einer Konzentration von etwa 100 ng MBP-rEfg1p/ μ l (geschätzt). Bei einem Molekulargewicht des Fusionsproteins von ca. 111 kDa entspricht die Menge von 1 pmol = 111 ng.

13.4 Herstellung polyklonaler Antikörper gegen Efg1p

Auswahl der Peptide und Kopplung an KLH

In der *Candida albicans* Gendatenbank (CGD) finden sich 2 offene Leserahmen für *EFG1*, die sich in ihrer Länge und der Basenzusammensetzung am C-Terminus unterscheiden: *ORF19.610* mit 1578 bp bzw. 525 AS und *ORF19.8243* mit 1650 bp bzw. 549 AS. *ORF19.8243* entspricht dabei der veröffentlichten Sequenz von Efg1p (Stoldt *et al.*, 1997). Die Proteinsequenzen dieser beiden Proteine sind nur bis zu Aminosäure 455 bzw. 450 nahezu vollständig identisch. Da nicht klar ist, welcher dieser Leserahmen das regulatorisch wirksame Protein kodiert, wurden die letzten 11 bzw. 10 C-terminalen Aminosäuren beider potenziellen Proteine, die für Antikörper zugänglich sein sollten, da sie nicht in der Dimerisierungs- und DNA-Bindedomäne liegen und die Proteine unterscheidbar machen, als Peptide synthetisiert (> 20 mg; Reinheit >70%; Thermo Hybaid, Ulm).

Ausschnitt der C-terminalen, nicht homologen 70 bzw. 99 Aminosäuren der beiden offenen Leserahmen für *EFG1* mit den ausgewählten Peptiden (unterstrichen):

ORF19.610 (kürzeres *EFG1*-Gen):

... ISRVVSLIVVLAQLLSRQHQCMMHHIHTTARQKQXHDQITTNSQISXKLLHQ
VVVQKLDSCTNHPKFSH

ORF19.8243 (längeres *EFG1*-Gen):

...YYQGGAANSSYPNYQQQPNYASSYPYQQQQKQQQQPNQQQSDQQ
QTSTPSGGAGTRSVHQSPQVQSLTQGSVHPSPQQHQANQSASTVAKEEK

Für die Immunisierung von jeweils 2 Kaninchen (Pineda Antikörper-Service, Berlin) wurden je 7 mg der Peptide in 700 µl PBS-Puffer, pH 7,4 an 7 mg KLH (*keyhole limpet* Hämocyanin, Sigma-Aldrich, Taufkirchen) in 700 µl H₂O durch Zugabe von 5 Mal 5,7 µl 5%-iger Glutaraldehyd-Lösung im Abstand von je 5 min bei Raumtemperatur zu einer Endkonzentration von 10 mM Glutaraldehyd, gekoppelt. Nach Kühlung auf Eis für 30 min wurden die Ansätze durch Zugabe von 1 M steril-filtrierte Glycin, pH 8,5, in einer Verdünnung von 1:25 blockiert.

Je 3 mg der so gekoppelten Peptide wurden für die Immunisierung eines Kaninchens verwendet.

Affinitätsreinigung der Efg1p-Antikörper

Da die Serumproben der Tiere zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Immunisierung in *Western Blot*-Analysen starke Kreuzreaktionen mit anderen *C. albicans*-Proteinen zeigten, wurden die finale Serumprobe des 290. Tages nach Immunisierung mit dem Peptid für *ORF19.8243* aufgereinigt. Es wurde das Serum von Tier 2 ausgewählt, da dieses in *Western Blot*-Analysen mit heterolog in *E. coli* exprimiertem Efg1p (s. Kap. 3.3; Abb. 37) die besten Ergebnisse zeigte. Dafür wurden 5 mg dieses Peptids an CNBr-aktivierte Sepharose 4B (Amersham Biosciences) gekoppelt. 0,6 g CNBr-aktivierter Sepharose wurden in 10 ml 1 mM HCl gequollen und auf einem Glasfilter mit 120 ml 1 mM HCl gewaschen. Die Sepharose wurde in ein 15 ml Falcon-Röhrchen (Greiner Bio-One) überführt und nach Zentrifugation für 2 min bei 2000 Upm (Heraeus Megafuge) mit 7,5 ml Bindungs-Puffer (100 mM NaHCO₃, 0,5 M NaCl, pH 8,3) gewaschen und erneut zentrifugiert (etwa 2 ml Bettvolumen). Der Überstand wurde verworfen. 5 mg des Peptids wurden in 2 ml Bindungs-Puffer gelöst, zu der Sepharosematrix gegeben und über Nacht bei 8°C rotiert. Überschüssige Liganden wurden am nächsten Tag durch Waschen mit dem 5-fachen Bettvolumen Bindungspuffer entfernt. Noch freie aktive Gruppen wurden durch Zugabe von 5 ml 1 M Ethanolamin, pH 8,0 und Inkubation für 2 h bei Raumtemperatur blockiert. Danach wurde die Matrix 3 Mal abwechselnd mit dem 5-fachen Bettvolumen 0,1 M Natriumazetat, 0,5 M NaCl, pH 4,0 und 0,1 M Tris-HCl, 0,5 M NaCl, pH 8,0 gewaschen. Zwischen den Waschschritten wurde jeweils für 2 min bei 2000 Upm zentrifugiert (Heraeus Megafuge). 5 ml Antiserum von Tier 2, 290 Tage nach Immunisierung mit dem Peptid von *ORF19.8243* wurden für 10 min bei 4000 Upm zentrifugiert, der Überstand zu der gewaschenen Sepharose gegeben und über Nacht bei 8°C rotiert. Nach Waschen mit dem 5-fachen Bettvolumen PBS-Puffer, pH 7,4, wurde die Matrix in eine 10ml-Polypropylensäule (Poly-Prep-Säule, Bio-Rad) überführt und nochmals mit PBS-Puffer, pH 7,4 gewaschen. Die Elution der Efg1p-Antikörper erfolgte in je 10 Fraktionen zu 1 ml mit zunächst 0,1 M Glycin, pH 2,8 und anschließend in 10 Fraktionen mit 0,1 M Triethylamin, pH 11 mittels Schwerkraft. In die Reaktionsgefäße, in denen die Fraktionen gesammelt wurden, waren für die erste Elution je 50 µl 1 M Tris-HCl, pH 8,8 und für die zweite Elution je 50 µl Tris-HCl, pH 6,8 vorgelegt worden. Der Proteingehalt der eluierten Fraktionen wurde bei 280 nm gemessen. Fraktionen 1 bis 4 der Elution mit Glycin zeigten die

höchsten Extinktionswerte, wurden vereinigt und über Nacht, sowie noch einmal für 2 h bei 8°C gegen PBS-Puffer, pH 7,4, dialysiert. Die so aufgereinigten Antikörper können in Gegenwart von 0,02% (w/v) Natriumazid bei 4 bis 8°C gelagert werden.

Charakterisierung des aufgereinigten Antikörpers

In *Western Blot*-Analysen (s.u.) erkannte der aufgereinigte Efg1p-Antikörper sowohl das heterolog exprimierte rEfg1p (Ergebnisse, Abb. 37), sowie natives Efg1p aus *C. albicans* Gesamtzellextrakten (Abb. 12).

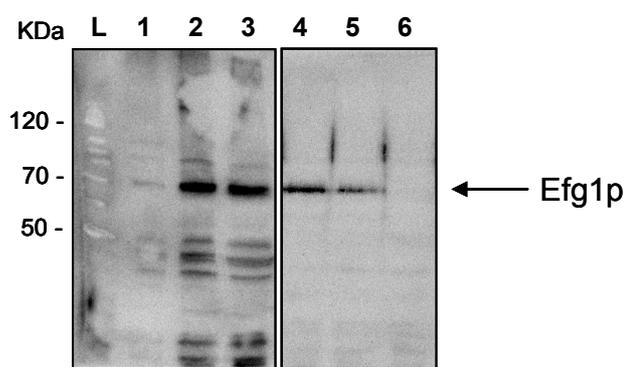


Abb. 12. *Western Blot*-Analyse von Gesamtzellextrakten aus *C. albicans*-Blastosporen. Detektion von Efg1p mittels Serumproben vor (Spuren 1 - 3) und nach der Affinitäts-Reinigung (Spuren 4 - 6); Serumprobe: Tier 2, 290. Tag nach Immunisierung; Spuren 1 - 3: 10 µg, 50 µg und 100 µg Gesamtzellextrakt SC3514; 1:5000-Verdünnung der nativen Serumprobe; Spuren 4, 5: 100 µg Gesamtzellextrakt SC3514, Spur 6: HLC52 (*efg1*-Deletionsstamm, + *URA3*; 100 µg); 1:2000-Verdünnung der aufgereinigten Serumprobe

Eine Immunpräzipitation von heterolog exprimiertem rEfg1p aus den Aufschlüssen der Bakterienstämme war sowohl mit Hilfe der Serumprobe, als auch mit dem aufgereinigten Antikörper möglich, natives Efg1p aus *C. albicans*-Extrakten konnte allerdings nicht immunpräzipitiert werden (Daten nicht gezeigt).

13.5 Bindungsstudien (Electrophoretic Mobility Shift Assays, EMSAs)

Mobility Shift Assays erfolgten nach (Ausubel *et al.*, 1989), Kap. 12.2.

Markierung der Sonden

Fragmente des RBE1-Promotors

Für eine effiziente Markierung mit $^{32}\text{P}_i$ wurden die Fragmente RI und RIV des *RBE1*-Promotors mit Oligonukleotiden amplifiziert, die einen Restriktionsverdau der PCR-Produkte mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *BglII* erlauben (Fragment RI: RBE1_FragI_for_Eco und RBE1_FragI_rev_B_BglII; Fragment RIV: RBE1_Frag4_for_Eco und RBE1_Frag4_rev_Bgl; Tab. 8).

Die PCR-Produkte wurden mit den beiden Restriktionsenzymen geschnitten, für 2 Mal 20 min dephosphoryliert (*Antarctic Phosphatase*, NEB oder *Shrimp Alkaline Phosphatase*, Roche) und aufgereinigt. Etwa 1 bis 20 pmol dephosphorylierter 5'-Enden wurden in Gegenwart von

0,1 mM EDTA, pH 8,0 für 3 min bei 100°C denaturiert und auf Eis abgekühlt. Diese wurden in einem Gesamtvolumen von 30 µl für 1 h bei 37°C endständig mit $^{32}\text{P}_i$ markiert. Der Reaktionsansatz enthielt zusätzlich:

- 50 pmol (150 µCi) [γ - ^{32}P] ATP (Hartmann Analytic GmbH, Braunschweig)
- 50 µg/ml BSA
- 20 U T4-Polynukleotidkinase (NEB)
- 1-fach T4-Puffer (NEB)

Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 µl 0,5 M EDTA, pH 8,0, abgestoppt. Anschließend wurden die markierten DNA-Fragmente mit Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1) extrahiert (Ausubel *et al.*, 1989), in 50 µl TE-Puffer, pH 7,6 aufgenommen und überschüssiges [γ - ^{32}P] ATP durch Gelfiltration abgetrennt (illustra ProbeQuant G-50 Micro Columns, GE Healthcare). Die so hergestellten Sonden wurden für mehrere Wochen bei 8°C aufbewahrt.

Fragmente des ALS3-Promotors

Promotorfragmente des hyphenspezifischen Zellwandgens *ALS3*, die in der Literatur als Kontrollen für Bindungsstudien mit heterolog exprimiertem rEfg1p verwendet wurden (Leng *et al.*, 2001), wurden zum einen mittels PCR hergestellt (Promotorfragment -196 bis – 106 bp oberhalb des Startkodons; s. Tab. 8). 50 µl PCR-Produkt wurden dephosphoryliert und davon 10 µl mit $^{32}\text{P}_i$ markiert. Zum anderen wurden komplementäre Oligonukleotide äquimolar in einer Endkonzentration von 20 µM zusammen gegeben und miteinander hybridisiert (5 min, 90°C, Abkühlen bei Raumtemperatur; Leng-Fragmente mit und ohne E-Box, s. Tab. 8). Davon wurden 100 pmol radioaktiv markiert. Von den Fragmenten wurde jeweils 1 µl für die Bindungsstudien eingesetzt.

Mobility Shift Assays

Bindereaktionen von DNA und Protein erfolgten in einem Volumen von 20 µl in 1,5 ml Reaktionsgefäßen für 20 min bei Raumtemperatur. Nach Titrationen ergab sich eine Menge von wenigen fmol markiertem DNA-Fragment (etwa 5 bis 15 fmol, geschätzt) und etwa 4 µg durch Heparinchromatographie angereicherter Proteine als ausreichend für einen eindeutig detektierbaren Mobility Shift. Die weiteren Reaktionsbedingungen waren wie folgt:

- 10% Glycerin
- 20 mM Tris-HCl, pH 7,9
- 100 mM KCl
- 1 mM EDTA, pH 8,0
- 1 mM DTT
- 300 µg/ml BSA (= 6 µg/Ansatz)
- 50 µg/ml unspezifische Träger-DNA (*Salmon Sperm DNA*, Eppendorf; = 1 µg/Ansatz)

Die Elektrophorese dieser Ansätze erfolgte in nicht-denaturierenden Polyacrylamidgelen (4%-ig, in 1-fach TAE; Größe: etwa 7 x 13 cm; Dicke: 1,5 mm; kein Sammelgel; kein Probenpuffer; Mini-PROTEAN® II Elektrophoresesystem, Bio-Rad) bei 100 V für 70 min in 1-fach TAE-Puffer bei Raumtemperatur.

Für die Auswertung mittels filmloser Autoradiografie wurden die Gele bei 65°C für 1,5 Stunden (bzw. 80°C für 1 Stunde) auf Filterpapier getrocknet (Bio-Rad Gel Dryer, Model 583), über Nacht exponiert (MS Phosphorbildplatten, Fujifilm) und mit einem Laserscanner ausgewertet (FLA-5100, Fujifilm).

13.6 Lokalisation von Rbe1p und Rbt4p in *C. albicans* – Sekretomanalysen

Anreicherung sekretierter Proteine

Für die Analyse von *C. albicans*-Kulturüberständen auf das Vorhandensein sekretierter Proteine mittels Massenspektrometrie wurden der Wildtyp-Stamm SC5314 sowie der *Arbe1/Arbt4*-Doppel-Deletionsstamm über Nacht in YPD-Medium angezogen, 2 Mal mit Wasser gewaschen, auf eine OD₆₀₀ von 0,1 in 100 ml der definierten (Peptid-freien) Medien SC und MEM-Alpha (Tab. 4 und 5) angeimpft und für 6 h bei 30°C bzw. 37°C für das Wachstum als Blastosporen bzw. Hyphen geschüttelt (160 Upm). Die Morphologien der einzelnen Kulturen wurden lichtmikroskopisch untersucht und dokumentiert. Zum Zeitpunkt der Analyse befanden sich alle Zellen entweder in der Blastosporen- oder der Hyphenform (Daten nicht gezeigt). Für die Gewinnung Zell-freier Überstände wurden die Kulturen in 50 ml PP-Röhrchen überführt und nach zweimaliger Zentrifugation für 10 min (Blastosporen: 3350 × g, Hyphen: 3850 × g), steril filtriert (PES-Membran 0,22 µm Porengröße), in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -20°C ü.N. aufbewahrt. Proteine in diesen Kulturüberständen wurden mittels Ultrafiltration angereichert (Amicon® Ultra-15 Zentrifugenfilter, MWCO: 10 kDa; Millipore). Nach Reduktion des Überstand-Volumens auf etwa 200 µl Endvolumen wurde mit 15 ml 50 mM Ammoniumbicarbonat gewaschen und erneut zentrifugiert, bis das Volumen auf etwa 150 µl bis 200 µl reduziert war. Die Ansätze wurden in 0,5 ml Reaktionsgefäße (Protein LoBind Zentrifugenröhrchen; Eppendorf) überführt (Filterspitzen) und bei -20°C aufbewahrt. Eine Konzentrationsbestimmung ergab eine Protein-Konzentration von 0,35 µg/µl bis 1 µg/µl für die angereicherten Überstände.

Massenspektrometrie und Identifikation der Proteine

Für eine massenspektrometrische Analyse der angereicherten Proteine mittels LC-MS/MS (*Liquid Chromatography - Tandem-Mass Spectrometry*; Zusammenarbeit mit Dr. E. Hiller, Fraunhofer IGB, Stuttgart) wurden diese zunächst proteolytisch gespalten. Etwa 20 µg Protein wurden für eine proteolytische Spaltung verwendet (Endvolumen: 100 µl, in 50 mM Ammoniumbicarbonat). Dafür wurden zunächst Disulfidbrücken durch Zugabe von 1 µl 45 mM Dithiothreitol (DTT) bei 50°C für 15 min reduziert und Cysteine durch Zugabe von 1 µl

100 mM Iodacetamid für 15 min bei Raumtemperatur im Dunkeln alkyliert. Proteolytische Spaltung erfolgte durch 0,4 µg des Enzyms Trypsin (sequencing grade, modified; Promega, Mannheim, Deutschland) für 4 h bei 37°C (Rosenfeld *et al.*, 1992). Diese wurde durch Zugabe von Trifluoressigsäure (1% Endkonzentration) gestoppt und die Proben bei -20°C aufbewahrt.

Etwa 0,2 pmol der in 0,1% wässriger Trifluoressigsäure gelösten Peptidmischung wurden zunächst mittels *reversed phase Nano Liquid Chromatography* bei einer Flußrate von 20 µl/min entsalzt (Ultimate 3000 nanoflow LC System; monolithic trap column; 200 µm x 5 mm; PS-DVB; Dionex). Mit Hilfe eines linearen Gradienten von 5% - 45% Lösungsmittel (80% Acetonitril in 0,1% Trifluoressigsäure (v/v)) an der analytischen Säule (monolithic PepSwift RP; 200 µm x 50 mm; PS-DVB; Dionex) wurden die aufgefangenen Peptide über einen Zeitraum von 40 min mit einer Flussrate von 1,5 µl/min bei 50°C eluiert. Das LC-Eluat wurde von Minute 9 bis 35 durch einen Fraktionensammler (Proteiner fc; Bruker Daltonik GmbH, Bremen) direkt auf einen MALDI-Probenräger (Prespotted AnchorChip target; Bruker) im 384er Mikrotiterplatten-Format in 12-Sekunden-Schritten fraktioniert (128 Fraktionen).

Die monoisotopische Molekülmasse der Peptide aller Fraktionen durch MALDI-TOF Massenspektrometrie bestimmt (*Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Tandem Time-of-Flight Mass Spectrometry*; Ultraflex II TOF/TOF 200; Bruker). Massen im Bereich von 700-5000 Da wurden im Reflektor-Modus unter Verwendung der WARP-LC, FlexControl und FlexAnalysis Software (Bruker) aufgenommen und verarbeitet. Unter Verwendung der WARP-LC Software wurden aus den zuvor generierten Massenlisten die Massen für eine MS/MS Messung selektiert (Signal/Noise>10; max. sechs MS/MS Messungen pro Fraktion) und diese automatisiert durchgeführt (Fragmentierung).

Zur Proteinidentifikation wurden die MS/MS-Spektren der fragmentierten Peptide über die Software BioTools (Bruker) an das Datenbank-Suchprogramm MASCOT (Matrix Science, Großbritannien) übermittelt. Als Grundlage für die Zuordnung der ermittelten Peptidsequenzen zu Proteinen wurde eine *C. albicans* Protein-Datenbank verwendet. Diese basierte auf Assembly 21 der translatierten offenen Leserahmen bezogen von der "*Candida Genome Database*" (<http://www.candidagenome.org>). Als Suchparameter in MASCOT wurden gewählt: bis zu einem fehlenden Schnitt; eine Toleranz von 50 ppm für Peptidmassen und 0,5 Da während MS/MS; Enzym: Trypsin; Variable Modifikationen: Oxidation (M); Fixe Modifikationen: Carbamidomethyl (C)). Um die Protein-Identifikationen zu bewerten wurden wahrscheinlichkeitsbasierte MASCOT Auswertungen verwendet. Es wurden nur Peptide verwertet, deren Wahrscheinlichkeit (*p*) für eine zufällig aufgetretene Zuordnung kleiner-gleich 0,05 war.

13.7 Heterologe Expression von *RBE1* und *RBT4* in *S. cerevisiae*

Klonierung von *RBE1* und *RBT4* und Transformation in *S. cerevisiae*

Die Gene *RBE1* und *RBT4* wurden für die Expression in *S. cerevisiae* mittels PCR ohne Stop-kodon amplifiziert (Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase, NEB) über die Restriktionsschnittstellen *Bam*HI und *Xho*I in das Plasmid pYES2/CT (Invitrogen) eingefügt (Oligonukleotide: RBE1_pYES_for_BamHI und RBE1_pYES_rev_XhoI, RBT4_pYES_for_BamHI und RBT4_pYES_rev_XhoI; Tab. 9). Die so konstruierten Plasmide wurden in *E. coli* (DH5 α) vermehrt, mittels PCR überprüft und sequenziert. Plasmide mit korrekt amplifizierten und integrierten offenen Leserahmen sowie das ursprüngliche Plasmid wurden mit Hilfe der Lithiumacetat-Methode in den diploiden *S. cerevisiae*-Stamm INVSc1 transformiert und diese mittels PCR auf die Integration der Plasmide überprüft. Für die Expression der rekombinanten Proteine wurden die transformierten Stämme in 20 ml SC-Medium, 2% Glucose, ohne Uracil für 2 Tage bei 30°C bis zu einer OD₆₀₀ von etwa 2,0 angezogen, durch Zentrifugation geerntet, in 100 ml SC-Medium, 2%Galaktose, 1% Raffinose, ohne Uracil, zu einer OD₆₀₀ von 0,4 aufgenommen und für 24 h bei 30°C kultiviert.

Zytosolische Proteinfractionen wurden durch mechanischen Aufschluss der Hefezellen mittels Glasperlen nach Angaben des Herstellers (Invitrogen) gewonnen.

Aufreinigung

Die rekombinant exprimierten Fusionsproteine wurden über das 6-fach His-Epitop mittels Nickel-Affinitätschromatographie (Ni-NTA Fast Start Kit, Qiagen) aus den Überständen von Induktionskulturen aufgereinigt. Für eine Aufreinigung unter nativen Bedingungen wurden die Überstände nach Zentrifugation (etwa 4000 x g, 5 min, 4°C) vereinigt und mittels Zugabe von mind. 1/10 Volumen 1 M Bis-Tris-Propan, pH 8,5, auf einen pH-Wert von mind. 6,5 bis 7 eingestellt.

Etwa 100 ml Kulturüberstand wurden mittels einer Persitalik-Pumpe (Autoclude; Modell VTM-L) über die Säule gegeben, welche anschließend mit 2 Mal 4 ml Waschpuffer gespült wurde. Die Elution gebundener Proteine erfolgte in 2 Mal 1 ml Elutionspuffer durch Schwerkraft. Die beiden Elutionsfraktionen wurden 2 Mal gegen 1 l 50 mM Bis-Tris-Propan-Puffer, pH 8,5 dialysiert, aliquotiert, in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -80°C aufbewahrt. Je 20 μ l der Fraktionen der Chromatographie wurden mittels SDS-PAGE analysiert.

13.8 Protease-Versuche

Peptid-Array

- Assay-Puffer (steril filtriert): 100 mM Bis-Tris-Propan, pH 8,5; 1 mM CaCl₂

Protease-Aktivität der in *S. cerevisiae* rekombinant exprimierten Proteine rRbe1p und rRbt4p wurde mit Hilfe eines Peptid-Arrays mit 360 Oligopeptiden von 8 Aminosäuren Länge untersucht (Protease Substrate Set, JPT Peptide Technologies, Berlin). Die Peptide des Peptid-Arrays (75 pmol/well) wurden in 10 µl Assay-Puffer resuspendiert und auf zwei 384 well-Mikrotiterplatten (384 Well Small Volume™ HiBase Polystyrol Microplate, schwarz, Greiner Bio-One) verteilt. 2 µl der aufgereinigten Proteine (entspricht einer Konz. von etwa 60 nM, geschätzt) wurden in 5 µl Assay-Puffer zu den Peptiden gegeben und die Platten nach Verschließen mit Parafilm bei 37°C inkubiert. Nach Zentrifugation der Platten (100 x g, 2 min) wurde die Fluoreszenz in den einzelnen wells nach 1 h, 2,5 h und 5 h bei einer Wellenlänge von 465 nm in einem Fluoreszenzplatten-Leser (TECAN SpectraFluor Plus) gemessen.

Spaltungsversuche

Für unabhängige Spaltungsansätze mit Peptiden des Peptid-Arrays, die die stärksten Fluoreszenzsignale zeigten, wurden die Peptide N3, G11, L17 und F11 ohne Modifikationen *de novo* synthetisiert (Thermo Fisher Scientific, Ulm).

Bis zu 1 µmol Peptid wurde dafür mit etwa 15 nmol rekombinantem Rbe1p bzw. Rbt4p bei 37°C über Nacht in 100 mM BisTrisPropan-Puffer/1 mM CaCl₂ inkubiert. Die Peptidgemische wurden mittels *reversed phase High Performance Liquid Chromatography* (HPLC; SMART™ System (Pharmacia Biotech)) in 0,1% Trifluoressigsäure über eine analytische Chromatographie-Säule (Vydac, C₁₈, 1 mm Durchmesser x 10 cm) in einem Gradienten von 7% bis 100% Acetonitril in 0,1% (v/v) Trifluoressigsäure über einen Zeitraum von 100 min mit einer Flussgeschwindigkeit von 100 µl/min aufgetrennt. Fraktionen, die eine deutliche Absorption im UV-Spektrogramm zeigten, wurden anschließend massenspektrometrisch analysiert (*Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Tandem Time-of-Flight Mass Spectrometry* (MALDI-TOF/TOFMS); Ultraflex II TOF/TOF, Bruker Daltonics; Zusammenarbeit mit Dr. E. Hiller, Fraunhofer IGB, Stuttgart).

13.9 Deletion von *RBE1* und *RBT4* in *C. albicans*

Die Gene *RBE1* und *RBT4* wurden mit Hilfe der Flipper-Methode von Morschhäuser *et al.* aus dem Genom von *C. albicans* entfernt (Morschhäuser *et al.*, 1999). Für die Deletion in *ura3*-defizienten Stämmen (CAI4 (Δ *ura3*) und HLC67 (Δ *efg1*)) wurde die Deletionskassette aus Plasmid pSFU1 verwendet, für Gendeletionen im Wildtypstamm SC5314 die Deletionskassetten aus den Plasmiden pSFS1 bzw. pSFS2 (Reuss *et al.*, 2004) (s. Anhang).

Die Verwendung der Flipperkassetten für die Herstellung von Deletionskonstrukten erlaubt die Regeneration des jeweiligen Markergens (pSFU1: *URA3*; pSFS1/2: *SAT1*) mit hoher Frequenz. Die Kasette kann über flankierende DNA-Regionen des zu deletierenden Gens über homologe Rekombination anstelle von diesem in das Genom integriert werden. Dafür wurden etwa 400 bis 500 bp lange genomische Regionen ober- und unterhalb der Start- und Stopkodons der jeweiligen Gene mittels PCR amplifiziert (flankierende Regionen FR1 und FR2, Oligonukleotidsequenzen s. Tab. 9), mit den Restriktionsenzymen *ApaI* und *XhoI* bzw. *NotI* und *SacII* geschnitten und vor und nach der entsprechenden Deletionskasette in die Plasmide ligiert. Die so konstruierten Deletionskassetten wurden mit *ApaI* und *SacII* aus den Plasmiden ausgeschnitten und der gesamte Ansatz in die entsprechenden *C. albicans*-Stämme transformiert. Positive Transformanten wurden auf den entsprechenden Medien selektiert (pSFU1: SC-Medium ohne Uridin, pSFS1/2: YPD-Medium mit 200 µg/µl Nourseothricin, mind. 2 Tage, 30°C). Selektierte Transformanten wurden mittels PCR und *Southern Blot*-Analyse auf die korrekte Integration der Deletionskasette überprüft.

Für die Verwendung als Sonde für die *Southern Blot*-Analyse wurde der jeweilige offene Leserahmen inklusive der flankierenden Region 1 (*RBE1*) bzw. der flankierenden Region 2 oder nur die flankierende Region 2 (*RBT4*) mittels PCR amplifiziert (Oligonukleotide: RBE1_FR1_for_ApaI und RBE1_ORF_for_BamHI oder 2767_E12 bzw. RBT4_FR2_for_NotI und RBT4_FR2_rev_SacII; Tab. 9).

Regeneration des Selektionsmarkers

Die verwendeten Deletionskassetten enthalten eine an die Kodonverwendung von *C. albicans* adaptierte ortsspezifische Rekombinase (*FLP*), die sich unter der regulatorischen Kontrolle eines induzierbaren Promotors befindet. Nach erfolgter Induktion des Promotors ist so das Entfernen der Kasette aus dem Genom möglich. Dabei entfernt die Rekombinase alle Sequenzen, die sich zwischen ihren spezifischen Erkennungssequenzen (*FRT*, *FLP-Rekombinase recognition target*) am 5'- und am 3'-Ende der Deletionskassetten befinden. Auf diese Weise kann das Deletionskonstrukt für die Deletion des zweiten Allels des betreffenden Gens verwendet werden.

Die Induktionsmedien für die entsprechenden Promotoren waren: YCB-BSA-Medium für den *SAP2*-Promotor in pSFU1 und pSFS1 bzw. YP-Medium mit 2% Maltose oder YPD-Medium für den *MAL2*-Promotor in pSFS2 (Morschhauser *et al.*, 1999; Reuss *et al.*, 2004).

Eine Übernachtskultur transformierter Zellen wurde 1:50 im entsprechenden Medium verdünnt und über Nacht oder für 2 Tage bei 30°C geschüttelt. Etwa 200 bis 300 Zellen wurden anschließend in 100 µl H₂O auf Medium mit einer geringen Konzentration von selektierendem Agens ausplattiert (*SAT1*-Flipperkasette: YPD-Medium, 20 µg/ml Nourseothricin; *URA3*-Flipperkasette: YPD-Medium). Nach Wachstum von 1 bis 2 Tagen bei 30°C wurden sensitive, langsam wachsende und daher kleinere Kolonien erneut auf Selektionsmedium und auf Wachstumsmedium (YPD) selektioniert und auf ihren Genomstatus hin überprüft (PCR, *Southern Blot*).

Reversion der Gene

Für die Re-Integration der Gene in die betreffenden Deletionsstämme an ihrem ursprünglichen Genomort wurden die linken flankierenden Regionen (FR1) in den Deletionsplasmiden jeweils durch die linke flankierende Region inklusive der gesamten Gensequenz einschließlich des Stopkodons ersetzt und für die Transformation verwendet Oligonukleotide: RBE1_FR1_for_ApaI und RBE1_ORF_for_XhoI, RBT4_FR1_for_ApaI und RBT4_ORF_rev_Xho; Tab. 9). Nach Entfernen der Flipper-Kassette durch die Induktion der *FLP*-Rekombinase (s.o.) ist der genomische Locus so annähernd wieder hergestellt. Es verbleibt lediglich eine 34 bp lange Erkennungssequenz für die *FLP*-Rekombinase (*FRT* = *FLP recombinase recognition target*, (Morschhauser *et al.*, 1999)) nach dem Stopkodon im Genom.

13.10 Überexpression von *RBE1* in *C. albicans*

Für die Überexpression von *RBE1* wurde der offene Leserahmen einschließlich des Stopkodons mit Hilfe der Restriktionsenzyme *XhoI* und *BamHI* anstelle des *lacZ*-Gens in das Positiv-Kontrollplasmid der *lacZ*-Assays (Ergebnisse, Abb. 23) eingefügt (Oligonukleotide RBE1_ORF_rev_XhoI und RBE1_ORF_for_BamHI; Tab. 9), so dass die Expression des *RBE1*-Gens durch den konstitutiv aktiven Promotor des Actin-Gens aktiviert wird. Das Plasmid wurde nach Linearisierung mit dem Restriktionsenzym *StuI* in den *RP10*-Genort der Stämme CAI4 (Δ *ura3*) und HLC67 (Δ *efg1*) integriert. Die transformierten Stämme wurden nach Restriktionsverdau der genomischen DNA mit den Restriktionsenzymen *HindIII* und *XbaI* mittels *Southern Blot*-Analyse überprüft.

13.11 Adhäsions- und Invasionsstests

Kultivierung humaner Epithelzellen

- Dulbecco's Modified Eagle Medium (D-MEM), High Glucose (4,5 g/l; Gibco), supplementiert mit 10% FCS (fötales Kälberserum; Gibco), 1 mM Natriumpyruvat, 1% Gentamycin (10 mg/ml)
- PBS⁻-Puffer (Ca²⁺-, Mg²⁺-freier Ablösungspuffer):

NaCl	137 mM
KCl	2,7 mM
KH ₂ PO ₄ anhydr.	1,5 mM
Na ₂ HPO ₄ x 12 H ₂ O	8,1 mM
EDTA	1 mM

Humane colorectale Karzinomzellen (Caco-2), vulvovaginale Epithelzellen (A431) und Epithelzellen der Mundschleimhaut (TR146) wurden in T-75 Zellkulturflaschen (Caco-2: 5 - 8 x 10⁵ Zellen; A431: 1 - 1,5 x 10⁶ Zellen) in supplementiertem D-MEM bei 37 °C und 5 %

CO₂ bis zu einer Konfluenz von etwa 80% angezogen und anschließend in einer Verdünnung von 1:5 (Caco-2, TR146) bzw. 1:3 (A431) in frische Kulturflaschen überführt. Dafür wurden die Zellen mit PBS⁻-Puffer gewaschen und anschließend für 3 min (Caco-2) bzw. 8 min (A431) bei 37°C mittels 2,5 ml Trypsin/EDTA in PBS⁻ (0,25 %Trypsin, 0,53 mM EDTA) abgelöst. Die Trypsinreaktion wurde durch Zugabe von 10 ml des supplementierten D-MEM abgestoppt, die Zellen in ein 15 ml Falcon Tube überführt, nach Zentrifugation (2000 x g, 3 min) in frischem, supplementiertem D-MEM aufgenommen und in frische Zellkulturflaschen überführt.

13.11.1 Quantitative Adhäsionstests

Das Adhäsionsverhalten der Einzel- sowie Doppel-Deletionsstämme für die Gene *RBE1* und *RBT4* im Wildtyp-Hintergrund an verschiedene Oberflächen über die Zeit wurde unter Verwendung eines *in vitro*-Modells für die Adhäsion von *C. albicans* an humane Epithelien getestet (Sohn and Rupp, 2009; Sohn *et al.*, 2006).

Für die Untersuchung des Adhäsionsverhaltens von *C. albicans* auf humanen Darm- und vulvo-vaginalen Epithelzellen wurden Caco-2- und A431-Zellen in 24 *well*-Platten angeimpft (2×10^5 Zellen pro *well*) und bis zu 100% konfluentem Wachstum für 2 Tage bei 37°C, 5% CO₂ inkubiert. Nach Waschen mit PBS⁻-Puffer wurden 250 µl D-MEM mit 10% FCS, 1 mM Natriumpyruvat zu den Zellen gegeben, für die Untersuchung des Adhäsionsverhaltens von *C. albicans* auf Plastikoberfläche (Polystyrol) wurden 250 µl Medium in frische *wells* gegeben.

Für die Infektion der verschiedenen Oberflächen wurden über-Nacht-Kulturen von *C. albicans* in YPD-Medium auf eine OD₆₀₀ von 0,25 in 10 ml frischem Medium verdünnt und bei 30°C bis zu einer OD₆₀₀ von etwa 1,0 angezogen. Nach Zentrifugation (3000 x g, 3 min), wurden die *C. albicans*-Zellen in 10 ml supplementiertem D-MEM aufgenommen und auf eine Konzentration von 6×10^3 Zellen/ml verdünnt (1:5000). Für die Infektion wurden 50 µl dieser Verdünnung in jedes *well* gegeben (entspricht etwa 300 *C. albicans*-Zellen). Als Ausgangsgröße für die Gesamtzahl nicht-adhärenter Zellen zum Zeitpunkt $t = 0$ wurde der Überstand der Infektionskultur direkt nach Infektion mit *C. albicans* abgenommen, auf YPD-Medium mit Ampicillin ausplattiert und nach Inkubation bei 30°C über Nacht ausgezählt. Die Infektionsansätze wurden anschließend bei 37°C, 5% CO₂ inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion (30, 60, 120 und 240 min) wurde das Verhältnis der Menge der nicht-adhärenter Zellen im Überstand der Infektionskultur zu adhärenter Zellen auf den verschiedenen Oberflächen bestimmt. Dafür wurden nicht-adhärenter *C. albicans*-Zellen durch Schütteln der Infektionskulturen für 2 min bei 180 Upm auf einem Plattenschüttler suspendiert, abgenommen und zur Bestimmung der Zellzahl auf YPD-Medium mit Ampicillin plattiert. Nach Waschen der verbliebenen Oberflächen mit PBS⁻-Puffer wurden adhärenter *C. albicans*-Zellen in 300 µl PBS⁻-Puffer mit Hilfe einer Pipettenspitze vom Untergrund gelöst und ebenfalls auf YPD-Medium mit Ampicillin plattiert. Die betreffenden Platten wurden nach Inkubation bei 30°C über Nacht ausgezählt.

13.11.2 Invasionstests

Um das Invasionsverhalten der $\Delta rbel$ - und $\Delta rbt4$ -Deletionsstämme im Vergleich zum Wildtypstamm mikroskopisch zu analysieren, wurde ein rekonstituiertes humanes Darmepithel (*reconstituted human intestinal epithelium*, RHIE) verwendet, das nach der Methode von Hernandez und Rupp hergestellt wurde (Hernandez and Rupp, 2009).

Für die Herstellung des dreidimensionalen Gewebemodells wurde durch Mischen von aus Rattenschwänzen gewonnenem Typ I-Kollagen in essigsaurer Lösung (5 mg/ml, 0,1 M Essigsäure) und einer Neutralisierungslösung (2,7 g D-MEM, 10 ml 7,5% Natriumbicarbonat, 7,5 ml 3 M HEPES, 20 ml fötales Kälberserum, 2 ml 10 M NaOH in 100 ml) ein Kollagengel hergestellt. Jeweils 250 μ l des Gels in Zellkultur-Einsätzen in 24 well-Platten (ThinCert, Greiner Bio-One) wurden mit $1,5 \times 10^5$ Caco-2-Zellen (humane colorectale Karzinomzellen), besiedelt. 600 μ l D-MEM (suppl., ohne Gentamycin) wurden als Nährmedium in die wells gegeben und die Platten für 3 Tage bei 37°C, 5% CO₂ inkubiert, wobei nach 24 h ein Mediumwechsel erfolgte. In dieser Zeit bilden die Epithelzellen einen konfluenten Monolayer aus.

Die Gewebemodelle wurden mit etwa 3×10^3 Zellen einer exponentiell wachsenden *C. albicans*-Kultur (OD₆₀₀=1, 30°C, YPD-Medium) infiziert und bei 37°C, 5% CO₂ inkubiert. Für jeden Stamm und jeden Zeitpunkt wurde eine Doppelbestimmung vorgenommen.

Die Zellkultureinsätze mit den infizierten Gewebemodellen wurden nach 8 und 24 h in eine neue 24 well-Platte überführt, für 1 h in Bouin-Lösung fixiert, für 2 h oder über Nacht gewässert und für die anschließende Färbung in einem Gewebeeinbettautomat (Shandon, Citadell™ 1000) dehydriert und in Paraffin eingebettet. Je 3 μ m dicke Schnitte der Gewebemodelle (Rotationsmikrotom Leica RM2145, Leica Instruments, Nussloch) wurden auf Objektträgern nach Trocknung für 2 h bei 50°C entparaffiniert (10 min Roticlear I, 3 min Roticlear II, 2 min 96% EtOH I, 2 min 96% EtOH II, 2 min 70% EtOH, 2 min 50% EtOH, ddH₂O) durch Perjodsäure-Schiff-Reaktion-(PAS)-Färbung (Schiffisches Reagenz gegen Aldehyde, Fluka) nach McManus angefärbt (Romeis *et al.*, 1989). 1,2-Glykole und Derivate dieser in Polysacchariden, Mukopolysacchariden, Muko- und Glykoproteinen, Glykolipiden, ungesättigten Fettsäuren und Phospholipiden werden dabei zu Aldehyden oxidiert und mittels Schiffischen Reagenzes detektiert. Sie erscheinen anschließend magentarot. Im Anschluss erfolgte eine Kernfärbung mittels Mayers Hämalaun und nach alkoholischer Entwässerung eine Gegenfärbung nach der Methode von Papanicolaou (Romeis *et al.*, 1989) mit Polychromlösung Eosin-Azur 50, wodurch die Kerne der Epithelzellen blau und die Kollagenmatrix hellblau erscheinen. Nach erneuter Entwässerung wurden die Schnitte unter dem Lichtmikroskop untersucht (Axiovert M200, Carl Zeiss, Jena) (Diplomarbeit Ö. Sogukpinar, Fraunhofer IGB, 2008).

Die Färbung umfasst folgende Schritte:

- 1% Perjodsäure: 5 min
- spülen in ddH₂O
- Schiffssches Reagenz: 15 min
- Sulfitwasser (je frisch angesetzt, nur 1x verwenden!): 3 x 2 min
- unter fließendem Leitungswasser spülen, 10 min
- Mayers Hämalan: 15 s
- sofort 1-2 x in 0,03M HCl eintauchen
- fließendes handwarmes Leitungswasser (Bläuen): 5 min
- 50%, 70%, 96% Ethanol: je 2 min
- Eosin-Azur 50-Färbelösung: 1 min
- 3 x 2 mal in 96% Ethanol eintauchen
- Alkohol, absolut: 30 s
- Isopropanol: 2 x 5 min (vollständige Entwässerung)

13.11.3 Zytotoxizitätstests

Zytolyse durch Schädigung der Plasmamembran humaner Epithelzellen wurde kolorimetrisch durch die Messung der Aktivität freigesetzter Laktatdehydrogenase (LDH) quantifiziert (*Cytotoxicity Detection Kit* (LDH); Roche Diagnostics, Mannheim).

Konfluente Monolayer humaner Darmepithelzellen (Caco-2) sowie humaner Mundschleimhautzellen (TR146) in 250 µl D-MEM ohne Gentamycin in 24 well-Platten wurden mit 3×10^3 *C. albicans*-Zellen aus der exponentiellen Wachstumsphase ($OD_{600} = 1$) in 50 µl H₂O_{steril} infiziert und bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Über einen Zeitraum von 18 (Caco-2) bzw. 16 h (TR146) wurde zu verschiedenen Zeitpunkten (0h, 12h, 18h/16h) der Überstand der Kulturen abgenommen (Überstand 1). Intakte Epithelzellen in den einzelnen Ansätzen wurden anschließend durch Inkubation für 3 min mit 500 µl Triton X-100 Lösung (1% in D-MEM) lysiert (Überstand 2). Verbliebene Zellen in den beiden Überständen wurden durch Zentrifugation bei 16060 x g für 10 min bei 4°C entfernt und die Proben auf Eis gelagert. Für die Ermittlung der freigesetzten LDH-Mengen wurde zunächst das Volumen von Überstand 1 durch Wiegen ermittelt. Die Aktivität freigesetzter LDH in den verschiedenen Überständen wurde nach den Angaben des Herstellers durch Umsetzung eines Farbstoffes kolorimetrisch bestimmt.

Die Überstände wurde in zwei verschiedenen Verdünnungen in D-MEM doppelbestimmt (12 h: 1:3 und 1:10 (Caco-2) bzw. 1:2 und 1:10 (TR146); 18h/16h: 1:10- und 1:30 (Caco-2) bzw. 1:10 und 1:20 (TR146) für Überstand 1; Überstand 2: je 1:10 und 1:30 (Caco-2) bzw. 1:20 (TR146)). Zu 100 µl der Verdünnungen jedes Überstandes werden 100 µl Reaktionsgemisch bestehend aus 250 µl Enzym (Diaphorase) und 11,25 ml Farblösung (INT: 2-[4-Iodophenyl]-3-[4-nitrophenyl]-5-phenyltetrazoliumchlorid) zugesetzt und die Ansätze in Mikrotiter-Platten (96 wells) pipettiert. Bei der enzymatischen Reaktion wird durch die LDH zunächst Laktat zu

Pyruvat oxidiert wobei NAD^+ zu NADH/H^+ reduziert wird. In einem zweiten Schritt überträgt der Katalysator Diaphorase H/H^+ von NADH/H^+ auf das Tetrazoliumsalz INT (hellgelb), welches so zu Formazan (rot) reduziert wird. Die Platte wird für 15 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert und die Absorption der Proben anschließend bei einer Anregung von 490 nm in einem Mikrotiterplatten-Spektrophotometer (SpectraMax Plus³⁸⁴, Molecular Devices) gemessen. Die LDH-Konzentration ($\mu\text{g}/\text{ml}$) in den einzelnen Ansätzen wurde mit Hilfe einer zuvor auf dieselbe Weise erstellten Eichgeraden von 0,0125 bis 0,2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ LDH errechnet. Aus den LDH-Konzentrationen lässt sich mit Hilfe der Volumina der Überstände 1 (durch Wiegen ermittelt) und 2 (500 μl) die LDH-Menge (μg) in den jeweiligen Überständen berechnen. Durch die Addition der LDH-Mengen in den Überständen 1 und 2 ergibt sich die Gesamtmenge der im jeweiligen Infektions-Ansatz vorhandenen LDH (100%). Auf diese Weise kann der Prozentsatz der durch die Infektion mit *C. albicans* lysierten Epithelzellen in jedem Ansatz ermittelt werden (Brutto-Zellzerstörung = Anteil der LDH-Menge in Überstand 1 an der Gesamtmenge and LDH). Die Netto-Zellzerstörung, welche nur auf Lyse durch *C. albicans* zurückzuführen ist, wurde durch Abzug des Prozentsatzes der ohne Fremdeinwirkung lysierten Zellen in den nicht-infizierten Kontroll-Anätzen von der Brutto-Zellzerstörung zu den jeweiligen Zeitpunkten ermittelt.

13.12 Paarungsversuche

Sequenz der synthetisch hergestellten Paarungs-Pheromone Alpha- (α -) und a-Faktor:

- α -Pheromon: Aminosäuresequenz GFRLTNFGYFEPG
- a-Pheromon: Aminosäuresequenz AVRSVSTGNCCSTC* (*mit Farnesyl-Rest)

Die synthetisch hergestellten Peptide (Thermo Fisher Scientific, Ulm) wurden in einer Konzentration von 3 mg/ml in 30% DMSO gelöst.

Für die Versuche mit den beiden Paarungs-Pheromonen wurden *white*- und *opaque*-Zellen der Paarungstypen *MTLa* und *MTL α* (s. Kap. 2.2.2) der zu untersuchenden Stämme über Nacht bei Raumtemperatur in SC- oder Spider-Medium unter Rotation angezogen, am nächsten Tag im entsprechenden Medium auf eine OD_{600} von 0,1 verdünnt und erneut bis zu einer OD_{600} von 1,0 rotiert oder direkt auf eine OD_{600} von 1,0 verdünnt. Die Pheromone wurden in einer Konzentration von 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (α -Faktor) bzw. 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ zu den Kulturen gegeben und diese erneut über Nacht rotiert (Volumen: zw. 0,1 und 0,5 ml, 15 ml Falcon-Röhrchen). Als Negativkontrolle wurde eine entsprechende Menge von 30% DMSO zu den Kulturen gegeben. Die Kulturen wurden mittels Lichtmikroskopie untersucht (Axiovert 25, Carl Zeiss, Jena; 40-fache Vergrößerung) und fotografiert (Zeiss AxioCam MRm, Software: Axiovision).

Paarungs-Versuche

Für die Paarungsversuche wurden *opaque*-Zellen der Paarungstypen *MTLa* und *MTLa* über Nacht bei Raumtemperatur in SC-Medium oder Spider-Medium angezogen, auf eine OD₆₀₀ von 0,1 verdünnt und bis zu einer OD₆₀₀ von 1,0 rotiert bevor sie in einem Mischungsverhältnis von 1:1 zusammengegeben und erneut über Nacht rotiert wurden. Alternativ wurden die entsprechenden Stämme direkt auf eine OD₆₀₀ von 1,0 verdünnt und zusammen gegeben (Volumen: zw. 0,5 und 1 ml, 15 ml Falcon-Röhrchen, Greiner Bio-One). Die Kulturen wurden mittels Lichtmikroskopie untersucht und fotografiert (s.o.).

13.13 Virulenzstudien

Studien zur Ausbildung systemischer Kandidosen durch *C. albicans in vivo* wurden im systemischen Mausmodell durchgeführt. Kohorten von jeweils 10 steril gehaltenen, weiblichen Labormäusen (C57BL/6) wurden mit ca. 5×10^5 *C. albicans*-Zellen einer über Nacht bei 30°C angezogenen Pilzkultur in 200 µl PBS-Puffer über die Schwanzvene infiziert und über einen Zeitraum von 30 Tagen observiert. Diese Arbeiten wurden in Kooperation mit Dr. C. F. Urban am MPI für Infektionsbiologie in Berlin durchgeführt. Der Verlauf der Infektionen wurden über einen Zeitraum von 30 Tagen dokumentiert und die jeweiligen Überlebensraten durch einen Log-Rank-Test (Graphpad Prism, V4.02) miteinander verglichen. Ein *p*-Wert < 0,05 wurde als signifikant angenommen.

14 Methoden für die *de novo*-Identifikation spezifisch Promotorbindender Proteine (s. Anhang)

14.1 Gewinnung von Kernproteinen aus *C. albicans*

Für die Gewinnung von Kernproteinen aus *C. albicans*-Zellen wurden diese mechanisch aufgeschlossen. Zellfreie Proteinextrakte wurden durch Ultrazentrifugation bei 100.000 x g gewonnen (S100-Fraktion). Darin enthaltene Proteine wurden durch Fällung mit 35 % (w/v) Ammoniumsulfat (entspricht einer Sättigung von 55%) konzentriert (Klekamp and Weil, 1982).

- Phenylmethyl-Sulfonyl Fluorid- (PMSF-) Stammlösung: 100 mM in Isopropanol
- 4 M (NH₄)₂SO₄, pH 7,9
- Aufschlusspuffer:

TRIS-Cl, pH 8,0	200 mM
MgCl ₂	10 mM
DTT	1 mM
Glycerin	10% (v/v)
PMSF	0,5 mM

• A50-Puffer:	TRIS-Cl, pH 8,0	20 mM
	(NH ₄) ₂ SO ₄	10 mM
	DTT	0,5 mM
	EDTA	0,5 mM
	Glycerin	10% (v/v)

C. albicans-Stämme wurden über Nacht in YPD-Medium mit 0,1 mM Uridin bei 30°C angezogen. Diese Kulturen wurden am nächsten Tag 1:50 in Induktionsmedium (YPD- bzw. MEM Alpha-Medium) verdünnt und für 7 bis 8 h geschüttelt (YPD-Medium: 30°C, MEM Alpha-Medium: 37°C; OD₆₀₀, YPD: ca. 5 (= 1,5 x 10⁸ Zellen/ml). Die Zellen wurden durch Zentrifugation geerntet (Heraeus Cryofuge 5000S, 1 Liter-Gefäße, 3800 Upm, 15 min, 5°C; oder Beckman J2-21 Zentrifuge, Rotor JA-10, 15 min, 6500 Upm (= 7500 x g)), 2 Mal mit dem 2- bis 4-fachen Volumen eisgekühlten Wassers gewaschen, gewogen, in 2 ml Aufschlusspuffer/g Nassgewicht der Zellen resuspendiert (Ausbeute Blastosporen: zw. 175 bis 220 g Zellen aus 10 l Flüssigkultur) und bei -80°C aufbewahrt oder direkt weiterverarbeitet.

Der Aufschluss der Zellen erfolgte zunächst in drei Durchgängen in einer *French Pressure Cell Press* (American Instrument Company). Spätere Aufschlüsse erfolgten mit Hilfe eines *Bead Beaters* (BioSpec Products, Modell # 110 7900). Dabei wurden gleiche Mengen an Zellsuspension und Glasperlen (0,5 mm Durchmesser) möglichst Luftblasen-frei in die Kammer des *Bead Beaters* gefüllt und unter Kühlung in 8 bis 10 Aufschlüssen für je 30 Sekunden homogenisiert. Zwischen den einzelnen Aufschlüssen wurden die Zellen für etwa 2 bis 3 Minuten gekühlt. Das Lysat wurde von den Glasperlen dekantiert, DTT und PMSF erneut zu einer Endkonzentration von 1 mM zugegeben. Das Lysat wurde durch Zugabe von 4 M Ammoniumsulfat, pH 7,9 auf eine Ammoniumsulfat-Konzentration von 400 mM eingestellt und anschließend 10 bis 15 Minuten auf Eis gekühlt. Bei dieser Konzentration von Ammoniumsulfat bleiben Kernproteine in signifikanten Mengen in Lösung (Ponta *et al.*, 1971). Unlösliche Bestandteile und Ribosomen wurden durch Ultrazentrifugation für 1 Stunde bei 100.000 x g, 5°C abgetrennt (Beckman Ultrazentrifuge L8-70; Rotor Ti45; 35.000 Upm). Die löslichen Proteine im Überstand dieser Zentrifugation wurden mit 35% (w/v) Ammoniumsulfat unter Rühren auf Eis präzipitiert, durch Zentrifugation bei 10.000 x g bis 15.000 x g für 20 Minuten geerntet (Beckman J2-21 Zentrifuge, Rotor JA-10, 5°C), in einem möglichst geringen Volumen A50-Puffer mit Protease-Inhibitoren (Complete, Roche) resuspendiert und 2 Mal bei 8°C gegen das etwa 50- bis 100-fache Volumen an A50-Puffer mit 1 mM PMSF dialysiert (Spectra/Por® 6, MWCO: 10.000 Da). Nach der Dialyse erfolgte eine erneute Zentrifugation bei 20.000 x g für 15 Minuten bei 4°C. Die Proteinkonzentration des Überstandes wurde nach Bradford bestimmt (Bio-Rad Protein Assay), das Lysat aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt.

14.2 Anreicherung DNA-bindender Proteine mittels Heparin-Affinitätschromatographie

Fast Protein Liquid Chromatography (Pharmacia FPLC):

- 2 x LKB-Pumpen P500, LKB-Controller LCC-500, Kontrolleinheit UV-1, Fraktionensammler FRAC-100

Heparinsäulen (HiPrep™ 16/10 Heparin FF; bzw. 100 ml Heparin Sepharose™ 6 Fast Flow in einer XK 50/20-Säule, GE Healthcare) wurden für die erste Verwendung bzw. nach längerer Lagerung in 20% EtOH mit jeweils dem 5-fachen Säulenvolumen Bindungs-, Elutions- und wieder Bindungspuffer äquilibriert. Die Flussgeschwindigkeiten waren 5 ml/min für die 20 ml-Säule und 10 ml/min für die 100 ml-Säule. Nach Aufbringen der Proteinprobe wurde mit dem 10- bis 20-fachen Säulenvolumen Bindungspuffer gewaschen, bis im UV-Detektor keine detektierbaren Mengen an Protein mehr auftauchten. Die an die Matrix gebundenen Proteine wurden mit einem kontinuierlichen Gradienten von 50 mM Ammoniumsulfat bis zwischen 400 mM und 800 mM Ammoniumsulfat im 10- bis 20-fachen Säulenvolumen eluiert und dabei fraktioniert (20 ml-Säule: 40 x 10 ml, 100 ml-Säule: 33 x 30 ml). 100 µl-Aliquots der Fraktionen sowie die Fraktionen selbst wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Die Säule wurde mit dem 2-fachen Säulenvolumen 2 M NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 8 gewaschen und mit dem 5-fachen Säulenvolumen Bindungspuffer re-äquilibriert. Kurzfristiges Aufbewahren der Säulen erfolgte in 30% EtOH, für längere Zeiträume in 20% EtOH, 0,05 Natriumacetat bei 4 bis 8°C. Etwa 5 µl der Fraktionen wurden für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese verwendet.

Ergebnisse

1 Die Pry-Proteinfamilie in *Candida albicans*

RBE1 ist ein in Abhängigkeit der Morphogenese reguliertes Gen in *C. albicans* mit einer Länge von 816 bp (Sohn *et al.*, 2003). Das von dieser Sequenz abgeleitete Protein besitzt eine Länge von 271 Aminosäuren und weist – ebenso wie das bereits beschriebene potenzielle Zelloberflächenprotein Rbt4p (Braun *et al.*, 2000) - signifikante Homologien zur ubiquitär verbreiteten Superfamilie der CAP-Proteine auf (*Cysteine-rich secretory proteins*, *Antigen 5*, and *Pathogenesis-related 1 proteins*, s. Einleitung, Kap. 4). Die CAP-Superfamilie setzt sich aus den sekretierten Proteinen der CRISP-Familie (*cysteine-rich secretory proteins*), der großen Gruppe der immunogenen Antigen 5-Proteine im Giftsekretionstrakt der Insekten sowie den Proteinen der PR-1-Familie in Pflanzen (*pathogenesis related proteins*), die nach Infektion mit Bakterien, Viren oder Pilzen induziert werden, zusammen (Gibbs *et al.*, 2008). In der zu *C. albicans* nahe verwandten Bäckerhefe *S. cerevisiae* finden sich drei Mitglieder dieser Proteinfamilie, die daher als Pry-Proteine bezeichnet werden (Pry1p – Pry3p; *pathogenesis related in yeast*; s. Einleitung, Kap. 4, Tab. 1).

Zur Identifikation von Genen in *Candida albicans*, die ebenso wie *RBE1* Homologien zur Superfamilie der CAP-Proteine bzw. zu Pry-Proteinen besitzen, wurde die DNA-Sequenz von *RBE1* (ORF19.7218) gegen die *Candida albicans*-Gendatenbank abgeglichen (<http://www.candidagenome.org>). Dabei finden sich insgesamt vier weitere Gene mit signifikanten Homologien zu *RBE1* und CAP-Proteinen (Tab. 17 und Abb. 13).

Tab. 17. *RBE1*-Homologe in *C. albicans* (*RBE1*-Sequenz: ORF19.7218)

<i>RBE1</i> -Homologe in <i>C. albicans</i>			
Gen	Allel	Genprodukt	Sequenzidentität innerhalb der CAP-Domäne von Rbe1p
ORF19.6202 (<i>RBT4</i>)	ORF19.13583	358 AS	47%
ORF19.6200	ORF19.13580	317 AS	46%
ORF19.2787 (<i>PRY1</i>)	ORF19.10303	411 AS	45%
ORF19.2336	ORF19.9872	202 AS	46%

Die molekulare Funktion dieser fünf Proteine in *C. albicans* ist nicht bekannt. Lediglich für *RBT4* ist bereits eine Funktion beschrieben worden. Es zeigte sich als essentieller Faktor für die Virulenz von *C. albicans* im systemischen Infektionsmodell, sowie für das invasive Wachstum in Korneagewebe im *ura3*-defizienten Stamm CAI4 (Braun *et al.*, 2000).

Strukturelle Charakteristika der Pry-Proteine

Analysen der Kristallstruktur verschiedener Mitglieder der CAP-Proteinfamilie in Pflanzen und anderen Organismen zeigen, dass diese Proteine einen durch Disulfidbrücken stabilisierten, strukturell konservierten Bereich einer Größe von 17 – 21 kDa besitzen, die sog. CAP-Domäne (auch: SCP- oder PR-Domäne). Im Bereich der CAP-Domäne finden sich die Signaturen 1 bis 4 der CRISP- bzw. der CAP-Proteinfamilie (Gibbs *et al.*, 2008; Gasteiger *et al.*, 2003). Diese Signaturen haben folgende Sequenzen:

- CRISP1 bzw. CAP1: [GDER]-[HR]-[FYWH]-[TVS]-[QA]-[LIVM]-[LIVMA]-W_{xx}-[STN]
- CRISP2 bzw. CAP2: [LIVMFYH]-[LIVMFY]-xC-[NQRHS]-Y_x-[PARH]-x-[GL]-N-[LIVMFYWDN] (<http://www.expasy.ch/prosite>)
- CAP3: HN_{xx}R
- CAP4: G[EQ]N[ILV]

Ein Bereich großer Homologie zur CAP-Domäne mit einer Länge von 130 Aminosäuren (etwa 14,3 kDa) findet sich in der abgeleiteten Aminosäuresequenz von *RBE1* zwischen Position 123 und 252 (Abb. 13, fettgedruckt).

In diesem Bereich finden sich auch die vier Signatursequenzen der CAP-Proteinfamilie. Sie zeigen eine hohe Homologie mit teilweise identischen Aminosäuren in allen abgeleiteten Sequenzen der Pry-Proteinfamilie in *C. albicans* (Abb. 13).

ORF19.13583 (Rbt4p)	-----MKFSQVATTAAI FAGLT TAEIAYVTQTRGVTVGETAT	37
ORF19.2336	-----MKTLLFIYLQLLLLLLSII IGRVVKVEYLHL	30
ORF19.7218 (Rbe1p)	-----MKITNTLLNAAALLAVTEAATITKFFTASTQTLFVTQ	37
ORF19.6200	-----MKFLQSFVILAVFSFAANLVSSKLVYVEYETKYVTVEIVTI	41
ORF19.2787	-----MKQNYILSIILCYLLANVHSAPAIITVWQTVTDAQVAAG	60
:		
ORF19.13583 (Rbt4p)	VATVTVGATVTGGGQGDVQVQSAAPEADDIQQSAVPEAD-----	78
ORF19.2336	VV-----	32
ORF19.7218 (Rbe1p)	TSQTVVATKSFVETIYSAPPKQLTS-----	62
ORF19.6200	VSGETTYTTERLETNGPTSTTTTIVIPSSKPSPEKPKSDSQ-----	84
ORF19.2787	PTAAPAPANANANVQQAASAPAPAPVASPAAPAPASSAPQSSTPSSSGWLSNLFNSFF	120
:		
ORF19.13583 (Rbt4p)	-----DIQQSVVPEAEPTADADGGNGIAITEVFTTTIMGQEIYVSGVYYS	123
ORF19.2336	-----EVEPSTITESCLSDGIDG-----YSGSFYL	57
ORF19.7218 (Rbe1p)	-----KTQDSTSPITSSVNSLTSSSATS YVETTTAPSSSTLTSTISS	107
ORF19.6200	-----PMFQSPSPVQITPSTTSINNAPSPKPKPETTVTASPAVIAHTSVFV	130
ORF19.2787	GGSDSDSSSGSDTASAAPASTSPQSSSSSSSSSSGNSFLSFLSGLFGSGSSSTPSSISQQ	180
:		
ORF19.13583 (Rbt4p)	YGEHTYGDVQVQTLTIGGGFPDQYPTTEVSAEASPSAV-----	165
ORF19.2336	N-----	58
ORF19.7218 (Rbe1p)	TASEDS-----	113
ORF19.6200	TPNSAP-----	136
ORF19.2787	QQQQQGS PASGSNSPNSAQPDAAAASNPVPQSNQSGSLGSGFGSGSGSDSDSGS	240
:		
ORF19.13583 (Rbt4p)	-----TTSSAVATPDAKVPDSTKDASQPAATTASGSSSGSNDFSGVKDTKFA	212
ORF19.2336	-----TTFA	62
ORF19.7218 (Rbe1p)	-----DATPTADVEFA	124
ORF19.6200	-----TTSSPPNIVQVKAAITPSAPKQPQPQENNSGTNDDSQLSSFS	183
ORF19.2787	GLPSASSSTIIQQQPSSNIGSSSTSSSSSSSSSSSSSSSGDIYAAISQCDGIDASFA	300
*:		
CAP3		
ORF19.13583 (Rbt4p)	QQILDAHNOQRARHGVPDLTWDATVYQYAKFADQ-YSCSGN-LQHS GGKYGENLAVGYA	270
ORF19.2336	ELMLKEHNNKRKLHQSCPLKWSSELFNYSQFAAE-YSCSGI-LQHS GGKYGENLAFGY	120
ORF19.7218 (Rbe1p)	EEILKEHNKRALHGVPALSWNSKLAEYAQDYANTGFDCSNLNLKHS GGPGYGENLAAGYM	184
ORF19.6200	RQILEAHNKKRASHGVNPLTWSNELYNYANKVASS-YDCSGN-LRHTSGPGYGENLALGYS	241
ORF19.2787	SEILDHANKYRAQHKGVDLSDVDVTYNYAKNNADN-YDCSGV-LTHTHGKFGENLAAGFK	358
	:* . ** * * * . * . : * * . * : * * . * * : * : * : * * * * * :	
CAP1		
ORF19.13583 (Rbt4p)	DGAAALQAWYEEAGKDGLSYSYSGSSSVYNHFTQVVKSTTKLGCAYKDCRAQN--WGLVY	328
ORF19.2336	P-IGAIEAWYDE---GEMVYVYGENVYNHFTAIVWNNTNSLGCAYKSCDTTTLNLYI	175
ORF19.7218 (Rbe1p)	GGISPVDAWYDEISMVDWNVDFTESTIG-HFTQLVWRSTIQVGCAMMCSTAWR---QIT	240
ORF19.6200	SGANAVSAWYSEG-----FNFGGAGKLNHFTQVVKSTTQLGCAYKDCRAKG--WGLYI	293
ORF19.2787	DGASTVAAWVDEP-----ISYSDASFVYNHFTQVIWKGSTKVGCAKDCRKN--WGLYV	411
	: : * * . * * * * : * * . : * * . : * * * * * * * :	
CAP2		
ORF19.13583 (Rbt4p)	VCSYDPAGNVMGTDPKTGKSYMAENVLRPQ-	358
ORF19.2336	VCSYPPGNVIGYSSQNVPPLNSKMN-----	202
ORF19.7218 (Rbe1p)	VCEYLPRGNVIGLNVTSGHSYFVDNVLPLK	271
ORF19.6200	ICNYQKPGNIIGQELANILPLIRS-----	317
ORF19.2787	VCEYDPYGNVIGQGSKNVFP-----	431
	: * . * * * : * * : * * . : * * . : * * . : * * . : * * . : * * . :	

Abb. 13. Sequenzvergleich der abgeleiteten Proteinsequenzen der PRY-Gene in Candida albicans: Rbt4p (ORF19.13583), ORF19.2336, Rbe1p (ORF19.7218), ORF19.6200 und ORF19.2787; erstellt mit Hilfe des Programms ClustalW2 (Larkin et al., 2007); (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2>); „*“ = identische AS in allen Sequenzen, „.“ = konservierte Substitutionen, „:“ = semi-konservierte Substitutionen; fettgedruckt: CAP-Domäne von Rbe1p; unterstrichen: hydrophobe Signalsequenz; CAP1-CAP4: CRISP- bzw. CAP-Signaturen 1-4 in Rbe1p bzw. Rbt4p (Hulo et al., 2008).

Die konservierte CAP-Domäne weist in allen fünf Proteinen in etwa die gleiche Größe von etwa 14 kDa bis 15 kDa auf und ist damit etwas kleiner als die durchschnittliche Größe dieser Domäne in der CAP-Proteinfamilie.

Alle fünf Aminosäuresequenzen weisen ferner Charakteristika sekretierter Proteine auf. Dazu gehört eine potenzielle hydrophobe Signalpeptidsequenz am N-Terminus (Abb. 13, unter-

strichen), die auf eine Lokalisation der prozessierten Proteine entlang des sekretorischen Wegs hinweist (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>). Potenzielle O-Glykosylierungsstellen in Regionen mit einem hohen Anteil der Aminosäuren Serin und Threonin finden sich für alle Gene außer *ORF19.2336/ORF19.9872* (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc>; s. Anhang). Glykosylierungen sind ebenfalls typisch für Zelloberflächenproteine bzw. sekretierte Proteine. Keines der fünf potenziellen Proteine verfügt über Sequenzen, die das Anfügen eines Glykosylphosphatidylinositol-Restes (GPI-Anker) am C-Terminus zur kovalenten Verankerung in der Zellwand erlauben (Vorhersage-Algorithmus: *big-PI Fungal Predictor*, http://mendel.imp.ac.at/gpi/fungi_server.html, (Eisenhaber *et al.*, 2004)) sowie über Transmembrandomänen (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM>, (Krogh *et al.*, 2001); Daten nicht gezeigt) (Abb. 14).

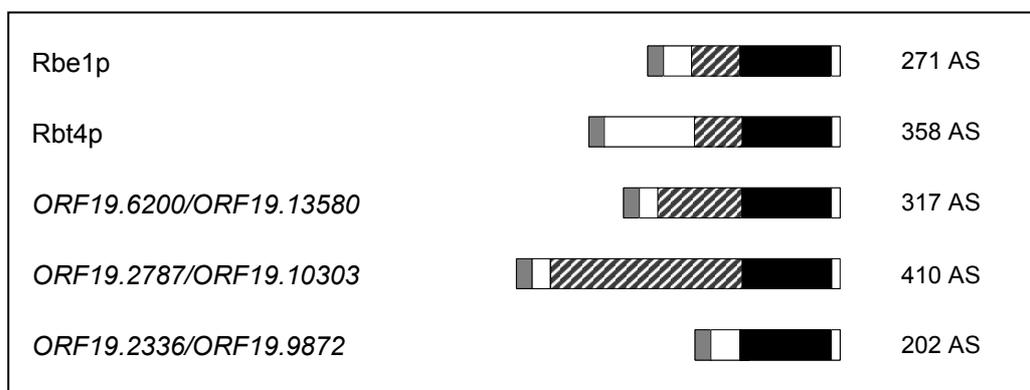


Abb. 14. Konservierte Bereiche der PRY-Proteine in *C. albicans*.

dunkelgrau: hydrophobe Signalsequenz, schraffiert: Serin-, Threonin-reiche Region; schwarz: CAP- bzw. PR1-Domäne

Aufgrund ihrer signifikanten Homologien untereinander, sowie zu den Proteinen der CAP-Superfamilie und damit zu den Pry-Proteinen von *S. cerevisiae*, wurden diese fünf Gene und ihre potenziellen Produkte einer neuen Familie von Pry-Proteinen in *Candida albicans* zugeordnet.

Phylogenetische Verwandtschaftsbeziehungen der Pry-Proteine in Pilzen

Die phylogenetischen Verwandtschaftsbeziehungen von Rbe1p als ein Vertreter der Pry-Proteine in *C. albicans* zu homologen Proteinen aus der Gruppe der Pilze, die ebenfalls der CAP-Proteinfamilie zugerechnet werden können, stellen sich folgendermaßen dar (Abb. 15):

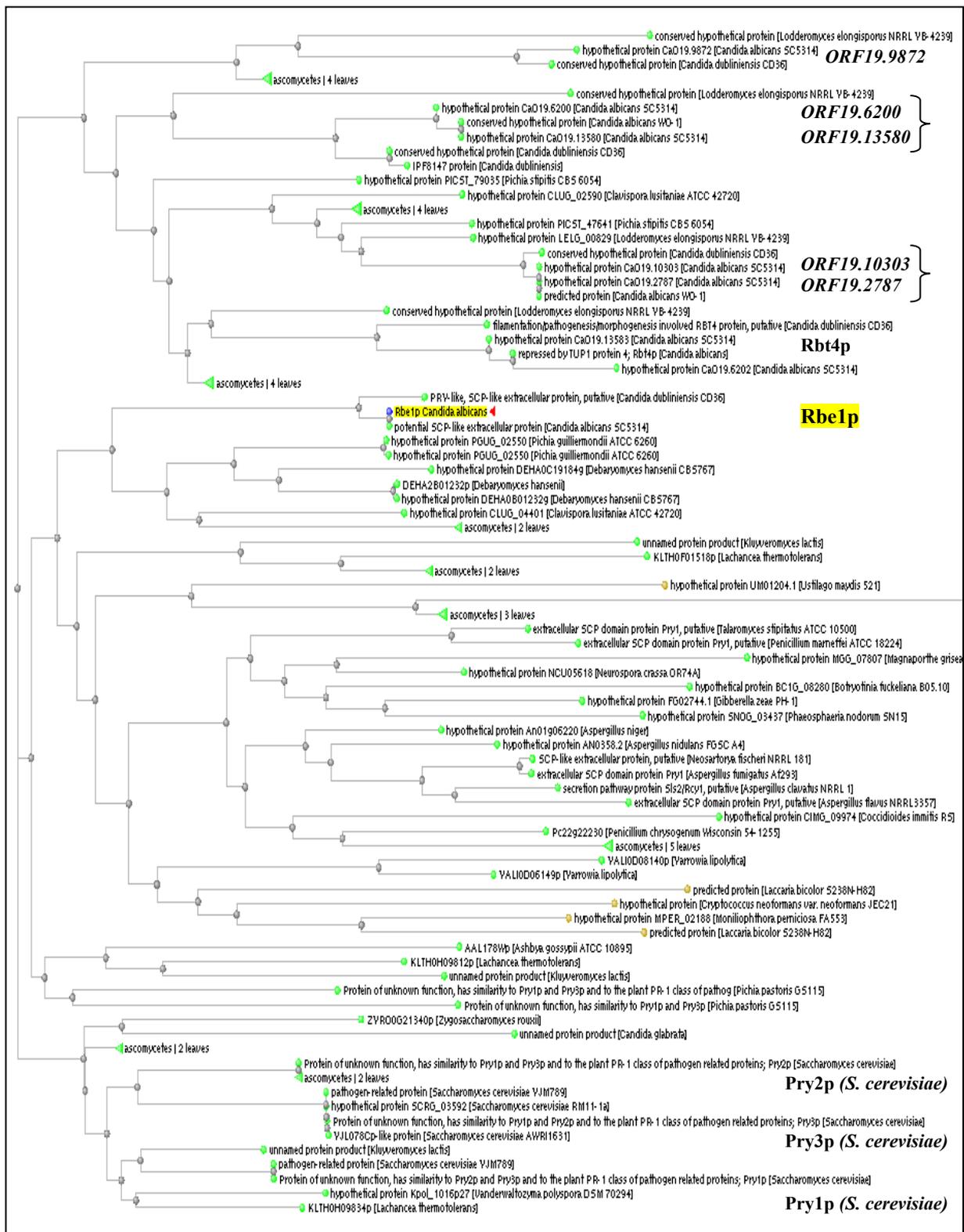


Abb. 15. Phylogenetische Verwandtschaft von Rbe1p mit potenziellen CAP-Proteinen von Pilzen. Abgleich der Aminosäuresequenzen von Rbe1p mit der Proteindatenbank der Pilze des NCBI mit Hilfe des BLAST-Algorithmus (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Mitglieder der Pry-Familie in *C. albicans* und *S. cerevisiae* sind hervorgehoben (Klammer: Allele). Stammbaum-Algorithmus: *Neighbor Joining* (Saitou and Nei, 1987).

Proteine mit großer Ähnlichkeit zu Rbe1p finden sich v.a. in Ascomyceten, nur wenige Proteine aus Basidiomyceten finden sich in der näheren Verwandtschaft. Dazu gehören aber einige bedeutende human- oder pflanzenpathogene Vertreter dieser Gruppe, wie *Cryptococcus neoformans* und *Ustilago maydis*. Auch bei den Vertretern der Ascomyceten, bei denen sich Proteine mit einer hohen Homologie zu Rbe1p finden, handelt es sich in der Hauptsache um Pathogene. Dazu gehören in nächster Verwandtschaft von *C. albicans* seltene Erreger invasiver Kandidosen wie *C. dubliniensis* (verursacht ~ 0,1% der invasiven Kandidosen weltweit), *Clavispora lusitaniae* (= *Candida lusitaniae*: ~ 1% der invasiven Kandidosen weltweit), *Pichia guilliermondii* und *Debaryomyces hansenii*. Bei den beiden letzteren handelt es sich um Teleomorphe (geschlechtliche Fortpflanzungsformen) der korrespondierenden Anamorphen *Candida guilliermondii* und *Candida famata*. *Pichia guilliermondii* ist in der Natur weit verbreitet und ein Bestandteil der mikrobiellen Flora des Menschen (Odds, F.C.: *Ecology of Candida and epidemiology of candidosis*; in: (Odds, 1988)), aber auch zusammen mit seiner anamorphen Form weltweit für etwa 1 – 2% der Infektionen des Blutstroms (Kandidämien) verantwortlich (Lan and Xu, 2006; Pfaller *et al.*, 2006). *Debaryomyces hansenii* ist für weltweit etwa 0,08 – 0,5% invasiver Kandidosen verantwortlich (Pfaller and Diekema, 2007). Im weiteren Umfeld finden sich neben Humanpathogenen wie *Coccidioides immitis*, *Penicillium marneffei* oder *Aspergillus fumigatus* weitere Arten der Gattung *Aspergillus*, sowie Pflanzenpathogene wie *Botryotinia fuckeliana* (Anamorph: *Botrytis cinerea*; Grauschimmelfäule vieler Nutzpflanzen, aber auch Edelfäule bei Wein) und *Ashbya gossipii* (Schädling von Baumwolle und Zitrusfrüchten, aber auch biotechnologisch zur Herstellung von Riboflavin (Vitamin B2) im industriellen Maßstab genutzt). Daneben finden sich weitere Pilze, die in der Biotechnologie genutzt werden oder u.U. nutzbar sind, wie *Aspergillus niger* (wird für die Produktion von 99% des weltweiten Zitronensäurebedarfs verwendet), *Kluyveromyces lactis* (Produktion des Labferments Chymosin, Käseherstellung), *Yarrowia lipolytica* (sekretiert nutzbare Stoffwechselprodukte wie Zitronensäure, kann Lipide in Methan umwandeln) oder *Pichia stipitis* (besitzt die größte Kapazität für die Umwandlung von Xylose in Ethanol).

Die Mehrzahl dieser Pilze ist dimorph (neben den *Candida*-Arten auch *C. neoformans*, *C. immitis*, *P. marneffei* (der einzige dimorphe Pilz der Gattung *Penicillium*), *S. cerevisiae*, *Y. lipolytica*, *P. stipitis*) oder filamentös (*A. fumigatus*, *A. niger*, *B. fuckeliana* oder *A. gossipii*).

Es fällt auf, dass die einzelnen Mitglieder der Pry-Proteinfamilie in *C. albicans* in ihrer phylogenetischen Verwandtschaft näher zu potenziellen Orthologen aus anderen Organismen stehen, als zu den paralogen Familienmitgliedern in *C. albicans* selbst. Bei den Orthologen nächster Verwandtschaft handelt es sich dabei für alle fünf Mitglieder der Pry-Familie um potenzielle Proteine aus dem nahe verwandten *C. dubliniensis*. Dabei nimmt Rbe1p eine besondere Stellung ein, da es von den anderen Pry-Proteinen in *C. albicans* isoliert erscheint und sogar (hypothetischen) Proteinen von Pilzen aus der Abteilung der Basidiomyceten, wie *C. neoformans*, näher zu stehen scheint, als diesen. In näherer Verwandtschaft von Rbe1p befinden sich dabei vor allem potenzielle Proteine der seltenen Erreger invasiver Kandidosen,

wie *P. guillermondii* und *D. hansenii*. Die anderen vier Mitglieder der Pry-Proteinfamilie stehen zu Rbe1p in einem ähnlichen Verwandtschaftsverhältnis wie dies für Pry-Proteine von *S. cerevisiae* zutrifft und finden sich in einem gemeinsamen Zweig. Aber auch innerhalb dieser Gruppe stehen ihnen orthologe Proteine anderer Organismen näher als die Mitglieder der Pry-Familie in *C. albicans* selbst.

Die Superfamilie der CAP-Proteine in Säugetieren gliedert sich anhand konservierter Sequenzmotive am C-Terminus in neun Unterfamilien (Gibbs *et al.*, 2008). Die Proteine der Pry-Familie von *S. cerevisiae* und der PR-1-Familie aus Pflanzen zeigen in Säugern die größte Verwandtschaft zur Unterfamilie der GliPR2-Proteine (*Glioma pathogenesis-related protein 2*, auch: GAPR1-Proteine für *Golgi-associated plant pathogenesis-related protein 1*). GliPR2-Proteine stellen die primitivsten CAP-Proteine in Säugern dar und haben sich bei diesen phylogenetisch wahrscheinlich als früheste der neun CAP-Unterfamilien diversifiziert. Ihnen fehlt jedoch als einzige Unterfamilie eine potenzielle Signalsequenz, was mit ihrer intrazellulären Lokalisation übereinstimmt (Eberle *et al.*, 2002). Ebenso wie den Proteinen der PR-1- und der Ag5-Familie fehlen ihnen C-terminale Sequenzmotive und ihre Sequenz endet kurz nach dem CAP2-Motiv. Homologe von GliPR2-Proteinen sind die am weitesten verbreiteten Proteine der CAP-Superfamilie und finden sich neben den Säugetieren und Pilzen (vgl. Abb. 11; z.B. *S. cerevisiae* Pry1p - Pry3p), Nematoden (z.B. *Caenorhabditis elegans*), Insekten (z.B. *Drosophila melanogaster*), Seescheiden, Amphibien, Fischen, Vögeln. Bis jetzt wurden 36 *GliPR2*-Gene identifiziert, davon 24 in Säugetieren (Gibbs *et al.*, 2008). Nur zwei Mitglieder dieser Unterfamilie der CAP-Proteine sind bereits charakterisiert: GliPR2p des Menschen und der Maus. Im Menschen findet sich GliPR2 hauptsächlich in Geweben mit immunologischer Funktion (Eisenberg *et al.*, 2002). In der Maus wird es normalerweise in den Nieren sekretiert und ist bei Nierenfibrose hochreguliert (Baxter *et al.*, 2007).

Auch Rbe1p zeigt als Protein eines eukaryontischen Pilzes große Homologien zu diesen Säugetierproteinen. So besteht im Bereich der konservierten CAP-Domäne (Abb. 16, grün) und darüber hinaus bis zum C-Terminus 34% Identität und 42% Homologie zu GliPR2 des Menschen und 39% Identität und 48% Homologie zu GliPR2 der Maus.

Ein phylogenetischer Stammbaum zeigt die Verwandtschaft von Rbe1p zu CAP-Proteinen des Menschen (Abb. 17):

GliPR2 (Mensch)	-----	
GliPR2 (Maus)	-----	
Rbe1p	MKITNTLLNAAALLAVTEAATITKFFTASTQTLFVTQTSQTVVATKSFVE	50
GliPR2 (Mensch)	-----	
GliPR2 (Maus)	-----	
Rbe1p	TIYSAPPKQLTSKTQDSTSPVSSVNSLTSSSATSIVETTTTTPAPSSSTLT	100
GliPR2 (Mensch)	-----MGKSASKQFHNEVLKAHNEYRQKHGVPPLKLCCKNLN	36
GliPR2 (Maus)	-----MGKSASKQFNNEVLKAHNEYRAQHGVPPLKLCCKKLN	36
Rbe1p	TSTISSSTASESDATPTADVEFAEEILKEHNVKRALHGVPAALSWSNKL	150
	:* . :* :*:** * * * **** . * . . : : *	
GliPR2 (Mensch)	REAQQYSEA--LASTRILKHSPESSRGCCGENLAWASYDQT-----	75
GliPR2 (Maus)	REAQQYSEA--LASTRILKHSPESSRGCCGENLAWASYDQTKDVAADRWY	84
Rbe1p	EYAQDYANTGFDCSNLNLKHS---GGPYGENLAAGYMGGISP--VDAWY	194
	. **:*::: .*. **** * ***** .	
GliPR2 (Mensch)	-----GHFTAMVWKNTKKMGVKGASASDGS-SFVVARY	107
GliPR2 (Maus)	SEIKSYNFQQPGFTSGTGHFTAMVWKNTKKIGVGKASASDGS-SFVVARY	133
Rbe1p	DEISMVDWNNVDFTSTGHFTQLVWRSTTQVGCACMMMCSTAWRQITVCEY	244
	**** :*: . * . : : * . * . . . : . * . *	
GliPR2 (Mensch)	FPAGNVVN-----EGFFEENVLPKK	128
GliPR2 (Maus)	FPAGNIVN-----QGFFEENVPPPK	154
Rbe1p	LPRGNVIGLNVTSGHSYFVDNVLPLK	271
	:* **::: . . : : * :** ** *	

Abb. 16. Sequenzvergleich von Rbe1p mit CAP-Proteinen von Säugetieren.

Vergleich der Aminosäuresequenzen von Rbe1p (*ORF19.7218*) mit GliPR2 aus Mensch und Maus (ClustalW2); „*“ = identische AS in allen Sequenzen, „.“ = konservierte Substitutionen, „.“ = semi-konservierte Substitutionen; unterstrichen: PR-Domäne von Rbe1p.

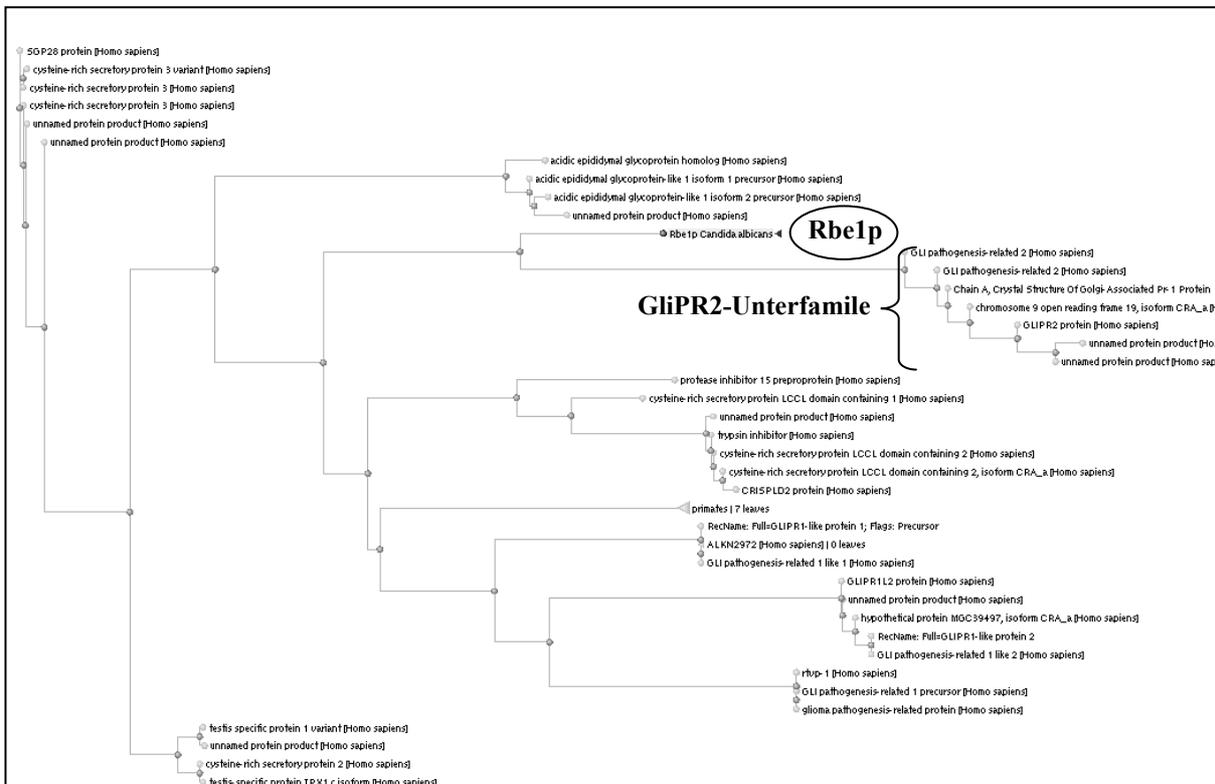


Abb. 17. Phylogenetische Verwandtschaft von Rbe1p mit CAP-Proteinen des Menschen.

Ableich der Aminosäuresequenz von Rbe1p mit der Proteindatenbank des Menschen des NCBI mit Hilfe des BLAST-Algorithmus (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>). Stammbaum-Algorithmus: Neighbor Joining (Saitou and Nei, 1987).

Aufgrund der häufigen Assoziation von GliPR2-Proteinen mit immunologischen Geweben und der Tatsache, dass sie die größte Identität zu den PR-1-Proteinen der Pflanzen aufweisen, wird eine evolutive Verbindung zwischen dem Immunsystem von Pflanzen und Säugetieren diskutiert (Eberle *et al.*, 2002; Murphy *et al.*, 1995; Szyperski *et al.*, 1998). Die nahe Verwandtschaft der Pry-Proteine der Pilze zu den GliPR2-Proteinen der Säugetiere könnte ebenfalls auf eine immunrelevante Funktion dieser Proteine hindeuten.

2 Transkriptionelle Regulation der *PRY*-Gene in *Candida albicans*

2.1 Expression von *RBE1* und *RBT4*

Das *PRY*-Gen *RBE1* wird in *C. albicans*-Wildtypzellen in Blastosporen exprimiert. Während der Induktion von Hyphenwachstum nimmt die Transkriptmenge über einen Zeitraum von 6 Stunden kontinuierlich ab und bleibt auch nach 8 Stunden auf einem sehr niedrigen Niveau. Die Repression von *RBE1* in Hyphen scheint essentiell mit dem zentralen Regulator der Morphogenese und der Virulenz in *C. albicans*, *EFG1*, verknüpft zu sein, da *RBE1* in einem Deletionsstamm für *EFG1* sehr stark induziert ist. Diese starke Induktion von *RBE1* in Abwesenheit von *EFG1* ist unter verschiedenen Bedingungen des Blastosporen- und Hyphenwachstums zu beobachten, woher die Namensgebung des Gens stammt (*Repressed By EFG1*; Sohn *et al.*, 2003).

Die Expression von *RBT4* wird dagegen von einem weiteren zentralen Regulator der Morphogenese in *C. albicans*, dem generellen Repressor *TUPI1*, reprimiert (*RBT4* = *Repressed By TUPI1*) und ist im Gegensatz zu *RBE1* während des Hyphenwachstums in Abhängigkeit von *EFG1* induziert (Braun and Johnson, 2000).

Vor einer genaueren Analyse der transkriptionellen Regulation der identifizierten 5 Mitglieder der *PRY*-Genfamilie in *Candida albicans* mit Hilfe quantitativer Real-Time PCR (qRT-PCR) wurde zunächst der Zeitverlauf der Expression von *RBE1* in Blastosporen des Wildtypstammes SC5314, sowie die Regulation der beiden Gene *RBE1* und *RBT4* im Zusammenhang mit der Morphogenese von *C. albicans* mittels *Northern Blot*-Analysen überprüft.

Um festzustellen, zu welchen Zeitpunkten *RBE1* in Blastosporen des Wildtypstammes SC5314 hauptsächlich exprimiert wird, wurde ein Zeitverlauf von 48 Stunden analysiert. Dazu wurden Wildtypzellen einer Über-Nacht-Kultur nach Inokulation in YPD-Medium für definierte Zeiträume bei 30°C kultiviert, anschließend die RNA isoliert und mittels *Northern Blotting* analysiert. Als Sonde für die Detektion des *RBE1*-Transkriptes wurde dabei ein Bereich des offenen Leserahmens am 5'-Ende des *RBE1*-Gens verwendet, der sich außerhalb der konservierten CAP-Domäne befindet, um Kreuzhybridisierungen mit anderen Mitgliedern der *PRY*-Familie in *C. albicans* zu vermeiden (Abb. 18).

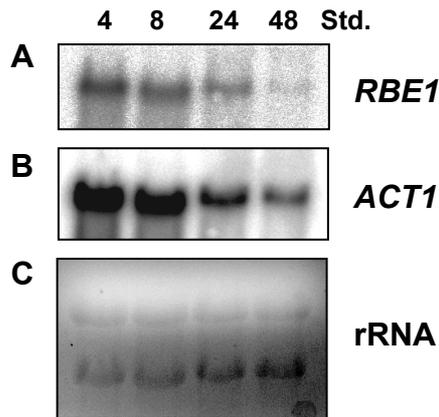


Abb. 18. Zeitverlauf der Expression von *RBE1* Blastosporen des *C. albicans*-Wildtypstammes (SC5314). Northern Blot-Analyse. A. Zeitverlauf der Expression von *RBE1* in *C. albicans* SC5314 (Wildtyp) bei Kultivierung der Zellen als Blastosporen in YPD-Medium, 30°C. B. Zeitverlauf der Expression von *ACT1*; C. Menge der aufgetragenen RNA für die Gelelektrophorese (Ethidiumbromid-Färbung).

Die relativen Signalstärken zu den verschiedenen Zeitpunkten zeigen eine Expression von *RBE1* in Blastosporen des Wildtypstammes v.a. in der exponentiellen Wachstumsphase (Zeitwerte: 4 und 8 Stunden). Das Expressionsniveau sinkt nach 24 Stunden Wachstum in der stationären Wachstumsphase deutlich ab, nach 48 Stunden ist eine Expression von *RBE1* fast nicht mehr nachweisbar. Dies trifft ebenfalls auf die Expression des normalerweise zur Normalisierung der in den einzelnen Spuren aufgetragenen RNA-Menge verwendeten Gens *ACT1* zu, weshalb als zusätzliche Kontrolle die für die Northern Blot-Analyse verwendete, durch Ethidiumbromid-Färbung im Gel sichtbare Menge der rRNA dargestellt ist. Diese ist in allen Spuren etwa gleich groß, so dass der Rückgang an detektierter Transkriptmenge zu den späteren Zeitpunkten tatsächlich auf eine Abnahme der Transkriptmenge in den entsprechenden RNA-Präparationen zurückzuführen ist.

Für die weiteren Mitglieder der Pry-Proteinfamilie in *C. albicans* (*ORF19.2787*, *ORF19.6200* und *ORF19.2336*) wurden vergleichbare Expressionsanalysen durchgeführt, ebenfalls mit Sonden aus dem 5'-Ende der offenen Leserahmen. Es konnten unter diesen Bedingungen jedoch keine signifikanten Transkriptmengen nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Da sowohl *RBE1* als auch *RBT4* in Abhängigkeit von der Morphogenese in *C. albicans* reguliert werden, wurde die Regulation beider Gene in Deletionsstämmen der an der Regulation der Morphogenese beteiligten Transkriptionsfaktoren Efg1p (Stoldt *et al.*, 1997), Tup1p (Braun and Johnson, 1997) und Tec1p (Schweizer *et al.*, 2000) untersucht, wobei Tec1p die Regulation Efg1p-regulierter Gene in bestimmten Fällen vermittelt (Lane *et al.*, 2001a). Dazu wurden die entsprechenden Deletionsstämme für 8 Stunden bei 30°C in YPD-Medium kultiviert (Abb. 19).

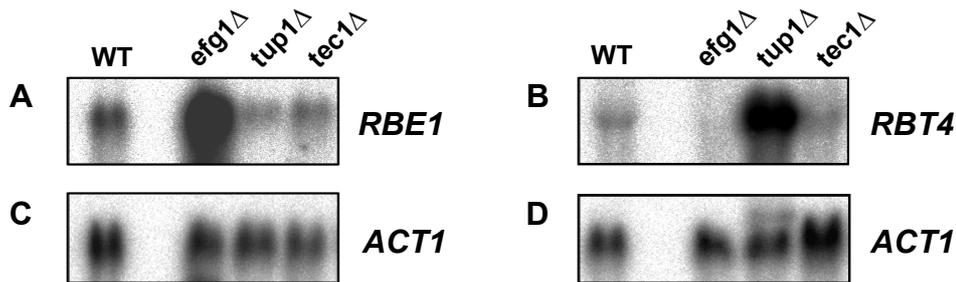


Abb. 19. Regulation der *PRY*-Gene *RBE1* und *RBT4* durch Regulatoren der Morphogenese in *C. albicans*. Northern Blot-Analyse. A, B. Expression von *RBE1* und *RBT4* in Deletionsstämmen der an der Morphogenese beteiligten Transkriptionsfaktoren Efg1p (Stamm: HLC52), Tup1p (Stamm: BCa2-10) und Tec1p (Stamm: CaAS12) in Blastosporen nach 8 Stunden Wachstum in YPD-Medium, 30°C. C, D. Expression von *ACT1* in den entsprechenden Stämmen. WT: Wildtypstamm SC5314.

Die Northern Blot-Analysen bestätigen zunächst die beschriebene starke Induktion von *RBE1* in Abwesenheit von Efg1p. Wie in vergleichenden Transkriptionsanalysen bereits gezeigt, wird die Expression von *RBE1* von Efg1p unter verschiedenen Bedingungen reprimiert. Fehlt Efg1p, gehört *RBE1* zu den am stärksten de-reprimierten Genen in den entsprechenden *C. albicans*-Stämmen (Sohn *et al.*, 2003). Dies bestätigt sich deutlich in der Northern Blot-Analyse von Blastosporen in der exponentiellen Wachstumsphase. Für die stationäre Phase nach einem Wachstum von 17 Stunden ergibt sich ein vergleichbares Bild (Daten nicht gezeigt). Dabei wird die Repression der *RBE1*-Transkription nicht von Tec1p bewirkt. Vergleicht man die relativen Signalstärken für *RBE1* im Wildtypstamm mit den Deletionsstämmen für *TUP1* und *TEC1*, findet sich vielmehr eine Reduktion der Transkriptmenge in den beiden Deletionsstämmen, so dass Tup1p und Tec1p eher als Aktivatoren der Transkription von *RBE1* in YPD-Medium erscheinen (Abb. 19, A). Die Repression von *RBT4* durch Tup1p in Blastosporen ist ebenfalls deutlich durch die starke Induktion der *RBT4*-Expression in Abwesenheit von Tup1 zu erkennen (Abb. 19, B). Das Fehlen von Efg1p sowie Tec1p hat keine Auswirkungen auf die Repression von *RBT4*, vielmehr ist in Abwesenheit von Efg1p keine Transkription von *RBT4* in Blastosporen nachzuweisen, so dass Efg1p nicht nur während des Hyphenwachstums, sondern auch während des Wachstums als Blastosporen in YPD-Medium als Aktivator der Transkription von *RBT4* erscheint (Abb. 19, B).

Hinsichtlich der Morphogenese sind die beiden *PRY*-Gene *RBE1* und *RBT4* also von zentralen Regulatoren des Dimorphismus genau gegensätzlich reguliert, wobei ihre Expression in je einer der beiden Wachstumsphasen reprimiert ist. *RBE1* wird von einem Aktivator des Hyphenwachstums - Efg1p - reprimiert und ist in Blastosporen exprimiert. Bei dem Übergang zu hyphalem Wachstum wird *RBE1* in Anwesenheit von Efg1p bis zur Nachweisgrenze reprimiert. *RBT4* wird während des Wachstums als Hefezellen dagegen von einem Repressor des Hyphenwachstums – Tup1p - reprimiert und v.a. während der hyphalen Wachstumsphase in Abhängigkeit von Efg1p als Aktivator exprimiert.

Für die weiteren Mitglieder der Pry-Proteinfamilie in *C. albicans* (*ORF19.2787*, *ORF19.6200* und *ORF19.2336*) konnten in diesen Stämmen keine signifikanten Transkriptmengen nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

2.2 Expression aller Mitglieder der *PRY*-Familie in *C. albicans*

In weiteren Analysen wurde die transkriptionelle Regulation aller fünf Mitglieder der in dieser Arbeit neu definierten *PRY*-Genfamilie in *C. albicans* - *RBE1*, *RBT4*, *ORF19.2787*, *ORF19.6200* und *ORF19.2336* - mit Hilfe der quantitativen Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR) untersucht. Dabei wurde die differentielle Regulation der *PRY*-Gene zum einen im Vergleich von Hefe- und Hyphenwachstum des *C. albicans* Wildtypstammes SC5314, sowie der zeitliche Verlauf ihrer Regulation in frühen Stadien des Hyphenwachstums untersucht. Ferner wurden die entsprechenden Regulationen in der unter physiologischen Bedingungen auftretenden weißen Zellform – den sog. *white*-Zellen - mit derjenigen in Paarungs-kompetenten *opaque*-Zellen des *C. albicans* Wildtypstammes SC5314 verglichen.

Die relative Quantifizierung erlaubt die Berechnung des Expressionsniveaus eines bestimmten Gens in einer unbekannt Probe relativ zu einem Referenz-Gentranskript, dessen Expressionsniveau zu den untersuchten Bedingungen als konstant angenommen wird (z.B. eines Haushalts-Gens) und das daher als endogene Kontrolle des jeweiligen Experiments dient. So können relative Veränderungen im Expressionsniveau eines zu untersuchenden Gens für verschiedene Stämme oder Wachstumsbedingungen quantitativ bestimmt werden. Das Ergebnis der relativen Quantifizierung ist das normalisierte relative Verhältnis der Konzentrationen der aus der RNA gewonnenen komplementären DNA des jeweiligen Gens unter den beiden untersuchten Bedingungen.

Regulation der PRY-Gene in Blastosporen versus Hyphen

Da die Expression der beiden *PRY*-Gene *RBE1* und *RBT4* von zentralen Regulatoren der Morphogenese und Virulenz in *Candida albicans* reguliert wird (Abb. 19), wurde eine Regulation der weiteren *in silico* identifizierten Mitglieder der *PRY*-Genfamilie im Zusammenhang mit der Morphogenese in *C. albicans* untersucht. Dafür wurden die relativen Konzentrationsverhältnisse der jeweiligen Gentranskripte im Vergleich von Blastosporen zu Hyphen des Wildtypstammes SC5314 zu einem Zeitpunkt von 8 Stunden nach der Induktion der jeweiligen Morphogenese-Formen bestimmt, da die Expression von *RBE1* in der exponentiellen Wachstumsphase in Blastosporen am höchsten ist (Abb. 18) und *RBT4* ebenfalls bereits zu frühen Zeitpunkten des Hyphenwachstums exprimiert wird (Braun and Johnson, 2000).

Für das Wachstum als Blastosporen bzw. Hyphen wurden Zellen des Wildtypstammes SC5314 über Nacht bei 30°C in YPD-Medium kultiviert, am nächsten Tag 1:100 in YPD-

bzw. α -MEM-Medium verdünnt und anschließend für 8 Stunden bei 30°C bzw. 37°C geschüttelt. Zu diesem Zeitpunkt befanden sich die Zellen in α -MEM-Medium nahezu ausschließlich in der Hyphenform.

Die transkriptionelle Analyse mittels RT-PCR ergab dabei folgende relative Veränderungen im Expressionsniveau der *PRY*-Gene im Übergang von Blastosporen- zu Hyphen-Wachstum (Abb. 20):

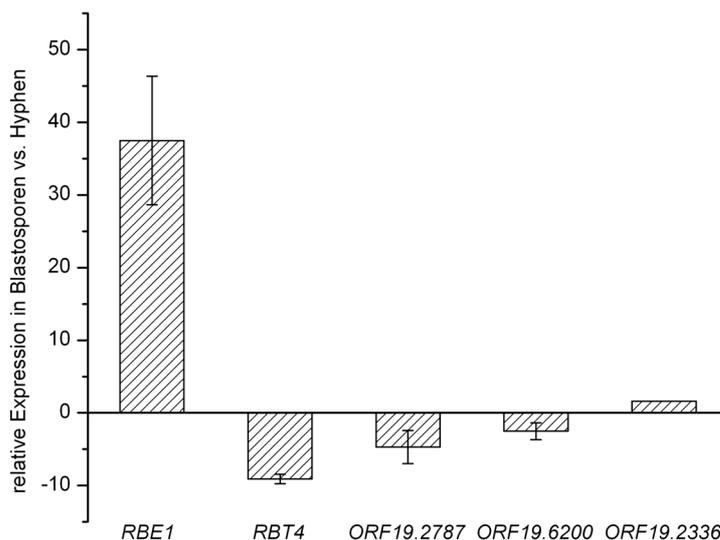


Abb. 20: Relative Expression der *PRY*-Gene im Vergleich von Blastosporen- zu Hyphenwachstum im *C. albicans* Wildtypstamm SC5314 (qRT-PCR). t = etwa 8 Stunden; Induktion von Blastosporen- und Hyphenwachstum in YPD-Medium, 30°C bzw. α -MEM-Medium, 37°C; Referenzgen: *ENO1*

Deutliche Änderungen im Transkriptionsniveau beim Vergleich von Blastosporen- und Hyphenwachstum von *C. albicans* zeigen sich erwartungsgemäß v.a. für die beiden *PRY*-Gene *RBE1* und *RBT4*. Die Expression von *RBE1* wird in Blastosporen um einen Faktor von über 37 gegenüber der Expression in Hyphen induziert, während die Expression von *RBT4* in Hyphen um das ca. 9-fache ansteigt.

Die differentielle Regulation der anderen drei *PRY*-Gene fällt weniger deutlich aus. Die Induktion von *ORF19.2336* in Blastosporen ist dabei kaum als signifikant zu bewerten (etwa 1,6-fach). *ORF19.2787* und *ORF19.6200* werden in Hyphen etwas stärker exprimiert als in Blastosporen (etwa 4,7-fach bzw. 2,5-fach). Die relativen Veränderungen in der Expression dieser drei Gene sind allerdings mit Vorsicht zu bewerten, da ihr Expressionsniveau insgesamt sehr niedrig ist – was sich bereits in der *Northern Blot*-Analyse andeutete (Kap. 2.1) - und eine Amplifikation erst in sehr späten Zyklen der RT-PCR erfolgt. So können geringe Unterschiede in der Konzentration der eingesetzten Menge an cDNA für die RT-PCR aufgrund der sehr geringen Ausgangsmenge darin enthaltener Transkripte bereits zu größeren relativen Unterschieden in der Amplifikation während der RT-PCR führen.

Kinetik der Regulation der *PRY*-Gene in frühen Stadien der Hyphenbildung

Die Expression von *EFG1* wird durch negative Autoregulation in den frühen Stadien der Hyphenbildung nach Induktion mit Serum oder Lee-Medium bei 37°C sehr rasch reprimiert (innerhalb von 5 min) und steigt über einen Zeitverlauf von etwa 60 min wieder an (Stoldt *et al.*, 1997; Tebarth *et al.*, 2003). Da die Expression von *EFG1* sowohl die Expression von *RBE1* als auch von *RBT4* beeinflusst (Abb. 19), wurde die Regulation der Mitglieder der *PRY*-Genfamilie in den frühen Stadien der Hypheninduktion des *C. albicans*-Wildtypstammes SC5314 mittels quantitativer RT-PCR untersucht. Dafür wurden Zellen des Stammes bei 30°C über Nacht in YPD-Medium inkubiert und für die Induktion hyphalen Wachstums am nächsten Tag auf eine optische Dichte (OD_{600}) von 0,1 in YPD-Medium mit 10% fötalem Kälberserum angeimpft und bei 37°C geschüttelt. Die Regulation der *PRY*-Gene sowie von *EFG1* wurde zu den Zeitpunkten 5, 15, 25, 40, 60 und 80 Minuten nach der Hyphen-Induktion im Vergleich zu ihrer Expression in der über-Nacht-Kultur als 0-Wert bestimmt (Abb. 21).

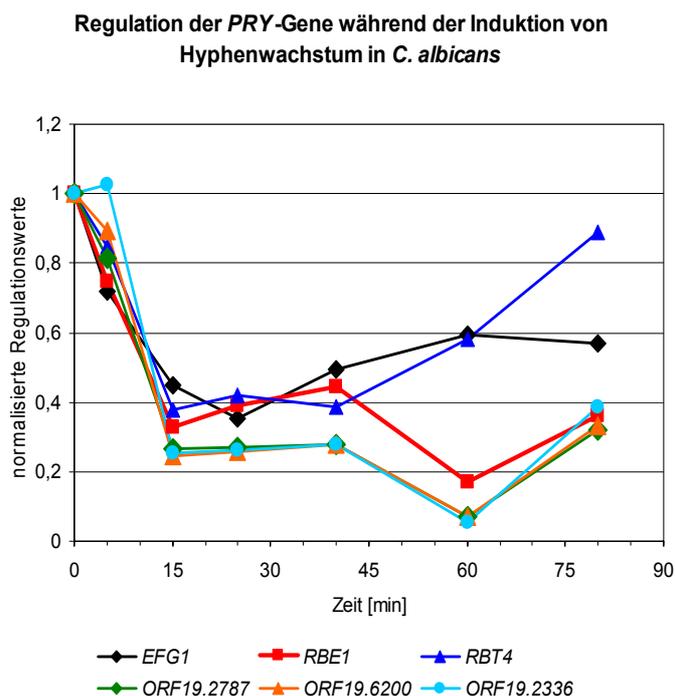


Abb. 21: Kinetik der relativen Expression der *PRY*-Gene während der Induktion von Hyphenwachstum im *C. albicans* Wildtypstamm SC5314 (qRT-PCR). Zeitwerte: 5, 15, 25, 40, 60 und 80 min nach Induktion von Hyphenwachstum in YPD-Medium, 10% Serum, 37°C; Regulation: Konzentration der cDNAs der jeweiligen Gene in Hyphen bezogen auf den 0-Stundenwert (stationäre Kultur nach Kultivierung ü.N. in YPD, 30°C); Referenzgen für die Normalisierung: *RDN18*.

Zunächst bestätigen die transkriptionellen Analysen die beschriebene rasche Repression von *EFG1* während der Hypheninduktion auch im Wildtypstamm SC5314. Die Transkriptmenge ist bereits nach 5 min reduziert und nimmt über einen Zeitverlauf bis 25 min stetig ab. Zu diesem Zeitpunkt zeigt sich eine etwa 2,8-fache Reduktion der *EFG1*-Transkriptmenge im Vergleich zu der in der stationären Blastosporen-Kultur gegebenen Transkriptmenge. Danach steigt die Konzentration des *EFG1*-Transkripts nach 60 bzw. 80 min bis auf einen Wert von dem etwa 0,6-fachen des Ausgangswertes an. Die Regulation der *PRY*-Gene verläuft dabei bis

zu einem Zeitpunkt von 40 min nach der Hypheninduktion parallel mit derjenigen von *EFG1*, indem die Transkriptmenge aller Gene um etwa dasselbe Verhältnis, wie für *EFG1* beschrieben, im Vergleich zum Ausgangswert abnimmt. Danach steigt die Transkriptmenge von *RBT4* kontinuierlich an. Die Transkriptmengen der anderen 4 Mitglieder der *PRY*-Familie erreichen nach 60 min ein Minimum, mit einer etwa 17-fachen Repression von *ORF19.2336*, einer etwa 14-fachen Repression von *ORF19.2787* und *ORF19.6200*, sowie einer etwa 6-fachen Repression von *RBE1*. Danach steigen die Transkriptmengen dieser 4 Gene beim Zeitpunkt von 80 min bis etwa zur 0,3-fachen Menge des Ausgangswertes wieder an.

Diese Ergebnisse bestätigen den positiven Zusammenhang der Regulation von *RBT4* und *EFG1*. Die Expression von *RBT4* ist in Hyphen nach der Aufhebung der Repression durch den generellen Repressor *TUPI* abhängig von der Induktion durch *EFG1* (Abb. 19, sowie (Braun and Johnson, 2000)), was sich in den parallelen Änderungen der Transkriptmengen beider Gene während der Hypheninduktion zeigt. Die Transkription von *RBT4* nimmt dabei nach 15 min kontinuierlich zu und wie die transkriptionellen Analysen vollständig ausgebildeter Hyphen nach 8 Stunden Wachstum zeigen (Abb. 20), ist *RBT4* zu diesem Zeitpunkt stark induziert. Andererseits reicht die Repression von *EFG1* zu den frühen Zeitpunkten der Hypheninduktion nicht für eine Induktion der *RBE1*-Transkription aus, wie sie in Abwesenheit von *EFG1* im $\Delta efg1$ -Deletionsstamm zu beobachten ist (Abb. 19, sowie (Sohn *et al.*, 2003)). Vielmehr ist unter diesen Bedingungen ebenfalls für *RBE1* sowie für alle weiteren Mitglieder der *PRY*-Genfamilie eine Repression zu beobachten. *RBE1* ist außerdem im Wildtyp – in Gegenwart von *EFG1* – sowie in der stationären Wachstumsphase ebenfalls reprimiert. Dies spricht für weitere Faktoren, die zu einer Repression von *RBE1* während des Hyphenwachstums beitragen. Ein möglicher Kandidat hierfür ist der Transkriptionsfaktor *CPHI*, da die Expression von *RBE1* während des hyphalen Wachstums in einem $\Delta cphi$ -Deletionsstamm bereits leicht und in einem Doppel-Deletionsstamm für *EFG1* und *CPHI* deutlich gegenüber den Einzeldelationen von *CPHI* und *EFG1* induziert ist (Sohn *et al.*, 2003). Während die Expression von *RBE1* in Hyphen über einen Zeitraum von 6 bis 8 Stunden stetig abnimmt (Sohn *et al.*, 2003), ist die Transkription von *ORF19.2787* und *ORF19.6200* zu diesem Zeitpunkt induziert, während diejenige von *ORF19.2336* wieder das Niveau der Transkription während des Blastosporenwachstums zu erreichen scheint (Abb. 20).

Regulation der PRY-Gene in white- versus opaque-Zellen

Mitglieder der *PRY*-Familie sind in einem weiteren wichtigen morphogenetischen Prozess in *C. albicans* differentiell reguliert: dem Wechsel von der unter physiologischen Bedingungen auftretenden weißen Zellform der Blastosporen, den sog. *white*-Zellen, zu den deutlich in Form, Größe und äußerer Erscheinung der Kolonien unterschiedlichen Paarungs-kompetenten *opaque*-Zellen (Miller and Johnson, 2002; Slutsky *et al.*, 1987).

Als Hauptaktivator dieses phänotypischen Wechsels wurde der Transkriptionsfaktor *Wor1p*

identifiziert. Dieser reprimiert in *opaque*-Zellen zusammen mit einem weiteren Transkriptionsfaktor, Czf1p, die Expression von Efg1p, welcher als Repressor des *opaque*-Status gilt und dessen Expression für die Aufrechterhaltung der *white*-Zellform erforderlich ist (Sonneborn *et al.*, 1999b; Srikantha *et al.*, 2000; Zordan *et al.*, 2006; Zordan *et al.*, 2007).

Vergleichende Transkriptionsstudien mit Hilfe Genom-weiter DNA-Microarrays zeigen eine transkriptionelle Induktion von *RBT4* in *white*-Zellen (etwa 7-fach) und *ORF19.2787/ORF19.10303* in *opaque*-Zellen (zwischen 4- und 14-fach) in dem zum Wildtyp isogenen Stamm CAI4 und dem klinischen Isolat WO-1, bei welchem der spontane Wechsel des Phänotyps als erstes beschrieben wurde (Lan *et al.*, 2002; Slutsky *et al.*, 1987; Tsong *et al.*, 2003).

Ferner konnte durch Chromatin-Immunpräzipitationen gezeigt werden, dass Wor1p zusammen mit dem Transkriptionsfaktor Mcm1p an die Promotorsequenz von *RBE1* bindet (Tuch *et al.*, 2008; Zordan *et al.*, 2007). In *C. albicans* bindet Wor1p zusammen mit Mcm1p an viele Gene, die an der Adaption an den menschlichen Wirt beteiligt sind, darunter auch solche, die an dem *white/opaque*-Wechsel beteiligt sind, wie z.B. auch Efg1p (Tuch *et al.*, 2008). Die Aminosäuresequenz von Wor1p weist dabei keines der konventionellen Motive für die sequenz-spezifische Bindung an die DNA auf.

Aus diesen Gründen wurde die transkriptionelle Regulation der *PRY*-Genfamilie während des *white/opaque*-Wechsels für den *C. albicans*-Wildtypstamm SC5314 während der exponentiellen Wachstumsphase mittels quantitativer RT-PCR untersucht.

Eine notwendige Voraussetzung für den Wechsel von der *white*- zur *opaque*-Form ist die Homozygotität bezüglich des Paarungs-Lokus (*mating type like*-, *MTL*-Lokus). Zellen, die heterozygot für den *MTL*-Lokus sind (a/α), was für die meisten klinischen Isolate von *C. albicans* gilt, können nicht in die *opaque*-Form wechseln, da die von diesen beiden Loci exprimierten regulatorischen Homeodomän-Proteine Mtl1p und Mtl α 2p - wahrscheinlich als Heterodimer - die Expression von Wor1p reprimieren und den Phänotypwechsel so unterbinden (Miller and Johnson, 2002).

Für den *MTL*-Lokus hemi- bzw. homozygote Zellen des Wildtypstammes SC5314 wurden durch Wachstum auf L-Sorbose als Kohlenstoffquelle gewonnen. Wachstum auf L-Sorbose selektiert auf den Verlust einer der beiden Kopien von Chromosom 5, auf denen sich die beiden singulären *MTL*-Loci von *C. albicans*, *MTLa* bzw. *MTL α* befinden (Janbon *et al.*, 1998; Magee and Magee, 2000; Rustchenko *et al.*, 1994). Durch den Verlust einer der beiden Kopien des Chromosoms 5 wird Hemizygotität für den *MTL*-Lokus hergestellt. Homozygotität für diesen Locus kann anschließend durch die Verdopplung der verbleibenden Kopie von Chromosom 5 durch Wachstum auf YPD-Medium induziert werden (Janbon *et al.*, 1998). Der Genomstatus so konstruierter Stämme wurde durch PCR- und *Southern Blot*-Analyse der beiden Gene *MTLa1* und *MTLa2* überprüft (Daten nicht gezeigt).

Spontan zur *opaque*-Form gewechselte Zellen der beiden Paarungstypen a und α des Stammes SC5314 wurden durch Kultivierung der entsprechenden Stämme auf SC-Medium für mehrere Tage bei Raumtemperatur, anschließender Vereinzelung der Zellen und erneutem Wachstum

auf SC-Medium für etwa 1 Woche selektioniert. Sektoren von *opaque*-Zellen in den normalerweise weißen Kolonien bzw. Kolonien von *opaque*-Zellen sind dabei deutlich durch ihre unterschiedliche Färbung zu erkennen.

Kulturen von *white*- und *opaque*-Zellen dieser Stämme wurden für die folgenden Analysen bei Raumtemperatur in Flüssigkultur angezogen und zunächst lichtmikroskopisch auf ihre Zellmorphologie hin untersucht (Abb. 22).

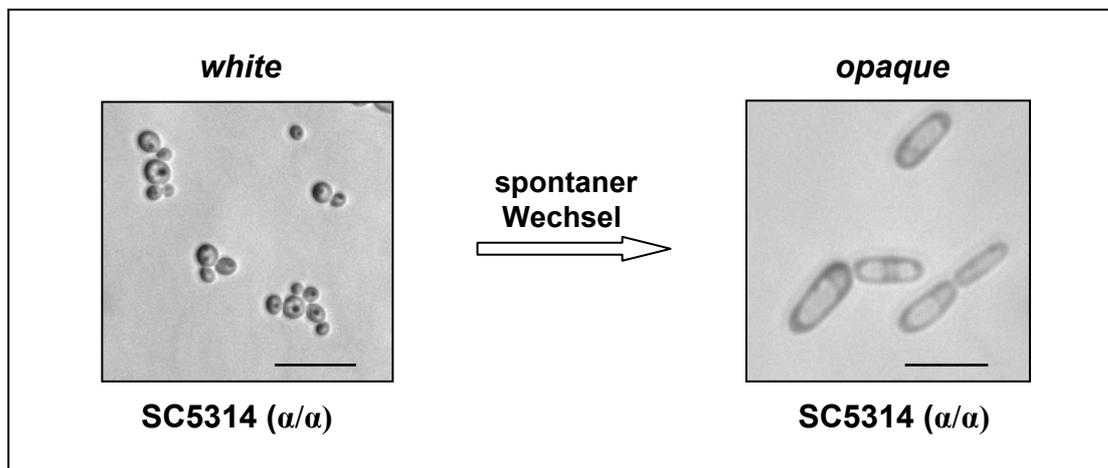


Abb. 22. *White*- und *opaque*-Zellen des Paarungstyps α/α des *C. albicans*-Wildtypstammes SC5314. Kultivierung in SC-Flüssigmedium bei Raumtemperatur; Lichtmikroskopie; Maßstabsbalken: 10 μm

Opaque-Zellen besitzen etwa die 2- bis 3-fache Größe von *white*-Zellen und weisen eine längliche, leicht gebogene Zellform auf (Slutsky *et al.*, 1987) Sie sind unter dem Lichtmikroskop deutlich von den weißen Blastosporen zu unterscheiden. Die Zellen der auf diese Weise gewonnenen *opaque*-Kulturen befanden sich in der großen Mehrheit in der *opaque*-Form, mit wenigen noch vorhandenen weißen Zellen.

Der Morphogenese-Status der betreffenden Stämme wurde anschließend ebenfalls auf transkriptioneller Ebene mittels RT-PCR anhand der Regulation Zelltyp-spezifischer Markergene während des exponentiellen Wachstums analysiert. *White*- und *opaque*-Zellen der beiden Paarungstypen α und α des Stammes SC5314 wurden dafür bis zu einer optischen Dichte (OD_{600}) zwischen 0,6 und 1 in SC-Flüssigmedium kultiviert.

Als *opaque*-spezifische Gene wurde die Regulation der Gene *OP4*, *SAP1*, *WOR1*, *CZF1* (Morrow *et al.*, 1993; Morrow *et al.*, 1992; Soll, 1997; Zordan *et al.*, 2006; Vines and Kumamoto, 2007), als *white*-spezifische Gene diejenige von *EFG1* und *ALS2* (Lan *et al.*, 2002; Sonneborn *et al.*, 1999b; Tsong *et al.*, 2003) in den betreffenden Stämmen untersucht (Tab. 18).

Tab. 18. Relative Expression *white*- bzw. *opaque*-spezifischer Gene in *opaque*-Zellen im Vergleich zu *white*-Zellen der Paarungstypen a und α des Wildtypstammes SC5314 (*white*-Zellen: OD₆₀₀ = 1, *opaque*-Zellen: OD₆₀₀ = 0,6)

<i>opaque::white</i>		
Gen	SC5314 [a/a]	SC5314 [α/α]
<i>WORI</i> *	14,89 x	30,25 x
<i>CZFI</i> *	9,89 x	9,49 x
<i>OP4</i> *	23,03 x	3,89 x
<i>SAPI</i> *	13,93 x	4,75 x
<i>EFGI</i> #	0,78 x	0,38 x
<i>ALS2</i> #	0,89 x	0,25 x

*: *opaque*-spezifische Gene, #: *white*-spezifische Gene

Zunächst zeigt die transkriptionelle Analyse eine starke Induktion des Hauptregulators des *white/opaque*-Wechsels, *WORI*, in *opaque*-Zellen von SC5314. Mit *CZFI* ist ein weiterer Regulator des Phänotypwechsels ebenfalls stark in *opaque*-Zellen induziert. *CZFI* wird laut einem Regulationsmodell für den *white/opaque*-Wechsel von *WORI* aktiviert und reprimiert gemeinsam mit diesem den Transkriptionsfaktor *EFGI*, welcher ein Repressor der *opaque*-Form ist und daher als *white*-spezifischer Marker gilt. Es fällt allerdings auf, dass trotz der vergleichsweise starken Induktion sowohl von *WORI* als auch von *CZFI* in *opaque*-Zellen von SC5314 die Expression von *EFGI* in diesem Stamm nur wenig reprimiert ist (etwa 1,3-fach in a-Zellen und 2,6-fach in α -Zellen).

Das *opaque*-spezifische Gen *OP4* zeigt ebenfalls eine Induktion in *opaque*-Zellen, allerdings variiert das Ausmaß der Induktion stark. Dabei ist die Induktion in a-Zellen von SC5314 deutlich stärker als in α -Zellen dieses Stammes. Letzteres gilt ebenfalls für die Induktion der sekretierten Protease *SAPI*. Eine vergleichbar unterschiedliche Regulation dieses Genes in a- und α -Zellen wurde bereits in der Literatur beschrieben (Miller and Johnson, 2002). Das *white*-spezifische Gen *ALS2* zeigt eine verminderte Expression in *opaque*-Zellen, wobei die Repression in Zellen des Paarungstyps α , ebenfalls wie diejenige von *EFGI*, stärker ist.

Insgesamt zeigen alle Gene eine der Zellform entsprechende Regulation, so dass davon auszugehen ist, dass sich die analysierten Zellen zum Zeitpunkt der RNA-Isolation tatsächlich in der *white*- bzw. der *opaque*-Phase befanden.

Daraufhin wurde die Regulation der *PRY*-Gene in Zellen der Paarungstypen a und α des Wildtypstammes SC5314 in der *opaque*-Phase im Vergleich zur *white*-Phase hin untersucht (Tab. 19).

Tab. 19. Relative Expression der *PRY*-Gene in *opaque*-Zellen im Vergleich zu *white*-Zellen in Zellen der Paarungstypen a und α des Wildtypstammes SC5314 ($OD_{600} = 1$, Wachstum: ca. 9 h)

Gen	<i>opaque::white</i>	
	SC5314 [a/a]	SC5314 [α/α]
<i>RBE1</i>	2,3 x	1,25 x
<i>RBT4</i>	0,3 x	1,0 x
<i>ORF19.2787/ORF19.10303</i>	2,84 x	1,6 x
<i>ORF19.6200/ORF19.13580</i>	0,4 x	0,32 x
<i>ORF19.2336/ORF19.9872</i>	0,3 x	0,3 x

Es zeigt sich eine differentielle Regulation der *PRY*-Gene in Abhängigkeit des *white/opaque*-Wechsels von *C. albicans* vor allem für Zellen des Paarungstyps a.

RBE1 wird in *opaque*-Zellen stärker transkribiert als in der *white*-Form. Die Ergebnisse der RT-PCR unterstützen ferner die in der Literatur für WO-1 sowie für Zellen des Paarungstyps a des zum Wildtyp isogenen Stammes CAI4 beschriebene Regulation der beiden *PRY*-Gene *RBT4* und *ORF19.2787* während des *white/opaque*-Wechsels auch für den Wildtypstamm SC5314 (Lan *et al.*, 2002; Tsong *et al.*, 2003). Die Expression von *RBT4* ist in *opaque*-Zellen in Zellen vom Paarungstyp a um das etwa 3-fache gegenüber *white*-Zellen reduziert, während *ORF19.2787* in *opaque*-Zellen um etwas denselben Faktor induziert ist. Für *ORF19.6200* und *ORF19.2336* ergeben mit einer Reduktion der Transkription um das etwa 2,5 bzw. 3-fache in *opaque*-Zellen ähnliche Werte der Regulation.

Ob die Induktion von *RBE1* in *opaque*-Zellen des Paarungstyps a auf eine verminderte Expression des Repressors *EFG1* in diesen Zellen (Tab. 18) zurückzuführen ist, lässt sich nicht mit Gewissheit feststellen, da eine stärkere Repression von *EFG1* in *opaque*-Zellen des Paarungstyps α kaum zu einer Induktion der *RBE1*-Expression in diesen Zellen führt.

Während die *PRY*-Gene *ORF19.6200* und *ORF19.2336* in beiden Paarungstypen eine vergleichbare Regulation während des *white/opaque*-Wechsels zeigen, sind die Gene *RBE1*, *RBT4* und *ORF19.2787* in α -Zellen kaum bzw. nicht reguliert. Dies liegt möglicherweise in einer abweichenden Regulation des zur Normalisierung der für die Analysen verwendeten Transkriptmengen verwendeten Gens *ENO1* begründet. Dieses zeigt in Zellen des Paarungstyps a keine Regulation im Vergleich von *opaque*-Zellen zu *white*-Zellen, scheint in *opaque*-Zellen vom Paarungstyps α jedoch stärker exprimiert zu sein, als in *white*-Zellen dieses Paarungstyps und erscheint dort in der RT-PCR 2 Zyklen früher. Daher sind die beobachteten Regulationswerte der *PRY*-Gene für Zellen des Paarungstyps a als zutreffend zu bewerten. Für eine exaktere Bestimmung der Regulation der Gene in Zellen des Paarungstyps α wäre ein Referenzgen, welches in beiden Zellformen keine signifikante Regulation zeigt, geeigneter.

Andererseits könnten die abweichenden Regulationswerte der *PRY*-Gene in a-Zellen im Vergleich zu α -Zellen auch der Situation *in vivo* entsprechen. So sind verschiedene während des *white/opaque*-Wechsels differentiell regulierte Gene teilweise stark unterschiedlich in den beiden Paarungstypen a und α reguliert. Dies zeigt bereits die transkriptionelle Analyse verschiedener Markergene für die beiden Zellformen (Tab. 18) und wurde z.B. für *SAP1* bereits beschrieben (Miller and Johnson, 2002).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Mitglieder der *PRY*-Familie in *C. albicans* signifikant in Abhängigkeit der Morphogenese (Hefe – Hyphe bzw. *white* – *opaque*) differentiell reguliert werden.

3 Promotoranalyse des *PRY*-Gens *RBE1*

3.1 Identifikation eines *RBE1*-Minimalpromotors

Exemplarisch für die *PRY*-Familie wurden im Folgenden systematische Promotoranalysen an *RBE1* durchgeführt. Für eine Analyse der transkriptionellen Regulation von *RBE1* auf molekularer Ebene wurde zunächst die für die Regulation *in vivo* minimal erforderliche Sequenz des *RBE1*-Promotors mit Hilfe von Reporter-gen-Studien bestimmt. Im Anschluss wurden die regulatorisch wirksamen Domänen innerhalb des so identifizierten Minimalpromotors näher eingegrenzt. Als Reporter-gen diente dabei ein für die Verwendung in *C. albicans* optimiertes *lacZ*-Gen von *Streptococcus thermophilus*, welches für das Enzym β -Galaktosidase kodiert. Regulatorische DNA-Sequenzen wurden vor das *lacZ*-Gen in Plasmid pAU36 eingefügt ((Uhl and Johnson, 2001a); s. Anhang) und die so konstruierten Plasmide in das Genom des *ura3*-auxotrophen *C. albicans*-Stammes CAI4 (Fonzi and Irwin, 1993), sowie des - ebenfalls *ura3*-auxotrophen – Deletionsstammes für den Transkriptionsfaktor Efg1p, HLC67, integriert. Die Aktivität des Enzyms in den transformierten Stämmen wurde anschließend durch Umsetzung des Substrates X-Gal (5-Brom-4-Chlor-3-indolyl- β -D-galaktosid) in Färbetests (*lacZ*-Assays) untersucht.

Konstruktion der Reporterplasmide

Um die für die Reporter-gen-Studien hergestellten Plasmide mit den zu analysierenden *RBE1*-Promotorbereichen über homologe Rekombination stabil an einem festgelegten Ort im Genom von *C. albicans* integrieren zu können, wurde das Gen *RP10* aus dem Plasmid pCaEXP (Care *et al.*, 1999) mittels PCR amplifiziert und zunächst ungerichtet in Plasmid pAU36 eingefügt (s. Methoden). Durch Linearisierung in diesem Gen integrieren die hergestellten Plasmide in den *RP10*-Lokus von *C. albicans*.

In den so konstruierten Plasmiden befindet sich das β -Galaktosidase-Gen unter der transkriptionellen Kontrolle des Actin-Promotors, der in *C. albicans* unter den meisten

Bedingungen ein konstantes Expressionsniveau des nachgeordneten Gens garantiert (Delbruck and Ernst, 1993). Daher ist es möglich, die entsprechend transformierten *C. albicans*-Stämme als Positivkontrolle für die Expression des β -Galaktosidase-Genes in weiterführenden Experimenten zu verwenden (Abb. 23).

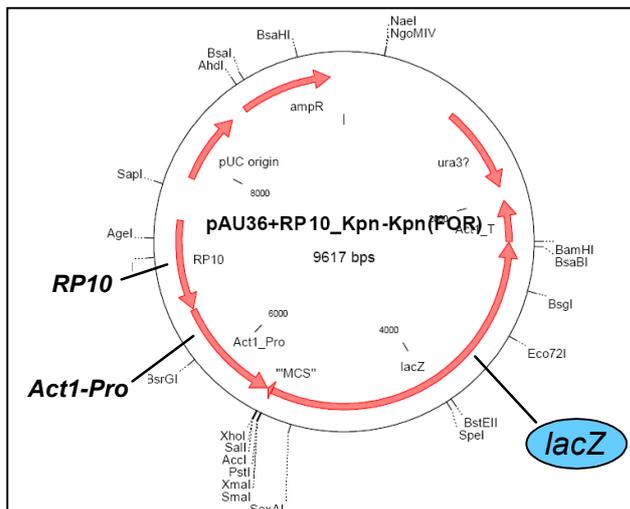


Abb. 23. Plasmidkarte des Positiv-Kontrollplasmis für die Filtertests. Integration in das *C. albicans*-Genom ist über das *RP10*-Gen möglich. „*lacZ*“: *lacZ*-Gen aus *S. thermophilus*; „*Act1-Pro*“: Promotor des Actin-Genes

Je ein Plasmid mit dem *RP10*-Gen in (5' → 3') bzw. gegen (3' → 5') die Leserichtung wurde in das Genom des Stammes CAI4 integriert, um zu überprüfen, ob das β -Galaktosidasegen nach Integration des Plasmides an diesem Genort aktiv ist und ob die Orientierung des *RP10*-Genes im Plasmid einen Einfluss auf die Expression des β -Galaktosidase-Genes und somit auf die Nachweisbarkeit des Expressionsniveaus in den Färbetests ausübt. Die anschließend durchgeführten Filtertests zeigten dabei keinen signifikanten Einfluss der Orientierung des *RP10*-Genes auf das Expressionsniveau des β -Galaktosidase-Genes (Daten nicht gezeigt). Da die Transformationsrate des Plasmids mit in Leserichtung orientiertem *RP10*-Gen jedoch höher war, wurde dieses für die zukünftigen Versuche als Positivkontrolle verwendet.

Für die Bestimmung des Minimalpromotors von *RBE1* wurde zunächst der Actin-Promotor in Plasmid pAU36 durch das *RP10*-Gen in einer gerichteten Klonierung ersetzt (s. Methoden). Da die so konstruierten Plasmide keine Promotorsequenz besitzen, die die Transkription des β -Galaktosidasegens initiieren könnten, können sie als Negativkontrolle in entsprechenden Expressionsstudien verwendet werden. Plasmide, die das *RP10*-Gen in beiden Orientierungen enthalten, wurden in Stamm CAI4 transformiert. In anschließenden Filtertests wurde die Aktivität des β -Galaktosidasegens in Blastosporen und Hyphen von *C. albicans* (Inkubation bei 30°C bzw. 37°C) untersucht.

Da die Transformationsrate des Plasmids mit in Leserichtung orientiertem *RP10*-Gen wiederum höher war und die Stämme mit dem gegen die Leserichtung (3' → 5') eingefügten *RP10*-Gen eine leichte Blaufärbung zeigten (Daten nicht gezeigt), wurde auch hier das Plasmid mit in Leserichtung orientiertem *RP10*-Gen als Kontrolle für zukünftige Versuche verwendet (Abb. 24).

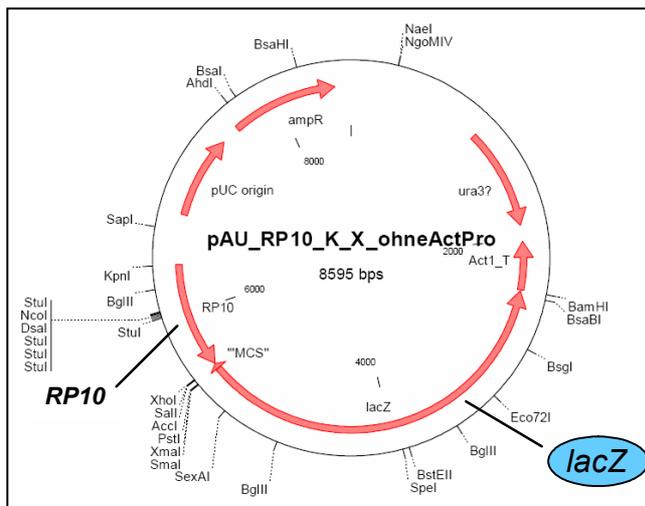


Abb. 24. Plasmidkarte des Negativ-Kontroll-plasmids ohne ACT1-Promotor. Integration in das *C. albicans*-Genom ist über das RP10-Gen möglich. „lacZ“: lacZ-Gen aus *S. thermophilus*

Die Annotation des Genoms von *C. albicans* (<http://www.candidagenome.org>, Assembly 19) zeigt, dass der nächstliegende mögliche offene Leserahmen oberhalb des Transkriptionsstarts des *RBE1*-Genes, *ORF19.7219*, mehr als 4,5 kb entfernt liegt. In diesem Bereich können sich regulatorische Sequenzen der *RBE1*-Expression befinden (Abb. 25).

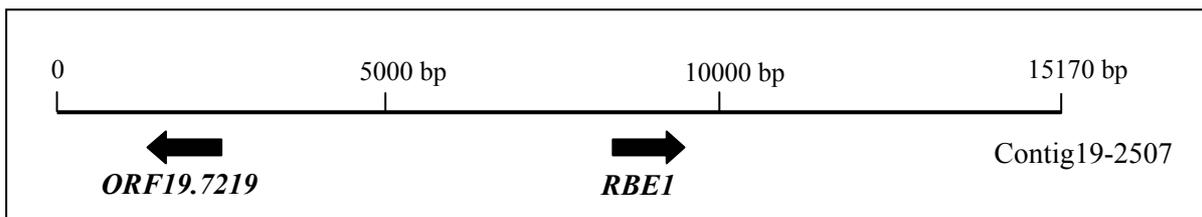


Abb. 25. Genomisches Umfeld des RBE1-Gens in C. albicans (Contig19-2507)

Für die Identifikation eines Minimalpromotors von *RBE1* wurden zunächst Promotorfragmente von 534 bp und 1039 bp Länge oberhalb des Startkodons mittels PCR amplifiziert, um diese für die Konstruktion entsprechender Plasmide vor das *lacZ*-Reportergen einzufügen (Abb. 26).

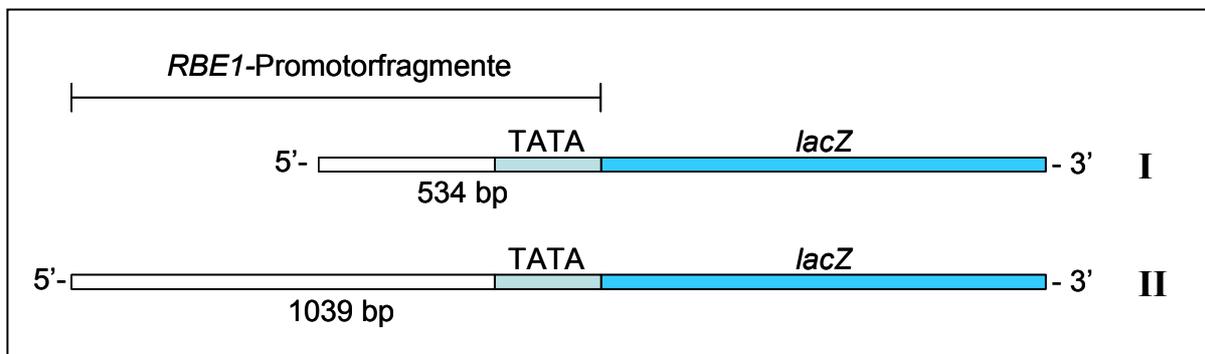


Abb. 26. lacZ-Reportergenkonstrukte für die Identifikation des RBE1-Minimalpromotors. Fragmente von ca. 0,5 kb und 1 kb Länge oberhalb des Startkodons von *RBE1* wurden vor das *lacZ*-Gen in das Reportergenplasmid für die Promotoranalyse ligiert.

Nach der Ligation der beiden Promotorfragmente in die Schnittstellen der Restriktionsenzyme *XhoI* und *PstI* des Negativ-Kontrollplasmids (Abb. 24) wurden die betreffenden Plasmide für die Transformation der *C. albicans*-Stämme CAI4 und HLC67, in dem das *EFG1*-Gen deletiert ist, verwendet. Die so erhaltenen Stämme wurden mittels *Southern Blot*-Analyse auf Integration des Plasmids am richtigen Ort im Genom überprüft (Daten nicht gezeigt).

Die transkriptionelle Aktivität der beiden Promotorfragmente wurde anhand der Expression des β -Galaktosidase-Genes in *lacZ*-Assays untersucht.

Da *RBE1* v.a. in Abwesenheit von Efg1p exprimiert wird (Abb. 19), eignet sich der Δ *efg1*-Deletionsstamm HLC67 besonders für die Überprüfung der regulatorischen Aktivität der *RBE1*-Promotorfragmente. Jeweils vier unabhängig transformierte *C. albicans*-Stämme wurden für die Analyse der Aktivität der β -Galaktosidase in Blastosporen verwendet. Die Stämme wurden dafür auf YPD-Medium bei 30°C über Nacht inkubiert (Abb. 27).

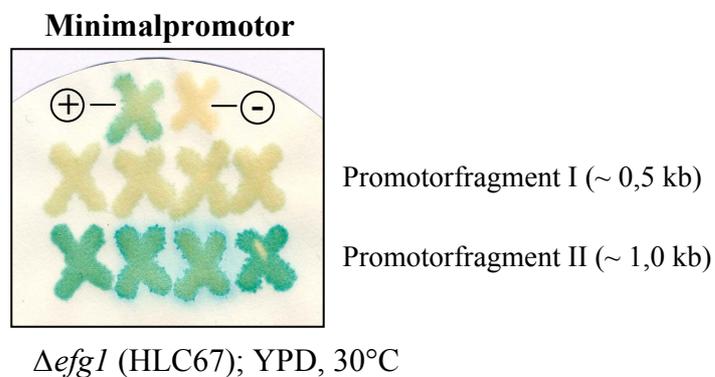


Abb. 27. *lacZ*-Assay mit den *RBE1*-Promotorfragmenten I (0,5 kb) und II (1,0 kb) in Δ *efg1* (HLC67). Wachstum auf YPD-Medium, 30°C; +/-: Stämme mit transformiertem Positiv- bzw. Negativ-Kontrollvektor. Jeweils vier unabhängige Transformanten pro Konstrukt wurden analysiert.

Bei einer Promotorlänge von ca. 1 kb ist im Δ *efg1*-Deletionsstamm HLC67 eine deutliche Blaufärbung nach Substratzugabe zu beobachten, was auf eine starke transkriptionelle Aktivierung des β -Galaktosidase-Genes hinweist. Dies ist bei einer Länge des Promotorfragments von nur 0,5 kb nicht der Fall. Im Gegensatz dazu ist für beide Fragmentlängen in Stamm CAI4, der isogen zum Wildtypstamm ist, keine Blaufärbung zu beobachten (Daten nicht gezeigt). Dies bedeutet, dass die transkriptionelle Aktivität der verwendeten Promotorfragmente im Wildtyp-Stamm durch die Anwesenheit von Efg1p so stark reprimiert ist, dass die Menge an gebildeter β -Galaktosidase nicht für einen detektierbaren Substratumsatz ausreicht. Im Δ *efg1*-Deletionsstamm HLC67 hingegen ist die Transkription des β -Galaktosidase-Genes durch Bindung transkriptioneller Aktivatoren an ein Promotorfragment von ca. 1 kb Länge gegeben. Daher liegt die minimale Länge des für die Aktivierung der Transkription notwendigen Promotors zwischen 0,5 und 1 kb.

Die Länge des Minimalpromotors, welche für eine der Situation *in vivo* entsprechende Regulation des *RBE1*-Genes erforderlich ist, wurde anhand der Reporter-gen-Studien als 1039 bp festgelegt und diente als Grundlage für die nähere Analyse der regulatorisch wirksamen Domänen innerhalb dieser Region.

3.2 Identifikation der regulatorischen Domänen innerhalb des *RBE1*-Minimalpromotors

Für die Identifikation regulatorischer Domänen innerhalb des definierten *RBE1*-Minimalpromotors von ca. 1 kb Länge wurde dieser zunächst in ca. 200 bis 250 bp lange Domänen (RI bis RIV) unterteilt, von denen jeweils eine für anschließende Expressionsstudien aus dem Minimalpromotor deletiert wurde. Die ersten 178 bp oberhalb des Startkodons wurden nicht deletiert und in den jeweiligen Promotorfragmenten belassen, um eine Transkription des nachfolgenden Genes zu gewährleisten, da sich in diesem Bereich wahrscheinlich die Transkriptionsinitiationsstelle befindet (TATA-Box, Abb. 26).

Für die Herstellung der Deletionskonstrukte des *RBE1*-Promotors, denen jeweils eine der 4 Domänen RI bis RIV fehlt, wurden Fragmente upstream (DLI - DLIII) und downstream (DRI - DRIV) des zu deletierenden Promotorfragments mittels PCR so amplifiziert, dass sie Schnittstellen für verschiedene Restriktionsenzyme tragen, um sie später vor das *lacZ*-Gen im Negativ-Kontrollplasmid der Promotoranalyse (Abb. 24) einfügen zu können (Abb. 28).

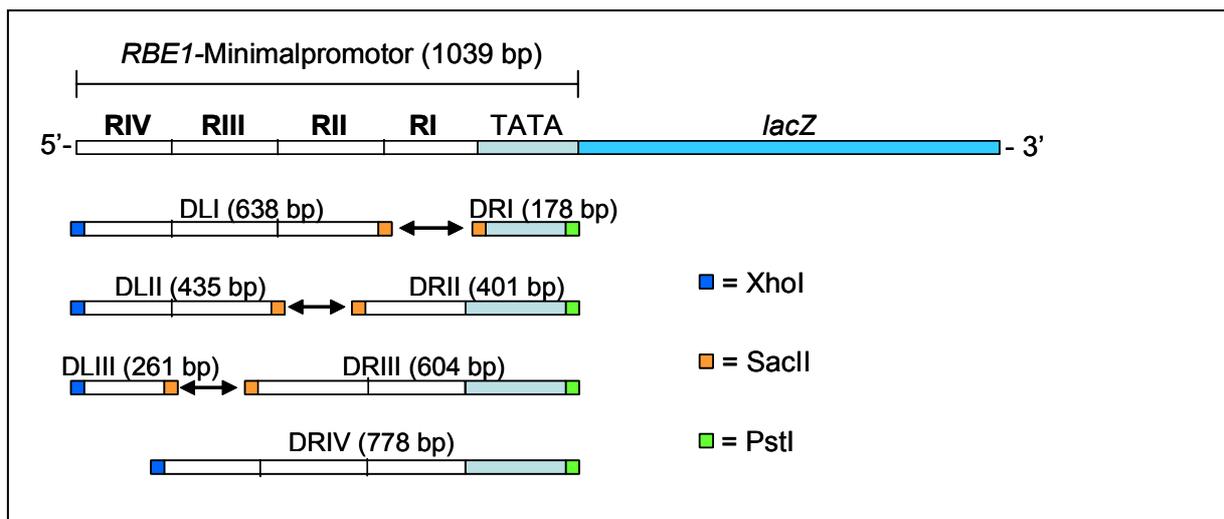


Abb. 28. Konstruktion der Deletionsfragmente des *RBE1*-Promotors: „linke“ und „rechte“ Fragmente des Promotors (DL/DR) mit Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *PstI/SacII* (DRI-DRIII) bzw. *SacII/XhoI* (DLI-DLIII) wurden so über die *SacII*-Schnittstellen zusammen gefügt, dass jeweils eines der 4 Promotorfragmente (RI bis RIV) fehlt und wurden über die Schnittstellen *XhoI* und *PstI* vor dem β -Galaktosidasegen in das Negativ-Kontrollplasmid eingefügt; die ersten 179 bp des Promotors wurden nicht deletiert, da sie wahrscheinlich die TATA-Box für die Initiation der Transkription enthalten (MatInspector; (Cartharius *et al.*, 2005))

Für die Konstruktion der Deletionsfragmente des *RBE1*-Promotors wurden die PCR-Produkte aufgereinigt und ebenso wie das Negativ-Kontrollplasmid für die Ligation mit den entsprechenden Restriktionsenzymen geschnitten (Abb. 29).

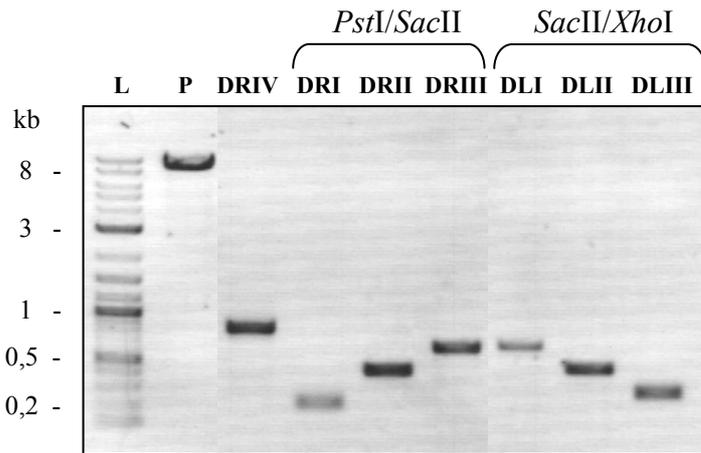


Abb. 29. Konstruktion der Deletionsplasmide für den *RBE1*-Promotor: Restriktionsverdau des Plasmids pAU/RP10_K_X (P): mit *XhoI/PstI* sowie PCR-amplifizierter Fragmente des *RBE1*-Promotors (DR/DL) mit den Restriktionsenzymen *PstI/SacII* (DRI-DRIII) bzw, *SacII/XhoI* (DLI-DLIII) für die Konstruktion der Deletionsplasmide

Die Fragmente DRI und DLI, DRII und DLII sowie DRIII und DLIII wurden jeweils in einem Ligationsansatz simultan in das Plasmid eingefügt; Fragment DRIV wurde ebenso wie das Plasmid mit den Restriktionsenzymen *XhoI/PstI* geschnitten und direkt in das Plasmid eingefügt – dies entspricht einer Deletion der ersten 261 bp am 5'-Ende des Minimalpromotors. Die entsprechenden Plasmide wurden mittels PCR und Restriktionsanalyse auf eine korrekte Integration der entsprechenden Fragmente hin untersucht (Daten nicht gezeigt).

Die deletierten Domänen RI bis RIV des *RBE1*-Minimalpromotors umfassen folgende Bereiche (Tab. 20):

Tab. 20. Deletionsfragmente des *RBE1*-Minimalpromotors (1039 bp) für die Expressionsanalyse

Fragment	Länge	Position*
RIV	261 bp	-1039 bp bis -779 bp
RIII	174 bp	-778 bp bis -605 bp
RII	203 bp	-604 bp bis -402 bp
RI	223 bp	-401 bp bis -179 bp

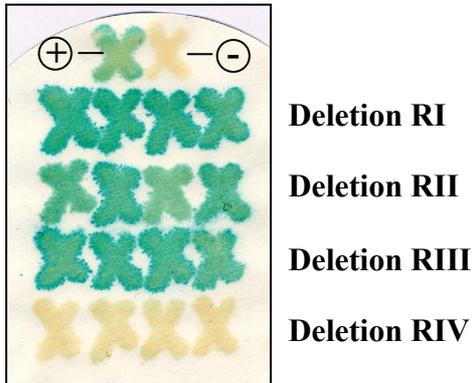
*: oberhalb des Startkodons des *RBE1*-Gens

*Identifikation der Aktivierungsdomäne des *RBE1*-Minimalpromotors*

Für die Identifikation der aktivierenden regulatorischen Domänen des *RBE1*-Minimalpromotors wurden die Deletionsplasmide in den *C. albicans* Δ *efg1*-Deletionsstamm HLC67 transformiert. Das *lacZ*-Reportergen wird in diesem Stamm aufgrund der Abwesenheit von *EFG1* unter der Kontrolle des vollständigen Minimalpromotors stark exprimiert (Abb. 27). Fehlen für die Aktivierung der Transkription entscheidende Bereiche, sollte keine

Transkription stattfinden. Für die Färbeversuche wurden jeweils vier unabhängig transformierte Stämme über Nacht bei 30°C auf YPD-Medium angezogen (Abb. 30).

Aktivierungsdomäne



$\Delta efg1$ (HLC67); YPD, 30°C

Abb. 30. Identifikation der aktivierenden regulatorischen Domäne innerhalb des *RBE1*-Minimalpromotors.

lacZ-Assay mit den Deletionsplasmiden in *C. albicans* $\Delta efg1$ (HLC67) auf YPD-Medium, 30°C. +/-: Stämme mit transformiertem Positiv- bzw. Negativ-Kontrollvektor. Jeweils vier unabhängige Transformanten pro Konstrukt wurden aufgetragen

Transkriptionelle Aktivität ist trotz Fehlens der Promotorfragmente RI bis RIII (Deletion RI bis Deletion RIII) anhand der Expression des β -Galaktosidase-Gens zu beobachten. Bei Fehlen des Promotorfragmentes RIV tritt keine Blaufärbung der *C. albicans*-Zellen auf. Transkription findet folglich statt, solange Fragment RIV von -1039 bp bis -787 bp im Minimalpromotor vorhanden ist, aber nicht, wenn dieses Fragment fehlt. Dies bedeutet, dass Fragment RIV essentiell für die Aktivierung der Transkription des Genes *RBE1* ist und aktivierende Transkriptionsfaktoren wahrscheinlich an Fragment RIV des Minimalpromotors binden.

Identifikation der Reprimierungsdomäne des *RBE1*-Minimalpromotors

Um reprimierende regulatorische Domänen innerhalb des *RBE1*-Minimalpromotors zu identifizieren, wurden die Deletionsplasmide in den *C. albicans*-Stamm CAI4 transformiert und Färbeversuche nach Inkubation der Stämme auf YPD-Medium bei 30°C über Nacht durchgeführt. CAI4 ist isogen zu *C. albicans* Wildtyp, weshalb durch die Anwesenheit von *EFG1* keine oder nur eine sehr geringe Aktivität des *RBE1*-Minimalpromotors zu erwarten ist, sofern der entsprechende Repressor an den Promotor binden kann (Abb. 31).

Reprimierungsdomäne

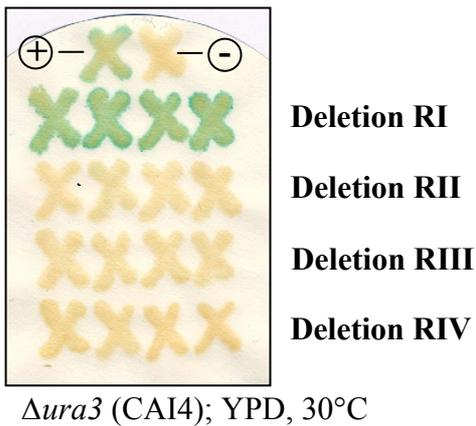


Abb. 31. Identifikation der reprimierenden regulatorischen Domäne innerhalb des RBE1-Minimalpromotors.

lacZ-Assay mit den Deletionsplasmiden in *C. albicans* *Aura3* (CA14) auf YPD-Medium, 30°C. +/-: Stämme mit transformiertem Positiv- bzw. Negativ-Kontrollvektor. Jeweils vier unabhängige Transformanten pro Konstrukt wurden aufgetragen

Nur wenn das Promotorfragment RI fehlt, ist eine Aktivität des Promotors zu beobachten. Die anderen drei Deletionskonstrukte zeigen keine messbare Expression des β -Galaktosidase-Gens. Dies bedeutet, dass die Transkription reprimiert ist, solange Fragment RI im Minimalpromotor vorhanden ist, nicht aber, wenn dieses fehlt. Reprimierende Faktoren der Transkription binden daher wahrscheinlich an Fragment RI innerhalb des *RBE1*-Minimalpromotors.

Anhand der Deletionsstudien stellt sich die Verteilung der regulatorischen Bereiche innerhalb des definierten *RBE1*-Minimalpromotors wie folgt dar:

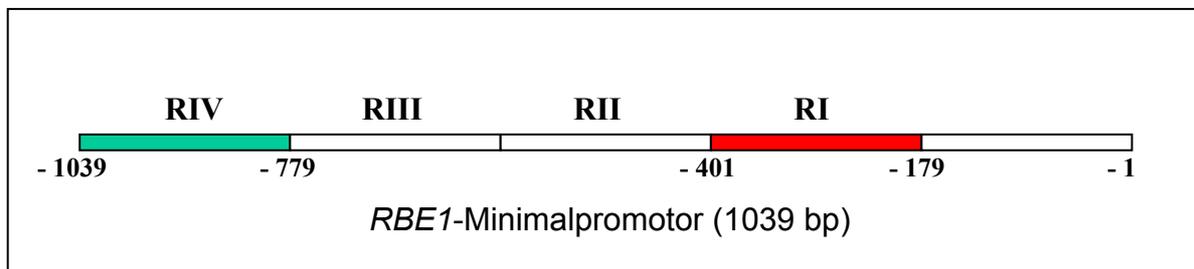


Abb. 32. Regulatorische Bereiche innerhalb des RBE1-Minimalpromotors; grün: aktivierender Bereich RIV; rot: reprimierender Bereich RI

Fragment RI von -179 bp bis -401 bp des *RBE1*-Minimalpromotors ist ein Fragment mit reprimierender Funktion, dessen Anwesenheit die Repression der Transkription des nachfolgenden Gens im Wildtyp-Stamm von *Candida albicans* gewährleistet.

Fragment RIV von -779 bp bis -1039 bp des *RBE1*-Minimalpromotors ist die für die Aktivierung der Transkription erforderliche Domäne, ohne die eine Expression des nachfolgenden Gens in Abwesenheit des Transkriptionsfaktors *EFG1* – welcher im Wildtyp-Stamm für eine Abschaltung des Promotors verantwortlich ist – nicht erfolgt.

3.3 Bindung heterolog exprimierter Transkriptionsfaktoren an die regulatorischen Domänen des *RBE1*-Promotors

Eine Analyse des *RBE1*-Minimalpromotors hinsichtlich konservierter Bindemotive für Transkriptionsfaktoren von Pilzen, welche die Aktivierung bzw. Repression der *RBE1*-Expression innerhalb der identifizierten regulatorischen Bereiche des Promotors vermitteln können, erfolgte mit Hilfe des Programmes MatInspector (Cartharius *et al.*, 2005) sowie einem Vergleich mit Konsensussequenzen von Transkriptionsfaktoren aus *S. cerevisiae* (*The Promoter Database of Saccharomyces cerevisiae*, SCPD, <http://rulai.cshl.edu/SCPD>). Dabei finden sich folgende potenzielle Bindestellen in den regulatorischen Domänen RIV und RI (Abb. 33, Tab. 21):

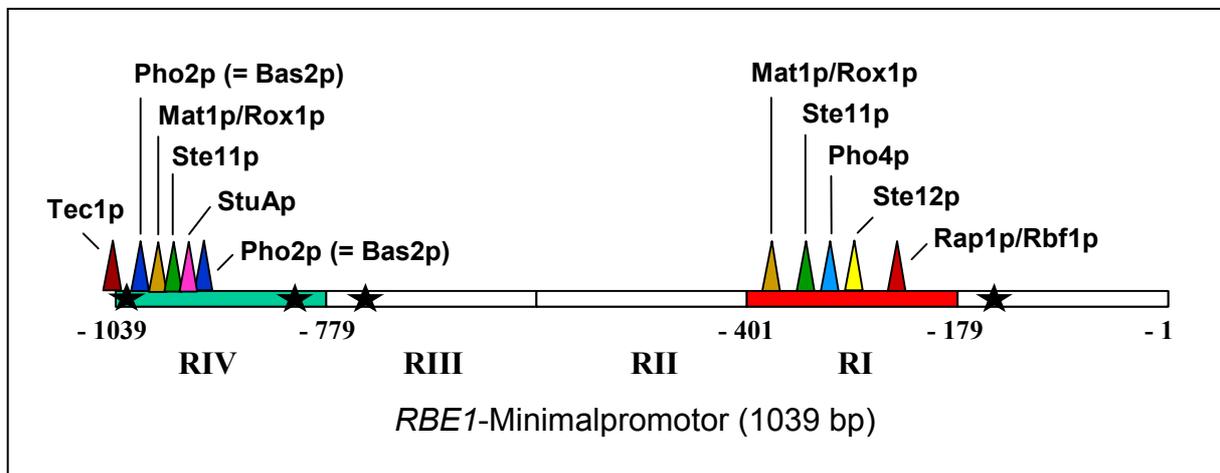


Abb. 33. Konsensussequenzen für Transkriptionsfaktor-Bindestellen und E-Box-Konsensussequenzen im Minimalpromotor von *RBE1* (★: E-Box-Konsensussequenzen; beginnend bei -1029 bp, -823 bp, -711 bp und -156 bp)

Tab. 21. Potenzielle Bindestellen für Transkriptionsfaktoren in den regulatorischen Domänen RIV und RI des *RBE1*-Minimalpromotors (1039 bp) (MatInspector)

Transkriptionsfaktor	Position	Sequenz (Strang)	<i>C. albicans</i> -Ortholog
Bindestellen in der Aktivierungsdomäne RIV (1 – 261 bp)			
Efg1p, <i>C. albicans</i> (bHLH*)	-1029 – -1034 bp -823 – -828 bp	5'-CANNTG-3' (E-Box) (+) 5'-CANNTG-3' (E-Box) (-)	-
Pho2p (=Bas2p), <i>S. cerevisiae</i> (Homeodomän-Protein)	-1006 – -1011 bp -801 – -815 bp	gaa CTAAtta actat# (-) t ttTTAAtta attt (+)	Fil2p (putativ)
Mat1p; <i>S. pombe</i> (HMG-Box-Protein)	-983 – -993 bp	ctt ATTG ttca (M-Box) (-)	-
Rox1p, <i>S. cerevisiae</i> (HMG-Box-Protein)	-983 – -992 bp	5'-YYNATTGTTY-3' (-)	Rfg1p
Ste11p, <i>S. pombe</i> (HMG-Box-Protein)	-969 – -987 bp	ttctat CTTTg tttctat (TR-Box) (-)	-
StuAp, <i>A. nidulans</i> (bHLH*)	-951 – -961 bp	aaa CGCG agat (MCB-Box) (-)	Efg1p
Bindestellen in der Reprimierungsdomäne RI (639 – 861 bp)			
Mat1p; <i>S. pombe</i> (HMG-Box-Protein)	-378 – -388 bp	tct ATTG ttta (M-Box) (-)	-
Rox1p, <i>S. cerevisiae</i> (HMG-Box-Protein)	-378 – -387 bp	5'-YYNATTGTTY-3' (+)	Rfg1p
Ste11p, <i>S. pombe</i> (HMG-Box-Protein)	-323 – 341 bp	cg tttCTTTg ttgta (TR-Box) (-)	-
Pho4p, <i>S. cerevisiae</i> (bHLH*)	-321 – -326 bp	5'-CACGTK-3'	-
Ste12p, <i>S. cerevisiae</i> (Homeodomän-Protein (Yuan and Fields, 1991))	-270 – -282 bp	ttgt gtAACA aca (pheromone response element) (+)	Cph1p
Rap1p, <i>S. cerevisiae</i>	-214 – -228 bp	cca ACCCa cccat (-) (RPG-Box)	Rap1p/Rbf1p

*: Transkriptionsfaktor der basischen Helix-Loop-Helix-Familie; #: Großbuchstaben = Kernsequenz (am höchsten konservierte aufeinanderfolgende Positionen in der Matrix der Nukleotid-Verteilung), rot: *consensus index vector* > 60 (MatInspector; (Cartharius *et al.*, 2005))

In den regulatorischen Domänen der Promotorsequenz von *RBE1* finden sich v.a. Bindemotive von Transkriptionsfaktoren der bHLH-, Homeodomän- und HMG-Box-Familien, die in Pilzen u.a. an der Regulation von Prozessen wie der Morphogenese, der Virulenz oder der Paarung beteiligt sind.

Pho2p (= Bas2p/Grf10p) aus *S. cerevisiae* ist ein Transkriptionsfaktor der Homeodomän-Familie. Die vorgeschlagene Konsensussequenz für die DNA-Bindung ist 5'-(T/C)TAA(T/A)T(T/G)AAT-3' (Barbaric *et al.*, 1996). Pho2p ist an der Regulation von über 20 Genen beteiligt, die bei der Biosynthese von Purin-Nukleotiden und Histidin sowie der Phosphat-Verwertung eine Rolle spielen. Zusammen mit dem bHLH-Transkriptionsfaktor Pho4p ist Pho2p bei Phosphatmangel für die Expression sekretierter Phosphatasen erforderlich (Pho5p) (Ogawa *et al.*, 2000; Vogel and Hinnen, 1990; Oshima, Y. in: Strathern, 1981; pp. 159–180). Eine Konsensussequenz für Pho4p findet sich auch in Fragment RI des *RBE1*-Promotors. Das potenzielle Ortholog von Pho2p in *C. albicans*, Fil2p, ist ebenso wie ein potenzielles Pho4p-Ortholog (*ORF19.1253*) noch nicht charakterisiert (www.candidagenome.org).

Mat1-Mcp und Ste11p sind Transkriptionsfaktoren, die über ein sog. HMG-Box-Motiv (*High Mobility Group*) für die DNA-Bindung verfügen (Gehring *et al.*, 1994; Scott *et al.*, 1989). Ste11p ist ein Hauptregulator der sexuellen Differenzierung in *S. pombe*. Dieser bindet an die sog. TR-Box in den Promotoren von Genen, die während der Paarung von *S. pombe* in Abhängigkeit von Ste11p exprimiert werden (TR-Box = *T-rich Box*, Konsensussequenz: 5'-TTCTTTGTTY-3', (Sugimoto *et al.*, 1991)). Mat1-Mcp bindet *in vitro* an die Kernsequenz der TR-Box (5'-CTTTGTT-3' (Dooijes *et al.*, 1993)) sowie stark an die sog. M-Box (5'-ACAAT-3' (Kjaerulff *et al.*, 1997)), die sich in direkter Nachbarschaft von TR-Boxen befindet und rekrutiert Ste11p zu Promotoren von Genen, die spezifisch in Minus- (M-) Zellen exprimiert werden und so den M-Paarungstyp von *S. pombe* bestimmen (Kjaerulff *et al.*, 1997). Sowohl in Fragment RIV als auch in Fragment RI des *RBE1*-Promotors finden sich TR- und M-Boxen in direkter Nähe zueinander. Gene, die für HMG-Box-Proteine kodieren, sind in den Paarungs-Loci verschiedener Ascomyceten hoch konserviert, und finden sich z.B. in *K. lactis* und *N. crassa* (Astrom *et al.*, 2000; Coppin *et al.*, 1997) sowie in *C. albicans*. Der HMG-Box-Transkriptionsfaktor MTLa2p ist dort ein Hauptregulator der Pheromon-induzierten Paarungsantwort in Zellen des Paarungstyps a (Tsong *et al.*, 2003).

Ein weiterer Transkriptionsfaktor der HMG-Box-Familie aus *S. cerevisiae*, Rox1p, bindet ebenfalls an eine der TR-Box ähnliche Sequenz (Rox1p-Konsensussequenz (SCPD): 5'-YYNATTGTTY-3'). Diese Konsensussequenz ist in beiden regulatorischen Domänen des *RBE1*-Promotors RIV und RI jeweils einmal vorhanden und dort zu 100% konserviert. Das Ortholog von Rox1p in *C. albicans* ist Rfg1p und ist dort ein transkriptioneller Regulator filamentösen Wachstums sowie der Virulenz (Kadosh and Johnson, 2001; Khalaf and Zitomer, 2001). In der DNA-bindenden HMG-Domäne weist Rfg1p 50% Sequenzidentität und 74% Homologie zu Rox1p auf und ist in der Lage, *in vitro* an eine Rox1p-Konsensussequenz von *S. cerevisiae* (5'-CCATTGTTCT-3', (Deckert *et al.*, 1998)) zu binden (Khalaf and Zitomer, 2001). Rfg1p ist während des Blastosporen-Wachstums von *C. albicans* an der Repression Hyphen- und Virulenz-spezifischer Gene durch die Rekrutierung des Ko-Repressors Tup1p an die Promotoren dieser Gene beteiligt. Zu den auf diese Weise reprimierten Genen gehört auch das *PRY*-Gen *RBT4* (Kadosh and Johnson, 2005). Rfg1p kann unter gewissen Hyphen-

induzierenden Bedingungen aber auch als transkriptioneller Aktivator Hyphen-spezifischer Gene wirken. Dies gilt allerdings nicht für *RBT4* (Kadosh and Johnson, 2001).

In der Reprimierungsdomäne RI des *RBE1*-Promotors findet sich ferner eine Sequenz mit Homologien zu sog. *pheromone response elements* (*PRE*) von Promotoren der Paarungsgene in *S. cerevisiae*. An dieses Element bindet der Homeodomän-Transkriptionsfaktor Ste12p während des Pheromon-induzierten Paarungsvorganges von haploiden *S. cerevisiae*-Zellen in beiden Paarungstypen und aktiviert so die Genexpression (Hagen *et al.*, 1991). Das entsprechende Ortholog in *C. albicans* ist Cph1p, das in der DNA-bindenden N-terminalen Domäne 71% Sequenzidentität mit Ste12p aufweist (Liu *et al.*, 1994; Malathi *et al.*, 1994) und dort ebenfalls an der Regulation der Paarung, daneben aber auch an der Regulation der Morphogenese und Virulenz beteiligt ist (Chen *et al.*, 2002a; Lo *et al.*, 1997).

Cph1p scheint bei der Regulation von *RBE1* allerdings eher eine Rolle als zusätzlicher Repressor neben Efg1p zu spielen, da die Expression von *RBE1* in einem Δ *cph1*-Deletionsstamm im Vergleich zu einem Δ *efg1*-Deletionsstamm bereits leicht de-reprimiert und zusätzlich in einem Δ *efg1*/ Δ *cph1*-Doppel-Deletionsstamm gegenüber einem Δ *efg1*-Deletionsstamm erhöht ist (Sohn *et al.*, 2003).

Weitere Homeodomän-Proteine aus *C. albicans* sind die Transkriptionsfaktoren MTL α 1p und MTL α 2p, die als Heterodimer die Paarung von *C. albicans* durch die Blockierung des Wechsels von *white*- zur *opaque*-Zellform verhindern und spezifisch einige Paarungsrelevante Gene in der *white*-Form reprimieren (Miller and Johnson, 2002; Tsong *et al.*, 2003). In Fragment RI findet sich auch eine potenzielle Bindestelle für Rap1p aus *S. cerevisiae*. Rap1p ist dort ein Telomer-bindendes Protein, sowie ein essentieller Transkriptionsfaktor, der an vielen unterschiedlichen Prozessen beteiligt ist und sowohl als transkriptioneller Aktivator wie auch als Repressor fungieren kann (Buchman *et al.*, 1988; Lieb *et al.*, 2001; Shore, 1994; Shore and Nasmyth, 1987). Die DNA-Bindedomäne von Rap1p zeigt keine Sequenzhomologie zu bekannten DNA-Bindemotiven, aber strukturelle Ähnlichkeit zur Homeodomäne und zu derjenigen des Proto-Onkogens Myb (Konig *et al.*, 1996). Rap1p ist u.a. für die korrekte Funktion von Pho2p erforderlich (Devlin *et al.*, 1991). Das entsprechende *C. albicans*-Ortholog, Rap1p, reprimiert Pseudohyphen-Wachstum unter Hefe-induzierenden Bedingungen und ist ebenso wie *S. cerevisiae*-Rap1p in der Lage, an die sog. RPG- (*ribosomal protein gene*-) Box mit der Konsensussequenz 5'-ACCA[A/C]ACA-3' zu binden (Biswas *et al.*, 2003; Buchman *et al.*, 1988; Machida *et al.*, 1989; Uemura *et al.*, 2004; Vignais *et al.*, 1987). An diese RPG-Box bindet auch der *C. albicans*-Transkriptionsfaktor Rbf1p, ebenso ein Repressor von Hyphenwachstum unter verschiedenen Hefe-induzierenden Bedingungen (Ishii *et al.*, 1997).

Oberhalb des 5'-Endes der Aktivierungsdomäne RIV des *RBE1*-Minimalpromotors findet sich ferner eine Signalsequenz für den Transkriptionsfaktor Tec1p (*TCS* = *Tec1p-binding site*; Konsensussequenz 5'-CATTCY-3'; (Andrianopoulos and Timberlake, 1994)), die noch 2 Basenpaare in den Minimalpromotor hineinragt. In *S. cerevisiae* bildet die Tec1p-Bindestelle zusammen mit der Ste12p-Bindestelle (*PRE*, *pheromone response element*) das sog.

filamentation and invasion response element (FRE). Die kooperative Bindung von Tec1p und Ste12p an diese Elemente reguliert filamentöses und invasives Wachstum in *S. cerevisiae* (Madhani *et al.*, 1997). Tec1p in *C. albicans* ist ebenfalls an der Regulation hyphalen Wachstums sowie der Virulenz beteiligt (Schweizer *et al.*, 2000). Tec1p-Bindungsstellen finden sich in den Promotoren aller Hyphen-spezifischen Gene in *C. albicans*, einschließlich demjenigen von *RBT4*. Tec1p ist nach Transkriptionsanalysen in dieser Arbeit möglicherweise an der positiven Regulation von *RBE1* beteiligt, da die Expression von *RBE1* in einem $\Delta tec1$ -Deletionsstamm gegenüber der Expression im Wildtyp reduziert erscheint (Abb. 19).

Ferner finden sich insgesamt vier sog. E-Box-Konsensusmotive innerhalb der Promotorsequenz von *RBE1*. Diese sind ein Bindungsmotiv basischer Helix-Loop-Helix- (bHLH-) Transkriptionsfaktoren an die DNA (z.B. Säuger: MyoD, C-Myc, C-Max, E47; Hefen: Pho4p, Cbf1p) und besitzen die Konsensussequenz: 5'-CANNTG-3' (Blackwell and Weintraub, 1990; Ferre-D'Amare *et al.*, 1993; Massari and Murre, 2000; Murre *et al.*, 1989a; Robinson and Lopes, 2000). Zu dieser Klasse von Transkriptionsfaktoren gehören in *C. albicans* Efh1p und Efg1p, wobei Efg1p der zentrale Regulator der Morphogenese und Virulenz in *C. albicans* ist (Doedt *et al.*, 2004; Lo *et al.*, 1997; Sohn *et al.*, 2003; Stoldt *et al.*, 1997).

Wie in vorhergegangenen Studien und auch in dieser Arbeit gezeigt, ist Efg1p ein Repressor der Expression von *RBE1* (Sohn *et al.*, 2003; sowie Abb. 19). Interessanterweise finden sich zwei E-Boxen in der Aktivierungsdomäne RIV des *RBE1*-Promotors, dagegen keine in der Reprimierungsdomäne RI. In der Aktivierungsdomäne RIV befindet sich mit einem MCB-Box-Motiv ("Mlu1 cell cycle box") ferner eine potenzielle Bindungsstelle für StuAp, dem Ortholog von Efg1p in *A. nidulans* (Dutton *et al.*, 1997) (Abb. 33). Beide Proteine gehören zur APSES-Unterfamilie der bHLH-Transkriptionsfaktoren, deren Mitglieder morphogenetische Prozesse in Pilzen regulieren (Ernst, 2000b; Stoldt *et al.*, 1997) und Efg1p scheint *in vitro* ebenfalls an das MCB-Box-Motiv mit der Konsensussequenz 5'-ACGCGT-3' zu binden (Noffz *et al.*, 2008). Zwei weitere E-Box-Konsensusmotive finden sich außerhalb der beiden regulatorischen Domänen in Fragment RIII, sowie 160 bp oberhalb des Startkodons. Statistisch ist dieses Sequenzmotiv alle 256 (4⁴) bp auf der DNA zu finden. Daher überrascht es nicht, dass es auch außerhalb regulatorischer Bereiche oder innerhalb offener Leserahmen zu finden ist.

Neben der E-Box-Konsensussequenz sind zahlreiche weitere Erkennungssequenzen für bHLH-Transkriptionsfaktoren beschrieben worden (Ledent and Vervoort, 2001; Robinson and Lopes, 2000). Dazu gehört u.a. die Kernsequenz 5'-ACGTG-3', die von einer bestimmten Gruppe von bHLH-Proteinen erkannt wird (Gruppe C, bHLH-PAS-Proteine (Crews, 1998)). Diese Sequenz findet sich in der Reprimierungsdomäne RI des *RBE1*-Promotors (bp -321 bis -325).

Efg1p selbst ist in der Lage, *in vitro* an mind. drei Zielsequenzen zu binden. Darunter eine E-Box-Sequenz (5'-CATTTG-3', (Leng *et al.*, 2001)), sowie die beschriebene MCB-Box. Eine dritte mögliche Zielsequenz für die Bindung von Efg1p wurde noch nicht veröffentlicht (Noffz *et al.*, 2008).

Aus diesen Gründen wurde untersucht, ob Efg1p direkt an die regulatorischen Domänen des *RBE1*-Promotors bindet und so die Regulation dieses Gens vermittelt.

Heterologe Expression von Efg1p

Die Expression von *RBE1* wird, wie in vorangegangenen Studien und auch in dieser Arbeit gezeigt, durch den Transkriptionsfaktor Efg1p reprimiert (Sohn *et al.*, 2003; sowie Abb. 19). Eine reprimierende Funktion bei der Transkription wurde für Efg1p bereits mehrfach in der Literatur beschrieben (Doedt *et al.*, 2004; Noffz *et al.*, 2008; Stoldt *et al.*, 1997).

Da Efg1p auch von der E-Box-Sequenz abweichende Zielsequenzen auf der DNA erkennt (s.o.), welche sich zwei mal in Fragment RIV des *RBE1*-Promotors findet (Abb. 33) und eine Erkennungssequenz für bHLH-Transkriptionsfaktoren auch in der Reprimierungsdomäne RI zu finden ist (s.o.), wurde untersucht, ob Efg1p direkt an den Promotor von *RBE1* bindet und so die Regulation dieses Gens vermittelt.

Dafür wurde Efg1p als Fusionsprotein mit dem Maltose-bindenden-Protein (MBP) am N-Terminus (= rEfg1p) mit Hilfe des *pMAL™ Protein Fusion and Purification Systems* (New England Biolabs) heterolog in *E. coli* exprimiert, aufgereinigt und in Bindungsstudien mit den beiden regulatorischen Fragmenten des *RBE1*-Promotors verwendet.

Um eine korrekte Translation des *EFGI*-Genproduktes in *E. coli* zu gewährleisten, wurde zunächst die DNA-Sequenz des *EFGI*-Genes an die Kodonverwendung in *E. coli* angepasst. *C. albicans* verfügt über eine vom genetischen Code abweichende ungewöhnliche Verwendung des Kodons CUG, welches normalerweise in die Aminosäure Leucin translatiert wird, in *C. albicans* aber für Serin kodiert (Santos *et al.*, 1997). Damit eine exakte Translation des *EFGI*-Genes in einem anderen Organismus gewährleistet ist, wurde ein vorhandenes CTG-Kodon an Position 438 des *EFGI*-Genes zunächst gegen das normalerweise Serin-spezifische Kodon TCG ausgetauscht. Dies geschah mit Hilfe direkt aufeinander folgender PCR-Reaktionen (Abb. 34). Zunächst wurden in zwei getrennten Reaktionen je der 5'- und der 3'-Teil des Genes, die das CTG-Kodon enthalten, amplifiziert. Dabei wurden zum einen komplementäre Oligonukleotide verwendet, die das betreffende CTG-Kodon umschließen, stattdessen aber das TCG-Kodon enthalten. Zum anderen wurden Oligonukleotide verwendet, die eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym *EcoRI* am 5'-Ende bzw. eine Schnittstelle für *BamHI* am 3'-Ende des gesamten Genes anfügen. So wurden jeweils ein 5'- und ein 3'-Teil des Genes amplifiziert, die sich gegenseitig überlappen und das neue TCG-Kodon enthalten. In einer folgenden PCR-Reaktion können die 3'-Enden der so amplifizierten beiden Teile nach dem Schmelzen der DNA-Stränge aneinander binden und durch die *Taq*-Polymerase zu dem vollständigen Gen verlängert werden. Durch erneute Verwendung des 5'-*EcoRI*-Primers und des 3'-*BamHI*-Primers wird das so entstandene, mutagenisierte Produkt amplifiziert (Abb. 34).

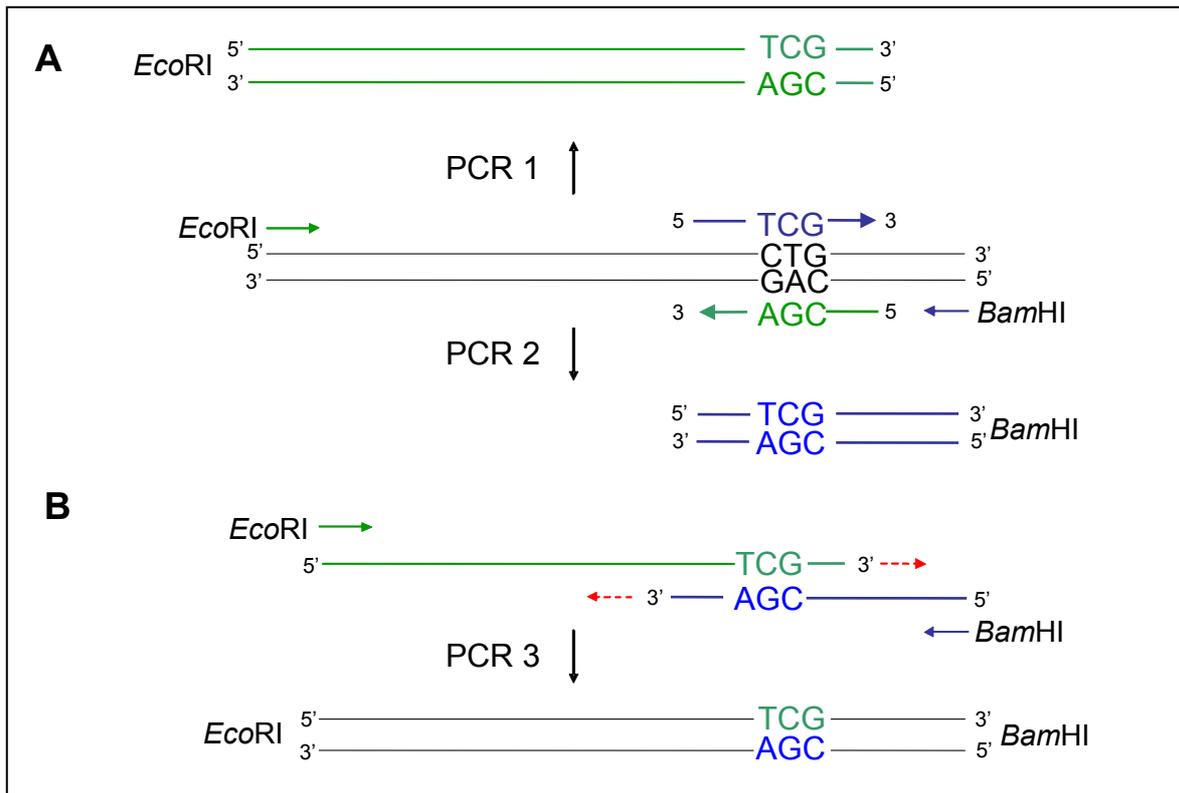


Abb. 34. Kodon-Optimierung des *EFG1*-Genes für die heterologe Expression und Translation in *E. coli*.
A. PCR-Amplifizierung eines 5'- (grün) und eines 3'- (blau) Teiles des *EFG1*-Genes mit komplementären Oligonukleotiden, welche ein TCG-Kodon enthalten für den Austausch des in *C. albicans* Serin-spezifischen Kodons CTG gegen das Kodon TCG; **B.** Verlängerung der 3'-Enden der so amplifizierten und aneinander hybridisierten Teile in einer zweiten PCR-Reaktion zum vollständigen Gen und Amplifizierung desselben mit Oligonukleotiden mit Schnittstellen für *EcoRI* und *BamHI*.

Nach Schneiden des erhaltenen PCR-Produktes mit *EcoRI* und *BamHI* wurde das so modifizierte *EFG1*-Gen in das Plasmid pMAL-c2X (New England Biolabs) ligiert und in den *E. coli*-Stamm TB1 transformiert (Daten nicht gezeigt). Nach Isolierung aus *E. coli* wurden die entsprechenden Plasmide einer Restriktionsanalyse mit den Enzymen *EcoRI* und *BamHI* unterzogen sowie sequenziert (Daten nicht gezeigt).

Die Expression des MBP-Efg1p-Fusionsproteins wurde zunächst in einem Pilotexperiment nach den Angaben des Herstellers überprüft. Dabei wurden Teilproben (Aliquots) von *E. coli* TB1-Zellen vor bzw. nach Induktion des Fusionsproteins durch Zugabe von IPTG zum Medium mit Hilfe von SDS-Probenpuffer bzw. Ultraschall aufgeschlossen (Rohextrakt). Nach Abzentrifugieren der unlöslichen Bestandteile wurde das Fusionsprotein aus dem Rohextrakt mit Hilfe einer Amylosematrix, an welche das Maltose-bindende Protein bindet, angereichert (Abb. 35).

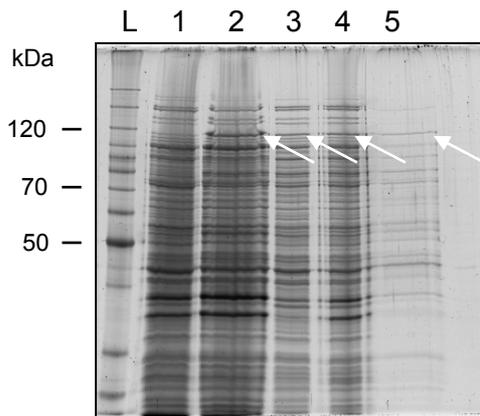


Abb. 35. Pilotexperiment für die Aufreinigung des Efg1p-MBP-Fusionsproteins aus *E. coli* TB1. SDS-PAGE isolierter Proteine aus Vor- und Induktionskultur (Spuren 1 und 2); Aufschluss mit SDS-Probenpuffer (Spuren 1 und 2) bzw. Ultraschall (Spuren 3-5), SYPRO-Ruby-Färbung; L: Leiter; Spur 1: nicht-induzierte Zellen; Spur 2: induzierte Zellen; Spur 3: Rohextrakt; Spur 4: unlösliche Bestandteile, Spur 5: Amylose-gebundene Proteine; Pfeil: Efg1p-MBP-Fusionsprotein

Die Gel-Analyse der gewonnenen Proteinfractionen zeigt eine zusätzliche Bande von ca. 120 kDa Größe in der Induktionskultur, bei der es sich wahrscheinlich um das Fusionsprotein handelt (Spuren 2 bis 4, s.u.). Weiter ist zu sehen, dass sich das Fusionsprotein zu einem guten Teil in der löslichen Proteinfraction befindet und mit Hilfe der Amylosematrix angereichert werden kann (Spur 5).

Die so erhaltenen Proben wurden zusätzlich mit Hilfe von α -MBP- und α -Efg1p-Antikörpern in *Western Blot*-Analysen auf die Anwesenheit von Fusionsprotein hin überprüft (nicht gezeigt, s.u.). Da beide Antikörper positive Signale zeigten, wurde das Fusionsprotein mittels Amylose-Affinitätschromatographie aus 1 l Induktionskultur nach Aufschluss mit Ultraschall (ca. 211 mg Gesamtprotein) aufgereinigt (Abb. 36).

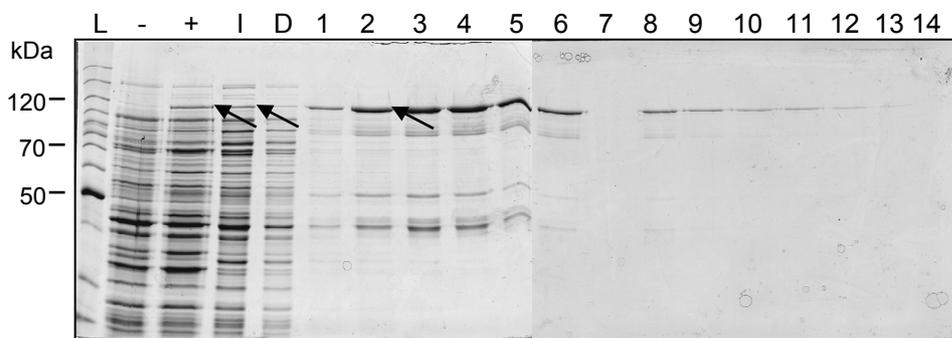


Abb. 36. Aufreinigung des Efg1p-MBP-Fusionsproteins aus *E. coli* TB1. SDS-PAGE der Amylose-Affinitätschromatographie; Coomassie-Färbung; L: Leiter; -, + Rohextrakt aus Vor- und Induktionskultur (20 μ l); I: Input, D: Durchfluss (je 20 μ g); Spuren 1-14: Fraktionen der Chromatographie (je 20 μ l; Elution: 10 mM Maltose); Pfeil: Fusionsprotein

Für den Nachweis, dass es sich bei der in der Induktionskultur und den eluierten Fraktionen persistenten Bande bei ca. 120 kDa tatsächlich um das Fusionsprotein aus Efg1p und dem Maltose-bindenden Protein handelt, wurden die Fraktionen wiederum mit Hilfe von α -MBP- und α -Efg1p-Antikörpern mit Hilfe des *Western Blot*-Verfahrens analysiert (Abb. 37).

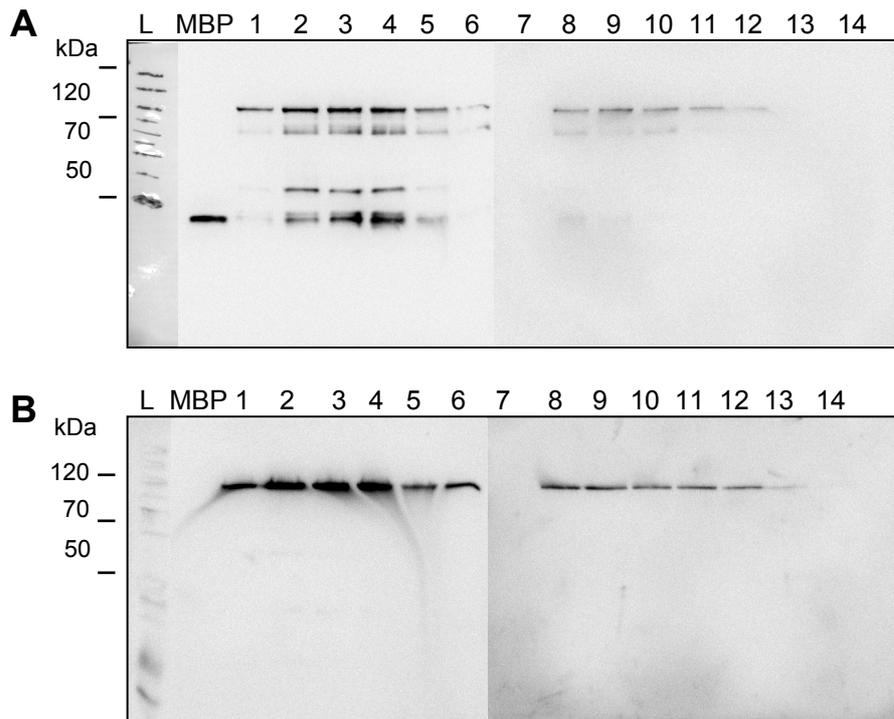


Abb. 37. Aufreinigung des MBP-Efg1p-Fusionsproteins aus *E. coli* TB1. *Western Blot*-Analyse der Amylose-Affinitätschromatographie; **A.** α -MBP-Antikörper; **B.** α -Efg1p-Antikörper (EFG1_Long); L: Leiter; MBP: 0,2 μ g MBP2^{*}; Spuren 1-14: Fraktionen der Chromatographie (je 2 μ l); Pfeil: Fusionsprotein

Der Antikörper gegen das Maltose-bindende Protein (MBP, Abb. 37A) zeigt mehrere Banden für das aufgereinigte Fusionsprotein. Bei diesen Banden handelt es sich entweder um Zwischenprodukte der Translation oder C-terminale Abbauprodukte des Fusionsproteins, da sich das MBP am N-Terminus von Efg1p befindet. Der Antikörper gegen Efg1p zeigt dagegen nur eine einzige Bande mit einer Größe von ca. 120 kDa, was der erwarteten Größe des Fusionsproteins entspricht (MBP2^{*} (42,482 kDa) + α -Fragment der β -Galaktosidase (8,361 kDa) = 50,843 kDa; längeres Efg1p: 549 AS = 60,39 kDa; experimentell bestimmt durch *Western Blot*-Analyse mit α -Efg1p-Antikörper; SC5314: Bandengröße von ca. 70 kDa (s. Methoden, Abb. 12); Summe Fusionsprotein = \sim 120 kDa). Da der α -Efg1p-Antikörper gegen den C-Terminus von Efg1p gerichtet ist, ist davon auszugehen, dass in diesen Fraktionen das vollständige Fusionsprotein enthalten ist. Die Fraktionen 3 bis 5 der Aufreinigung des MBP-Efg1p-Fusionsproteins (= rEfg1p) wurden vereinigt und für die weiteren Bindungs-Experimente verwendet.

Bindungsstudien mit rekombinantem Efg1p

Da sich in Fragment RIV des *RBE1*-Promotors zwei potenzielle Konsensussequenzen für die Bindung von Efg1p an die DNA befinden (E-Boxen; Abb. 33), wurde überprüft, ob das über die Amylose-Säule aufgereinigte rekombinante MBP-Efg1p-Fusionsprodukt (= rEfg1p) an die

Fragmente RIV oder auch an Fragment RI des *RBE1*-Promotors bindet. Dies erfolgte mit Hilfe radioaktiv markierter DNA-Fragmente in Bindungsstudien - sog. *Gelshift Assays* bzw. *Electrophoretic Mobility Shift Assays (EMSAs)*. Bei diesen werden DNA-Proteinkomplexe durch Gelelektrophorese in nicht-denaturierenden Polyacrylamidgelen durch eine Verzögerung der Wanderungsgeschwindigkeit von freier DNA getrennt (Fried and Crothers, 1981; Garner and Revzin, 1981) (Abb. 38).

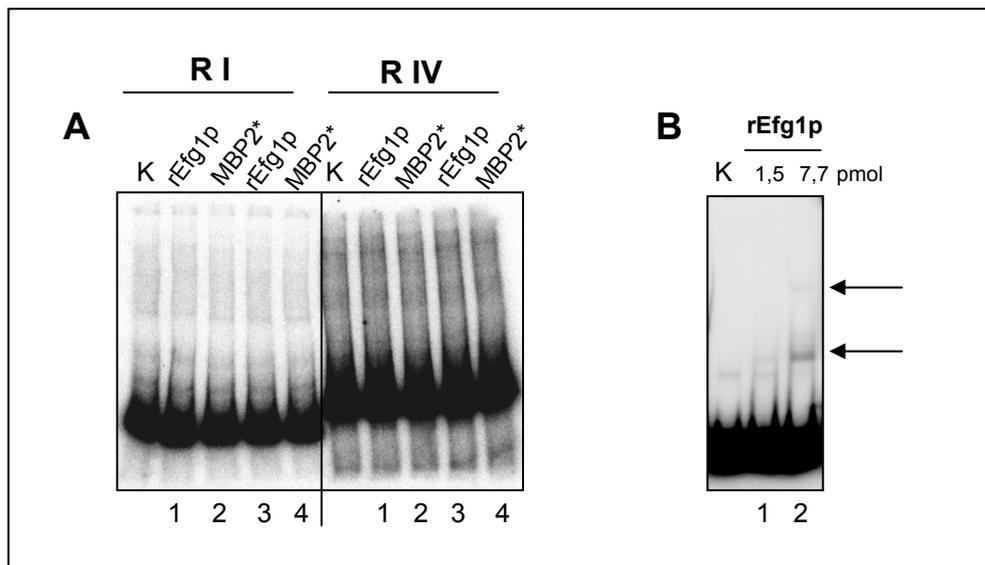


Abb. 38. Bindung des aufgereinigten MBP-Efg1p-Fusionsproteins an die *RBE1*-Promotorfragmente RI und RIV (*Gelshift Assays*). **A.** Spuren 1 und 3: 1 pmol bzw. 0,1 pmol MBP-Efg1p; Spuren 2 und 4: 1 pmol bzw. 0,1 pmol MBP2*; K: Kontrolle (freies DNA-Fragment); **B.** Positivkontrolle: Bindung des aufgereinigten MBP-Efg1p-Fusionsproteins an das in der Literatur als Positivkontrolle verwendete Fragment des *ALS3*-Promotors von -106 bis -196 bp oberhalb des Transkriptionsstarts (Leng *et al.*, 2001); K: Kontrolle (freies DNA-Fragment); Spuren 1 und 2: 1,5 pmol bzw. 7,7 pmol MBP-Efg1p; Pfeile: mögliche Band-Shifts

In verschiedenen Bindungsexperimenten mit bis zu 8 pmol aufgereinigtem rEfg1p konnte keine Bindung des Fusionsproteins an die beiden Fragmente des *RBE1*-Promotors beobachtet werden (Abb. 38A).

Als Positivkontrolle wurde daher das in der Literatur beschriebene Promotorfragment des Hyphen-spezifische Zelloberflächen-Glykoproteins Als8p (= Als3p) von -106 bis -196 bp oberhalb des Startkodons, welches eine Konsensussequenz für die Bindung von Efg1p and die DNA (E-Box) enthält (Leng *et al.*, 2001), in Bindungsstudien mit aufgereinigtem rEfg1p verwendet (Abb. 38B). Bei Verwendung größerer Mengen (7,7 pmol) an rekombinantem Efg1p zeigt sich eine mögliche Bindung an das markierte DNA-Fragment in der Ausbildung zweier DNA-Proteinkomplexe, deren Wanderungsgeschwindigkeit im Gel verzögert wird (Abb. 38B, Pfeile).

Die Ausbildung von DNA-Proteinkomplexen ließ sich für die beiden regulatorischen Domänen des *RBE1*-Promotors mit aufgereinigtem rEfg1p nicht nachweisen. Es ist daher möglich, dass Efg1p nicht direkt, sondern indirekt über andere DNA-bindende Proteine an den *RBE1*-Promotor bindet und so seine regulatorische Funktion vermittelt. Um eine Bindung

von Efg1p an den *RBE1*-Promotor definitiv ausschließen zu können, müsste allerdings zunächst die Spezifität der Bindung des rekombinant exprimierten Efg1p an das DNA-Fragment der Positivkontrolle über Kompetitionsstudien, bei denen ein molarer Überschuss an spezifischem DNA-Fragment im Gegensatz zu einem unspezifischen DNA-Fragment das markierte DNA-Fragment aus dem Protein-DNA-Komplex verdrängt, nachgewiesen werden (vgl. Anhang: **Eine Methode zur *de novo*-Identifikation spezifisch Promotor-bindender Proteine**).

Die hier durchgeführten Experimente schließen allerdings eine mögliche direkte Bindung von Efg1p an die publizierte E-Box-Konsensussequenz für Transkriptionsfaktoren der bHLH-Familie nicht aus. Dies ist ein erster Hinweis, dass nicht nur Rohextrakte einer heterologen Expression von Efg1p, sondern auch aufgereinigtes, heterolog exprimiertes Efg1p in der Lage ist, direkt an DNA zu binden.

Bindungsstudien mit rekombinantem Tec1p

Der Transkriptionsfaktor Tec1p ist nach Transkriptionsanalysen in dieser Arbeit möglicherweise an der Aktivierung der Expression von *RBE1* beteiligt (s. Kap. 2.1, Abb. 19). In *Northern Blot*-Analysen zeigte sich in Blastosporen die Expression von *RBE1* in Deletionsstämmen für Tec1p gegenüber dem Wildtyp leicht erniedrigt. Tec1p gehört zur TEA/ATTS-Familie von Transkriptionsfaktoren, deren 3 Mitglieder aus der Gruppe der Pilze an der Regulation der Morphogenese beteiligt sind (Schweizer *et al.*, 2000). Sie besitzen eine konservierte TEA-Domäne für die Bindung an DNA. Die TEA-Konsensussequenz für die Bindung an die DNA wurde in einem pilzlichen Promotor als 5'-CATTCTY-3' bestimmt (Andrianopoulos and Timberlake, 1994). Tec1p-Konsensussequenzen finden sich auch in den Promotoren aller Hyphen-spezifischer Gene in *C. albicans*, einschließlich demjenigen von *RBT4* (Lane *et al.*, 2001a). Die Expression einiger bereits untersuchter Hyphen-spezifischer Gene ist teilweise von *TEC1* abhängig (Basilana *et al.*, 2005). Eine Tec1p-Bindestelle findet sich auch überlappend mit dem 5'-Ende des *RBE1*-Minimalpromotors (Abb. 33). Das für die Aktivierung der Transkription verantwortliche Fragment RIV des *RBE1*-Promotors wurde daher um diese Sequenz erweitert (-1043 bp bis -1038 bp oberhalb des Transkriptionsstarts). Beide regulatorisch wichtigen Fragmente des *RBE1*-Promotors, RI und RIV, wurden für Bindungsstudien mit rekombinant hergestelltem Transkriptionsfaktor Tec1p verwendet (heterolog exprimiert in und aufgereinigt aus *E. coli* mittels pET-Vektorsystem, Novagen; freundlich zur Verfügung gestellt von M. Sehnal, Dr. K. Schröppel, Tübingen; persönl. Kommunikation). Für die Experimente wurden Rohextrakte eines *E. coli*-Stammes (TB1) mit induziertem rTec1p sowie eines Kontrollstammes, der nur das Expressionsplasmid ohne die *TEC1*-Gensequenz enthielt, sowie über Nickel-Affinitätschromatographie aufgereinigtes rTec1p verwendet (Abb. 39).

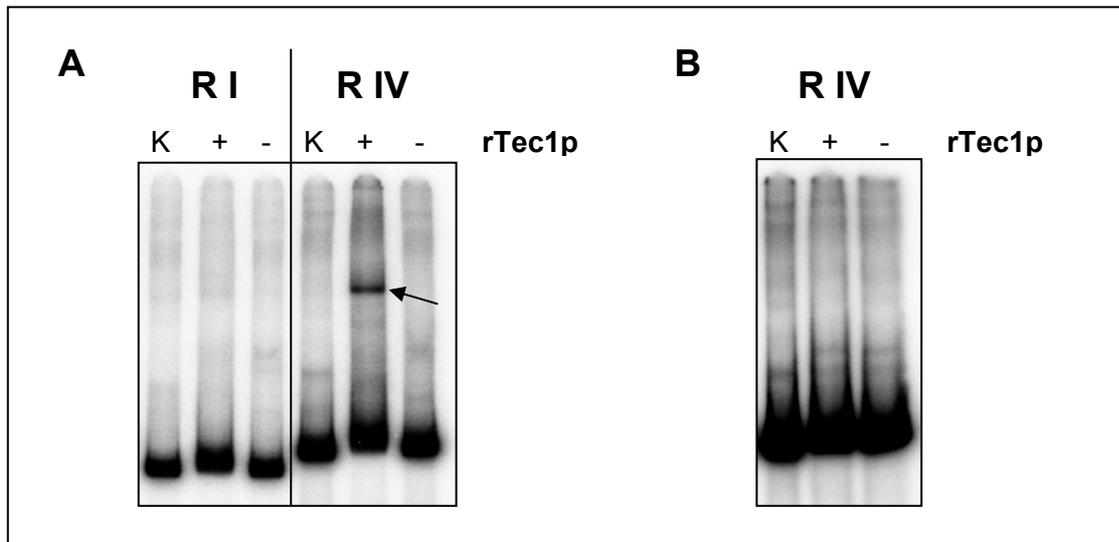


Abb. 39. Bindungsstudien mit den *RBE1*-Promotorfragmenten RI und RIV und rekombinant exprimiertem Tec1p. 2,5 µg Rohextrakt (A) bzw. 2,5 µg Säulenaufreinigung (B) aus *E. coli* mit induziertem rTec1p („+“) und des Kontrollstammes mit dem „leeren“ Plasmid („-“); Kontrolle (K): freies Promotorfragment ohne Protein; Pfeil: spezifischer Bandsift?

Bei Fragment RIV, aber nicht bei Fragment RI des *RBE1*-Promotors ist ein „Gelshift“ nach der Zugabe von Rohextrakt mit induziertem rTec1p (Spur 1) zu beobachten, der bei den Kontrollextrakten nicht vorhanden ist. Dies ist zu erwarten, da Fragment RIV eine Konsensussequenz für die Tec1p-Bindung aufweist.

Der unter Verwendung des *E. coli*-Rohextraktes beobachtete „Gelshift“ ließ sich allerdings mit bis zu 2,5 µg über Nickel-Affinitätschromatographie aufgereinigten rTec1p nicht reproduzieren (Abb. 39B). Es muss daher in weiteren Versuchen analysiert werden, z.B. unter Optimierung der Bindungsbedingungen, ob Tec1p tatsächlich spezifisch an den Promotor von *RBE1* binden kann.

Alternativ zu Bindungsstudien mit aufgereinigten Transkriptionsfaktoren können die identifizierten regulatorischen Bereiche des *RBE1*-Promotors auch für eine direkte biochemische Anreicherung spezifisch bindender Proteine verwendet werden, um die Faktoren, die die Expression von *RBE1* regulieren, zu identifizieren. Erste Schritte für die Etablierung einer solchen Methode wurden in dieser Arbeit bereits durchgeführt (s. Anhang: **Eine Methode zur *de novo*-Identifikation spezifisch Promotor-bindender Proteine**).

4 Funktionelle Charakterisierung von Rbe1p und Rbt4p

Um die Funktion der beiden Pry-Proteine Rbe1p und Rbt4p in *Candida albicans* näher zu analysieren, wurde zunächst die zelluläre Lokalisation der beiden Proteine mittels Massenspektrometrie untersucht. Um dann die molekulare Funktion der beiden Proteine zu analysieren, wurden diese heterolog in *S. cerevisiae* exprimiert. Ferner wurden beide Gene in verschiedenen Stämmen mit unterschiedlichem genetischem Hintergrund deletiert. Durch phänotypische Analysen der so konstruierten Deletionsstämme im Vergleich mit dem Wildtypstamm unter verschiedenen Bedingungen lässt sich eine Beteiligung der beiden Proteine an unterschiedlichen zellulären Prozessen sowie an den Virulenzeigenschaften von *C. albicans* im Zusammenspiel mit dem Wirt untersuchen.

Die Untersuchungen konzentrierten sich auf Rbe1p und Rbt4p, da diese unter den hier untersuchten Bedingungen signifikant exprimiert sind, wohingegen sich für die anderen drei Mitglieder der *PRY*-Familie in *C. albicans* keine erhöhte Expression unter diesen Bedingungen nachweisen lässt (s. Kap. 2).

4.1 Lokalisation von Rbe1p und Rbt4p in *C. albicans* – vergleichende Sekretomanalysen

Für eine Aufklärung der molekularen Funktion eines Proteins ist zunächst seine Lokalisation inner- oder auch außerhalb der Zelle aufschlussreich. Die Lokalisation von Rbe1p und Rbt4p in *C. albicans* wurde in diesem Zusammenhang mit verschiedenen Methoden untersucht.

In Vorversuchen hatte sich die Lokalisation der beiden Proteine durch Einfügen von GFP oder Hämagglutinin-domänen in die Gensequenz und anschließender Fluoreszenz- bzw. Immundetektion weder innerhalb noch außerhalb der Zelle eindeutig nachweisen lassen (Daten nicht gezeigt). Da die Genprodukte von *RBE1* und *RBT4* strukturelle Eigenschaften sekretierter Proteine aufweisen (eine hydrophobe Signalsequenz für die Sekretion, einen Serin-/Threonin-reichen Bereich, an dem Glykosylierungen erfolgen können, sowie das Fehlen einer Sequenz, die eine kovalente Verankerung in der Zellwand gestattet; vgl. Abb. 14), wurden Kulturüberstände von *C. albicans* Wildtyp-Zellen mittels Massenspektrometrie auf eine mögliche Anwesenheit von Rbe1p und Rbt4p hin untersucht. Zusätzlich wurden Kulturüberstände des Doppel-Deletionsstammes für *RBE1* und *RBT4* (s. Kap. 4.3) hinsichtlich löslicher sekretierter Proteine (des Sekretoms) analysiert.

Zellfreie Kulturüberstände von Blastosporen bzw. Hyphen des Wildtypstammes SC5314 sowie des Doppel-Deletionsstammes für *RBE1* und *RBT4* wurden nach Wachstum von 6 Stunden in den definierten (Peptid-freien) Medien SC bei 30°C bzw. MEM-Alpha bei 37°C durch Zentrifugation und anschließender Sterilfiltration gewonnen. Proteine in den jeweiligen Kulturüberständen wurden mittels Ultrafiltration angereichert und mit dem Enzym Trypsin proteolytisch gespalten (Rosenfeld *et al.*, 1992). Die so gewonnenen Peptide wurden mittels Flüssigkeitschromatographie (LC) fraktioniert und anschließend massenspektrometrisch

analysiert (MALDI-TOF/TOF; *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Tandem Time-of-Flight Mass Spectrometry*; Zusammenarbeit mit Dr. E. Hiller, Fraunhofer IGB, Stuttgart). Nach Bestimmung der monoisotopischen Peptidmassen wurde die jeweilige Peptidsequenz durch mittels anschließender Fragmentierung erhaltene MS-Spektren ermittelt. Für die Identifikation von Proteinen wurden die erhaltenen MS/MS-Spektren mit Hilfe der Suchmaschine Mascot (<http://www.matrixscience.com>) Proteinen der *C. albicans*-Datenbank zugeordnet (<http://www.candidagenome.org>). Für die Zuordnung wurden nur Peptide verwendet, für die die Wahrscheinlichkeit (p) einer zufälligen Zuordnung $\leq 0,05$ war. Die Analysen wurden für jeweils 3 unabhängige biologische Replikate je untersuchtem Stamm und Wachstumsbedingung durchgeführt (Tab. 22; Peptide für die Zuordnung zu den einzelnen Proteinen: s. Anhang, Tab. 25-28).

Auf diese Weise konnten insgesamt 39 verschiedene Proteine aus den Überständen von Blastosporen und Hyphen identifiziert werden. Davon finden sich bis zu 26 Proteine in den Überständen von Blastosporen und bis zu 30 Proteine in den Überständen von Hyphen (Tab. 22). Eine Sequenzanalyse hinsichtlich des Vorhandenseins hydrophober Signalsequenzen am N-Terminus für den Eintritt in den Sekretionsweg (Vorhersage-Algorithmus: SignalP-NN und SignalP-HMM) zeigt, dass die überwiegende Mehrheit der identifizierten Proteine über eine solche Signalsequenz verfügt (Ausnahmen: Hak1p, *orf19.7076* und *orf19.480*, die daher nicht als sekretorische Proteine gelten und wahrscheinlich im Zytoplasma lokalisiert sind; Daten nicht gezeigt). Das Vorhandensein von Transmembrandomänen ist ein weiteres Ausschlusskriterium für sekretorische Proteine. Dies ist allerdings nur für eines der hier identifizierten Proteine der Fall: Msb2p (Roman *et al.*, 2009). 17 Proteine weisen eine potenzielle Sequenz für das Anfügen eines GPI-Ankers für eine kovalente Verankerung in der Zellmembran bzw. -wand auf (Tab. 23; Vorhersage-Algorithmus: *big-PI Fungal Predictor*, http://mendel.imp.ac.at/gpi/fungi_server.html, (Eisenhaber *et al.*, 2004); sowie: (De Groot *et al.*, 2003); Als1p, Als3p, Als5p, Cht2p Crh11p, Ecm33p, Exg2p, Phr1p, Phr2p, Pga4p, Plb4.5, Rbt5p, Rhd3p, Sod4p, Sod5p (Fradin *et al.*, 2005), Utr2p, Ywp1p; Daten nicht gezeigt).

Es ist daher davon auszugehen, dass es sich bei den in dieser Arbeit identifizierten Proteinen in den analysierten Kulturüberständen in der Mehrheit um sekretorische Proteine handelt. Tatsächlich wurden einige bereits als solche postuliert bzw. beschrieben (Chaffin, 2008; Chaffin *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 2003). Proteine, die über einen GPI-Anker verfügen gelten üblicherweise als kovalent an der Zelloberfläche verankert (De Groot *et al.*, 2003; Klis *et al.*, 2001), wie z.B. die Adhäsine der *ALS*-Familie (Hoyer, 2001), die pH-regulierten Proteine Phr1p und Phr2p (Muhlschlegel and Fonzi, 1997; Saporito-Irwin *et al.*, 1995) oder Rbt5 (Braun *et al.*, 2000). Ihr Vorhandensein in Kulturüberständen ist möglicherweise auf ein Ablösen aus der Zellwand zurückzuführen. Neben solchen sekretorischen Proteinen, deren Hauptanteil möglicherweise an die Zelloberfläche gebunden ist, finden sich nur wenige Vertreter von Proteinfamilien, deren Mitglieder bekanntermaßen – zumindest teilweise – ins umgebende Medium sezerniert werden, wie sekretierte Aspartylproteasen (Hube and Naglik, 2001) (Sap5p).

Etwa die Hälfte der identifizierten sekretorischen Proteine ist in beiden Morphogeneseformen – Blastosporen und Hyphen - zu finden (Tab. 22; Bgl2p, Cht2p, Cht3p, Coi1p, Ecm33p, Exg2p, Mp65p, Pga4p, Plb4.5p, Rbt4p, Rbt5p, Sim1p, Sun41p, Tos1p, Xog1p, Ywp1p). Es lassen sich jedoch signifikante Morphogenese-spezifische Unterschiede im Sekretionsmuster feststellen (Blastosporen: Abg1p (Veses *et al.*, 2005; Veses *et al.*, 2009), Dag7p, Eng1p, Phr2p, Rhd3p, Scw11p, Sod4p, Utr2p; Hyphen: Als1p, Als3p, Als5p, Asm33p, Ece1p, Phr1p, Sap5p, Sod5p). Zu diesen gehört auch das Sekretionsmuster von Rbe1p, welches nur in Überständen von Blastosporen des Wildtypstammes (SC5314), nicht aber in denjenigen von Hyphen nachzuweisen ist. Dies korreliert mit der transkriptionellen Regulation von *RBE1*, welches während des hyphalen Wachstums reprimiert ist (Abb. 20). Damit ist Rbe1p ein Bestandteil des differentiell regulierten Sekretoms von *C. albicans* und wird in Abhängigkeit von der Morphogenese spezifisch von Blastosporen sekretiert. Rbt4p findet sich in allen 3 biologischen Replikaten des Wildtypstammes in den Überständen von Hyphen, in einem biologischen Replikate auch in den Überständen von Blastosporen. Somit ist Rbt4p ebenfalls ein Bestandteil des Sekretoms von *C. albicans*. Rückschlüsse auf quantitative Veränderungen im Sekretionsmuster lassen sich anhand der hier durchgeführten Experimente nicht ziehen und müssten in anschließenden Experimenten spezifisch untersucht werden (z.B. durch Markierung einzelner Proteine und anschließender Quantifizierung mittels Immundetektion). Eine Anreicherung von Rbt4p in den Überständen von Hyphen würde dabei ebenfalls mit dem Expressionsmuster von *RBT4* korrelieren, welches schwach in Blastosporen exprimiert ist und während des hyphalen Wachstums induziert wird (Abb. 20; (Braun *et al.*, 2000)). Aufgrund der sekretorischen Natur von Rbt4p ist dies zumindest wahrscheinlich.

Ein Vergleich der Sekretome des Wildtypstammes mit denjenigen des Doppel-Deletionsstammes für *RBE1* und *RBT4* ergibt keine Veränderung hinsichtlich der qualitativen Zusammensetzung (Tab. 22). Das Fehlen von Rbe1p und Rbt4p im umgebenden Medium kann als Spezifitätskriterium für den Genomstatus der verwendeten Stämme gelten. Eine Analyse möglicher quantitativer Veränderungen im Sekretionsmuster durch die Deletion von *RBE1* und *RBT4* wäre in anschließenden spezifischen Untersuchungen möglich, da die Anzahl identifizierter Peptide für ein bestimmtes Protein mit der Konzentration dieses Proteins zusammen hängt (Liu *et al.*, 2004) (mögliche Proteine, die im Doppel-Deletionsstamm induziert sind: Rhd3p und Ywp1p in Blastosporen, Bgl2p, Cht2p, Ecm33p, Plb4.5p in Hyphen, die dort in allen 3 biologischen Replikaten, im Wildtyp jedoch nur einmal auftauchen). Quantitative Veränderungen im Sekretionsmuster (z.B. durch die kompensatorische Induktion anderer sekretierter Proteine) würden dabei einen Hinweis auf eine mögliche Funktion der beiden Pry-Proteine in *C. albicans* geben. Eine Sekretion der weiteren Mitglieder der Pry-Familie lässt sich nicht nachweisen, so dass diesen Proteinen möglicherweise andere Funktionen zukommen als Rbe1p und Rbt4p. Diese Beobachtung stimmt ebenfalls mit den transkriptionellen Analysen dieser Arbeit überein, bei denen keine signifikante Expression dieser 3 Gene unter den untersuchten Bedingungen nachgewiesen werden konnte (Kap. 2.2).

Tab. 22. Vergleichende Sekretom-Analysen. Identifikation sekretierter Proteine in Blastosporen und Hyphen in *C. albicans* mittels massenspektrometrischer Analyse von Kultur-Überständen des Wildtyp-Stammes (SC3514), sowie des Doppel-Deletionstammes für *RBE1* und *RBT4*. Daten aus jeweils 3 biologischen Replikaten.

SC5314 – Blastosporen (SC-Medium, 30°C, 6 h)			SC5314 – Hyphen (MEM-Alpha, 37°C, 6 h)			Δ <i>rbe1</i> /Δ <i>rbt4</i> -Doppel-Deletionstamm – Blastosporen (SC-Medium, 30°C, 6 h)			Δ <i>rbe1</i> /Δ <i>rbt4</i> -Doppel-Deletionstamm – Hyphen (MEM-Alpha, 37°C, 6 h)		
Protein (ORF# ^a)	Biologische Replikate ^b	Peptide ^c	Protein (ORF# ^a)	Biologische Replikate ^b	Peptide ^c	Protein (ORF# ^a)	Biologische Replikate ^b	Peptide ^c	Protein (ORF# ^a)	Biologische Replikate ^b	Peptide ^c
Abg1p (<i>orf19.1597</i>)	2	1	Als3p (<i>orf19.1816</i>)	3	6	Abg1p (<i>orf19.1597</i>)	1	1	Als1p (<i>orf19.5741</i>)	1	1
Bgl2p (<i>orf19.4565</i>)	3	2	Als5p (<i>orf19.5736</i>)	2	1	Bgl2p (<i>orf19.4565</i>)	3	2	Als3p (<i>orf19.1816</i>)	3	6
Cht2p (<i>orf19.3895</i>)	2	2	Asm3p (<i>orf19.6037</i>)	3	4	Cht2p (<i>orf19.3895</i>)	2	2	Als5p (<i>orf19.5736</i>)	1	1
Cht3p (<i>orf19.7586</i>)	3	2	Bgl2p (<i>orf19.4565</i>)	1	1	Cht3p (<i>orf19.7586</i>)	3	2	Asm3p (<i>orf19.6037</i>)	3	8
Coilp (<i>orf19.5063</i>)	3	3	Cht2p (<i>orf19.3895</i>)	1	1	Coilp (<i>orf19.5063</i>)	3	2	Bgl2p (<i>orf19.4565</i>)	3	3
Dag7p (<i>orf19.4688</i>)	3	2	Cht3p (<i>orf19.7586</i>)	3	3	Dag7p (<i>orf19.4688</i>)	3	2	Cht2p (<i>orf19.3895</i>)	3	2
Ecm33p (<i>orf19.3010.1</i>)	1	1	Coilp (<i>orf19.5063</i>)	2	1	Ecm33p (<i>orf19.3010.1</i>)	2	1	Cht3p (<i>orf19.7586</i>)	3	2
Eng1p (<i>orf19.3066</i>)	2	1	Ecm33p (<i>orf19.3010.1</i>)	1	1	Eng1p (<i>orf19.3066</i>)	3	1	Coilp (<i>orf19.5063</i>)	3	1
Exg2p (<i>orf19.2952</i>)	3	1	Ecelp (<i>orf19.3374</i>)	3	2	Exg2p (<i>orf19.2952</i>)	3	1	Chl1p (<i>orf19.2706</i>)	1	1
Mp65p (<i>orf19.1779</i>)	3	2	Exg2p (<i>orf19.2952</i>)	3	1	Mp65p (<i>orf19.1779</i>)	3	2	Ecm33p (<i>orf19.3010.1</i>)	3	1
Msb2p (<i>orf19.1490</i>)	3	2	Mp65p (<i>orf19.1779</i>)	3	2	Msb2p (<i>orf19.1490</i>)	3	2	Ecelp (<i>orf19.3374</i>)	3	3
Pga4p (<i>orf19.4035</i>)	2	4	Msb2p (<i>orf19.1490</i>)	2	2	Pga4p (<i>orf19.4035</i>)	3	4	Exg2p (<i>orf19.2952</i>)	2	1
Phr2p (<i>orf19.6081</i>)	3	2	<i>orf19.7067</i> (-)	1	1	Phr2p (<i>orf19.6081</i>)	3	2	Hak1p (<i>orf19.6249</i>)	1	1
Plb4-5p (<i>orf19.1442</i>)	3	4	Pho100p (<i>orf19.4424</i>)	1	1	Plb4-5p (<i>orf19.1442</i>)	3	4	Mp65p (<i>orf19.1779</i>)	3	1
Rbe1p (<i>orf19.7218</i>)	3	2	Pga4p (<i>orf19.4035</i>)	1	1	Rbe1p (<i>orf19.7218</i>)	2	1	Msb2p (<i>orf19.1490</i>)	3	2
Rbt4p (<i>orf19.6202</i>)	1	1	Phr1p (<i>orf19.3829</i>)	3	7	Rbt4p (<i>orf19.6202</i>)	3	1	<i>orf19.480</i> (-)	1	1
Rbt5p (<i>orf19.5636</i>)	3	1	Plb4-5p (<i>orf19.1442</i>)	1	1	Rbt5p (<i>orf19.5636</i>)	3	4	Pho100p (<i>orf19.4424</i>)	2	2
Rhd3p (<i>orf19.5305</i>)	1	1	Rbt4p (<i>orf19.6202</i>)	3	1	Rhd3p (<i>orf19.5305</i>)	3	8	Pga4p (<i>orf19.4035</i>)	2	2
Scw11p (<i>orf19.3893</i>)	3	3	Rbt5p (<i>orf19.5636</i>)	2	2	Scw11p (<i>orf19.3893</i>)	3	1	Phr1p (<i>orf19.3829</i>)	3	10
Sim1p (<i>orf19.5032</i>)	3	8	Sap5p (<i>orf19.5585</i>)	3	2	Sim1p (<i>orf19.5032</i>)	3	2	Plb4-5p (<i>orf19.1442</i>)	3	2
Sod4p (<i>orf19.2062</i>)	3	1	Sim1p (<i>orf19.5032</i>)	2	2	Sod4p (<i>orf19.2062</i>)	3	7	Rbt5p (<i>orf19.5636</i>)	3	2
Sun41p (<i>orf19.3642</i>)	3	2	Sod5p (<i>orf19.2060</i>)	3	4	Sun41p (<i>orf19.3642</i>)	3	1	Sap5p (<i>orf19.5585</i>)	3	4
Tos1p (<i>orf19.1690</i>)	3	7	Sun41p (<i>orf19.3642</i>)	3	2	Tos1p (<i>orf19.1690</i>)	3	3	Sim1p (<i>orf19.5032</i>)	2	2
Utr2p (<i>orf19.1671</i>)	3	1	Tos1p (<i>orf19.1690</i>)	3	8	Utr2p (<i>orf19.1671</i>)	3	1	Sod5p (<i>orf19.2060</i>)	3	4
Xog1p (<i>orf19.2990</i>)	3	2	Xog1p (<i>orf19.2990</i>)	3	2	Xog1p (<i>orf19.2990</i>)	3	1	Sun41p (<i>orf19.3642</i>)	3	3
Ywp1p (<i>orf19.3618</i>)	1	1	Ywp1p (<i>orf19.3618</i>)	1	1	Ywp1p (<i>orf19.3618</i>)	3	1	Tos1p (<i>orf19.1690</i>)	3	8
									Xog1p (<i>orf19.2990</i>)	3	4
									Ywp1p (<i>orf19.3618</i>)	2	1

^a Nummer des *open reading frame* (ORF) nach Assembly 21 der *C. albicans* Genom-Datenbank (www.candidagenome.org)

^b Zahl der biologischen Replikate mit signifikant identifizierten Peptiden

^c Gesamtzahl der in den 3 biologischen Replikaten identifizierten Peptide mit einem Erwartungswert für die Sequenzübereinstimmung $p < 0.05$ (Identität oder signifikante Homologie)

Tab. 23. Funktion, strukturelle Charakteristika und Lokalisation der in den Überständen von Blastosporen und Hyphen identifizierten Proteine.

Protein (ORF# ^a)	Funktion ^b	Signalsequenz ^c	GPI-Anker ^d	Lokalisation ^e
Abg1p (<i>orf19.1597</i>)	unbekannt	ja		Plasmamembran (Vakuole, Hyphen) (Veses <i>et al.</i> , 2005; Veses <i>et al.</i> , 2009)
Als1p (<i>orf19.5741</i>)	Adhäsion	ja	ja	Zellwand (Hefe, Hyphe)
Als3p (<i>orf19.1816</i>)	Adhäsion	ja	ja	Zellwand (Hefe, Hyphe) extrazellulär
Als5p (<i>orf19.5736</i>)	Adhäsion	ja	ja	Zellwand (Homologie)
Asm3p (<i>orf19.6037</i>)	sekretierte Sphingomyelin-Phospho-diesterase (pot.)	ja		unbekannt
Bgl2p (<i>orf19.4565</i>)	β -1,3-Glukosyltransferase	ja		Zellwand (Hefe), extrazellulär
Cht2p (<i>orf19.3895</i>)	Chitinase	ja	ja*	Zellwand (Hefe), extrazellulär
Cht3p (<i>orf19.7586</i>)	Chitinase	ja		Zellwand, extrazellulär
Coi1p (<i>orf19.5063</i>)	unbekannt	ja		Zelloberfläche
Crh11p (<i>orf19.2706</i>)	Transglykosidase (pot.)	ja	ja*	Zellwand (Hefe, Hyphe), -membran [#]
Dag7p (<i>orf19.4688</i>)	unbekannt	ja		unbekannt
Ece1p (<i>orf19.3374</i>)	unbekannt	ja		unbekannt
Ecm33p (<i>orf19.3010.1</i>)	Adhäsion	ja	ja	Zellwand (Hefe, Hyphe), -membran [#]
Eng1p (<i>orf19.3066</i>)	Endo- β -1,3-Glukanase	ja		Zelloberfläche
Exg2p (<i>orf19.2952</i>)	Exo- β -1,3-Glukosidase (pot.)	ja	ja	Zellwand, -membran [#]
Hak1p (<i>orf19.6249</i>)	Kalium-Transporter (pot.)	-		unbekannt
Mp65p (<i>orf19.1779</i>)	β -Glukanase/Adhäsion (pot.)	ja		Zellwand (Hefe, Hyphe), extrazellulär
Msb2p (<i>orf19.1490</i>)	Zellwand-Organisation	ja		Plasmamembran, extrazellulär
<i>orf19.480</i> (-)	unbekannt	-		Zytoplasma, Zellkern
<i>orf19.7067</i> (-)	unbekannt	-		Cdc73p/Paf1p-Komplex
Pho100p (<i>orf19.4424</i>)	saure Phosphatase (pot.)	ja		Zelloberfläche, extrazellulär
Pga4p (<i>orf19.4035</i>)	β -1,3-Glukosyltransferase (pot.)	ja	ja	Zellwand (Hefe, Hyphe), -membran [#]
Phr1p (<i>orf19.3829</i>)	β -1,3-Glukosyltransferase	ja	ja*	Zellwand (Hefe, Hyphe), -membran
Phr2p (<i>orf19.6081</i>)	β -1,3-Glukosyltransferase	ja	ja*	Zellwand (Hefe, Hyphe), -membran
Plb4.5p (<i>orf19.1442</i>)	Phospholipase	ja	ja*	Zelloberfläche, extrazellulär
Rbe1p (<i>orf19.7218</i>)	unbekannt	ja		Zelloberfläche, extrazellulär
Rbt4p (<i>orf19.6202</i>)	unbekannt	ja		Zelloberfläche, extrazellulär
Rbt5p (<i>orf19.5636</i>)	Hämoglobin-Bindung	ja	ja	Zellwand (Hefe), -membran
Rhd3p (<i>orf19.5305</i>)	unbekannt	ja	ja*	Zellwand (Hefe, Hyphe), -membran [#]
Sap5p (<i>orf19.5585</i>)	sekretierte Aspartylprotease	ja		extrazellulär
Scw11p (<i>orf19.3893</i>)	β -1,3-Glukosidase (pot.)	ja		Zelloberfläche
Sim1p (Sun42p) (<i>orf19.5032</i>)	Aufrechterhaltung der Zellwand	ja		Zellwand, extrazellulär
Sod4p (<i>orf19.2062</i>)	Superoxid-Dismutase	ja	ja	Zellwand (Hefe, Hyphe)
Sod5p (<i>orf19.2060</i>)	Superoxid-Dismutase	ja	ja	Zellwand ⁺
Sun41p (<i>orf19.3642</i>)	Glykosidase (pot.)	ja		Zellwand, extrazellulär
Tos1p (<i>orf19.1690</i>)	unbekannt	ja		Zellwand, extrazellulär
Utr2p (<i>orf19.1671</i>)	Transglykosidase (pot.)	ja	ja	Zellwand (Hefe, Hyphe), -membran [#]
Xog1p (<i>orf19.2990</i>)	Exo- β -1,3-Glukanase	ja		Zelloberfläche, extrazellulär
Ywp1p (<i>orf19.3618</i>)	Adhäsion	ja	ja	Zellwand (Hefe, Hyphe), extrazellulär

^a Nummer des *open reading frame* (ORF) nach Assembly 21 der *C. albicans* Genom-Datenbank (www.candidagenome.org)

^b Funktion nach der *C. albicans* Genom-Datenbank; pot = potenziell (Vorhersage nach Sequenzhomologie)

^c potenzielle hydrophobe Signalsequenz am N-Terminus mit Spaltungsstelle innerhalb 15 – 25 AS vom N-Terminus; Vorhersage-Algorithmus: SignalP-NN, SignalP-HMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>)

^d potenzielle Sequenz für das Anfügen eines GPI-Ankers (ω -Spaltstelle; Vorhersage-Algorithmus: big-PI Fungal Predictor, http://mendel.imp.ac.at/gpi/fungi_server.html; * zusätzlich vorhergesagt nach (De Groot *et al.*, 2003))

^e Lokalisation nach der *C. albicans* Genom-Datenbank; [#] gefunden in Plasmamembran von (Cabezón *et al.*, 2009); ⁺ beschrieben von (Fradin *et al.*, 2005)

4.2 Protease-Assays mit heterolog exprimiertem Rbe1p und Rbt4p

Datenbankrecherche nach bereits funktionell charakterisierten Mitgliedern der Superfamilie der CAP-Proteine in der Sequenz-Datenbank des *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) mit Hilfe des BLAST-Programmes liefert nur ein Protein mit einer charakterisierten molekularen Funktion. Es handelt sich um Tex31p, ein Protein aus dem Giftkanal der Meeresschnecke *Conus textile*. Tex31p besitzt eine Größe von 30 kDa und wurde als Calcium-abhängige, sekretierte sequenzspezifische Serin-Protease beschrieben (Milne *et al.*, 2003). Die Autoren schlagen eine katalytische Triade aus 3 Aminosäuren vor (Ser⁸⁰, Glu¹¹⁵, und His¹³⁰), die als katalytisches Zentrum für die Spaltung basischer Peptide fungieren soll. Ein Vergleich der Genprodukte von Tex31p und Rbe1p ergibt eine Sequenzidentität von 29% und eine Homologie von 43% über einen Bereich von 155 Aminosäuren der beiden Proteine (Abb. 40).

```

Tex31p 10  LTPAHTMCLTDKPNNAVAVPLTQ-ETEHEILEMHNKIRADVTDAAANMLKMEWDERLATVAQ 68
          LT +   T   ++ A P   E   EIL+ HN RA       + + W +LA AQ
Rbe1p 80  LTTSTISSSTASESDATPTADVEFAEEILKEHNVKRA----LHGVPALSWSNKLAEYQAQ 135

Tex31p 69  KWAMQCILGHDSGRGEPDLPGSVGQNVAVSSGDLTFLGAVQMWADDEI--VDFQYGVWTD 126
          +A   G D           G G+N+A +G + + V W DEI VD+ +T+
Rbe1p 136  DYANT--GFDCSNLNLKHSGGPYGENLA--AGYMGGISPVDAWYDEISMVDWNNVDFTE 190

Tex31p 127  GTGHYIQQVFAGASRIGCGQSACGN--NKYFVCNY 159
          TGH+ Q V+ +++GC + C + VC Y
Rbe1p 191  STGHFTQLVWRSTQVGCAMMCSTAWRQITVCEY 225

```

Abb. 40. Sequenzvergleich der Proteine Tex31p aus *Conus textile* und Rbe1p aus *Candida albicans*. („BLAST 2 Sequences“, NCBI; „+“ = homologe Aminosäuren; rot und orange unterlegt: vorgeschlagene katalytische Triade für die Spaltung basischer Peptide; gelb hervorgehoben: CAP- bzw. CRISP-Signatur 1 in Rbe1p und Tex31p (Hulo *et al.*, 2008).

Es zeigt sich, dass die drei vorgeschlagenen katalytisch wirksamen Aminosäuren bei beiden Proteinen konserviert sind. Die entsprechenden Aminosäuren in der Sequenz von Rbe1p sind: Ser¹⁴⁵, Glu¹⁷⁷ und His¹⁹⁴ (Abb. 41, unterlegt).

Rbe1p und Tex31p zeigen zudem Homologien in der konservierten Signatur 1 der CAP- bzw. CRISP-Proteine (<http://www.expasy.ch/prosite>; Abb. 13).

Für den Sequenzvergleich von Tex31p mit Rbt4p ergibt sich eine ähnliche Homologie wie für Rbe1p mit 27% Sequenzidentität und 42 % Homologie über einen Bereich von 142 Aminosäuren (Daten nicht gezeigt).

Ein Sequenzvergleich aller 5 Pry-Proteine in *C. albicans* zeigt, dass die 3 vorgeschlagenen katalytischen Aminosäuren in allen Sequenzen konserviert sind (Abb. 41, rot unterlegt).

```

ORF19.13583 (RBT4) QQILDahnQKRARHGVPDLTWDATVYQYAQKFADQ-YSCSGN-LQHSGGKYGENLAVGYA 270
ORF19.2336 ELMLKEHNNKRKLHQSCPLKWSSELFNYASQFAAE-YSCSGI-LQHSGGKYGENLAFGYS 120
ORF19.7218 (RBE1) EEILKEHNVKRALHGVPALSWSNKLAEYAQDYANTGFDCSNLNKHSGGPPYGENLAAGYM 184
ORF19.6200 RQILEAHNIKRAshGVNPLTWSNELYNYANKVASS-YDCSGN-LRHTSGPYGENLALGYS 241
ORF19.2787 SEILDAHNKYRAQHkVGDLSWDVDTYNYAKNNADN-YDCSGV-LTHTHGKFGENLAAGFK 358
      :*. ** * * *.** :***. * :.***. * *: * :***** *:

ORF19.13583 (RBT4) DGAAALQAWYEAGKDGLSYSGSSSVYNHFTQVVWKSTTKLGcAYKDCRAQN--WGLYV 328
ORF19.2336 P-IGAIeAWYD---GEMVYVYGSENVYNHFTAIvWNNTNSLGcAYKSCDTTTLNLYI 175
ORF19.7218 (RBE1) GGISPVDAWYDISMVDWNNVDFTESTG-HFTQLVWRSTTQVGCakmmCSTAWR---QIT 240
ORF19.6200 SGANAVSAWYSEG-----FNFGGAGKLNHFTQVVWKSTTQLGcAYKDCRAKG--WGLYI 293
ORF19.2787 DGASTVAAWVDEP-----ISYSDASfVYNHFTQVIWKGSTKVGcAYKDCRKSN--WGLYV 411
      .: ** . *          *** :.*.....*** *

ORF19.13583 (RBT4) VCSYDPAGNVMGTDPKTGKSYMAENVLRPQ- 358
ORF19.2336 VCSYPPGNVIGYSSQNVPPLNSKMVN---- 202
ORF19.7218 (RBE1) VCEYLPRGNVIGLNVTSghSYFVDNVLPPLK 271
ORF19.6200 ICNYQKPGNIIGQELANILPLIRS----- 317
ORF19.2787 VCEYDPYGNVIGQGSKNVFP----- 431
      :*. * **::* . .
    
```

Abb. 41. Sequenzvergleich der Proteine Rbt4p (ORF19.13583), ORF19.2336, Rbe1p (ORF19.7218), ORF19.6200 und ORF19.2787 von *Candida albicans* (Ausschnitt). Erstellt mit Hilfe des Programmes „ClustalW2“ (Larkin *et al.*, 2007); „*“ = identische AS in allen Sequenzen, „:“ = konservierte Substitutionen, „.“ = semi-konservierte Substitutionen; fettgedruckt: CAP-Domäne von Rbe1p; rot hervorgehoben: vorgeschlagene katalyt. Aminosäuren für die Spaltung basischer Peptide.

Aufgrund der signifikanten Homologien von Tex31p zu den Mitgliedern der Pry-Familie in *C. albicans* und der Konservierung der vorgeschlagenen katalytischen Triade aus 3 Aminosäuren in allen 5 Pry-Proteinen in *C. albicans*, wurden die beiden Proteine Rbe1p und Rbt4p auf eine mögliche Funktion als Protease hin untersucht. Zu diesem Zweck wurden beide Proteine heterolog in *S. cerevisiae* exprimiert und anschließend aufgereinigt.

Heterologe Expression von Rbe1p und Rbt4p in *S. cerevisiae*

Die Gene *RBE1* und *RBT4* wurden für die Expression in *S. cerevisiae* ohne Stop-Kodon über die Restriktionsschnittstellen *Bam*HI und *Xho*I in das Plasmid pYES2/CT (Invitrogen) ligiert. Bei der Expression und Translation in *S. cerevisiae* werden so Fusionsproteine gebildet, die an ihrem C-Terminus ein virales V5-Epitop (GKPIPnPLLGldST), sowie ein sechsfaches Histidin-Epitop zum immunologischen Nachweis bzw. für die Aufreinigung mittels Affinitätschromatographie tragen.

In *S. cerevisiae* ist die Expression der Fusionsproteine durch die Zugabe von Galaktose als Kohlenstoffquelle zum Medium induzierbar, da die Gene der betreffenden Fusionsproteine in dem für die Expression verwendeten Plasmid unter der regulatorischen Kontrolle des *GAL1*-Promotors stehen (Abb. 42).

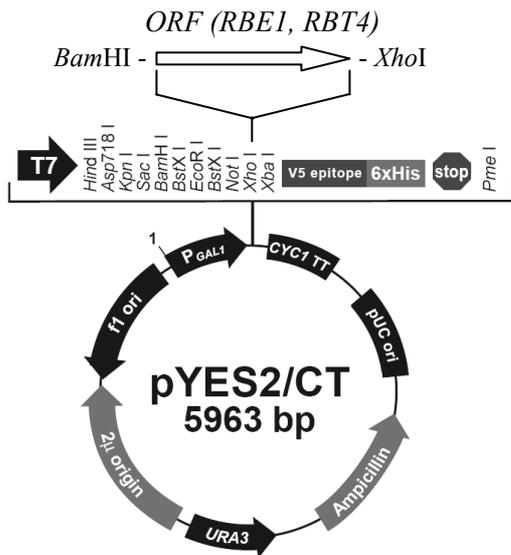


Abb. 42. Plasmide für die heterologe Expression von RBE1 und RBT4 in *S. cerevisiae*. Karte des für die Expression verwendeten Plasmids (pYES2/CT, Invitrogen); die offenen Leserahmen der beiden Gene wurden ohne Stop-Kodon über die Restriktionsschnittstellen *Bam*HI und *Xho*I in das Plasmid ligiert; dort stehen sie unter transkriptioneller Kontrolle des *GAL1*-Promotors und werden als Fusionsproteine mit einem V5-Epitop und einem 6-fachen His-Tag am C-Terminus exprimiert.

Um festzustellen, in welcher Fraktion der Induktionskulturen sich der Hauptteil der Fusionsproteine befindet, wurden zunächst die löslichen Proteine aus dem Zytosol der *S. cerevisiae*-Zellen sowie die Überstände induzierter und nicht-induzierter Kulturen immunologisch durch *Western Blot*-Analyse mit Hilfe eines Antikörpers gegen das V5-Epitop auf die Anwesenheit der Fusionsproteine hin untersucht (Abb. 43).

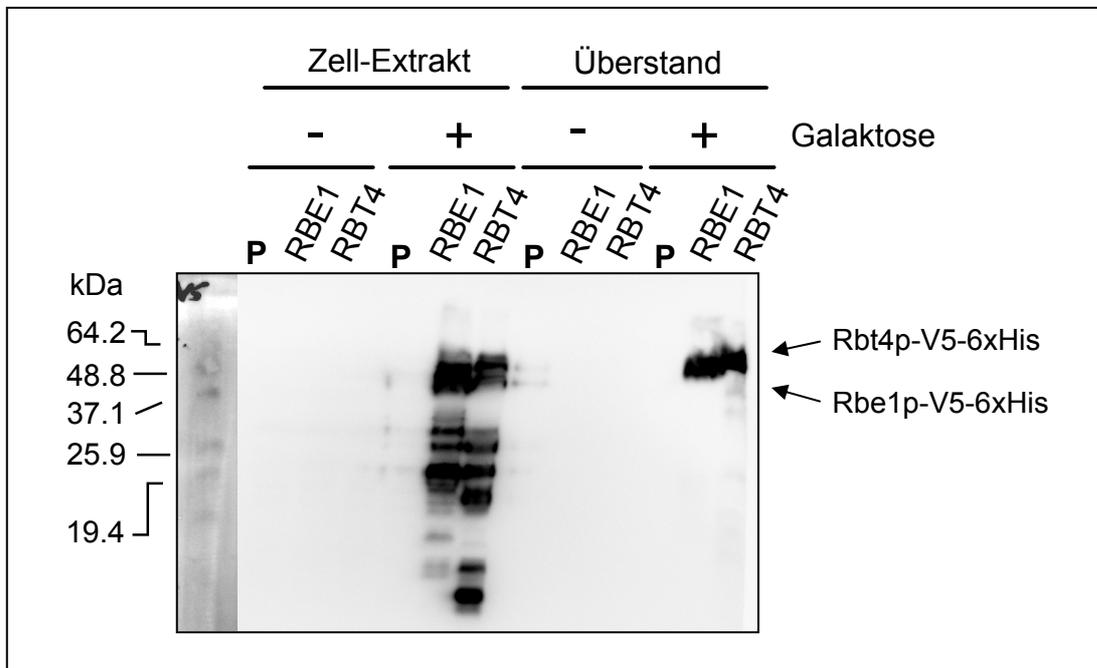


Abb. 43. Heterologe Expression von Rbe1p und Rbt4p in *S. cerevisiae*. *Western Blot*-Analyse der Induktionskulturen; Induktion: 24 Stunden SC-Medium (mit (+) bzw. ohne (-) Galaktose, ohne Uracil, 30°C); Entwicklung: V5-Antikörper; P: Kontrollstamm (pYES2/CT); „RBE1“, „RBT4“: pYES2/CT mit integriertem RBE1- bzw. RBT4-Gen

Der V5-Antikörper bindet nur an Proteine der mit Galaktose induzierten *S. cerevisiae*-Kulturen mit den *RBE1*- und *RBT4*-tragenden Plasmiden, nicht an Proteine des Kontrollstammes, welcher nur das „leere“ Plasmid trägt, noch an Proteine der nicht-induzierten Stämme. In den Proteinfraktionen der Überstände der Stämme mit den Expressionsplasmiden für rRbe1p und rRbt4p ist deutlich jeweils nur eine Bande zu erkennen. Das bedeutet, dass beide Proteine - wie in *C. albicans* (s.o.) - auch bei der Expression in *S. cerevisiae* in das Medium sekretiert werden. Dies unterstützt die Daten der massenspektrometrischen Analysen aus *C. albicans*, die ebenfalls auf eine Sekretion der beiden Proteine in den extrazellulären Bereich hinweisen (Tab. 22).

Die Bandengrößen der beiden Fusionsproteine im Gel ist mit etwa 70 kDa deutlich größer als vom Molekulargewicht der beiden Proteine zu erwarten (gereiftes Rbe1p (ohne Signalsequenz): 252 AS = 27,72 kDa, gereiftes Rbt4p: 339 AS = 37,29 kDa; Größe der beiden Epitope V5 und 6-fach His: etwa 2 kDa). In den zytosolischen Proteinfraktionen der Induktionskulturen sind zahlreiche Banden zu sehen. Diese entsprechen wahrscheinlich *steady-state* Produkten des Sekretionsweges bzw. N-terminal abgebauten Produkten.

Da beide Fusionsproteine in hinreichenden Mengen in den Überständen der induzierten Kulturen zu finden sind, wurden sie aus diesen mittels Nickel-Affinitätschromatographie aufgereinigt und gegen 50 mM Bis-Tris-Propan-Puffer dialysiert. Die Fraktionen der Chromatographie wurden mittels SDS-PAGE analysiert (Abb. 44).

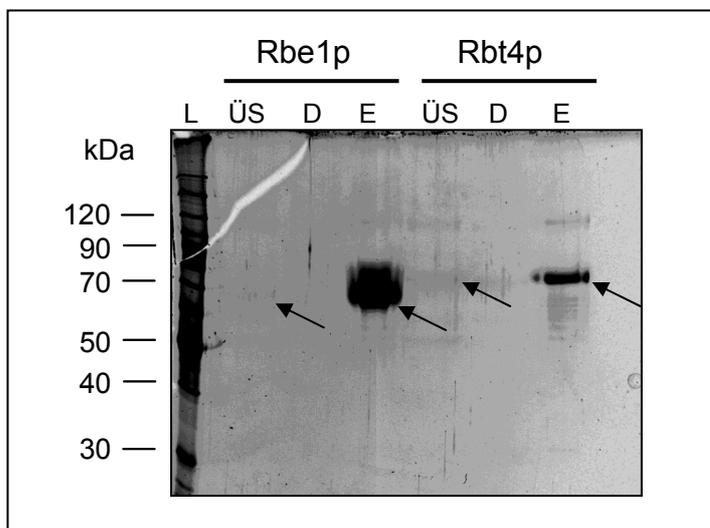


Abb. 44. Aufreinigung von rRbe1p und rRbt4p aus *S. cerevisiae*.

SDS-PAGE der Fraktionen nach Nickel-Affinitätschromatographie (Ni-NTA); SYPRO Ruby-Färbung; L: Leiter, ÜS: Überstände der Induktionskulturen (= Input), D: Durchfluss, E: Elutions-Fraktion 1

Die Fraktionen der Elution (Abb. 44, E) zeigen jeweils eine starke Anreicherung des entsprechenden rekombinanten Fusionsproteins (Konzentration: etwa 10 ng/μl; entspricht bei einer Größe von 30 kDa = 0,3 μM) gegenüber den Überständen der Induktionskulturen (ÜS), bei denen die entsprechenden Banden bereits schwach zu erkennen sind. Die Bandengrößen der aufgereinigten Proteine entsprechen mit etwa 70 kDa denjenigen des Immunnachweises (Abb. 43). Die Bande von rRbe1p ist etwas diffus, was auf einen höheren Glykosylierungsgrad hinweisen kann und läuft bei einem etwas geringeren Molekulargewicht als diejenige von rRbt4p.

Die auf diese Weise aufgereinigten Proteine wurden in Protease-Assays auf eine mögliche Protease-Funktion hin untersucht.

Protease-Assays

Die heterolog in *S. cerevisiae* exprimierten und aufgereinigten Proteine rRbe1p und rRbt4p wurden mit Hilfe eines Peptid-Arrays auf Protease-Aktivität hin untersucht. Dieser umfasst 360 Oligopeptide von 8 Aminosäuren Länge (75 pmol/well), die 2520 Protease-Spaltsequenzen repräsentieren (Protease Substrate Set, JPT Peptide Technologies, Berlin). Die Oligopeptide tragen endständig ein Fluorophor (EDANS = 5-[(2-Aminoethyl)amino]naphthalen-1 Sulfonsäure) und einen nicht-fluoreszierenden Quencher (Dabcyl = 4-[4-Dimethylamino-phenylazo-]benzoesäure). Fluoreszenz ist nur im Falle der proteolytischen Spaltung zu messen, da das Emissionsspektrum des Fluorophors EDANS (Emission: 490 nm) mit dem Absorptionsspektrum des Quenchers Dabcyl (Absorption: $\lambda_{\max}=472$ nm) stark überlappt. So wird die von EDANS emittierte Fluoreszenz bei großer räumlicher Nähe von Dabcyl absorbiert.

Für die Messung einer möglichen proteolytischen Aktivität von rRbe1p und rRbt4p wurden die Peptide des Peptid-Arrays auf zwei 384 well-Mikrotiterplatten verteilt und Fluoreszenz bei einer Wellenlänge von 465 nm vor und nach Zugabe der rekombinanten Proteine rRbe1p und rRbt4p in einem Fluoreszenzplatten-Leser (TECAN SpectraFluor Plus) nach Inkubation bei 37°C über einen Zeitraum von 18 Stunden zu mehreren Zeitpunkten gemessen. Da Tex31p als Calcium-abhängige Protease beschrieben wurde, wurden bei den Ansätzen die in der Literatur beschriebenen Reaktionsbedingungen verwendet (100 mM Bis-Tris-Propan-Puffer, 1 mM CaCl₂). Relative Fluoreszenzwerte für die einzelnen Spaltansätze wurden anhand der Differenz der Werte nach und vor Zugabe der Proteine gebildet und graphisch dargestellt (Abb. 45 für eine Inkubation von 2,5 Stunden).

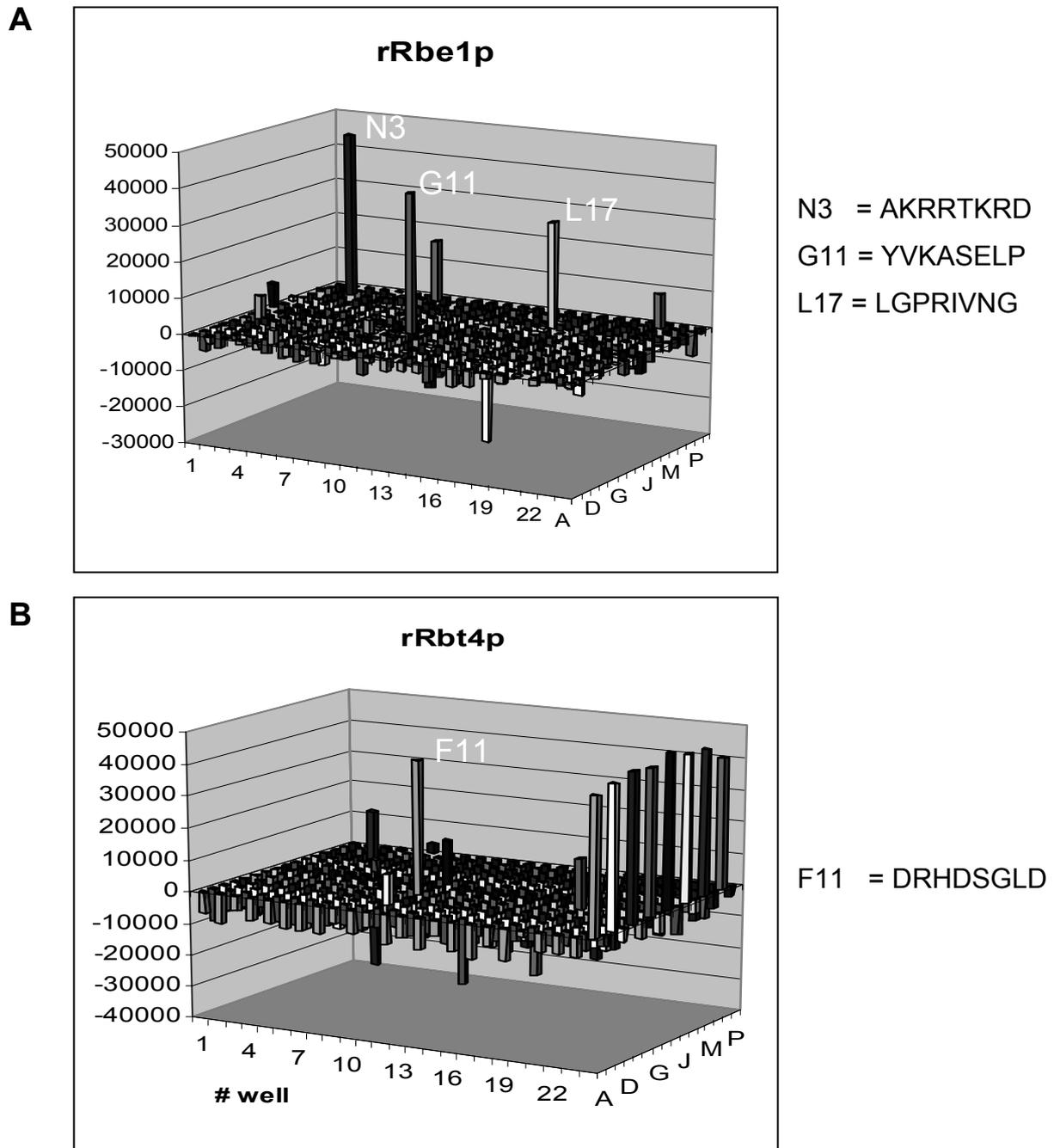


Abb. 45. Protease-Assays für rRbe1p (A) und rRbt4p (B). Relative Fluoreszenzwerte (y-Achse) in den einzelnen Gefäßen der 384 *well*-Mikrotiterplatten (24 x 16) nach Zufügen der rekombinanten Proteine und Inkubation für 2,5 Stunden bei 37°C; N3, G11, L17, F11: Koordinaten der *wells* mit der höchsten relativen Fluoreszenz und die entsprechenden Sequenzen der darin enthaltenen Oligopeptide.

Nach Inkubation der rekombinanten Proteine mit der Peptid-Bibliothek sind zu allen gemessenen Zeitpunkten signifikante Fluoreszenzwerte für beide rekombinanten Proteine in einzelnen Spaltansätzen der Mikrotiterplatte zu detektieren (stärkste relative Fluoreszenzwerte rRbe1p: N3, G11, L17; Rrbt4p: F11). Dies würde man für sequenzspezifische Proteasen erwarten, da diese hochselektiv nur wenige Sequenzen erkennen und prozessieren. Ein dibasisches Aminosäuremotiv, welches typisch für die Spaltstelle von Pro-Hormonen wie auch

der Vorstufen der Conotoxine ist, findet sich bei Peptid N3 in Form der Aminosäuren Lysin-Arginin (KR). Dies zeigt auch die stärkste relative Fluoreszenz nach Zugabe rekombinanten Rbe1p. Bei den übrigen Peptiden findet sich jeweils nur eine basische Aminosäure (Lysin (K) bzw. Arginin (R)) und diese sind in ihrer Gesamtzusammensetzung nur schwach basisch bzw. neutral. Die regelmäßig auftretenden Fluoreszenzwerte in Reihe 24 der Mikrotiterplatte bei Zugabe von rRbt4p (Abb. 45B, Reihe 24) sind möglicherweise auf eine Protease-Kontamination der verwendeten Pipettenspitzen zurückzuführen.

Spaltungsversuche

Drei der Peptide, bei denen sich die stärksten Fluoreszenzwerte nach Inkubation mit rRbe1p zeigten (N3, G11 und L17) und eines aus dem Ansatz mit rRbt4p (F11) wurden ohne Modifikationen *de novo* synthetisiert (Thermo Fisher Scientific, Ulm) und in unabhängigen Experimenten für Spaltungsversuche verwendet. Ziel dieser Versuche war es, die Ergebnisse der Peptid-Arrays zu bestätigen. Dafür wurden verschiedene Mengen der Peptide mit verschiedenen Mengen der rekombinanten Proteine in 100 mM BisTrisPropan-Puffer/1 mM CaCl₂ inkubiert. Unter diesen Bedingungen waren auch die Protease-Assays mit Hilfe des Peptid-Arrays (s.o.) durchgeführt worden. Die dabei entstandenen Spaltprodukte sollten mit verschiedenen Methoden nachgewiesen werden

Zunächst wurde die Spaltansätze direkt massenspektrometrisch analysiert (*Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Tandem Time-of-Flight Mass Spectrometry* (MALDI-TOF/TOFMS); Ultraflex II TOF/TOF, Bruker Daltonics). In den Spaltansätzen ließen sich auf diese Weise jedoch keine Spaltprodukte nachweisen (Daten nicht gezeigt).

Um die Reinheit der Spaltprodukte zu erhöhen, wurden bis zu 1 µmol Peptid mit 15 nmol rekombinantem Rbe1p bzw. Rbt4p bei 37°C über Nacht inkubiert und anschließend mittels *reversed phase* HPLC fraktioniert. Fraktionen, die eine deutliche Absorption im UV-Spektrogramm zeigten, wurden anschließend wiederum massenspektrometrisch untersucht. Auch hier ließen sich keine spezifischen Spaltprodukte in den verschiedenen Ansätzen nachweisen (Daten nicht gezeigt).

Insgesamt zeigen die Protease-Experimente kein konsistentes Bild. Zusammenfassend deuten daher die hier durchgeführten Untersuchungen nicht eindeutig auf eine molekulare Funktion der beiden Pry-Proteine Rbe1p und Rbt4p als Proteasen hin.

4.3 Deletion von *RBE1* und *RBT4* in *C. albicans*

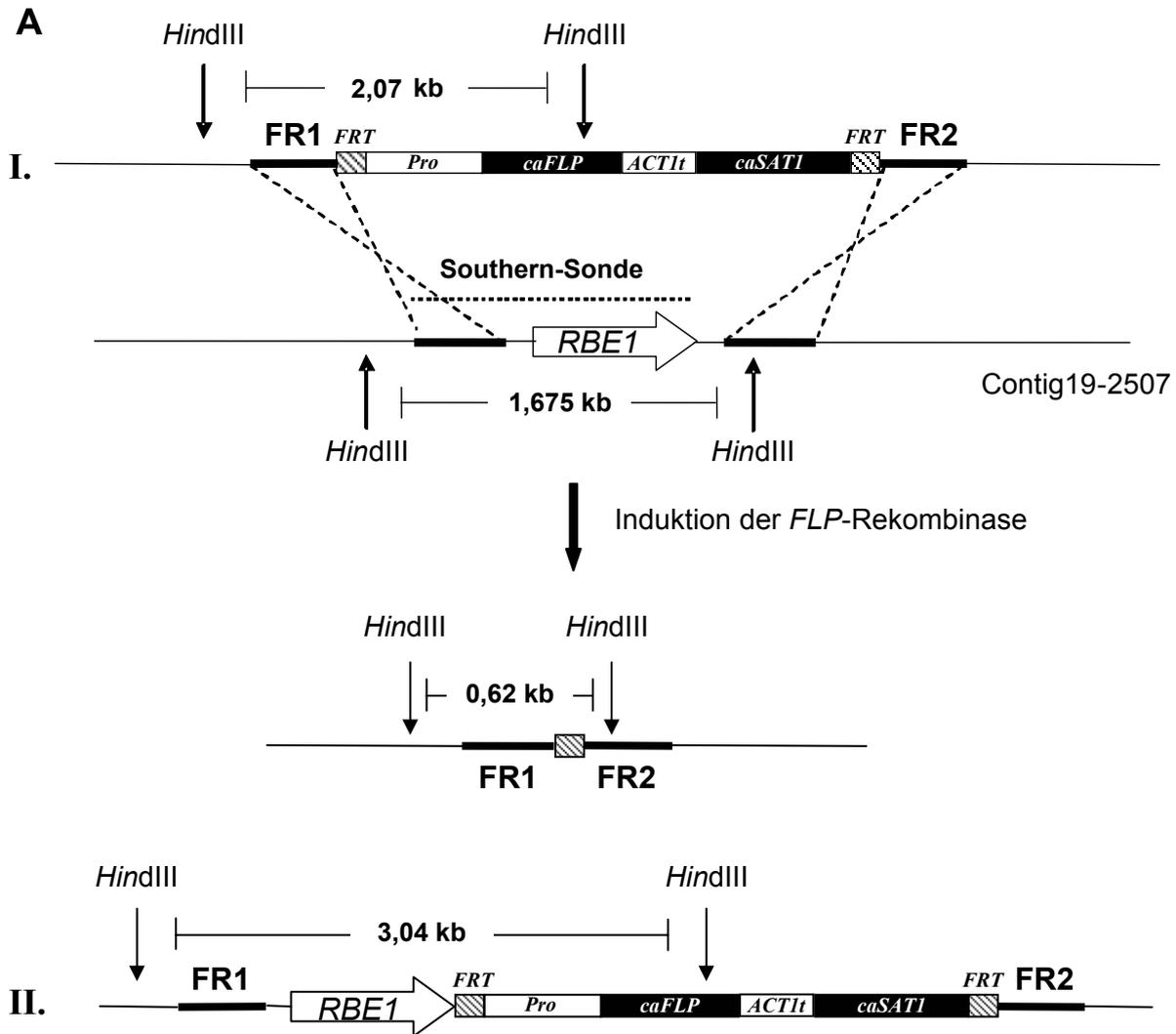
Rbt4p ist als ein kritischer Faktor für die Fähigkeit zur Invasion und für die Virulenz von *C. albicans* in dem *ura3*-auxotrophen Stamm CAI4 beschrieben worden (Braun *et al.*, 2000). Durch das Fehlen des Gens *URA3* (Orotidin-5'-Phosphatdecarboxylase) ist dieser Stamm auxotroph für die Biosynthese von Pyrimidin. Da das Expressionsniveau eines ektopisch eingefügten *URA3*-Gens vom Ort der Integration in das Genom abhängig ist (Brand *et al.*, 2004; Lay *et al.*, 1998) und Uridin-auxotrophe *C. albicans*-Stämme avirulent sind (Cole *et al.*, 1995; Kirsch and Whitney, 1991), kann der Integrationsort Auswirkungen auf die Virulenzeigenschaften von *C. albicans* haben (Cheng *et al.*, 2003). Bei Verwendung des *URA3*-Gens als Markergen bei der Konstruktion von Deletionsstämmen für ein zu untersuchendes Gen (Fonzi and Irwin, 1993) kann es daher schwierig sein, die Rolle dieses Genes bezüglich seiner Beteiligung an der Virulenz zu beurteilen (Staab and Sundstrom, 2003). Ferner können durch Positionseffekte vom Wildtyp abweichende Phänotypen entstehen, die nicht mit der Deletion des zu untersuchenden Gens zusammen hängen, wenn das *URA3*-Markergen in den homozygoten Deletionsstämmen an einem anderen Genomort oder auf eine andere Art integriert wird, als in den entsprechenden komplementierten Stämmen (Sundstrom *et al.*, 2002).

Für die Beurteilung der biologischen Funktion eines bestimmten Genproduktes in Deletionsstudien ist die Reversion des beobachteten Phänotyps durch eine erneute Integration des betreffenden Gens in die entsprechenden Deletionsstämmen von entscheidender Bedeutung. Eine Wiederherstellung des Wildtyp-Phänotyps spricht dabei für eine Beteiligung des betreffenden Genproduktes an dem beobachteten biologischen Prozess. Dies war jedoch im Falle der Deletion von *RBT4* in der Studie von Braun *et al.* nicht möglich. Entsprechende Reversionsstämmen zeigten gegenüber dem verwendeten Kontrollstamm keine erhöhte Invasionsfähigkeit bzw. Virulenz im systemischen Mausmodell sondern verhielten sich analog zum Deletionsstamm (Braun *et al.*, 2000).

In diesem Zusammenhang war die tatsächliche Beteiligung der Pry-Proteine Rbe1p und Rbt4p an der Fähigkeit von *C. albicans* zur Invasion in das Wirtsgewebe sowie an den allgemeinen Virulenzeigenschaften von *C. albicans* im Wildtypstamm (SC5314) von besonderem Interesse. Um Positionseffekte der Integration des *URA3*-Markergens zu vermeiden, wurde ein dominanter Selektionsmarker für die Konstruktion der entsprechenden $\Delta rbt4$ - bzw. $\Delta rbe1$ -Einzel-, und der $\Delta rbt4/\Delta rbe1$ -Doppel-Deletionsstämmen sowie der Reversionsstämmen im *C. albicans*-Wildtypstamm SC5314 verwendet. Dabei handelt es sich um das für *C. albicans* optimierte Gen für die Streptothricin-Acetyl-Transferase (*caSAT1*) aus *Streptomyces noursei*, welches den transformierten Stämmen eine Resistenz gegen das Antibiotikum Nourseothricin verleiht (Heim *et al.*, 1989; Joshi *et al.*, 1995; Reuss *et al.*, 2004).

Konstruktion der Einzel-Deletions- und Reversionsstämme für RBE1 und RBT4

Für die Deletion der beiden Gene *RBE1* und *RBT4* wurden flankierende Regionen beider Gene mittels PCR amplifiziert und an eine Kasette mit dem *SAT1*-Markergen aus den Plasmiden pSFS1 bzw. pSFS2 ligiert (Reuss *et al.*, 2004) (s. Anhang). Die so erhaltenen Deletionskassetten wurden aus den jeweiligen Plasmiden ausgeschnitten und in zwei aufeinander folgenden Deletionsrunden für die Deletion jeweils beider Allele von *RBE1* und *RBT4* aus dem Genom von *C. albicans* mittels homologer Rekombination verwendet. Durch Induktion der in den Deletionskassetten enthaltenen ortsspezifischen *FLP*-Rekombinase wurden die Deletionskassetten nach erfolgter Integration jeweils wieder aus dem Genom entfernt (s. Methoden). So konstruierte Stämme wurden mit Hilfe von PCR und *Southern Blot*-Analyse auf ihren Genomstatus hin untersucht. Es wurden jeweils drei voneinander unabhängige Deletions- und die entsprechenden Reversions-Stämme hergestellt. Für die Konstruktion der Reversionsstämme wurde das betreffende Gen – ebenfalls unter Verwendung der Deletionskassetten - an seinem ursprünglichen Genort in das Genom der Deletionsstämme re-integriert. Im Falle von *RBE1* fehlen dabei 118 bp unterhalb des Stop-Kodons, da die für die Integration der Deletionskassette verwendete flankierende Region am 3'-Ende des *RBE1*-Gens (FR2) erst dort beginnt und dieser Bereich somit bei der Deletion entfernt wurde. Zur Überprüfung der generierten Stämme mittels *Southern Blot*-Analyse erfolgte das Schneiden der genomischen DNA mit den Restriktionsenzymen *HindIII* (Deletion von *RBE1*) bzw. *ClaI* (Deletion von *RBT4*). Als Sonde für die Detektion der dabei entstandenen Genomfragmente wurde der jeweilige offene Leserahmen inklusive der flankierenden Region 1 (FR1) von *RBE1* bzw. der flankierenden Region 2 (FR2) von *RBT4* verwendet (Abb. 46 und 47; Ergebnisse der *Southern Blot*-Analysen exemplarisch gezeigt für jeweils einen Stamm).



B

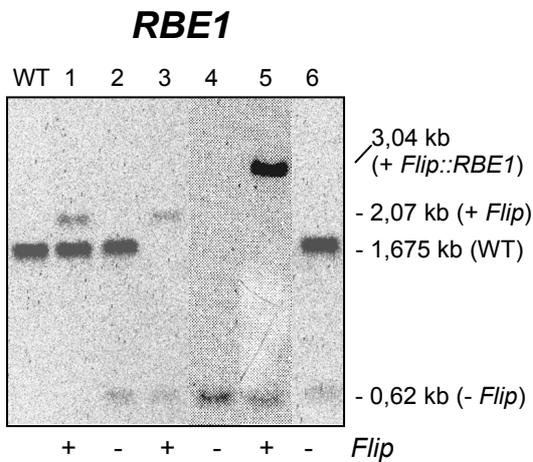
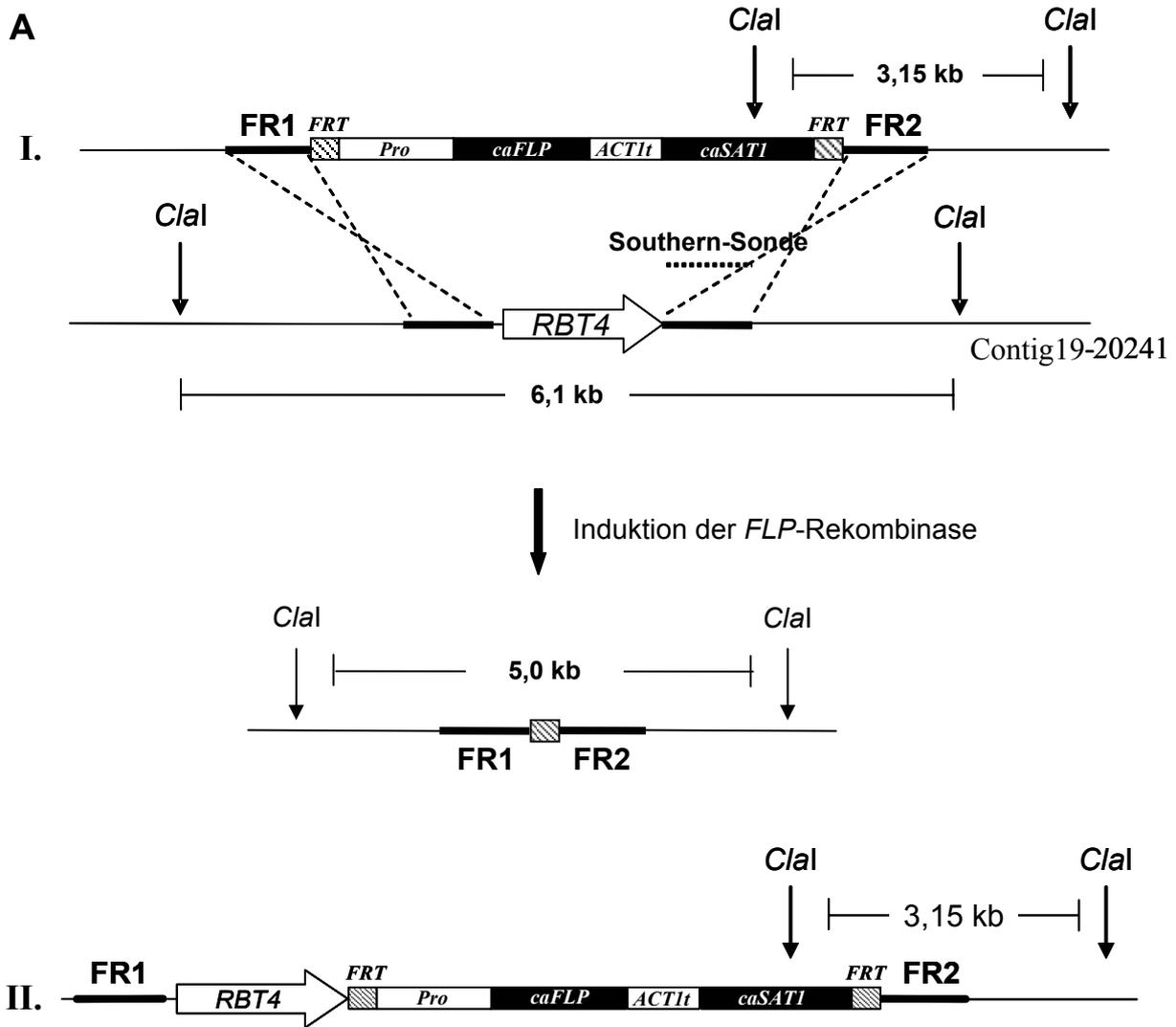


Abb. 46. Deletion und Reversion von *RBE1* in *C. albicans* Wildtyp (SC5314). **A. I.** Schema der Integration und der anschließenden Exzision der Deletionskassette aus Plasmid pSFS1/2 (Reuss *et al.*, 2004) mit den im Restriktionsansatz entstehenden DNA-Fragmenten. **II.** Schema der *RBE1*-Reversion. FR1/2: flankierende Region 1/2; *FRT*: Erkennungssequenz der *FLP*-Rekombinase (34 bp); *Pro*: *SAP2*- (pSFS1) bzw. *MAL2*- (pSFS2)-Promotor; *caFLP*: *FLP*-Rekombinase; *ACT1t*: Terminator des *ACT1*-Genes; *caSAT1*: dominantes Markergen für Nourseothricin-Resistenz (Streptothricin-Acetyl-Transferase).

B. *Southern Blot*-Analyse der *RBE1*-Deletion und -Reversion. Heterozygote (1, 2) bzw. homozygote (3, 4) Deletionsstämme mit integriertem (+ *Flip*) bzw. entferntem (- *Flip*) Deletionskonstrukt; 5, 6: Reversionsstämme mit (+ *Flip::RBE1*) bzw. ohne (- *Flip*) Reversionskonstrukt; Sonde: flankierende Region 1 (FR1) inkl. offener Leserahmen von *RBE1*; WT = Wildtyp; Fragmentierung der genomischen DNA: *HindIII*



B

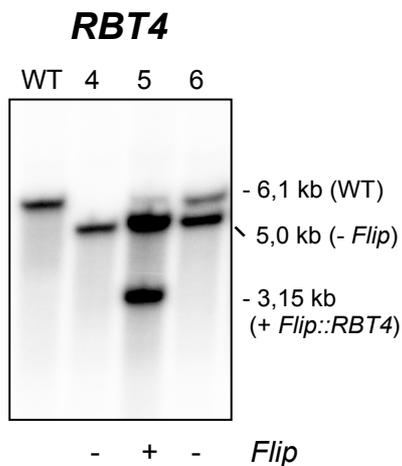


Abb. 47. Deletion und Reversion von *RBT4* in *C. albicans* Wildtyp (SC5314). **A. I.** Schema der Integration und der anschließenden Exzision der Deletionskassette aus Plasmid pSFS1/2 (Reuss *et al.*, 2004) mit den im Restriktionsansatz entstehenden DNA-Fragmenten. **II.** Bei der Reversion von *RBT4* entsteht dasselbe 3,15 kb-Fragment wie im Falle der Deletion. FR1/2: flankierende Region 1/2; *FRT*: Erkennungssequenz der *FLP*-Rekombinase (34 bp); *Pro*: *SAP2*- (pSFS1) bzw. *MAL2*- (pSFS2)-Promotor; *caFLP*: *FLP*-Rekombinase; *ACT1t*: Terminator des *ACT1*-Genes; *caSAT1*: dominantes Markergen für Nourseothricin-Resistenz (Streptothricin-Acetyl-Transferase).

B. *Southern Blot*-Analyse der *RBT4*-Deletion und -Reversion. 4: homozygoter Deletionsstamm mit entferntem Deletionskonstrukt (- *Flip*), 5, 6: Reversionsstämme mit (+ *Flip::RBT4*) bzw. ohne (- *Flip*) Reversionskonstrukt; Sonde: flankierende Region 2 (FR2); WT = Wildtyp; Fragmentierung der genomischen DNA: *Clal*

Die Stämme zeigen die durch die Integration und das Entfernen der Deletions- sowie Reversionskassetten erwarteten Bandenmuster und wurden daher für die phänotypische Charakterisierung verwendet.

Konstruktion der Doppel-Deletions- und Reversionsstämme für RBE1 und RBT4

Jeweils zwei unabhängig hergestellte Deletions- und Reversionsstämme für *RBT4* wurden für die Herstellung der $\Delta rbe1/\Delta rbt4$ Doppel-Deletions- bzw. Reversionsstämme durch die zusätzliche Deletion des *RBE1*-Genes in diesen Stämmen verwendet. Die Deletion des *RBE1*-Gens erfolgte analog zur Konstruktion der Einzel-Deletionsstämme. In die Doppel-Deletionsstämme mit bereits re-integriertem *RBT4* wurde für die Konstruktion der Doppel-Reversionsstämme zusätzlich das *RBE1*-Gen re-integriert. Die konstruierten Stämme wurden ebenfalls mittels *Southern Blot*-Analyse auf ihren Genomstatus hin untersucht. Als Sonde wurde der offene Leserahmen von *RBE1* inklusive seiner flankierenden Region verwendet (Abb. 48).

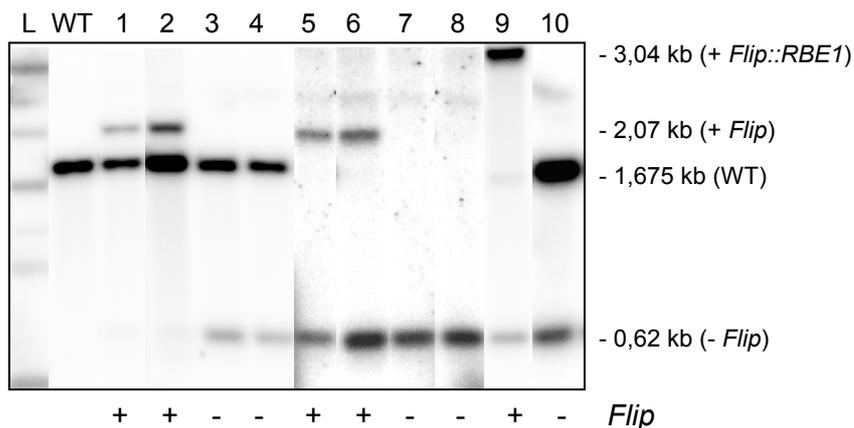


Abb. 48. Southern Blot-Analyse der Doppel-Deletionsstämme sowie -Reversionsstämme für *RBE1* und *RBT4* in *C. albicans* (Wildtyp; SC5314); 1, 3, 5, 7: *RBE1*-Deletion im $\Delta rbt4$ -Deletionsstamm; 2, 4, 6, 8: *RBE1*-Deletion im $\Delta rbt4$ -Deletionsstamm mit re-integriertem *RBT4*-Gen; 1, 2 & 3, 4: heterozygote Deletionsstämme mit (+ *Flip*) & ohne (- *Flip*) Deletionskonstrukt, 5, 6 & 7, 8: homozygote Deletionsstämme mit (+ *Flip*) & ohne (- *Flip*) Deletionskonstrukt, 9, 10: Doppel-Reversionsstämme mit (+ *Flip::RBE1*) bzw. ohne (- *Flip*) Reversionskonstrukt; Sonde: flankierende Region 1 (FR1) inkl. offener Leserahmen von *RBE1*; WT = Wildtyp; Enzym für das Fragmentieren der genomischen DNA: *HindIII*

Alle in anschließenden Versuchen verwendeten Deletions- und Reversionsstämme (Einzel-, sowie Doppel-Deletionsstämme) wurden zusätzlich auf transkriptioneller Ebene auf die korrekte Expression der entsprechenden Gene durch RT-PCR überprüft (Daten nicht gezeigt).

4.4 Phänotypische Charakterisierung der *RBE1*- und *RBT4*-Deletionsstämme

Wachstumsbedingungen

Zunächst wurde die allgemeine *Fitness* der Deletions- und Reversionsstämme durch den Vergleich ihrer Wachstumsraten in Flüssigmedium (YPD, 30°C) mit derjenigen des Wildtypstammes über einen Zeitraum von ca. 14 Stunden überprüft. Dabei zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Wachstumsgeschwindigkeit der einzelnen Stämme (Daten nicht gezeigt). Dies bedeutet, sie zeigten durch die genetischen Veränderungen keine Effekte bei Wachstum in Vollmedium, was die Beurteilung von Phänotypen zusätzlich erschweren würde.

Die Deletionsstämme sowie ein Überexpressionsstamm für *RBE1* wurden auf unterschiedlichsten Medien auf abweichendes Verhalten zum Wildtypstamm SC5314 hin untersucht (Tab. 5). Die getesteten Bedingungen umfassten dabei Induktionsmedien der Morphogenese (Spider-, Lee-, α -MEM-, M199-, fötales Kälberserum-Medium), Kohlenstoff-Metabolismus (Angebot verschiedener C-Quellen (Succinat, Maltose, Galaktose, Laktose, Ethanol), Stickstoff-Metabolismus (hochmolekulare N_2 -Quelle: YCB-BSA-Medium; niedermolekulare N_2 -Quelle: YNB-Medium; N_2 -Mangel: SLAD-Medium), verschiedene Arten von Stress (oxidativ (H_2O_2), reduktiv (DTT, Diamid, Paraquat), Hitze (42°C), Zellwandaufbau (Koffein; interkalierende Substanzen: Calcoflour White für Chitin, Kongorot für Glukan)), Einfluss unterschiedlicher pH-Werte auf das Wachstum (pH 4,0 und pH 10,0), Hypoxie (Einbetten in Agar), Antimykotika-Sensitivität (Fluconazol, Amphotericin B, Caspofungin), Einfluss von Schwermetallen (Kupfer, Cadmium), Adhäsion an und Invasion in Agar (Waschtests), Zell-Zell-Adhäsion (Wachstum auf YPD-Medium mit 0,3% Agar). Die Untersuchungen wurden dabei sowohl in Flüssig- als auch auf festem Medium durchgeführt. Auf festem Medium wurden Verdünnungsreihen der jeweiligen Stämme ausplattiert und diese bei 30°C und 37°C für mehrere Tage inkubiert (Abb. 49, exemplarisch gezeigt für die $\Delta rbe1$ -Deletions- und Reversionsstämme).

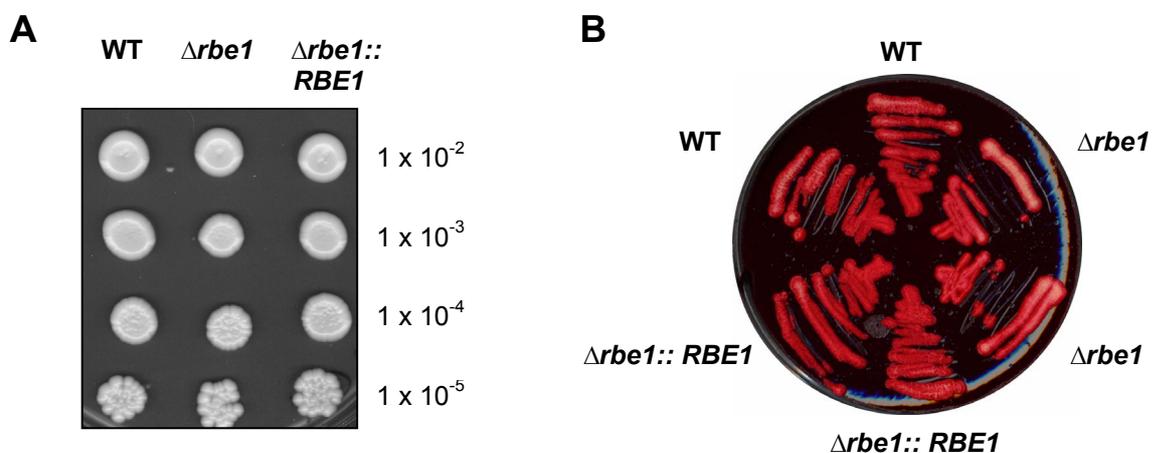


Abb. 49. Phänotypische Untersuchungen der Deletions- und Reversionsstämme für *RBE1* und *RBT4*; exemplarisch gezeigt für die die $\Delta rbe1$ -Deletions- und Reversionsstämme **A.** Verdünnungsreihen auf Festmedium (hier: YPD-Medium); **B.** Beispiel für Wachstum unter Stressbedingungen (Kongorot-Agar); WT: Wildtypstamm SC5314; $\Delta rbe1$: Deletionsstamm für *RBE1*; $\Delta rbe1::RBE1$: Reversionsstamm für *RBE1*

Weder die $\Delta rbe1$ -/ $\Delta rbt4$ -Einzel- noch die Doppel-Deletionsstämme zeigten unter den getesteten Bedingungen einen vom Wildtypstamm SC5314 abweichenden Phänotyp. Auch die *RBE1*-Deletion im *efg1*-defizienten Stamm HLC52, in welchem die Expression von *RBE1* stark erhöht ist (Abb. 19), zeigt keinen Effekt auf das phänotypische Erscheinungsbild im Vergleich zum entsprechenden Wildtypstamm (CAI4). Dasselbe gilt auch für die Überexpression von *RBE1* im *ura3*-defizienten, zum Wildtyp isogenen Stamm CAI4 (Daten nicht gezeigt).

Dies bedeutet, dass die beiden Proteine Rbe1p und Rbt4p an den hier getesteten morphogenetischen und metabolischen Prozessen nicht maßgeblich beteiligt sind.

Adhäsion in vitro

Adhäsion an verschiedene Epithelien und Oberflächen ist eine kritische Voraussetzung für die spätere Invasion in das Wirtsgewebe und damit für die Virulenz von *Candida albicans* und stellt die erste Phase der Wirt-Erreger-Interaktion dar. Es wurde bereits beschrieben, dass Rbt4p in einem *ura3*-auxotrophen Stamm kritisch für die Infektion und Invasion von Wirtsgewebe durch *C. albicans* in einem Kornea-Infektionsmodell in Kaninchen *in vivo* ist (Braun *et al.*, 2000). Daher wurde zunächst die Adhäsionsfähigkeit der hier im Wildtyp-Hintergrund hergestellten Einzel- sowie Doppel-Deletionsstämme für die Gene *RBE1* und *RBT4* in quantitativen Tests unter Verwendung eines *in vitro*-Modells für die Adhäsion von *C. albicans* an humane Epithelien getestet (Sohn and Rupp, 2009; Sohn *et al.*, 2006).

Konfluent wachsende, humane Epithelzellen einer kolorektalen Karzinomzelllinie (Caco-2) sowie einer epidermoiden vulvo-vaginalen Zelllinie (A431) bzw. reine Polystyroloberflächen wurden in 24-Well-Platten mit etwa 3×10^2 Zellen einer exponentiell wachsenden *C. albicans*-Kultur infiziert und bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Das Infektionsverhältnis beträgt dabei etwa eine *C. albicans*-Zelle auf 100 Humanzellen (*multiplicity of infection (MOI)* = 0,01). Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden nicht-adhärenente *C. albicans*-Zellen im Überstand der Kultur sowie die auf den Epithelzellen bzw. der Plastikoberfläche adhärierenden *C. albicans*-Zellen auf Festmedium ausplattiert und nach 24 h Wachstum bei 30°C gezählt. So lässt sich das Verhältnis nicht-adhärenenter zu adhärenenter Zellen auf den verschiedenen Oberflächen bestimmen. Die Daten setzen sich aus den Werten von zwei unabhängigen Experimenten mit jeweils 2 biologischen Replikaten je Zeitpunkt zusammen (Abb. 50).

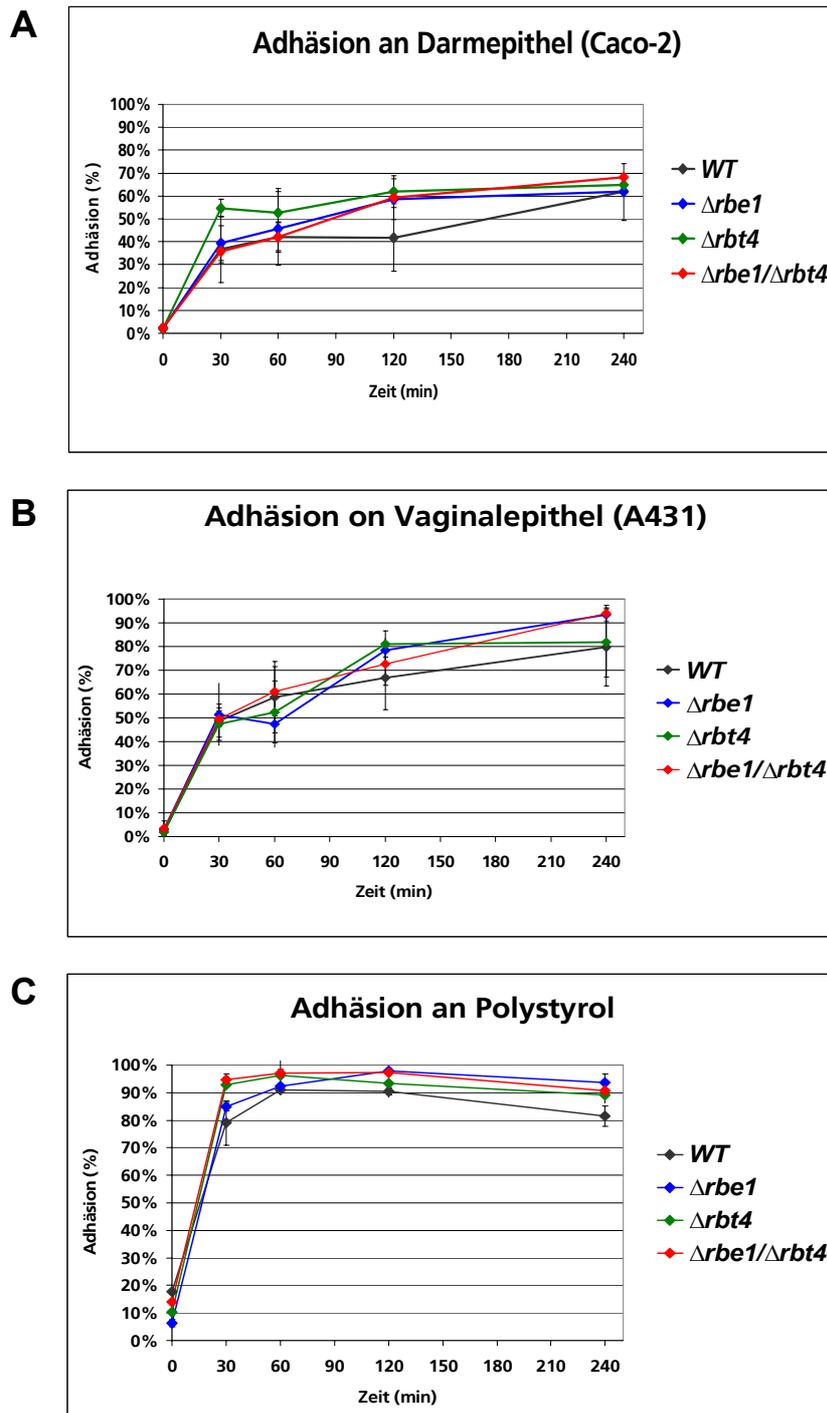


Abb. 50. Adhäsionsverhalten der Einzel- und Doppel-Deletionsstämme für *RBE1* und *RBT4* auf verschiedenen Oberflächen. **A.** Darmepithel (humane Caco-2-Zellen); **B.** Vaginalepithel (humane A431-Zellen); **C.** Polystyrol-Oberfläche; *WT* = Wildtypstamm SC5314; $\Delta rbe1$: Deletionsstamm für *RBE1*; $\Delta rbt4$: Deletionsstamm für *RBT4*; $\Delta rbe1/\Delta rbt4$: Doppel-Deletionsstamm für *RBE1* und *RBT4*; Fehlerbalken: Standardabweichung für 4 Werte aus 2 unabhängigen Experimenten mit je 2 biologischen Replikaten.

Die Experimente zeigen, dass der Großteil der adhärenen Zellen bereits nach 30 Minuten auf den verschiedenen Oberflächen adhärert. Nur im Falle des Vaginalepithels steigt die Zahl der adhärenen Zellen über den Versuchszeitraum von etwa 50% adhärenen Zellen nach 30 Minuten auf bis zu 80% bis 90% adhärenen Zellen nach 240 Minuten Inkubation an. Weiter ist auffallend, dass *C. albicans* unterschiedlich stark an die verschiedenen Oberflächen adhärert. So sind auf der Polystyrol-Oberfläche bereits nach 30 min mind. 80% aller Zellen adhärert,

wobei auf dem Darmepithel auch nach 2 Stunden nur max. 60% der *C. albicans*-Zellen adhäreren. Dies wurde so auch in der Literatur beschrieben (Sohn *et al.*, 2006).

Die Deletionsstämme für *RBE1* und *RBT4* sowie der Doppel-Deletionsstamm zeigen in diesen Experimenten keine signifikanten Unterschiede zum Wildtypstamm im Adhäsionsverhalten auf den verschiedenen Oberflächen. Dies zeigt, dass die Pry-Proteine Rbe1p und Rbt4p im Wildtypstamm keine bedeutende Rolle bei der Adhäsion von *C. albicans* unter den getesteten Bedingungen spielen.

Dies steht allerdings im Gegensatz zu den publizierten Beobachtungen der *RBT4*-Deletion im *ura3*-defizienten Stamm CA14. Dieser Stamm zeigte eine stark verminderte Infektion von Korneagewebe sowie eine stark eingeschränkte Invasion des Gewebes durch Hyphen. Dies führte zu dem Schluss, dass *RBT4* neben der Invasion von Wirtsgewebe auch direkt oder indirekt an der Adhäsion von *C. albicans* an dieses beteiligt sein sollte (Braun *et al.*, 2000).

Invasion in vitro

In der späten Phase der Wirt-Erreger-Interaktion wächst *C. albicans* invasiv in das besiedelte Gewebe des Wirtes ein, wodurch der Pilz entweder durch die Darmwand in die Blutbahn gelangt oder in Organe einwächst. Da Rbt4p als kritisch für die Invasion von *C. albicans* in Wirtsgewebe beschrieben wurde, wurde die Invasionsfähigkeit der $\Delta rbe1$ - und $\Delta rbt4$ -Deletionsstämme eines rekonstituierten humanen Darmepithels (*reconstituted human intestinal epithelium*, RHIE) *in vitro* untersucht (Dieterich *et al.*, 2002; Hernandez and Rupp, 2009). Dafür wurden humane Darmepithelzellen (Caco-2-Zellen) als einzellige Schicht konfluent auf einer Kollagenmatrix angezogen und mit etwa 3×10^3 Zellen einer exponentiell wachsenden *C. albicans*-Kultur infiziert. Nach 8 bzw. 24 Stunden wurden histologische Präparate der verschiedenen Experimente angefertigt. Diese wurden durch Perjodsäure-Schiff-Reaktion-(PAS)-Färbung nach McManus und Papanicolaou angefärbt (Romeis *et al.*, 1989) und unter dem Lichtmikroskop untersucht. PAS-positive Substanzen - in diesem Fall die Polysaccharidkomponenten der Zellwand von *C. albicans* - erscheinen dabei rosa bis violett. Durch eine Gegenfärbung mit Polychromlösung (Eosin-Azur 50) nach Papanicolaou werden die Kerne der Epithelzellen dunkelblau und die Kollagenmatrix hellblau gefärbt, was zu einer Verbesserung der Kontrastierung führt (Abb. 51).

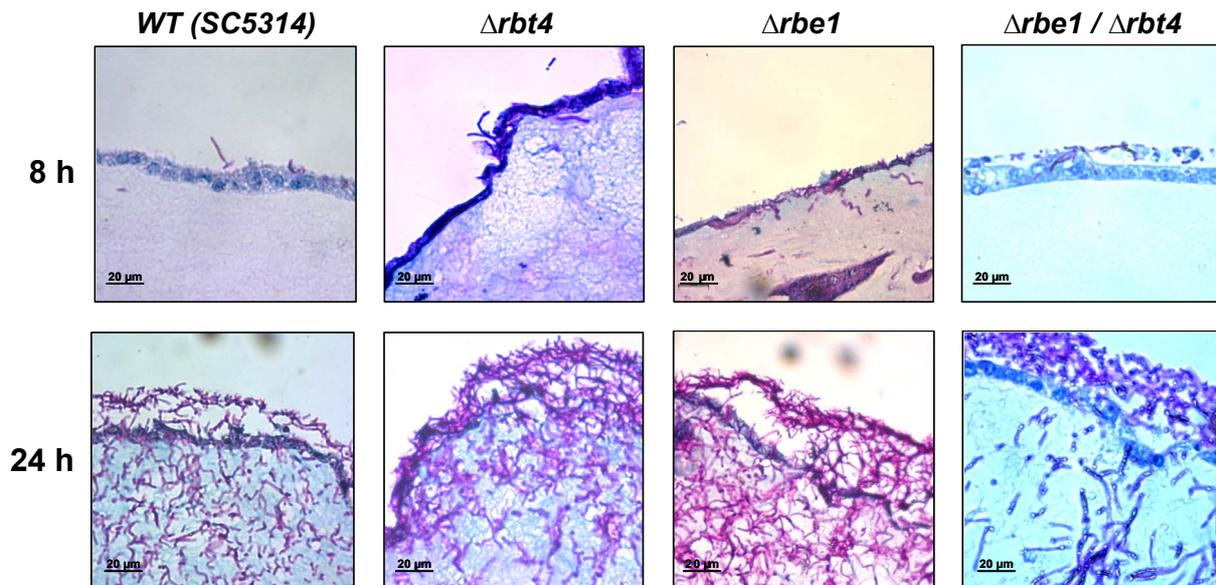


Abb. 51. Invasionsverhalten der Einzel- und Doppel-Deletionsstämmen für *RBE1* und *RBT4* auf einem rekonstituierten humanen Darmepithel (RHIE; Caco-2-Zellen). Lichtmikroskopie nach 8 Stunden und 24 Stunden. *C. albicans*-Zellen erscheinen pink, Epithelzellen dunkelblau und die Kollagenmatrix hellblau. Maßstabsbalken: 20 μm

Bereits 8 Stunden nach der Infektion zeigen alle verwendeten Stämme die beginnende Ausbildung von hyphalem Zellwachstum sowie teilweise bereits Invasion in das Epithelmodell. Nach 24 Stunden sind alle Stämme vollständig in das Modell eingewachsen, wobei die Darmepithelzellen sowie die Kollagenmatrix teilweise stark zerstört sind. Vergleichbar mit den *in vitro* Adhäsionstests sind hier ebenfalls keine signifikanten Unterschiede im Verhalten der Deletionsstämmen für *RBE1* und *RBT4* im Vergleich zum Wildtypstamm SC5314 zu erkennen. Alle verwendeten Stämme zeigen eine vergleichbare Fähigkeit zu invasivem Wachstum. Dies steht wiederum im Gegensatz zu der stark verringerten Invasionsfähigkeit von $\Delta rbt4$ -Deletionsstämmen, die in einem Corneamodell für invasives Wachstum beobachtet worden war (Braun *et al.*, 2000).

Das Ausmaß der Invasivität scheint bei allen Stämmen vergleichbar zu sein, so dass man nicht von einer signifikanten Beteiligung der Proteine Rbe1p und Rbt4p am Invasionsverhalten von *C. albicans in vitro* ausgehen kann.

Zytotoxizitätstests

Ein Maß für die Zerstörung humaner Epithelzellen – z.B. aufgrund der Zell-Lyse durch einen invasiv wachsenden Pilz – ist die Freisetzung zytosolischer Laktat-Dehydrogenase (LDH) in das umgebende Medium. Die Menge an freigesetzter LDH kann kolorimetrisch bestimmt werden. Da sich das Ausmaß der Lyse infizierter Epithelzellen mit Hilfe dieses Tests quantifizieren lässt, wurde er dazu verwendet, einen möglichen Effekt der Deletion von *RBE1* und *RBT4* auf die Kinetik, d.h. den zeitlichen Verlauf der Invasion zu untersuchen. Dafür

wurden konfluente *Monolayer* humaner Darmepithelzellen (Caco-2) sowie humaner Mundschleimhautzellen (TR146) in 24 well-Platten mit 3×10^3 Zellen des *C. albicans* Wildtypstammes SC3514 (in Duplikaten) bzw. der beiden unabhängigen $\Delta rbe1/\Delta rbt4$ -Doppel-Deletionsstämme und des Doppel-Reversionsstammes als Kontrolle infiziert. Dies entspricht etwa einem Verhältnis einer *C. albicans*-Zelle auf zehn Humanzellen (*multiplicity of infection* (MOI) = 0,1). Die Ansätze wurden anschließend bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert und über einen Zeitraum von 18 (Caco-2) bzw. 16 Stunden (TR146) zu verschiedenen Zeitpunkten (0h, 12h, 18h/16h) die Menge an freigesetzter LDH im Überstand dieser Kulturen sowie die Menge der LDH in den nach Abnahme des Überstandes noch vorhandenen intakten Epithelzellen bestimmt. Aus der so ermittelten Gesamtmenge an LDH in den jeweiligen Ansätzen wurde der Prozentsatz der durch die Infektion mit *C. albicans* lysierten Epithelzellen berechnet (Brutto-Zellzerstörung). Die Netto-Zellzerstörung ergibt sich durch den Abzug des Prozentsatzes lysierter Epithelzellen in den nicht-infizierten Kontrollansätzen zu den jeweiligen Zeitpunkten von der Brutto-Zellzerstörung (Abb. 52).

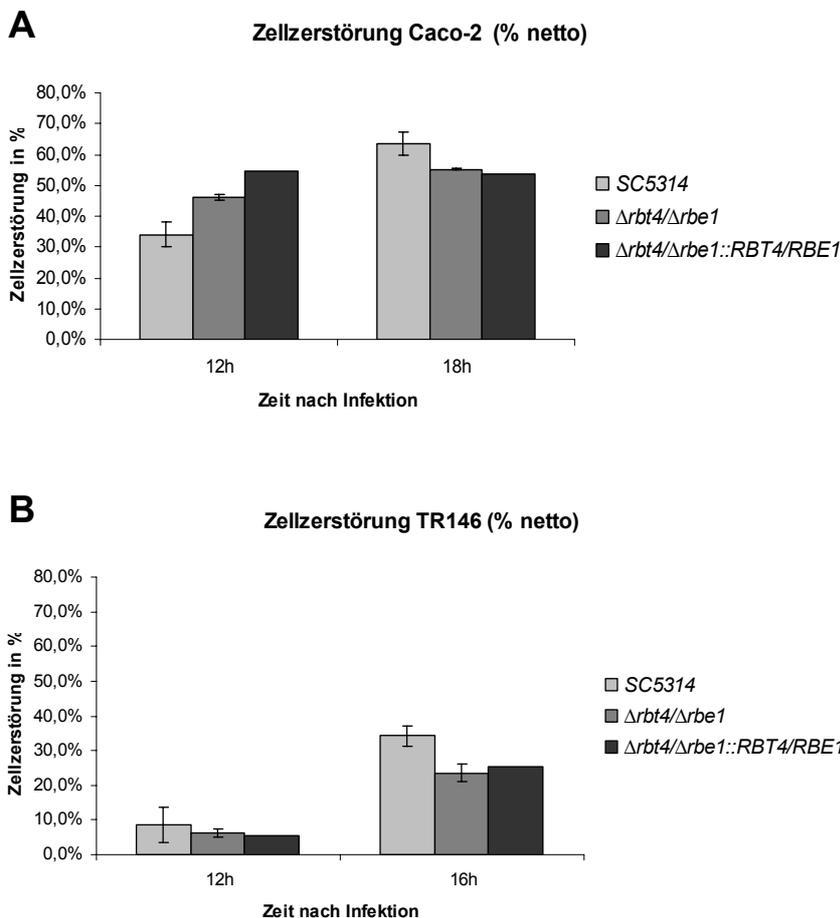


Abb. 52. Desintegration humaner Epithelzellen durch Wildtyp *C. albicans* im Vergleich zu $\Delta rbt4/\Delta rbe1$ -Deletions- und Reversionsstämmen.

Laktat-Dehydrogenase- (LDH-) Test: Freisetzung zytosolischer Laktat-Dehydrogenase als Maß der Zellzerstörung humaner Epithelzellen nach Infektion mit *C. albicans* nach 12 h und 18 h bzw. 16 h Wachstum bei 37°C, 5% CO₂.

A. Darmepithel (Caco-2-Zellen; SC3514, $\Delta rbt4/\Delta rbe1$: n=2; $\Delta rbt4/\Delta rbe1::RBT4/RBE1$: n=1); **B.** Mundschleimhautepithel (TR146-Zellen; SC3514, $\Delta rbt4/\Delta rbe1$: n=2; $\Delta rbt4/\Delta rbe1::RBT4/RBE1$: n=1); SC3514: Wildtyp; $\Delta rbt4/\Delta rbe1$: Doppel-Deletionsstamm; $\Delta rbt4/\Delta rbe1::RBT4/RBE1$: Doppel-Reversionsstamm; Fehlerbalken: Standardabweichung der biologischen Replikate (SC3514 in Duplikaten, 2 unabhängig konstruierte Doppel-Deletionsstämme)

Die Daten zeigen keine signifikanten Unterschiede im Zeitverlauf der Invasion humaner Epithelien zwischen klinischem Isolat (Wildtyp) und den Doppel-Deletions- bzw. Reversionsstämmen für *RBE1* und *RBT4*, wobei zwischen 60% (Caco-2) und 30% (TR146) der Epithelzellen nach 18 bzw. 16 Stunden lysiert waren. Zum Zeitpunkt t = 0 ließen sich

nach Normalisierung gegen nicht-infizierte Epithelzellen keine signifikanten Mengen an LDH in den Infektionsansätzen nachweisen (Daten nicht gezeigt). Dies ist ein Hinweis darauf, dass die verwendeten Medien keine zytotoxischen Eigenschaften besitzen und die Lyse von Epithelzellen zu späteren Zeitpunkten hauptsächlich auf die Infektion durch *C. albicans* zurückzuführen ist.

Auch unter den hier gewählten Bedingungen lässt sich eine Beteiligung der Pry-Proteine Rbe1p und Rbt4p an der Fähigkeit zur Invasion humaner Epithelien durch *C. albicans* nicht nachweisen.

Beteiligung von Rbe1p und Rbt4p an der Paarung von C. albicans

In Hefen wird die sexuelle Reproduktion durch eine Pheromon-vermittelte Signalkaskade gesteuert. Auch *C. albicans* verfügt über Gene, die konservierte Eigenschaften der α - und a-Pheromon-Genfamilie besitzen. Das Gen für den α -Faktor (*ORF6.4306*, *ORF19.4481* = *MF α 1*) enthält drei Sequenzen, die für Pheromon-Peptide kodieren, von denen zwei eine Länge von 13 und eines eine Länge von 14 Aminosäuren besitzen. Die anhand der gefundenen Sequenzen synthetisch hergestellten Peptide sind in der Lage, bei *opaque*-Zellen des Paarungstyps a (*MTLa*) die Expression von Genen, die am Paarungs-Prozess sowie der Filamentierung beteiligt sind, sowie spezifische Paarungs-Strukturen zu induzieren (Lockhart *et al.*, 2003b; Panwar *et al.*, 2003; Zhao *et al.*, 2005). Zu den auf diese Weise induzierten Genen gehört auch *RBT4*, welches nach Zugabe von α -Faktor bis zu 12-fach induziert wird (Bennett *et al.*, 2003).

Das Gen für den a-Faktor (*CaMFA1*, *ORF19.2164.1*) enthält eine Sequenz, die laut Vorhersage *in silico* zu einem prenylierten Pheromon mit einer Länge von 14 Aminosäuren prozessiert wird. Zellen vom Paarungstyp a (*MTLa*), in denen dieses Gen deletiert wurde, sind – im Gegensatz zu Stämmen vom Paarungstyp α (*MTLa*) – nicht mehr zur Paarung in der Lage (Dignard *et al.*, 2007). Beide Gene der α - und a-Pheromon-Genfamilie in *C. albicans* weisen nur eine sehr geringe Sequenzähnlichkeit zu denjenigen von *S. cerevisiae* auf.

In sog. „*transwell assays*“, wobei *opaque*-Zellen der Paarungstypen *MTLa* und *MTLa* als Pheromon-Spender von zu testenden Zellen durch einen Mikroporen-Filter getrennt sind (Daniels *et al.*, 2006), konnte indirekt gezeigt werden, dass a-Pheromon bei *opaque*-Zellen des Paarungstyps *MTLa* des Wildtyp-Stammes P57072 Paarungs-spezifische Strukturen induzieren kann (Yi *et al.*, 2008). Synthetisch hergestelltes a-Pheromon wurde in solchen Versuchen noch nicht verwendet.

Wie in dieser Arbeit mittels RT-PCR und in der Literatur mittels Genom-weiter Transkriptionsanalysen gezeigt, werden die *PRY*-Gene im Zusammenhang mit der Paarung von *C. albicans* differentiell reguliert (s. Kap. 2.2 und Tabelle 17). Dabei wird die Expression von *RBE1* und *ORF19.10303* (Allel von *ORF19.2787*) während des phänotypischen Wechsels von *white*- zu Paarungs-kompetenten *opaque*-Zellen induziert, die Expression von *RBT4*, *ORF19.6200* und *ORF19.2336* reduziert (Lan *et al.*, 2002; Tsong *et al.*, 2003). Ferner ist

RBT4 als eines von nur wenigen Zelloberflächenproteinen in *opaque*-Zellen des Paarungstyps α in Gegenwart von α -Pheromon induziert (Bennett *et al.*, 2003).

Aus diesen Gründen wurde eine Beteiligung der beiden Proteine Rbe1p und Rbt4p an der Pheromon-vermittelten Paarung des *C. albicans*-Wildtypstammes SC5314 mit Hilfe der $\Delta rbe1/\Delta rbt4$ Doppel-Deletionsstämme untersucht.

Dafür wurde zunächst Homozygotität für den Paarungslokus in den $\Delta rbe1/\Delta rbt4$ Doppel-Deletionsstämmen analog zu dem für den Wildtyp unter Kap. 2.2 geschilderten Verfahren durch Wachstum auf L-Sorbose hergestellt und *opaque*-Zellen der beiden Paarungstypen *MTLa* und *MTLa* nach Wachstum der betreffenden Stämme bei Raumtemperatur selektioniert. Für den Nachweis einer möglichen Beteiligung von Rbe1p und Rbt4p an der Paarungsantwort wurden zum einen die Wirkungen der beiden synthetisch hergestellten Paarungs-Pheromone α - und α -Faktor auf *opaque*-Zellen der Paarungstypen *MTLa* und *MTLa* (hemi- bzw. homozygot für den Paarungstyp-Lokus) des Wildtypstammes SC5314 sowie des Doppel-Deletionsstammes für Rbe1p und Rbt4p auf zellulärer Ebene mittels Lichtmikroskopie untersucht. Zum anderen wurde das phänotypische Verhalten von *opaque*-Zellen dieser Stämme in Mischkulturen gegensätzlicher Paarungstypen in Flüssigkultur untersucht. Da die Paarungseffizienz dieser Zellen in SC-Medium vernachlässigbar ist, wurde für diese Versuche Spider-Flüssigmedium verwendet, in dem etwa 1% der Zellen nach einem Tag eine Paarung vollziehen (Bennett *et al.*, 2005) (Abb. 53).

Die verwendeten synthetischen Peptidpheromone haben folgende Aminosäuresequenzen:

- α -Pheromon: GFRLTNFGYFEPG
- α -Pheromon: AVRSVSTGNCCSTC* (*mit Farnesyl-Rest)

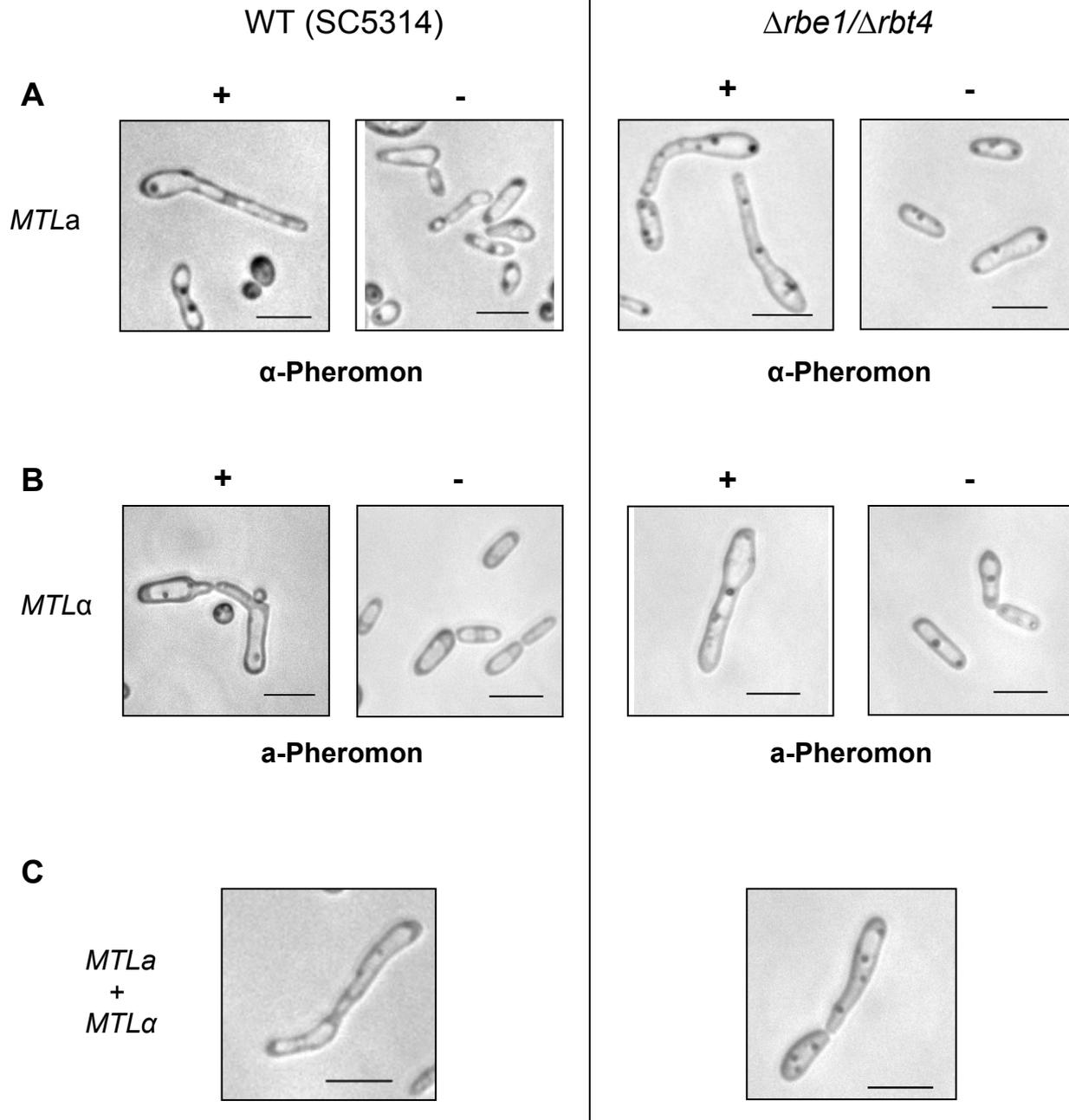


Abb. 53: Paarungs-Versuche. **A, B.** Reaktion von *opaque*-Zellen des Wildtyp-Stammes SC5314 sowie des $\Delta rbe1/\Delta rbt4$ Doppel-Deletionsstammes auf die Zugabe synthetischer Paarungs-Pheromone in Flüssigkultur (Spider-Medium; „+“: Zugabe von Pheromon, „-“: Zugabe des entsprechenden Volumens an Lösungsmittel); **A.** Zugabe von α -Pheromon zu Zellen des Paarungstypes *MTLa* (10 $\mu\text{g/ml}$); **B.** Zugabe von a-Pheromon zu Zellen des Paarungstypes *MTLa* (300 $\mu\text{g/ml}$); **C.** Mischkulturen von *opaque*-Zellen der Paarungstypen *MTLa* und *MTLa* des Wildtyp-Stammes SC5314 (links) sowie des $\Delta rbe1/\Delta rbt4$ Doppel-Deletionsstammes (rechts); Maßstabsbalken: 10 μm

Es zeigt sich, dass *opaque*-Zellen sowohl des Wildtypstammes SC5314 sowie des $\Delta rbe1/\Delta rbt4$ Doppel-Deletionsstammes bei Zugabe des jeweiligen synthetischen Pheromons Paarungs-typische Strukturen in Form lang gestreckter Zellfortsätze (Paarungsschläuche; *conjugation tubes*) ausbilden. Dieser Effekt wird von dem Paarungs-Pheromon α -Faktor nur bei *opaque*-Zellen des Paarungstyps *MTLa* ausgelöst (Abb. 53A), nicht bei *white*-Zellen

dieses Paarungstyps und nicht bei *opaque*-Zellen des Paarungstyps *MTLa* (Daten nicht gezeigt). Umgekehrt bilden nur *opaque*-Zellen des Paarungstyps *MTLa* Paarungs-typische Strukturen bei Zugabe des Pheromons α -Faktor aus (Abb. 53B), nicht jedoch *white*-Zellen dieses Paarungstyps und nicht *opaque*-Zellen des Paarungstyps *MTLa* (Daten nicht gezeigt). Dabei ist für die Induktion der beschriebenen Effekte eine 30-fach höhere Menge an α -Pheromon verglichen mit α -Pheromon zu den entsprechenden Flüssigkulturen erforderlich (300 μg α -Pheromon/ml Flüssigkultur im Vergleich zu 10 μg α -Pheromon/ml Flüssigkultur). Die Ausbildung Paarungs-typischer Strukturen ist auch in Mischkulturen von *opaque*-Zellen entgegen gesetzter Paarungstypen in Suspensionskultur zu beobachten. Dies gilt in gleichem Maße für den Wildtypstamm SC5314 wie für den $\Delta rbe1/\Delta rbt4$ Doppel-Deletionsstamm (Abb. 53C), sowie für alle möglichen Kombinationen entgegen gesetzter Paarungstypen dieser beiden Stämme, nicht aber für Mischkulturen gleichen Paarungstyps oder Kulturen von *white*-Zellen (Daten nicht gezeigt). Die Zellen scheinen dabei Paarungs-typisches Verhalten, wie Zellteilungsstopp, Ausbildung und chemotropische Annäherung von Keimschläuchen sowie Zellfusion zu zeigen (vgl. (Lockhart *et al.*, 2003a)). Somit lässt sich unter diesen Bedingungen keine Beteiligung von Rbe1p und Rbt4p an der Pheromon-induzierten Ausbildung von Paarungsstrukturen, sog. Paarungsschläuchen, sowie an der Biologie des Paarungsvorganges von *C. albicans* nachweisen.

Virulenzstudien in vivo

Um eine Beteiligung von *RBE1* und *RBT4* auf die Ausbildung systemischer Kandidosen bei Infektionen des Blutstroms durch *C. albicans* zu untersuchen, wurden Virulenzstudien mit den $\Delta rbe1$ -/ $\Delta rbt4$ -Deletions- und Reversionsstämmen im systemischen Mausmodell durchgeführt. Kohorten von jeweils 10 steril gehaltenen Labormäusen (C57BL/6) wurden über die Schwanzvene mit ca. 5×10^5 *C. albicans*-Zellen der jeweiligen Einzel- und Doppel-Deletionsstämmen sowie der entsprechenden Reversionsstämmen infiziert und über einen Zeitraum von 30 Tagen observiert (Kollaboration mit MPI für Infektionsbiologie Berlin, Dr. C. F. Urban; Abb. 54).

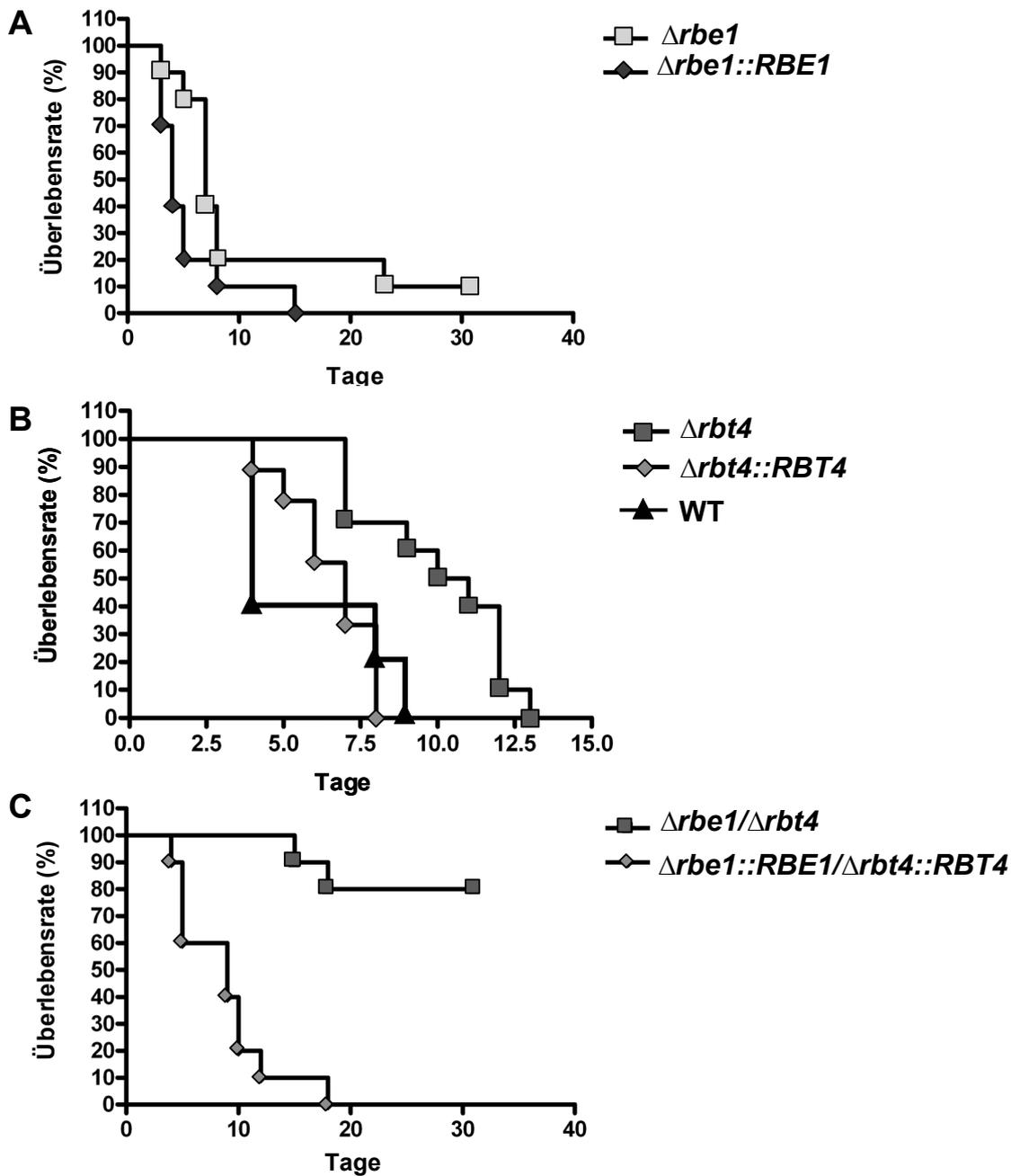


Abb. 54. *in vivo*-Virulenzstudien der Einzel- und Doppel-Deletionsstäme für *RBT4* und *RBE1* sowie der entsprechenden Reversionsstäme im systemischen Mausmodell. Intravenöse Injektion von 5×10^5 *C. albicans*-Zellen in die Schwanzvene; Kohorten von 10 Mäusen (C57BL/6) pro Stamm, in Duplikaten; Auftragung der Überlebensrate in Prozent über die Zeit (30 Tage) **A.** $\Delta rbe1$ -Deletions- und Reversionsstamm; **B.** $\Delta rbt4$ -Deletions- und Reversionsstamm, WT: Wildtypstamm SC5314; **C.** $\Delta rbe1/\Delta rbt4$ -Doppeldeletions- und Reversionsstamm

Die Virulenzstudien zeigen im Falle der Einzel-Deletionsstäme für *RBE1* und *RBT4* eine moderate, aber dennoch signifikante Reduktion der Virulenz im Vergleich zu den Reversionsstämen (Abb. 54A und 54B; Signifikanz: P-Wert = 0,038 (A); P-Wert = 0,0017 (B)). Zunächst fällt auf, dass beide Einzel-Deletionsstäme virulent sind und ein Großteil der Mäuse nach einer gewissen Zeit stirbt. Bei Infektion mit dem *RBT4*-Deletionsstamm sind alle

Mäuse nach 13 Tagen gestorben, bei Infektion mit dem *RBE1*-Deletionsstamm überleben 10% der Versuchstiere nach 24 Tagen. Bei den beiden Reversionsstämmen beträgt die Sterberate jeweils 100% und die Versuchstiere sterben signifikant schneller als diejenigen, die mit den Deletionsstämmen infiziert wurden. Die Reversionsstämmen verhalten sich in diesem Fall vergleichbar mit dem Wildtypstamm SC5314, bei dem alle Tiere nach etwa 8 bis 9 Tagen gestorben sind (exemplarisch gezeigt in Abb. 54B).

Bei der Virulenz des Doppel-Deletionsstammes ist dagegen ein deutlicher Unterschied zu den Einzel-Deletionsstämmen zu beobachten (Abb. 54C; P-Wert < 0,0001). Bei Infektion mit diesem Stamm beträgt die Überlebensrate der Mäuse auch nach 30 Tagen noch 80%. Dieser Stamm ist gegenüber den Einzel-Deletionsstämmen demnach in seinen virulenten Eigenschaften bei systemischen Infektionen deutlich geschwächt. Der Doppel-Reversionsstamm zeigt auch hier eine dem Wildtypstamm vergleichbare Virulenz mit einer Sterberate von 100%, wenngleich die Versuchstiere etwas langsamer sterben, als bei den Einzel-Reversionsstämmen.

Dies bedeutet, dass das Fehlen der beiden Pry-Proteine Rbe1p und Rbt4p zusammen einen synergistischen Effekt auf die Virulenzeigenschaften von *Candida albicans* bei systemischen Infektionen des Blutstroms in Säugetieren hat, der größer ist, als für die beiden Einzeldelationen zusammen genommen und zu einem nahezu vollständigen Virulenzdefekt des Doppel-Deletionsstammes führt. Das Vorhandensein beider Proteine ist für die volle Ausbildung der Virulenz unter diesen Bedingungen erforderlich. Dahingegen hat das Fehlen nur jeweils eines der beiden Proteine nur einen geringen Effekt auf die Virulenz des Pilzes.

Dass tatsächlich diese beiden Proteine für die beobachteten Effekte verantwortlich sind, zeigt die Wiederherstellung der Virulenz in den jeweiligen Reversionsstämmen, die sich in ihrer Virulenz ähnlich dem Wildtypstamm verhalten.

Dieser synergistische Effekt deutet ferner auf eine ähnliche Funktion der beiden Pry-Proteine Rbe1p und Rbt4p bei der systemischen Infektion durch *Candida albicans* hin.

Transkriptionelle Regulation der PRY-Gene in den Deletionsstämmen

Der synergistische Virulenzphänotyp der Doppeldeletion von *RBE1* und *RBT4* im systemischen Mausmodell, der zu einer nahezu vollständigen Reduktion der Virulenzeigenschaften von *C. albicans* führt, deutet auf eine synergistische Funktion der jeweiligen Genprodukte bei der Pathogenese im Säugetierwirt hin. Da der Grad der Homologien der Pry-Proteine für eine ähnliche Funktionsweise spricht (Abb. 13 und 14), wurde untersucht, ob die entsprechenden Gene in Abhängigkeit voneinander exprimiert werden. Dazu wurden Veränderungen im Transkriptionsniveau aller fünf *PRY*-Gene in den Einzel- und Doppel-Deletionsstämmen für *RBE1* und *RBT4* gegenüber dem Expressionsniveau im Wildtypstamm mittels quantitativer RT-PCR für die beiden Wachstumsbedingungen Blastosporen (YPD, 30°C) und Hyphen (α -MEM, 37°C) ermittelt.

Dabei zeigten nur die beiden Gene *RBE1* und *RBT4* eine signifikante Änderung ihrer Regulation in den jeweiligen Einzel-Deletionsstämmen im Vergleich zum Wildtypstamm (Tab. 24).

Tab. 24. Differentielle Regulation der *PRY*-Gene *RBE1* und *RBT4* in den Einzel-Deletionsstämmen bezogen auf den *C. albicans* Wildtypstamm SC5314. qRT-PCR in Blastosporen und Hyphen (Daten aus zwei Experimenten mit je zwei unabhängig hergestellten Stämmen (n=4); in Klammer: Standardabweichung)

<i>PRY</i> -Gen	$\Delta rbe1$ -Deletionsstämme (Blastosporen)	$\Delta rbt4$ -Deletionsstämme (Hyphen)
<i>RBE1</i>	-	+ 7,24 (\pm 2,6)
<i>RBT4</i>	+ 10,89 (\pm 4,2)	-

Eine Veränderung des Transkriptionsniveaus zeigt sich für die beiden Gene unter derjenigen Bedingung, bei der das jeweils deletierte Gen im Wildtyp transkriptionell aktiviert ist. So ist die Transkriptionsrate von *RBT4* im $\Delta rbe1$ -Deletionsstamm gegenüber derjenigen des Wildtypstammes signifikant in Blastosporen erhöht – der Bedingung, bei der *RBE1* im Wildtyp exprimiert ist. Umgekehrt wird die Transkriptionsrate von *RBE1* gegenüber dem Wildtypstamm im $\Delta rbt4$ -Deletionsstamm während des Hyphenwachstums verstärkt – der Bedingung, bei der *RBT4* im Wildtypstamm exprimiert wird. Die Gene *ORF19.2787*, *ORF19.6200* und *ORF19.2336* zeigten keine signifikanten Änderungen ihres Expressionsniveaus in den untersuchten Stämmen (Daten nicht gezeigt).

Zusammenfassend zeigt sich eine kompensatorische Aktivierung der *RBE1*-Transkription in Abwesenheit von Rbt4p sowie eine kompensatorische Aktivierung der *RBT4*-Transkription in Abwesenheit von Rbe1p unter jeweils der Bedingung, bei der das fehlende Gen normalerweise im Wildtypstamm exprimiert wird. Dies ist eine Erklärung für den synergistischen Effekt dieser beiden Proteine auf die Virulenz von *C. albicans*. Beide Proteine spielen eine Rolle bei der Pathogenität von *C. albicans* im Wirt. Fehlt nur eines der beiden Pry-Proteine, könnte der dadurch entstandene Virulenzdefekt teilweise durch eine verstärkte Produktion des jeweils anderen Proteins ausgeglichen werden. Dies führt dann zu einer nur moderaten Reduktion der Virulenzeigenschaften der Einzel-Deletionsstämme im Vergleich zum Doppel-Deletionsstamm (vgl. Abb. 54).

Die funktionelle Komplementierung der beiden Pry-Proteine Rbe1p und Rbt4p ist ein Hinweis auf eine ähnliche molekulare Funktion beider Proteine sowie eine Beteiligung an ähnlichen Prozessen bei der Pathogenese von *C. albicans*.

Diskussion

Pilze sind wichtige Verursacher opportunistischer Infektionen beim Menschen. *Candida albicans* stellt dabei mit bis zu 66% aller Fälle die bei weitem häufigste Ursache invasiver Kandidosen dar (Pfaller and Diekema, 2007). Die Sterberate solcher Infektionen des Blutstromes liegt bei bis zu 50% (Eggimann *et al.*, 2003; Gudlaugsson *et al.*, 2003; Wey *et al.*, 1988).

Systemische Mykosen sind meist opportunistische Erkrankungen, die nur bei einem stark geschwächten Immunsystem, verursacht durch Defekte in der Zahl und Funktion von Neutrophilen, der Zell-vermittelten Immunität oder Erkrankungen des Immunsystems wie AIDS auftreten. Auch der zunehmende Einsatz von Breitspektrum-Antibiotika, zytotoxischer Chemotherapie sowie die Zunahme von Transplantationen erhöhen das Risiko opportunistischer Pilzkrankungen (Segal *et al.*, 2006). Von den wenigen heute bekannten Antimykotika sind nur wenige in der Lage, den Pilz spezifisch zu bekämpfen, ohne dabei Nebenwirkungen zu verursachen. Zudem treten durch die verbreitete Anwendung von Antimykotika zunehmend Resistenzen auf.

C. albicans verfügt über eine ganze Reihe von Faktoren, die es ihm ermöglichen, sich bei einem geschwächten Immunsystem im Körper des Wirtes zu verbreiten. Dabei wird dem Dimorphismus, der Fähigkeit, die Wachstumsform je nach den vorherrschenden Umweltbedingungen zwischen einzelligen, sphärischen Blastosporen und der Ausbildung von Filamenten (Hyphen oder Pseudohyphen) zu wechseln, die größte Bedeutung für die Virulenz von *C. albicans* zugeschrieben. Den hyphalen Wuchsformen kommt dabei wahrscheinlich eine Rolle bei der Adhäsion an Zellen des Wirtes und der Invasion von Wirtsgewebe zu, während die Blastosporen eher einer schnellen Vermehrung im Wirtsorgansimus und der Verbreitung über dessen Blutbahn dienen (Cutler, 1991; Fradin *et al.*, 2003; Lo *et al.*, 1997; Saville *et al.*, 2003). Zum anderen sind während des Wuchsformwechsels co-regulierte Virulenzgene an der Pathogenität beteiligt (Braun *et al.*, 2000; Braun *et al.*, 2001; Brown and Gow, 1999; Gow *et al.*, 2002; Kumamoto and Vines, 2005). Zu diesen Virulenzfaktoren gehören sekretierte Proteine, wie Proteasen oder Lipasen, oder Zelloberflächenmoleküle, wie die Adhäsine, die bei der Adhäsion an Wirtszellen oder bei der Phagozytose von *Candida*-Zellen durch diese, beteiligt sind. Stämme, die in ihrer Fähigkeit zur Hyphenbildung gehemmt sind, sind so meist auch in Modellsystemen weniger virulent (Leberer *et al.*, 1997; Lo *et al.*, 1997; Whiteway and Oberholzer, 2004).

Die Expression von Zelloberflächenproteinen wird von zentralen Regulatoren der Morphogenese von *C. albicans* kontrolliert. Dies sind der globale Repressor von Hyphenwachstum, Tup1p, sowie der zentrale positive Regulator der Filamentierung, der durch einen cAMP-abhängigen Proteinkinase A-Signalweg regulierte Transkriptionsfaktor Efg1p. Zu diesen Oberflächenmolekülen gehören auch die beiden Proteine Rbt4p und Rbe1p, die gegensätzlich von diesen beiden Regulatoren der Morphogenese reguliert werden. Dabei wird Rbt4p in Hefezellen von Tup1p reprimiert und in Hyphen sehr stark durch Efg1p induziert, wohin-

gegen Rbe1p in Hyphen von Efg1p reprimiert und hauptsächlich in Hefezellen exprimiert wird.

Beide Proteine weisen signifikante Homologien zur Familie 1 der sog. PR-Proteine (*pathogenesis related*) in Pflanzen und zu den Pry-Proteinen in *S. cerevisiae* (*pathogenesis related in yeast*) auf und sind damit Teil der ubiquitär vorkommenden CAP-Familie von Proteinen, deren molekulare Funktion bis heute ungeklärt ist (Abb. 10, 11; Tab. 1). Rbt4p ist in *C. albicans* als essentieller Faktor für die Virulenz sowie für das invasive Wachstum diskutiert worden (Braun *et al.*, 2000).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Zugehörigkeit der beiden Proteine Rbe1p und Rbt4p zu einer neuen, noch nicht beschriebenen Familie von Pry-Proteinen in *C. albicans* untersucht, die Mitglieder dieser Familie identifiziert sowie deren Regulation und Funktion in *C. albicans* charakterisiert. Durch die Konstruktion von Einzel- und Doppel-Deletionsstämmen für *RBE1* und *RBT4* konnte keine Beteiligung dieser beiden Pry-Proteine an der Adhäsion und der Invasion *in vitro*, wohl aber eine synergistische Funktion bei der Virulenz von *C. albicans in vivo* nachgewiesen werden.

1. Eine neue Familie von Pry-Proteinen in *C. albicans*

Die potenziellen Zelloberflächenproteine Rbe1p und Rbt4p aus *C. albicans* weisen große Homologien zur Familie 1 der PR-Proteine (*pathogenesis related*) in Pflanzen auf (Abb. 10; (Braun *et al.*, 2000)). Zusammen mit den Antigen 5-Allergenen der Insektengifte und den CRISP-Proteinen aus Säugern und anderen Vertebraten bildet die PR-1-Familie die Superfamilie der CAP-Proteine (Gibbs *et al.*, 2008). CAP-Proteine sind sehr weit verbreitet und finden sich in zahlreichen Organismen aller Reiche – von Archaea über pro- und eukaryontische Einzeller, Pflanzen, Wirbellose bis hin zu Säugetieren (Szyperski *et al.*, 1998). Die evolutiven Verwandtschaftsverhältnisse dieser Proteine deuten auf eine Entwicklung aus einem gemeinsamen Vorläufer hin. Dies und die weite Verbreitung der Mitglieder dieser Familie sprechen für eine Beteiligung dieser Proteine an fundamentalen biologischen Prozessen.

Die CAP-Proteinfamilie wird strukturell durch das Vorhandensein von vier Signatursequenzen (CAP1 – CAP4) definiert, die sich in der konservierten CAP-Domäne befinden (Gibbs *et al.*, 2008). In *S. cerevisiae*, als dem am besten charakterisierten eukaryontischen Pilz, finden sich drei Mitglieder der CAP-Proteine. Sie werden dort als Pry-Proteine bezeichnet (Pry1p – Pry3p, für *pathogenesis related in yeast*; Tab. 1). Rbe1p und Rbt4p weisen innerhalb der konservierten Domäne 58% bzw. 57% Sequenzidentität zu Pry1p auf.

Homologievergleiche in der Genomsequenz von *C. albicans* fördern neben Rbe1p und Rbt4p drei weitere potenzielle offene Leserahmen zu Tage, die signifikante Homologien zu diesen Proteinen aufweisen: *ORF19.6200/ORF19.13580* (Genprodukt: 317 AS), *ORF19.2787/ORF19.10303* (Genprodukt: 410 AS) und *ORF19.2336/ORF19.9872* (Genprodukt: 202 AS). Innerhalb der konservierten CAP-Domäne weisen alle fünf Proteine untereinander eine

Sequenzidentität zwischen 45% und 47% auf (Tab. 17, Abb. 13). Mit etwas 14 - 15 kDa ist diese etwas kleiner als im Rest der Proteinfamilie (17 – 21 kDa). Daneben finden sich in allen Genprodukten konservierte Bereiche, die auf eine Sekretion hindeuten (Abb. 14).

In Pflanzen existieren die PR-1-Proteine als Multi-Gen-Familien (z.B. Tabak: mind. 16 Mitglieder (Cornelissen *et al.*, 1987); Arabidopsis: 22, Reis: 39 Mitglieder (van Loon *et al.*, 2006)). In *C. albicans* sind alle fünf offenen Leserahmen auf Chromosom 1 lokalisiert, bilden dort aber kein Cluster (Assembly 21 der *Candida*-Genomdatenbank).

Homologe der CAP-Proteine/von Rbe1p finden sich in einer Vielzahl dimorpher pathogener Pilze (Abb. 15). Dabei zeigen die einzelnen Mitglieder der Pry-Familie in *C. albicans* eine größere phylogenetische Verwandtschaft zu orthologen Proteinen anderer Pilze als untereinander. Dies weist auf eine frühe evolutive Diversifizierung dieser Proteine hin, die noch vor der Trennung der jeweiligen Organismen stattgefunden hat, während die einzelnen Mitglieder der Familie später in den betreffenden Organismen spezifischen Funktionen adaptiert haben.

Aufgrund ihrer großen Sequenz- und Strukturhomologien untereinander, sowie zu potenziellen Pry-Proteinen in anderen Pilzen und damit großen Homologien zur Superfamilie der CAP-Proteine, werden diese fünf Gene und ihre Produkte in dieser Arbeit einer neuen Familie von Pry-Proteinen in *C. albicans* zugerechnet.

2. Die Familie der *PRY*-Gene wird während der Morphogenese von *C. albicans* differentiell reguliert

Die transkriptionelle Regulation der Mitglieder der *PRY*-Familie wurde in dieser Arbeit im Zusammenhang zweier morphogenetischer Prozesse von *C. albicans* im Wildtyp-Stamm SC5314 untersucht: dem Wechsel zwischen Blastosporen- und Hyphenwachstum, sowie dem phänotypischen Wechsel von Blastosporen zur Paarungs-kompetenten *opaque*-Zellform. Die Mitglieder der *PRY*-Familie zeigen dabei eine differentielle Regulation bei beiden Prozessen.

Regulation während des Wechsels von Hefe- zu Hyphenwachstum

Während der frühen Stadien der Hyphenbildung zeigt sich eine Repression aller 5 Mitglieder der *PRY*-Familie, welche parallel zur Regulation des zentralen Regulators der Hyphenbildung in *C. albicans*, *EFG1*, verläuft. Die Expression von *EFG1* wird während der Hyphenbildung durch negative Autoregulation sowie durch den Proteinkinase A-Signalweg rasch reprimiert (Stoldt *et al.*, 1997; Tebarth *et al.*, 2003) und erreicht nach 25 min ein Minimum. Parallel dazu nimmt auch die Expression der *PRY*-Gene innerhalb dieses Zeitraums kontinuierlich ab (Abb. 21). Nach diesem Zeitpunkt steigt die Expression von *EFG1* wieder an. Dies gilt auch für die Expression von *RBT4*, während die Expression der weiteren vier Mitglieder der *PRY*-Familie weiter abnimmt und nach 60 min ein Minimum erreicht. Während des weiteren Hyphenwachstums zeigt sich eine Induktion von *RBT4*, *ORF19.2787* und *ORF19.6200*

während der exponentiellen Wachstumsphase bei einem Zeitwert von 8 Stunden, während die Expression von *ORF19.2336* wieder den Ausgangswert der Expression während des Blastosporen-Wachstums erreicht. Im Gegensatz dazu ist die Expression von *RBE1* zu diesem Zeitpunkt in Hyphen sehr stark reprimiert (Abb. 20). Im Wildtyp-Stamm ist *RBE1* vor allem während des exponentiellen Wachstums von Blastosporen leicht exprimiert (Abb. 18) und wird während des Hyphenwachstums kontinuierlich reprimiert (Sohn *et al.*, 2003). *RBT4* zeigt ebenfalls ein gewisses Transkriptionsniveau in Blastosporen (Abb. 19), während für *ORF19.2787*, *ORF19.6200* und *ORF19.2336* unter diesen Bedingungen keine signifikante Expression in *Northern Blot*-Analysen nachgewiesen werden konnte. Diese drei Gene scheinen unter den hier untersuchten Bedingungen daher nur schwach exprimiert zu sein.

Einfluß der Morphogenese-Regulatoren EFG1, TUP1 und TEC1 auf die Regulation der PRY-Gene

Die Gene *RBE1* und *RBT4* befinden sich unter starker regulatorischer Kontrolle durch zentrale Regulatoren der Morphogenese. So ist die Expression von *RBE1* durch den zentralen positiven Regulator filamentösen Wachstums, *EFG1*, sowohl während des Blastosporen- als auch während des Hyphenwachstums stark reprimiert und in einem Deletionsstamm für *EFG1* unter beiden Wachstumsbedingungen stark induziert (Abb. 19; (Sohn *et al.*, 2003; Ernst, 2000b; Stoldt *et al.*, 1997)). Es ist dabei das am stärksten induzierte Zelloberflächenprotein in diesem Stamm, woher die Bezeichnung für dieses Gen rührt (*RBE1* = *Repressed By EFG1*) (Sohn *et al.*, 2003). Im Gegensatz dazu ist die Expression von *RBT4* von einem Repressor filamentösen Wachstums, dem allgemeinen Repressor *TUP1*, ebenfalls während des Blastosporen- und Hyphenwachstums reprimiert (*RBT4* = *Repressed By TUP1*) und ist in einem $\Delta efg1$ -Deletionsstamm nicht exprimiert (Abb. 19). *RBT4* wird vielmehr in Hyphen in Abhängigkeit von *EFG1* exprimiert (Braun and Johnson, 2000).

Dies zeigt eine genau gegensätzliche Regulation von *RBE1* und *RBT4* während der Morphogenese von *C. albicans*, wobei beide Gene jeweils durch einen zentralen positiven bzw. negativen Regulator der Morphogenese reprimiert werden. Dabei ist *RBE1* in Blastosporen geringfügig exprimiert und während des Hyphenwachstums reprimiert, während es sich bei *RBT4* umgekehrt um ein vor allem in Hyphen induziertes Gen handelt. Für die weiteren Mitglieder der *PRY*-Familie konnte eine entsprechende Repression durch die Transkriptionsfaktoren *EFG1* und *TUP1* nicht gefunden werden. Sie zeigten in Deletionsstämmen für diese beiden Gene keine deutliche Induktion (Daten nicht gezeigt).

Die *EFG1*-abhängige Expression von *RBT4* zeigt sich auch in den frühen Stadien des Hyphenwachstums, bei denen die Expression beider Gene zunächst abnimmt und nach einem Zeitraum von 25 min wieder gemeinsam zunimmt (Abb. 21). Das der Regulation von *RBT4* entsprechende Transkriptionsmuster von *ORF19.2787* und *ORF19.6200* unter diesen Bedingungen – Repression in frühen und Induktion in späteren Phasen des Hyphenwachstums – spricht dabei für eine mögliche Beteiligung von *EFG1* auch an der Regulation dieser beiden

PRY-Gene. Dagegen führt die Repression der *EFG1*-Transkription unter diesen Bedingungen nicht zu einer Induktion von *RBE1*. Die Transkription von *RBE1* wird vielmehr bereits in den frühen Hyphenstadien reprimiert, was für eine Beteiligung weiterer Faktoren an der Repression von *RBE1* in Hyphen spricht. Ein Faktor der ebenfalls zur Repression von *RBE1* beiträgt, ist der ebenfalls an der Regulation filamentösen Wachstums beteiligte Transkriptionsfaktor *CPHI* (Liu *et al.*, 1994; Lo *et al.*, 1997). So führt die Deletion von *CPHI* bereits zu einer leichten Induktion von *RBE1*, sowie die gemeinsame Deletion von *CPHI* und *EFG1* zu einer stärkeren Induktion der *RBE1*-Transkription als nur die Deletion von *EFG1* alleine (Sohn *et al.*, 2003).

Die mittels *Northern Blot*-Analysen in Deletionsstämmen für Morphogenese-Regulatoren durchgeführten transkriptionellen Studien zeigen zudem eine mögliche Abhängigkeit der Expression von *RBE1* in Blastosporen von *TEC1*, einem Transkriptionsfaktor, welcher die regulatorische Funktion von *EFG1* in manchen Fällen vermittelt (Lane *et al.*, 2001a; Schweizer *et al.*, 2000). Die Transkriptmenge von *RBE1* ist in $\Delta tec1$ -Deletionsstämmen gegenüber dem Wildtypstamm reduziert, was auf eine mögliche aktivierende Funktion von *TEC1* auf die Expression *RBE1* hinweist (Abb. 19).

Zusammengenommen zeigt die differentielle Regulation der *PRY*-Gene während der morphogenetischen Wechsels zwischen Hefe- und Hyphenwachstum von *C. albicans*, dass diese Teil eines komplexen Regulationsnetzwerkes sind, welches neben der Morphogenese und der Virulenz auch weitere wichtige Prozesse in *C. albicans* reguliert. Sowohl *EFG1* als auch *TUPI* dienen nicht ausschliesslich der Regulation filamentösen Wachstums. So ist *EFG1* auch an der Regulation metabolischer Prozesse in *C. albicans* beteiligt (Doedt *et al.*, 2004) und das nah verwandte *TUPI*-Gen in *S. cerevisiae* wird von verschiedenen Regulationswegen als Repressor ihrer Zielgene genutzt (Keleher *et al.*, 1992).

Regulation während des white/opaque-Wechsels

Die *PRY*-Gene zeigen ebenfalls eine differentielle Regulation bei dem für die Paarung von *C. albicans* essentiellen phänotypischen Wechsel von weißen Zellen zu den Paarungskompetenten *opaque*-Zellen (Tab. 19).

Eine notwendige Voraussetzung für den Wechsel der Zellform ist die Homozygotität für den Paarungslokus. In Zellen des Paarungstyps a/a ist der Wechsel zu *opaque*-Zellen durch die reprimierende Wirkung der beiden Homeodomän-Proteine $a1$ und $a2$, die von den Paarungsloci *MTLa* und *MTLa* exprimiert werden, auf die Expression des Hauptregulators des *white/opaque*-Wechsels, *WOR1*, blockiert (Huang *et al.*, 2006; Miller and Johnson, 2002; Srikantha *et al.*, 2006; Zordan *et al.*, 2006).

Der *opaque*-Status wird, einmal induziert, durch ein Netzwerk positiver Feedback-Schleifen auf Transkriptionsebene für viele Generationen stabil aufrechterhalten. Diese resultieren in der Aktivierung von *WOR1* sowie des Transkriptionsfaktors *CZF1*, die gemeinsam die

Expression von *EFG1* reprimieren, dessen Genprodukt für die stabile Aufrechterhaltung des *white*-Status erforderlich ist (Sonneborn *et al.*, 1999b; Srikantha *et al.*, 2000; Zordan *et al.*, 2006; Zordan *et al.*, 2007). Fällt das Niveau der *WOR1*-Transkription unter einen bestimmten Schwellenwert, wird die positive Feedback-Schleife unterbrochen, die Repression von *EFG1* wird aufgehoben und die Zellen wechseln stabil zur *white*-Zellform (Abb. 55).

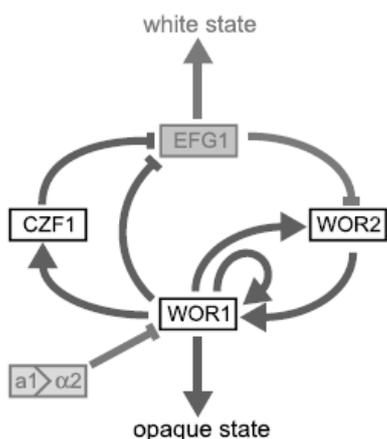


Abb. 55: Modell des genetischen Regulationsnetzwerkes für den Wechsel von der *white*- zur *opaque*-Zellform in *opaque*-Zellen. In *opaque*-Zellen ist die Expression von *WOR1* durch die fehlende Repression durch das $\alpha 1$ - $\alpha 2$ -Heterodimer induziert. Die Aktivierung positiver Feedback-Schleifen resultiert in der Induktion der Transkriptionsfaktoren *CZF1*, *WOR2* und *WOR1*, was zu einer verminderten Expression von *EFG1* führt. Abbildung aus (Zordan *et al.*, 2007).

Transkriptionsanalysen mit Hilfe von DNA-Microarrays zeigen, dass während des Phänotypwechsels von *white*- zu *opaque*-Zellen etwa 400 Gene differentiell reguliert werden. Die Regulation aller dieser Gene wird letztlich von *WOR1* kontrolliert. Von diesen ist etwa jeweils eine Hälfte in der *white*-, die andere in der *opaque*-Phase induziert. Untersucht wurden dafür bezüglich des Paarungslokus homozygote Zellen der *C. albicans*-Stämme CAI4 (Paarungstyp *MTLa*) und WO-1 (Paarungstyp *MTLa*), für welchen der *white/opaque*-Wechsel zum ersten mal beschrieben wurde (Lan *et al.*, 2002; Slutsky *et al.*, 1987; Tsong *et al.*, 2003). Zu den während des *white/opaque*-Wechsels differentiell regulierten Genen gehören auch Mitglieder der *PRY*-Familie. So ist *RBT4* in *white*-Zellen sowie *ORF19.2787* in *opaque*-Zellen induziert. Ferner zeigen Chromatin-Immunpräzipitationen eine direkte Bindung des Hauptregulators des *white/opaque*-Wechsels, Wor1p, sowie des Transkriptionsfaktors Mcm1p an den Promotor von *RBE1* in *opaque*-Zellen des Paarungstyps a (Zordan *et al.*, 2007). Da die Aminosäuresequenz von Wor1p keines der konventionellen Motive für die Sequenzspezifische Bindung an die DNA aufweist, ist die genaue Bindestelle innerhalb des *RBE1*-Promotors durch Sequenzvergleiche allerdings nicht näher bestimmbar. Wor1p bindet in *C. albicans* zusammen mit Mcm1p an regulatorische Sequenzen von Genen, die wichtig für Adaption an den Wirt sind, so z.B. auch an Gene, die den *white/opaque*-Wechsel regulieren wie *EFG1*, *CZF1* und *WOR1* selbst (Tuch *et al.*, 2008). Daher wurde die Regulation der *PRY*-Familie während des *white/opaque*-Wechsels in Stämmen der Paarungstypen *MTLa* und *MTLa* des Wildtypstammes SC5314 untersucht.

Homozygotität für den Paarungslokus des Wildtypstammes SC5314 wurde in dieser Arbeit durch Kultivierung auf L-Sorbose als Kohlenstoffquelle und anschließendem Wachstum auf YPD-Medium hergestellt (Janbon *et al.*, 1998; Magee and Magee, 2000; Rustchenko *et al.*, 1994). Spontan zur *opaque*-Form gewechselte Zellen dieser Stämme wurden anhand mehrerer

Kriterien auf ihre Identität als *opaque*-Zellen hin überprüft: der Farbe und Morphologie der Kolonien auf Festmedium, der Zellform und -größe der einzelnen Zellen (Abb. 22) sowie der Induktion Zellform-spezifischer Gene. Dabei zeigt sich in *opaque*-Zellen beider Paarungstypen eine starke Induktion der *white/opaque*-Regulatoren *WOR1* und *CZF1*, sowie eine Zellform-typische Regulation der *white*- bzw. *opaque*-spezifischen Gene *OP4*, *SAP1* und *ALS2* (Tab. 18). Dies zeigt, dass sich die analysierten Stämme tatsächlich in der *opaque*-Phase befanden.

Die in dieser Arbeit mittels quantitativer RT-PCR durchgeführten Transkriptionsanalysen für diese Stämme zeigen eine differentielle Regulation aller Mitglieder der *PRY*-Familie während des *white/opaque*-Wechsels von *C. albicans*. Dies gilt in besonderem Maße für Zellen des Paarungstyps α (Tab. 19).

Dabei bestätigt sich zunächst die beschriebene Induktion für *RBT4* in *white*- bzw. von *ORF19.2787* in *opaque*-Zellen dieser Stämme (Lan *et al.*, 2002; Tsong *et al.*, 2003). Die Transkription von *RBE1* ist ebenfalls in *opaque*-Zellen induziert, mit einem Faktor von 2,3 dabei ähnlich stark wie *ORF19.2787*. Für die beiden weiteren Mitglieder der *PRY*-Familie, *ORF19.6200* und *ORF19.2336*, zeigt sich eine Induktion in *white*-Zellen beider Paarungstypen um einen Faktor zwischen 2,5 und 3. Ihre Regulation entspricht damit derjenigen von *RBT4* in Zellen des Paarungstyps α .

Ein Zusammenhang zwischen der Regulation von *EFG1* und der Repression von *RBT4* sowie der Induktion von *RBE1* in *opaque*-Zellen lässt sich dabei nicht herstellen. *EFG1* ist in α -Zellen des Wildtypstammes zwar schwach reprimiert (Tab. 18), was zu einer verminderten Expression von *RBT4* bzw. zu einer Aufhebung der Repression von *RBE1* führen könnte. Allerdings führt die in α -Zellen im Vergleich zu α -Zellen stärkere Repression von *EFG1* nicht zu einer verminderten Expression von *RBT4* bzw. einer stärkeren Induktion von *RBE1* in diesen Zellen. Damit erfolgt die Regulation von *RBT4* während des *white/opaque*-Wechsels – im Gegensatz zu der Regulation während des morphogenetischen Wechsels von Blastosporen- zu Hyphenwachstum (s.o.) - entweder indirekt durch *EFG1* oder es sind unterschiedliche Regulationswege für die Expression von *RBT4* in *white*-Zellen der Paarungstypen α und α verantwortlich. Als möglicher Aktivator für *RBE1* in *opaque*-Zellen des Paarungstyps α kommt *WOR1* selbst in Frage, da in Zellen dieses Paarungstyps eine direkte Bindung von *WOR1* an den Promotor von *RBE1* nachgewiesen werden konnte (Zordan *et al.*, 2007).

In Zellen des Paarungstyps α zeigt sich keine bzw. eine nur geringe Regulation von *RBE1*, *RBT4* und *ORF19.2787* während des *white/opaque*-Wechsels. Dies ist möglicherweise auf die unterschiedliche Regulation des zu Normalisierung der für die RT-PCR eingesetzten Mengen an cDNA verwendeten Gens *ENO1* in Zellen des Paarungstyps α zurückzuführen. Dies scheint in *opaque*-Zellen dieses Paarungstyps stärker exprimiert zu sein, weshalb die Regulation der untersuchten Gene durch die Normalisierung geringer erscheint (Tab. 19). Allerdings zeigt die transkriptionelle Analyse Zellform-spezifischer Gene ebenfalls deutliche Unterschiede im Vergleich der Paarungstypen α und α . So sind die *opaque*-spezifischen Gene *OP4* und *SAP1* sowie das *white*-spezifische Gen *ALS2* in Zellen des Paarungstyps α ebenfalls

deutlich geringer reguliert als in Zellen des Paarungstyps a (Tab. 18). Eine vom Paarungstyp abhängige Regulation ist für *SAP1* ebenfalls bereits in der Literatur beschrieben worden (Miller and Johnson, 2002). Daher besteht die Möglichkeit, dass die unterschiedliche Regulation der drei genannten *PRY*-Gene auf mögliche regulatorische Unterschiede zwischen den beiden Paarungstypen zurückzuführen ist. Dafür spricht möglicherweise auch die für beide Paarungstypen vergleichbare Regulation von *ORF19.6200* und *ORF19.2336*

In dieser Arbeit wurden zwei Bedingungen untersucht, bei denen die physiologische Expression von *EFG1* reprimiert ist: die morphogenetischen Wechsel von der Hefe- zur Hyphenform, sowie von der *white*- zur *opaque*-Zellform. In beiden Fällen lässt sich jedoch keine Induktion der *RBE1*-Expression nachweisen, die der De-Repression von *RBE1* im Δ *efg1*-Stammhintergrund vergleichbar wäre. Dies ist möglicherweise in einer Zellzyklus-spezifischen Regulation der *PRY*-Gene begründet, wie dies für *Pry1p* – *Pry3p* in *S. cerevisiae* der Fall ist (Spellman *et al.*, 1998) (<http://genome-www.stanford.edu/cellcycle>). Da *C. albicans*-Kulturen unter gewöhnlichen Laborbedingungen bezüglich des Zellzyklus nicht synchronisiert sind, lässt sich eine entsprechende Induktion der Transkription von *RBE1* nicht nachweisen, da sie jeweils nur einen Bruchteil der untersuchten Zellen betraf.

Eine entsprechende Induktion von *RBE1* ließe sich möglicherweise durch einen Pheromon-induzierten Zellzyklus-Arrest in nach Exposition von *opaque*-Zellen gegenüber den synthetischen a- oder α -Pheromonen nachweisen (Bennett and Johnson, 2006). Dafür spricht ebenfalls, dass ein niedriges Expressionsniveau von *EFG1* in einem Abkömmling von SC5314 zu einem *opaque*-ähnlichen Phänotyp führt (Sonneborn *et al.*, 1999b) und die Zellen möglicherweise bereits in ihrem Zellzyklus arretiert sind. Träfe dies ebenfalls auf den Δ *efg1*-Deletionsstamm zu, könnte die beobachtete *RBE1*-Induktion unter diesen Umständen zutage treten.

Ferner fällt auf, dass die Transkription von *EFG1* in *opaque*-Zellen des Wildtypstammes SC5314 während des exponentiellen Wachstums vergleichsweise schwach reguliert ist (Tab. 18). *EFG1* ist ein Repressor der Bildung von *opaque*-Zellen (Sonneborn *et al.*, 1999b; Srikantha *et al.*, 2000) und wird durch transkriptionelle Feedback-Schleifen durch die Transkriptionsfaktoren *CZF1* und *WOR1* reprimiert (Abb. 55; (Zordan *et al.*, 2007)). Eine Deletion von *EFG1* führt in Zellen, die homozygot für den Paarungslokus sind, zu einem Wechsel zur *opaque*-Zellform in der Mehrheit der Population und *EFG1* gilt daher als Repressor des *opaque*-Status (Sonneborn *et al.*, 1999b; Srikantha *et al.*, 2000; Zordan *et al.*, 2007). Während in der Literatur in *opaque*-Zellen verschiedener Stämme Northern Blot-Analysen kein Transkript für *EFG1* nachgewiesen werden konnte (Sonneborn *et al.*, 1999b; Zhao *et al.*, 2005) und sich in Microarray-Analysen eine etwa 7- bis 8-fache Repression für *EFG1* in *opaque*-Zellen des Stammes CAI4 (Tsong *et al.*, 2003) zeigte, ist die Repression von *EFG1* mit einem Faktor von 1,3 in a-Zellen bzw. von 2,6 in α -Zellen in den in dieser Arbeit analysierten *opaque*-Zellen vergleichsweise schwach, obwohl sowohl *CZF1* als auch *WOR1* in diesen Zellen stark induziert sind (Tab. 18). Zum Zeitpunkt der Analyse befand sich die

überwiegende Menge der analysierten Zellen in der *opaque*-Zellform (Abb. 22), so dass eine Verfälschung der Regulationswerte für *EFG1* durch eine größere Menge noch vorhandener *white*-Zellen nicht wahrscheinlich ist.

Bezüglich des Modells für die stabile Aufrechterhaltung der *opaque*-Phase über viele Generationen scheint die Repression von *EFG1* zu den in dieser Arbeit untersuchten Zeitpunkten im Wildtyp-Stamm SC5314 – im Gegensatz zu den in der Literatur verwendeten *URA3*-defizienten Stämmen - einen geringeren Effekt auf diese zu haben, als vielmehr die starke Induktion von *WOR1* durch die dargestellten positiven Feedback-Schleifen (Abb. 55), welche zur Induktion *opaque*-spezifischer Gene führt. Es ist weiterhin möglich, dass für den Wechsel von der *white*- zur *opaque*-Phase lediglich eine kurzfristige Repression der *EFG1*-Transkription erforderlich ist, vergleichbar mit der Situation bei der Induktion filamentösen Wachstums, bei der eine derartige Regulation von *EFG1* beschrieben wurde (Stoldt *et al.*, 1997; Tebarth *et al.*, 2003). Dieses Regulationsmuster würde dafür sprechen, dass nach einer Unterbrechung der transkriptionellen Feedback-Schleifen, die zur Aufrechterhaltung der *opaque*-Phase führen, hauptsächlich die durch *WOR1* reprimierten *white*-spezifischen Gene für den Wechsel von der *opaque*- zur *white*-Phase erforderlich sind. Tatsächlich führt die Deletion von *EFG1* in Zellen die homozygot für den Paarungslokus sind, nicht zu ausschließlichem Wachstum in der *opaque*-Phase (Zordan *et al.*, 2007). Das Vorhandensein von weißen Zellen in diesen Stämmen verdeutlicht ebenfalls, dass *EFG1* nicht strikt für das Wachstum in der *white*-Phase erforderlich ist.

3. Der Minimalpromotor von *RBE1* besitzt eine Länge von 1 kb und beinhaltet eine aktivierende und eine reprimierende Domäne

Für eine detailliertere Analyse der Regulation von *RBE1*, stellvertretend für die Mitglieder der *PRY*-Familie, wurden systematische Promotoranalysen für dieses Gen durchgeführt. *lacZ*-Analysen mit Fragmenten unterschiedlicher Länge des oberhalb des Startkodons von *RBE1* gelegenen regulatorischen Bereiches identifizierten einen Bereich von 1039 bp Länge, der für eine der physiologischen Situation entsprechende Regulation von *RBE1* notwendig ist. Für diese Identifikation des Minimalpromotors von *RBE1* wurden Abschnitte unterschiedlicher Länge dieses regulatorischen Bereiches in ein Plasmid ligiert, welches ein für die Expression in *C. albicans* optimiertes *lacZ*-Gen für eine β -Galaktosidase aus *Streptococcus thermophilus* enthält (Uhl and Johnson, 2001b). In dieser Arbeit wurde in dieses Plasmid zusätzlich das *RP10*-Gen von *C. albicans* eingefügt, um die konstruierten Plasmide an diesem Locus in das Genom von *C. albicans* integrieren zu können. Der *RP10*-Lokus wird häufig für die ektopische Expression von Genen in *C. albicans* verwendet, da er zum einen eine hohe Transformationseffizienz (Care *et al.*, 1999) und zum anderen hohe Expressionslevel der integrierten Gene gewährleistet (Murad *et al.*, 2000). Dies macht ihn auch für die ektopische Expression des häufig verwendeten Auxotrophiemarkers *URA3* geeignet (Brand *et al.*, 2004). Für die Überprüfung der transkriptionellen Aktivität der Promotorbereiche von *RBE1* wurden

die konstruierten Plasmide in den *URA3*-auxotrophen, zum Wildtyp isogenen Stamm CAI4 sowie den Δ *efg1*-Deletionsstamm HLC67 integriert. Da im Δ *efg1*-Deletionsstamm durch das Fehlen des transkriptionellen Repressors von *RBE1*, Efg1p, eine starke transkriptionelle Aktivität des funktionalen Minimalpromotors von *RBE1* zu erwarten ist, sollte diese bei Vorhandensein aller regulatorisch erforderlichen Sequenzen zu detektieren sein. Jeweils vier unabhängig transformierte *C. albicans*-Stämme wurden auf die Expression des β -Galaktosidase-Gens durch die Umsetzung des farblosen Substrats X-Gal zu einem blauen Farbstoff mittels Filtertests überprüft. Eine Blaufärbung trat nach Aufschluss der Zellen und Substratzugabe nur bei dem Promotorfragment von 1 kb im Δ *efg1*-Deletionsstamm, nicht aber bei einer Länge von 0,5 kb und nicht in Stamm CAI4 auf. Dies entspricht der durch transkriptionelle Analysen in dieser Arbeit festgestellten Regulation von *RBE1* einer starken Induktion in Abwesenheit von *EFG1* (Abb. 19), als auch den Ergebnissen vorhergehender Arbeiten (Sohn *et al.*, 2003). Damit besitzt der Minimalpromotor von *RBE1*, der für eine physiologische Regulation erforderlich ist, eine Länge von 1039 bp.

4. Regulatorische Domänen innerhalb des *RBE1*-Minimalpromotors weisen konservierte Bindemotive für Regulatoren der Morphogenese und der Paarung auf

Regulatorische Domänen innerhalb des definierten *RBE1*-Minimalpromotors wurden durch Deletionsstudien identifiziert. Fragmente von etwa 200 bp Länge wurden aus dem Promotor von *RBE1* entfernt und die so erhaltenen Deletionskonstrukte auf transkriptionelle Aktivität anhand der Expression einer nachgeschalteten β -Galaktosidase, wie unter 4.3 beschrieben, untersucht. Ein Fragment von 178 bp Länge direkt oberhalb des Startkodons von *RBE1* wurde dabei im Promotor belassen, um eine Aktivierung der Transkription durch die generelle Transkriptionsmaschinerie zu gewährleisten. Der restliche Bereich wurde in vier Fragmente von etwa 200 bp Länge unterteilt, von denen jeweils eines für die Expressionsstudien entfernt wurde. Entsprechend konstruierte Plasmide wurden in den *RP10*-Lokus in das Genom des *URA3*-auxotrophen, zum Wildtyp isogenen Stamm CAI4 sowie des Δ *efg1*-Deletionsstammes HLC67 integriert und die transkriptionelle Aktivität der Deletionskonstrukte des *RBE1*-Promotors durch Aktivitätsmessung der von ihnen kontrollierten β -Galaktosidase – wie für die Identifikation des Minimalpromotors unter 4.4 beschrieben – untersucht. Jeweils vier unabhängige Transformanten für jedes Deletionskonstrukt wurden für die Identifikation der aktivierenden Domäne im Δ *efg1*-Deletionsstamm HLC67, bzw. für die Identifikation der reprimierenden Domäne in Stamm CAI4 in Färbetests untersucht. Dabei zeigte Fragment RIV von -779 bp bis -1039 bp des Minimalpromotors eine aktivierende Funktion in dem in Abwesenheit von Efg1p sehr stark aktiven Promotor, da eine Transkription der β -Galaktosidase nur in Anwesenheit dieses Fragmentes erfolgt, nicht aber, wenn dieses fehlt (Abb. 30). Im Wildtyp-Stamm ist der *RBE1*-Promotor in Blastosporen sehr stark in Abhängigkeit von Efg1p reprimiert (Abb. 19). Daher kann dieser Promotor nur aktiv sein, wenn die reprimierende Domäne fehlt und diese nicht gleichzeitig Bindestellen für essentielle

Aktivatoren der Transkription enthält. Das trifft für einen Bereich von -178 bp bis -401 bp des *RBE1*-Promotors zu (Fragment RI). Fehlt dieser, ist der Promotor transkriptionell aktiviert, in Anwesenheit dieses Fragmentes findet keine – messbare – Transkription von diesem Promotor statt (Abb. 31).

Um nähere Erkenntnisse über die Regulation von *RBE1* auf Transkriptionsebene zu erhalten, wurden die Sequenzen der beiden regulatorischen Domänen RI und RIV des *RBE1*-Promotors auf das Vorhandensein von Konsensusmotiven für DNA-bindende Proteine hin analysiert. Dabei zeigt sich, dass in beiden Domänen des *RBE1*-Promotors Konsensussequenzen für transkriptionelle Regulatoren von Prozessen der Morphogenese, Virulenz und Paarung in Pilzen enthalten (Tab. 21 und Abb. 33). Dies befindet sich im Einklang mit der differentiellen Regulation von *RBE1* während der Morphogenese und des für die Paarung notwendigen phänotypischen Wechsels von der *white*- zur *opaque*-Zellform sowie der Beteiligung von *RBE1* an der Virulenz von *C. albicans* (vgl. Punkt 2 und 9). Bei den Konsensusmotiven für DNA-bindende Proteine handelt es sich dabei um Bindungsmotive für Transkriptionsfaktoren der Klasse der basischen Helix-Loop-Helix- (bHLH-), HMG-Box- und Homeodomänproteine. Für jede dieser Klassen existieren nur wenige Mitglieder in *C. albicans*.

In der Aktivierungsdomäne für die *RBE1*-Expression RIV finden sich Bindestellen für Orthologe der *C. albicans*-Transkriptionsfaktoren Efg1p (bHLH-Protein) – sog. E-Box- und MCB-Box-Motive -, Fil2p (Homeodomän-Protein) und Rfg1p (HMG-Box-Protein). Von diesen kommt Efg1p nicht als Aktivator der *RBE1*-Transkription in Frage, da Efg1p nicht an diese Domäne bindet (s.u.) sowie als Repressor von *RBE1* fungiert und *RBE1* in Abwesenheit von Efg1p sehr stark induziert ist (Abb. 19; (Sohn *et al.*, 2003)). Das potenzielle *C. albicans*-Ortholog von Pho2p aus *S. cerevisiae*, Fil2p (*ORF19.4000*), ist ein bisher nicht charakterisiertes Protein in *C. albicans*, besitzt aber möglicherweise eine Funktion als transkriptioneller Aktivator (<http://www.candidagenome.org>). Rfg1p fungiert in Blastosporen als transkriptioneller Repressor Hyphen- und Virulenz-spezifischer Gene durch die Rekrutierung des transkriptionellen Repressors Tup1p an die Promotoren der betreffenden Gene. Auf diese Weise wird auch die Expression des *PRY*-Gens *RBT4* in Blastosporen reprimiert. Unter bestimmten Hyphen-induzierenden Bedingungen besitzt Rfg1p aber *in vitro* auch eine Funktion als transkriptioneller Aktivator (Kadosh and Johnson, 2001). Das zweite bHLH-Protein in *C. albicans*, Efh1p, scheint ebenfalls nicht an der Aktivierung von *RBE1* beteiligt zu sein. Efh1p besitzt zwar eine Funktion als transkriptioneller Aktivator, jedoch ist die Transkription von *RBE1* in einem $\Delta efg1/efh1\Delta$ -Deletionsstamm ebenfalls induziert (Doedt *et al.*, 2004). Weitere Homeodomän-Proteine in *C. albicans* sind Cph1p, sowie MTLa1p und MTLa2p (Liu *et al.*, 1994; Miller and Johnson, 2002). Cph1p ist ein Regulator der Morphogenese, der an der Repression von *RBE1* beteiligt ist, da die Expression von *RBE1* in einem $\Delta efg1/\Delta cph1$ -Doppel-Deletionsstamm gegenüber einem $\Delta efg1$ -Deletionsstamm erhöht ist (Sohn *et al.*, 2003). Tatsächlich findet sich eine Bindestelle für das Cph1p-Homolog Ste12p in Fragment RI des *RBE1*-Promotors. MTLa1p und MTLa2p werden vom Paarungslokus in *C. albicans* exprimiert und reprimieren als Heterodimer den *white/opaque*-

Wechsel durch indirekte Regulation und haben eine direkte Rolle als transkriptionelle Repressoren (Tsong *et al.*, 2003). Als HMG-Box-Proteine in *C. albicans* sind neben Rfg1p nur MTLa2p und Gcf1p beschrieben worden (Tsong *et al.*, 2003), von denen Gcf1p an der Organisation des Mitochondrien-Genoms beteiligt ist (Visacka *et al.*, 2009) sowie an den Promotor des Hypen-spezifischen Zellwandproteins *HWPI* bindet und möglicherweise zur Repression dieses Gens in Blastosporen beiträgt (Kim *et al.*, 2007). MTLa2p ist ein positiver Regulator der Paarung von *opaque*-Zellen des Paarungstyps a und induziert dort nach Stimulation durch α -Pheromon Gene, die für die Paarung dieser Zellen erforderlich sind (Tsong *et al.*, 2003). Ob Transkriptionsfaktoren wie Fil2p, Rfg1p oder MTLa2p auch an der transkriptionellen Aktivierung Blastosporen- bzw. *opaque*-spezifischer Gene wie *RBE1* beteiligt sein können ist bisher nicht beschrieben. Eine entsprechende regulatorische Funktion dieser Gene würde sich durch die Deletion dieser Gene in einem Deletionsstamm für Efg1p durch die fehlende Induktion von *RBE1* in diesen Stämmen zeigen.

Dies gilt ebenfalls für den Morphogenese-Regulator Tec1p (Schweizer *et al.*, 2000), für dessen Ortholog AbaA aus *S. cerevisiae* sich eine Konsensussequenz am 5'-Ende der aktivierenden Domäne RIV befindet (Abb. 33). Tec1p besitzt eine mögliche aktivierende Funktion von Tec1p auf die Expression von *RBE1* (Abb. 19 und Punkt 2).

Heterologe Expression von Efg1p

In der Reprimierungsdomäne RI des *RBE1*-Promotors befinden sich mind. zwei mögliche Bindestellen für Transkriptionsfaktoren der basischen Helix-Loop-Helix- (bHLH-) Familie. Dies sind Konsensussequenzen für den bHLH-Transkriptionsfaktor Pho4p aus *S. cerevisiae*, sowie für bHLH-PAS-Proteine (Crews, 1998). Für DNA-bindende Proteine der bHLH-Klasse sind jedoch zahlreiche weitere Bindestellen beschrieben worden (Ledent and Vervoort, 2001; Robinson and Lopes, 2000). Der Helix-Loop-Helix-Teil der bHLH-Domäne dient der Ausbildung von Homo- oder Heterodimeren (Blackwell and Weintraub, 1990; Ma *et al.*, 1994; Murre *et al.*, 1989b; Review: Massari and Murre, 2000). Die Kombination der basischen Teile erlaubt daraufhin die Bindung verschiedener Hexanukleotidsequenzen auf der DNA (Ellenberger *et al.*, 1994; Ledent and Vervoort, 2001).

Efg1p gehört zur Familie der APSES-Transkriptionsfaktoren, die morphogenetische Prozesse in Pilzen regulieren (Stoldt *et al.*, 1997). Die konservierte APSES-Domäne dieser Proteine soll die Ausbildung einer basischen Helix-Loop-Helix- (bHLH-) Struktur erlauben. Efg1p ist ein DNA-bindendes Protein, das *in vitro* an mind. drei verschiedene Zielsequenzen bindet, darunter ein E-Box-, sowie ein MCB-Box-Motiv (Leng *et al.*, 2001; Noffz *et al.*, 2008). Über ein weiteres Bindungsmotiv für Efg1p wurde berichtet, dieses aber noch nicht veröffentlicht (Noffz *et al.*, 2008). Die APSES-Domäne des Transkriptionsfaktors StuAp aus *A. nidulans* bindet ebenfalls Sequenz-spezifisch an ein MCB-Box-Motiv (Dutton *et al.*, 1997).

Da die Repression von *RBE1* unter verschiedenen Bedingungen von Efg1p vermittelt wird (Sohn *et al.*, 2003), wurde untersucht, ob Efg1p die Expression von *RBE1* direkt durch spezifische Bindung an die regulatorischen Domänen des *RBE1*-Promotors kontrolliert. Ein für die universelle Kodonverwendung optimiertes *EFGI*-Gen wurde dafür heterolog in *E. coli* exprimiert und als Fusionsprotein mit dem Maltose-bindenden Protein (MBP) nach Induktion und Aufschluss der Bakterienzellen mittels Amylose-Chromatographie aufgereinigt (Abb. 34-36). *Western Blot*-Analysen mit einem durch Immunisierung von Kaninchen mit Peptiden vom C-Terminus der translatierten *EFGI*-Sequenz hergestellten α -Efg1p-Antikörper sowie einem α -MBP-Antikörper zeigten das erwartete Molekulargewicht des aufgereinigten Fusionsproteins (Abb. 12, 37). Mittels Bindungsstudien (*Electrophoretic Mobility Shift Assays (EMSA)*, (Carey, 1991; Kerr, 1995; Shore and Nasmyth, 1987)) konnte allerdings keine direkte Bindung dieses Fusionsproteins an die regulatorischen Domänen des *RBE1*-Promotors nachgewiesen werden, so dass die Repression von *RBE1* wahrscheinlich nicht direkt durch Efg1p vermittelt wird (Abb. 38). Auch in Chromatin-Immunpräzipitationen (ChIP) mit an der DNA immobilisiertem Efg1p konnten die Fragmente des *RBE1*-Promotors nicht nachgewiesen werden (E. Setiadi, Universität Düsseldorf, persönliche Kommunikation). Dies ist ein weiterer Hinweis auf eine eher indirekte Rolle von Efg1p bei der Regulation von *RBE1*. Das aufgereinigte Efg1-MBP-Fusionsprotein zeigt dagegen in Positivkontrollen eine mögliche Bindung an ein DNA-Fragment, welches eine E-Box enthält und das ebenfalls in der Literatur für den Nachweis der Bindung von Efg1p an diese Konsensussequenz verwendet wurde (Abb. 38) (Leng *et al.*, 2001). Die Spezifität der in dieser Arbeit gezeigten Bindung des heterolog exprimierten Efg1p an die E-Box-Konsensussequenz muss allerdings noch näher untersucht werden. Dafür wären Kompetitionsversuche geeignet, wobei ein Überschuss an spezifischem, nicht-markiertem DNA-Fragment das markierte DNA-Fragment aus dem Protein-DNA-Komplex verdrängen sollte. Ferner wäre es von Interesse, ob das heterolog exprimierte Efg1p auch nach Abspaltung von MBP in der Lage ist, direkt an die DNA zu binden. Dies wäre der erste Nachweis für eine direkte Bindung aufgereinigten Efg1ps an die DNA. Diese spezifische Bindung ist bis jetzt nur mit Rohextrakten der heterologen Expression von Efg1p und daher indirekt gezeigt worden (Leng *et al.*, 2001). Die spezifische Bindung von Efg1p wäre zudem ein direkter Hinweis auf eine Homodimerisierung von Efg1p, welche in Zwei-Hybrid-Versuchen bis jetzt nicht nachgewiesen werden konnte (Doedt *et al.*, 2004).

Die Reprimierungsdomäne RI des *RBE1*-Promotors enthält ferner mögliche Bindestellen für die *C. albicans*-Orthologe Rfg1p, Cph1p und Rap1p, sowie weitere Bindestellen für Transkriptionsfaktoren der HMG-Box-Klasse (Abb. 33). Eine reprimierende Funktion auf die Transkription von *RBE1* wurde für Cph1p bereits gezeigt. Cph1p trägt unter verschiedenen Bedingungen zur Efg1p-vermittelten Repression von *RBE1* bei, übt dabei aber nur einen vergleichbar schwachen Effekt aus (Sohn *et al.*, 2003). Als mögliche Repressoren für die *RBE1*-Transkription kommen sowohl Rfg1p als auch Rap1p in Frage, da für beide Proteine bereits reprimierende Funktionen beschrieben wurden (Biswas *et al.*, 2003; Kadosh and Johnson, 2001; Uemura *et al.*, 2004). Dies gilt ebenfalls für den Transkriptionsfaktor Rbf1p,

einem Repressor filamentösen Wachstums, welcher ebenso wie Rap1p an das in Fragment RI vorhandene RPG-Box-Konsensusmotiv binden kann (Ishii *et al.*, 1997; Uemura *et al.*, 2004). Ferner kommt dem HMG-Box-Protein Gcf1p ebenfalls eine mögliche reprimierende Funktion zu (s.o.). Eine reprimierende Funktion dieser Transkriptionsfaktoren auf die Expression von *RBE1* würde sich durch eine Induktion der *RBE1*-Transkription bei Deletion der entsprechenden Gene im Wildtypstamm nachweisen lassen.

Bindungsstudien mit heterolog exprimiertem Tec1p

Da der Transkriptionsfaktor Tec1p eine mögliche aktivierende Funktion auf die Expression von *RBE1* besitzt (Abb. 19, Punkt 2) und sich am 5'-Endes der Aktivierungsdomäne RIV des *RBE1*-Minimalpromotors eine Bindemotiv für Tec1p befindet, wurde ebenfalls eine mögliche direkte Bindung von heterolog exprimiertem Tec1p an die *RBE1*-Promotorsequenz untersucht (zur Verfügung gestellt von M. Sehnal, Dr. K. Schröppel, Tübingen; persönl. Kommunikation). Tec1p gehört der zur Familie der TEA/ATTS-Familie von Transkriptionsfaktoren, die an der Regulation der Morphogenese von Pilzen beteiligt sind (Schweizer *et al.*, 2000). Bei der Verwendung von Rohextrakten von *E. coli* mit induzierter rTec1p-Expression konnte in Bindungsstudien eine Bindung an Fragment RIV beobachtet werden. Dies war weder für Fragment RI sowie in Negativ-Kontrollen mit Rohextrakten aus Bakterien, die das für die Expression verwendete Plasmid ohne *TEC1*-Gen enthielten, der Fall, was auf eine mögliche Bindung von Tec1p an die aktivierende Domäne des *RBE1*-Promotors hindeutet. Allerdings konnte diese Bindung mit über Affinitätschromatographie aufgereinigtem rTec1p nicht gezeigt werden. Dies wäre für den eindeutigen Nachweis der spezifischen Bindung von Tec1p an den *RBE1*-Promotor erforderlich. Zusätzlich müsste diese Bindung auch in Kompetitionsstudien revertierbar sein.

5. Die Pry-Proteine Rbe1p und Rbt4p sind sekretierte Proteine in *C. albicans*

Die beiden Genprodukte von *RBE1* und *RBT4* lassen sich massenspektrometrisch in den Kulturüberständen des *C. albicans*-Wildtypstammes SC5314 nachweisen. Dabei findet sich Rbe1p in Kulturüberständen von Blastosporen, die bei 30°C kultiviert wurden, aber nicht in Überständen von Hyphen, die bei 37°C kultiviert wurden. Rbe1p ist damit ein Bestandteil des in Abhängigkeit von der Morphogenese differentiell regulierten Sekretoms von *C. albicans* (Tab. 22). Rbt4p findet sich in Überständen von Hyphen, aber auch in Blastosporen. Die in dieser Arbeit durchgeführten lassen zwar keine direkten quantitativen Rückschlüsse zu, allerdings gibt es in einigen Fällen deutliche Unterschiede in der Zahl der biologischen Replikate sowie der Anzahl der identifizierten Peptide für unterschiedliche Proteine. Zu diesen gehört auch Rbt4p, das in allen 3 biologischen Replikaten in den Überständen, allerdings nur einmal in den Überständen von Blastosporen gefunden wurde (Tab. 22). Ein derartiges Sekretionsmuster würde mit der transkriptionellen Induktion von *RBT4* in Hyphen

übereinstimmen. Die Identifikation von Rbe1p und Rbt4p in Kulturüberständen bestätigt auch die in dieser Arbeit sowie in der Literatur mit Hilfe verschiedener Algorithmen vorgenommenen Sequenzanalysen, die beide postulierten Genprodukte dem Sekretom von *C. albicans* zurechnen (Abb. 14; (Lee *et al.*, 2003)). Dabei wird für beide Genprodukte eine für die Sekretion erforderliche hydrophobe Signalsequenz, eine für Zelloberflächenmoleküle bzw. sekretierte Proteine charakteristische Serin-/Threonin-reiche Region, bei gleichzeitigem Fehlen von Transmembrandomänen (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM>) sowie einer Sequenz für das Anfügen eines Glykosylphosphatidylinositol- (GPI-) Restes für die kovalente Verankerung an das β -1,3-Glukan in der Zellwand vorhergesagt. Dass es sich bei beiden Genprodukten um sekretorische Proteine handelt, zeigt auch die heterologe Expression von Rbe1p und Rbt4p in *S. cerevisiae*, bei der sich zwar Zwischen- oder Abbauprodukte sowie die vollständigen Proteine intrazellulär nachweisen lassen, der Hauptteil der gebildeten Fusionsproteine aber im Überstand der entsprechenden Induktionskulturen zu finden ist (Abb. 43, 44). Die massenspektrometrischen Daten bestätigen auch auf Proteomebene die Transkriptionsanalysen für beide Gene, die *RBE1* als v.a. in Blastosporen exprimiertes Gen, *RBT4* als Hyphen-spezifisch exprimiertes Gen ausweisen (Abb. 18-20; (Braun and Johnson, 2000)).

Während der Anfertigung dieser Doktorarbeit wurden ähnliche Ergebnisse für die Zusammensetzung und Regulation des Sekretoms von *Sorgo et al.* gefunden (*Sorgo et al.*, 2010 online-Publikation). Die Autoren dieser Studie identifizierten insgesamt 79 Proteine (im Vergleich zu 39 Proteinen in dieser Arbeit), davon 28 zytosolische Proteine in den Überständen des Wildtypstammes SC5314 (hier: nur 1 zytosolisches Protein (*orf19.7067*)) unter 4 verschiedenen Wachstumsbedingungen auf eine vergleichbare Art und Weise, wie in dieser Arbeit erfolgt, allerdings zu einem späteren Zeitpunkt (18 h, im Vergleich zu 6 h in dieser Arbeit). In semi-quantitativen Auswertungen der Daten beschreiben die Autoren dieser Studie Rbt4p als angereichert unter hyphalen Bedingungen, was mit der transkriptionellen Regulation dieses Gens korreliert und die Ergebnisse der in dieser Arbeit vorgenommenen Sekretom-Analysen unterstützt, bei den Rbt4p in 3 biologischen Replikaten unter hyphalen Wachstumsbedingungen, allerdings nur für ein biologisches Replikat in der Hefeform nachgewiesen werden konnte (Tab. 22). Ferner findet sich das Pry-Protein *ORF19.2787* im Überstand von Blastosporen bei 37°C, pH 4. Vergleicht man die Wachstumsbedingungen, bei denen *C. albicans* ausschließlich als Hyphen bzw. Blastosporen wächst, die den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Bedingungen am Nächsten kommen, finden sich jedoch Abweichungen in der Morphogenese-abhängigen Sekretion für einige der identifizierten Proteine. So finden die Autoren dieser Studie Ecm33p, Pga4p nur in Blastosporen (hier: in Blastosporen und Hyphen), Phr1p und Sod4p nur in Mischkulturen von Blastosporen und Hyphen (37°C, pH7,4) nicht aber in rein hefeförmigen oder hyphalen Kulturen (hier: Phr1p nur in Hyphen, Sod4p nur in Blastosporen), Plb4.5p nur in Blastosporen-Kulturen bei pH4 und 37°C (hier unter beiden Bedingungen), Utr2p nicht in Blastosporen bei 30°C (hier: nur in Blastosporen), Ywp1p nicht in rein hyphalen Kulturen bei 37°C (hier: unter beiden Bedingungen). Nicht gefunden wurden von *Sorgo et al.* Abg1p, Als5p, Asm3p, Ece1p,

Exg2p, Pho100p und Phr2p, die alle über eine Signalsequenz am N-Terminus verfügen, wobei Als5p, Exg2p und Phr2p zusätzlich über potenzielle Sequenzen für das Anfügen eines GPI-Ankers verfügen. Die Unterschiede in den Ergebnissen beider Sekretom-Analysen liegen wahrscheinlich zum einen in den unterschiedlichen Zeitpunkten der Analyse, zum anderen in den leicht unterschiedlichen Induktionsmedien für die Morphogenese begründet (Sorgo *et al.*: YNB mit Saccharose, pH7,4 und pH4; Hypheninduktion durch 5 mM N-Acetylglukosamin). Die Daten finden sich auch in teilweiser Übereinstimmung mit früheren Sekretom-Analysen (Hiller *et al.*, 2007).

Die anderen drei Mitglieder der Pry-Familie (*ORF19.2787*, *ORF19.6200* und *ORF19.2336*) konnten in den analysierten Kulturüberständen nicht nachgewiesen werden. Ihr Fehlen in den Überständen des Doppel-Deletionsstammes für *RBE1* und *RBT4* deutet auf eine von diesen abweichende Funktion hin. Da diese 3 Proteine vergleichbare Sequenzcharakteristika zu *RBE1* und *RBT4* aufweisen (Abb. 14), ist es wahrscheinlich, dass es sich bei den entsprechenden Genprodukten ebenfalls um sekretierte Proteine in *C. albicans* handelt, die jedoch unter anderen Bedingungen, als den in dieser Arbeit untersuchten, exprimiert werden. Dafür spricht, dass *ORF19.2787* von Sorgo *et al.* als sekretorisches Protein im sauren pH gefunden wurde. Es ist daher davon auszugehen, dass es sich bei den Pry-Proteinen in *C. albicans* um eine sekretierte Familie von Proteinen handelt.

6. Die Pry-Proteine Rbe1p und Rbt4p besitzen keine proteolytische Aktivität

Die evolutiven Verwandtschaftsverhältnisse der Superfamilie der CAP-Proteine lassen auf einen frühen gemeinsamen Vorgänger schließen. Dies und der Grad der Sequenz- und Strukturhomologien dieser Proteine deutet auf einen ähnlichen Wirkmechanismus hin (Szyperski *et al.*, 1998).

Strukturell weisen die Pry-Proteine in *C. albicans* unter den CAP-Proteinen die größte Ähnlichkeit zu den Proteinen der PR-1-Familie in Pflanzen auf, die durch Infektionen mit Pathogenen induziert werden (Abb. 10). Die Mitglieder der PR-1-Familie stellen die primitivsten Vertreter der CAP-Proteine dar, deren Sequenz meist kurz nach dem CAP2-Motiv mit einem PY-Dipeptid endet. Dies weist auf eine frühe Entstehung der PR-1-Proteine in der Evolution der CAP-Proteine hin. Andere Mitglieder der Proteinfamilie verfügen über weitere strukturelle Merkmale am C-Terminus, wie eine Cystein-reiche Region von bis zu 60 AS Länge, die den verschiedenen Proteinen multiple Funktionen verleihen (z.B. Regulation von Ionenkanälen durch die CRISP-Proteine aus Reptiliengiften wie Helothermin der Skorpion-Krustenechse (Yamazaki and Morita, 2004)). Die Pry-Proteine in *C. albicans* enthalten alle 4 CAP-Motive, ihnen fehlen jedoch funktionelle Motive am C-Terminus. Ihre Sequenz endet ebenfalls kurz (zw. 8 und 18 AS) nach der CAP-Domäne und ihnen fehlt das PY-Dipeptid (Abb. 13).

Die Bestimmung der NMR-Struktur von P14a und der Kristallstruktur mehrerer CAP-Proteine (darunter Ves v5 (Antigen V5) aus *Vespa vulgaris*, GAPR-1 des Menschen, Na-

ASP-2 aus Nematoden sowie zahlreiche CRISP-Proteine aus Schlangengift, z.B. Stecrisp, Natrin; (Asojo *et al.*, 2005; Fernandez *et al.*, 1997; Henriksen *et al.*, 2001; Serrano *et al.*, 2004; Yamazaki and Morita, 2004)) zeigt eine ähnliche Struktur der konservierten CAP-Domäne für alle analysierten Proteine. Diese besitzt eine einzigartige α - β - α -Faltung, die durch ein Netzwerk von Wasserstoffbrücken-Bindungen und – außer bei GAPR-1 – mehreren Disulfidbrücken stabilisiert wird. Die Mitglieder der Pry-Familie in *C. albicans* weisen dabei wie die CRISP-Proteine der Vertebraten in der CAP-Domäne 4 Cysteine auf, während das PR-1-Protein P14a 6 Cysteine in dieser Domäne aufweist. Diese drei-dimensionale Struktur verleiht den CAP-Proteinen die beschriebene Hitze-, pH- und proteolytische Stabilität, die mit den strukturellen Anforderungen extrazellulär wirkender Proteine übereinstimmt (Fernandez *et al.*, 1997) (Abb. 56).

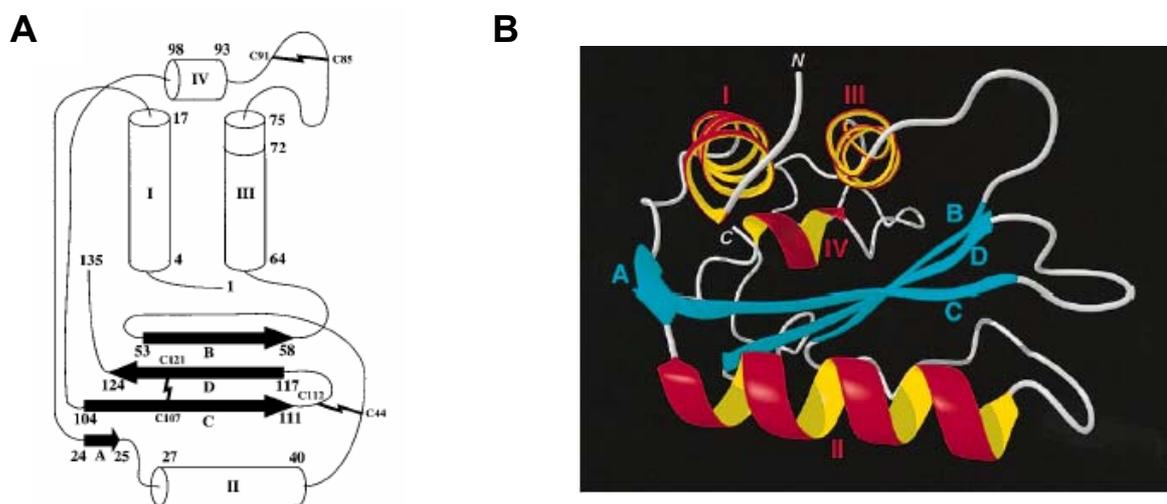


Abb. 56: Die α - β - α -Faltung der CAP-Domäne von P14a (*Lycopersicon esculentum*).

A. Sekundärstrukturen. **B.** Ribbon-Darstellung des α - β - α -„Sandwichs“. I-IV: α -Helices (rot und gelb), „A“-„D“: β -Stränge (cyan), grau: weitere Sequenzen des Polypeptids, „Cxx“: konservierte Cysteinreste mit Disulfidbrücken. Abbildung aus (Fernandez *et al.*, 1997).

Ein Vergleich der Tertiärstrukturen aller bekannten CAP-Proteine zeigt, dass alle beschriebenen CAP-Domänen konservierte Aminosäuren besitzen, von denen nur sieben über Medium-exponierte Seitenketten verfügen. Diese sind wichtig für die Interaktion mit anderen Proteinen in Lösung. Konservierte Aminosäuren dieser Art könnten für spezifische Interaktionen und enzymatisch aktive Zentren von Bedeutung sein. Einige befinden sich in Medium-exponierten Spalten an der Oberfläche der Proteine, welche mögliche aktive Zentren darstellen. Von besonderer Bedeutung sind dabei 2 konservierte Histidine, die sich im Zentrum der untersuchten Spalten befinden, was auf eine mögliche Beteiligung an einer enzymatischen Funktion hinweist sowie saure Aminosäuren (i.d.R. Glutaminsäure). Die Histidinreste bilden eine Struktur mit Ähnlichkeit zu aktiven Zentren von Proteasen und könnten der Bindung divalenter Kationen dienen. Hinsichtlich ihrer Struktur verfügen die CAP-Proteine über einige Eigenschaften einer Protease, es fehlt ihnen jedoch ein vollständig

aktives Zentrum in Form einer Aminosäuren-Triade, wie sie in klassischen Proteasen vorhanden ist (Gibbs *et al.*, 2008; Szyperski *et al.*, 1998).

Die einzige bis jetzt postulierte molekulare Funktion für ein Mitglied der Superfamilie der CAP-Proteine ist eine Proteasefunktion für das Protein Tex31p der räuberischen Meeresschnecke *Conus textile* (Milne *et al.*, 2003). Die Autoren isolierten Tex31p anhand einer spezifischen Proteaseaktivität aus dem Giftkanal von *C. textile* als sekretiertes Protein. Das Gift dieser Schnecken enthält neuroaktive Peptide (sog. Conotoxine), die durch Sequenzspezifische Spaltung aus Vorläuferstufen (Propeptiden) entstehen. Das sekretierte Protein besitzt eine Länge von 276 AS und zeigt innerhalb der CAP-Superfamilie die nächste Verwandtschaft zu den CRISP-Proteinen (*cysteine-rich secretory proteins*; darunter z.B. Helothermin), die sich durch eine Cystein-reiche Region am C-Terminus auszeichnen. In Spaltungsversuchen zeigte das aufgereinigte Tex31p eine spezifische Spaltaktivität für Propeptid-Substrate von Conotoxinen. In einem Homologiemodell, welches mit Hilfe der Kristallstruktur des Antigens 5 aus *V. vulgaris* und der NMR-Struktur von P14a aus Pflanzen erstellt wurde, zeigt Tex31p eine mögliche Erkennungsstelle für basische Substrate innerhalb einer elektronegativen Spalte, die sich innerhalb der CAP-Domäne befindet. Die Autoren schlagen die dort befindlichen Aminosäuren His¹³⁰ und Glu¹¹⁵ als zwei Mitglieder einer katalytischen Triade für die Spaltung basischer Peptide vor. Ein möglicher Kandidat für das dritte Mitglied dieser Triade ist dabei ein relativ konserviertes Serin an Position 80 (Milne *et al.*, 2003).

Diese drei vorgeschlagenen katalytischen Aminosäuren sind auch in den CAP-Domänen aller 5 Mitglieder der Pry-Proteinfamilie in *C. albicans* konserviert (Abb. 41). Aus diesem Grund wurden die beiden Pry-Proteine Rbe1p und Rbt4p in dieser Arbeit heterolog in *S. cerevisiae* exprimiert und aufgereinigt. *Western Blot*-Analysen der Überstände der Induktionskulturen für die Expression der entsprechenden Fusionsproteine mittels eines Antikörpers gegen das V5-Epitop dieser Proteine bzw. SDS-PAGE der Fraktionen der Aufreinigung beider Proteine mittels Affinitätschromatographie zeigten dabei für beide Proteine jeweils nur ein spezifisches Signal übereinstimmender Größe (Abb. 43 und 44). Diese sind mit etwa 70 kDa etwa doppelt so groß, wie für das Molekulargewicht beider gereiften Proteine zu erwarten (rRbe1p: etwa 30 kDa, rRbt4p: etwa 40 kDa). Dies ist wahrscheinlich auf Glykosylierungen innerhalb der Serin-/Threonin-reichen Regionen beider Proteine zurückzuführen. Da die betreffenden Proteine jedoch sowohl bei der *Western Blot*-Analyse als auch der Gelelektrophorese dasselbe apparente Molekulargewicht zeigen, ist davon auszugehen, dass beide Fusionsproteine bis zur Reinheit aufgereinigt werden konnten. Diese wurden anschließend mittels eines Peptid-Arrays aus 360 Oktamerpeptiden, welche 2520 potenzielle Spaltsequenzen enthalten, auf eine mögliche Protease-Aktivität hin untersucht. Obwohl basische Aminosäuren in den Peptiden, die nach Zugabe der aufgereinigten Fusionsproteine zu den Spaltansätzen die größten relativen Fluoreszenzwerte zeigen, vorhanden sind – wie für die katalytische Funktion von Tex31p postuliert (Milne *et al.*, 2003) – ließen sich entsprechende Spaltprodukte in späteren Spaltansätzen massenspektrometrisch unter keiner getesteten Bedingung nachweisen. Diese umfassten auch Bedingungen, bei denen die katalytische Aktivität von Tex31p nachgewiesen

worden war. Dies deutet darauf hin, dass weder Rb1p noch Rb4p eine spezifische Proteasefunktion besitzen und es sich bei den zunächst im Peptid-Array gezeigten Aktivitäten vermutlich um Verunreinigungen in den entsprechenden Ansätzen handelt.

Diese Ergebnisse werden durch Untersuchungen an einem homologen Protein von Tex31p aus der verwandten Meeresschnecke *Conus marmoreus* unterstützt (Hansson *et al.*, 2006; Qian *et al.*, 2008). Dieses Protein, GlaCrisp bzw. Mr30, weist mit 65% Sequenzidentität auf der Aminosäureebene eine signifikante Homologie zu Tex31p auf. Beide Gruppen reinigten das betreffende Protein bis zur Reinheit auf. In Protease-Assays zeigte dieses jedoch entweder keine nachweisbare proteolytische Aktivität für das Substrat von Tex31p, welches von Milne *et al.* verwendet wurde (Ac-KLNKRWAbuKQSG-NH₂ (Hansson *et al.*, 2006)), bzw. eine im Vergleich zu Trypsin vergleichbar geringe proteolytische Aktivität für ein basisches Fluoreszenzsubstrat (pERTKR-Methylcoumarinamid), welche durch einen immobilisierten Serinprotease-Inhibitor (Aprotinin) vollständig aus der Proteinpräparation entfernt werden konnte, ohne die Konzentration des Tex31p-Homologs signifikant zu verändern (Qian *et al.*, 2008). Dieselben Autoren konnten ferner zeigen, dass der irreversible Serinprotease-Inhibitor RVKR-Chloromethylketon, der die proteolytische Aktivität der Proteinaufreinigung vollständig inhibiert, zwar an Trypsin nicht aber kovalent an das Tex31p-Homolog bindet. Die von Hansson *et al.* verwendete Methode zur Aufreinigung des betreffenden Proteins beinhaltet ebenso, wie die in dieser Arbeit verwendete Methode eine Affinitätsaufreinigung, welche mögliche Proteasekontaminationen wahrscheinlich entfernt, weshalb in beiden Fällen keine spezifische Proteaseaktivität nachgewiesen werden konnte. Zusammen genommen sprechen diese Ergebnisse eher für eine Protease-Kontamination der Proteinaufreinigung von Tex31p und dessen Homologs als für eine tatsächliche proteolytische Aktivität der aufgereinigten Proteine. In ähnlichen Versuchen konnte für die CRISP-Proteine Stecrisp aus dem Schlangengift von *Trimeresurus stejnegeri* (chin. Baumvipere) sowie das humane GAPR-1 ebenfalls keine Protease-Funktion für das Substrat von Tex31p sowie einiger chromogener Peptide nachgewiesen werden (Guo *et al.*, 2005; Serrano *et al.*, 2004).

Eine Protease-Funktion der CAP-Proteine erscheint unter diesen Gesichtspunkten eher unwahrscheinlich. Es ist aber möglich, dass die CAP-Proteine über ein sehr hohes Maß an Substratspezifität verfügen, die durch die in dieser Arbeit verwendeten 2520 potenziellen Spaltsequenzen nicht erfasst wurde bzw. die gewählten Bedingungen für den Nachweis der katalytischen Aktivität nicht geeignet waren. Daher muß eine mögliche Proteasefunktion dieser Proteine für spezifische Substratsequenzen unter der Verwendung entsprechender Kontrollen (u.a. Entfernung möglicher Protease-Kontaminationen) unter verschiedenen Reaktionsbedingungen weiter systematisch untersucht werden.

Einige PR-1-Proteine der Pflanzen wurden auf eine Funktion als Protease-Inhibitor getestet, eine derartige Funktion wurde jedoch noch nicht berichtet, obwohl für das humane PI5-Protein, das von Glioblastomzellen sekretiert wird, eine solche Funktion beschrieben wurde (Gibbs *et al.*, 2008; Koshikawa *et al.*, 1996). Ebenso konnte eine mögliche RNase-Funktion für P14a nicht bestätigt werden (Szyperski *et al.*, 1998). Für die PR-1-Proteine der Pflanzen wurde eine fungizide Wirkung beschrieben (Niderman *et al.*, 1995), die möglicherweise durch

eine Hemmung extrazellulärer pflanzlicher β -1,3-Glukanase-Aktivität vermittelt wird (Riviere *et al.*, 2008). Eine derartige Funktion der Pry-Proteine Rbe1p und Rbt4p, die für die Ausbildung der vollen Virulenz von *C. albicans* im systemischen Mausmodell erforderlich sind (s. Abb. 54), könnte bei einer Infektion des Wirtes die Freisetzung von Elicitoren des Immunsystems des Wirtes aus der Zellwand des Pilzes verhindern. β -Glukane stellen neben Mannan die Hauptkennungs-Merkmale von *C. albicans* durch das Immunsystem des Wirtes dar (Jouault *et al.*, 2009; Poulain and Jouault, 2004). So wird der Hauptrezeptor für β -Glukane, Dectin-1, v.a. von Makrophagen und Neutrophilen exprimiert (Taylor *et al.*, 2002) und eine Immunisierung mit Hilfe von Laminarin, einem β -1,3-Glukan, führt durch die Bildung von Anti- β -1,3-Glukan-Antikörpern zu einem wirksamen Schutz vor *Candida*-Infektionen (Torosantucci *et al.*, 2005; Torosantucci *et al.*, 2009). Eine Hemmung extrazellulärer β -1,3-Glukanase-Aktivität durch die Pry-Proteine würde so zu einer Verzögerung der Immunantwort des Wirtes beitragen, was dem Erreger einen Vorteil bei der Infektion des Wirtsgewebes verschaffen würde.

Andererseits könnte eine hemmende Funktion der Pry-Proteine auch auf endogene Glukanasen wirken. Diese sind Zellzyklus-spezifisch für die Remodellierung der Zellwand von *C. albicans* während unterschiedlicher morphogenetischer Prozesse oder für die Abtrennung von Tochterzellen bei der Sprossung erforderlich. Eine Hemmung solcher Glukanasen sollte dann rasch erfolgen, was auf Proteinebene eher gewährleistet werden kann, als auf transkriptioneller Ebene.

Eine solche Funktion der Pry-Proteine liesse sich experimentell möglicherweise mit einer verminderten Resistenz des $\Delta rbe1/\Delta rbt4$ Doppel-Deletionsstammes gegenüber einer β -1,3-Glukanase-Aktivität im umgebenden Medium bzw. mit einer direkten Hemmung von β -1,3-Glukanase-Aktivität durch Zugabe von heterolog exprimiertem Rbe1p bzw. Rbt4p in entsprechenden Versuchen nachweisen. Die Deletionsstämme zeigten zwar keine erhöhte Sensitivität gegenüber Kongorot, welches mit dem Glukananteil der Zellwand interagiert und bei einem durch die Aktivität endogener Glukanasen verminderten Glukananteil zu einer Hemmung des Wachstums führen würde (Abb. 49). Dies muß aber nicht gegen eine entsprechende Funktion der Pry-Proteine sprechen, da es in den $\Delta rbe1/\Delta rbt4$ -Deletionsstämmen zur kompensatorischen Repression der Glukanasen kommen kann, wodurch sich ein entsprechender Phänotyp nicht manifestieren würde. Solche kompensatorischen Regulationen würden möglicherweise durch den Vergleich der Transkriptome des Doppel-Deletionsstammes mit dem Reversionsstamm mittels Genomweiter Microarrays sichtbar. Eine Funktion der Pry-Proteine bei der Hemmung endogener Glukanasen würde weiter für eine Zellzyklus-abhängige Regulation dieser Proteine sprechen, für die es bereits Hinweise gibt (s. Punkt 2).

7. Die Pry-Proteine Rbe1p und Rbt4p sind nicht an der Pheromon-vermittelten Ausbildung von Paarungsstrukturen beteiligt

Vergleichbar mit *S. cerevisiae* wird die Paarung bei *C. albicans* durch eine von Paarungshormonen induzierte Signalkaskade gesteuert. Paarungs-kompetente *opaque*-Zellen der beiden Paarungstypen *MTLa* und *MTLa* sezernieren unterschiedliche Paarungs-Pheromone, die bei Zellen entgegengesetzten Paarungstyps genetische, morphologische und physiologische Veränderungen verursachen und diese so auf die Paarung vorbereiten. In *C. albicans* wurden zwei singuläre Gene identifiziert, die für a- bzw. α -Pheromone kodieren (*MFA1* bzw. *MFa1*). Die Charakterisierung dieser Gene erlaubte im Falle von α -Pheromon, welches von α -Zellen sezerniert wird, die chemische Synthese des Pheromons und die Analyse seiner Wirkung auf Zellen. Es handelt sich dabei, wie bei *S. cerevisiae*, um einfache Peptide von 13 oder 14 Aminosäuren Länge (Bennett *et al.*, 2003; Lockhart *et al.*, 2003b; Panwar *et al.*, 2003). Die Struktur von a-Pheromon, welches von a-Zellen sezerniert wird, wurde als prenyliertes Peptid von 14 Aminosäuren Länge vorhergesagt (Dignard *et al.*, 2007). Die Pheromone induzieren bei *opaque*-Zellen des entgegengesetzten Paarungstyps polarisiertes Wachstum von Paarungsstrukturen (*mating projections*) in Mixturen beider Zelltypen sowie einen Zellzyklusarrest in der G1-Phase (Lockhart *et al.*, 2003a; Miller and Johnson, 2002; Panwar *et al.*, 2003). Dieser Effekt konnte ebenfalls für das synthetische α -Pheromon nach Zugabe zu Kulturen von a-Zellen, sowie indirekt für a-Pheromon bei α -Zellen gezeigt werden (Bennett *et al.*, 2003; Lockhart *et al.*, 2003b; Yi *et al.*, 2008). Im Laufe der Paarung kommt es durch Verschmelzung der Paarungsstrukturen zur Zellfusion von Zellen entgegengesetzten Paarungstyps und nach Bildung der Zygote zu anschließender Karyogamie (Bennett *et al.*, 2005).

Mitglieder der *PRY*-Familie werden während der Pheromon-induzierten Paarungsantwort in *C. albicans* differentiell reguliert. Bei der Pheromonantwort von *opaque*-Zellen des Paarungstyps a werden etwa 60 bis 70 Gene durch α -Pheromon induziert. Darunter auch einige Gene, die Hyphen-spezifische Zelloberflächenproteine kodieren und für die volle Ausbildung der Virulenz von *C. albicans* im systemischen Infektionsmodell erforderlich sind. Zu diesen gehört neben Genen für Zellwandproteine (*HWPI*, *ECE1*, *RBT1*) und Genen für sekretierte Proteine (*SAP4-6*) auch das *PRY*-Gen *RBT4*, dessen Produkt ebenfalls sekretiert (vgl. Punkt 5) und an der Virulenz beteiligt ist (vgl. Punkt 9) (Bennett *et al.*, 2003; Zhao *et al.*, 2005). Dies spricht dafür, dass die Regulationswege der Paarung und der Virulenz gemeinsame Genprodukte für die Vermittlung von Zell-Zell-Interaktionen nutzen. Es wird daher spekuliert, dass strukturelle Komponenten des Paarungs-Mechanismus von *C. albicans* nach der evolutiven Trennung von *S. cerevisiae* für die Wechselwirkung mit dem Wirt adaptiert wurden. Für eine direkte Beteiligung von Zelloberflächenproteinen, die – wie Rbt4p - an der Virulenz von *C. albicans* beteiligt sind, an der Paarung spricht die Tatsache, dass die Deletion der beiden verwandten Zellwandproteine *HWPI* und *RBT1* in Zellen beider Paarungstypen zu einer Reduktion der Paarungseffizienz um einen Faktor von etwa 20 führt (R. J. Bennett und

A. D. Johnson, nicht publizierte Daten (Bennett *et al.*, 2003)). Im Gegensatz zu der Regulation von *RBT4* wird die Expression des *PRY*-Gens *ORF19.2787* durch α -Pheromon reprimiert (Bennett and Johnson, 2006).

Die in dieser Arbeit durchgeführten transkriptionellen Studien zeigen zudem eine Induktion des *PRY*-Gens *RBE1* während des *white/opaque*-Wechsels (s. Kap. 2.2; Tab. 19). Da es sich bei Rbe1p und Rbt4p ferner um sezernierte Proteine in *C. albicans* handelt (vgl. Punkt 5) war von Interesse, ob die beiden Pry-Proteine an der Pheromon-vermittelten Paarung von *C. albicans* beteiligt sind. Daher wurde durch Kultivierung auf Sorbose im Wildtypstamm SC5314 sowie in homozygoten $\Delta rbe1/\Delta rbt4$ -Doppel-Deletionsstämmen im Wildtyp-Hintergrund (SC5314) Homozygotität für den Paarungslokus (*MTL*-Lokus) hergestellt und *opaque*-Zellen dieser Stämme nach Kultivierung bei Raumtemperatur gewonnen (vgl. Punkt 2).

Opaque-Zellen der beiden Paarungstypen a und α dieser Stämme wurden auf ihre Fähigkeit, die Pheromon-vermittelte Paarungsreaktion auszubilden unter drei Bedingungen untersucht: (i) Induktion durch Wildtyp-Zellen entgegengesetzten Paarungstyps, (ii) Induktion durch Zellen der $\Delta rbe1/\Delta rbt4$ -Doppel-Deletionsstämmen entgegengesetzten Paarungstyps und (iii) Induktion durch synthetisch hergestellte Paarungs-Pheromone (α - bzw. a-Pheromon). Dabei zeigt sich, dass die Deletion von *RBE1* und *RBT4* unter keiner der getesteten Bedingungen in *opaque*-Zellen zu einem Verlust der Fähigkeit, die Pheromonantwort auszulösen und Paarungsstrukturen auszubilden, führt. Die entsprechenden Zellen scheinen auch in der Lage zur Zellfusion zu sein (Abb. 53). Daher spielen diese beiden Mitglieder der *PRY*-Familie bei der Ausbildung der Pheromonantwort von *C. albicans* keine signifikante Rolle. Dies bedeutet allerdings nicht, dass die Mitglieder dieser Familie nicht an der Paarung von *C. albicans* beteiligt sind. Um dies zu testen, müssten quantitative Paarungs-Tests durchgeführt werden, bei denen Stämme unterschiedlichen Paarungstyps z.B. mittels verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe markiert und die Paarungseffizienz in entsprechenden Mischkulturen mittels Fluoreszenz-Mikroskopie analysiert werden (vgl. (Lockhart *et al.*, 2003a)). Eine andere Möglichkeit wäre die Analyse der Paarungseffizienz entsprechender Stämme durch die Rekombination verschiedener Auxotrophiemarker während der Paarung. Dazu müssten entweder die beiden *PRY*-Gene *RBE1* und *RBT4* in den entsprechenden Stammhintergründen deletiert oder die entsprechenden Auxotrophiemarker (z.B. *URA3* und *ADE2*) in den bereits konstruierten $\Delta rbe1/\Delta rbt4$ -Doppel-Deletionstämmen zusätzlich deletiert werden. Eine mögliche Rolle der anderen Mitglieder der *PRY*-Familie bei der Paarung müsste durch deren Deletion und ebensolche Paarungsstudien verifiziert werden.

Daneben ist dies das erste Mal, dass die Induktion der Pheromonantwort in *opaque*-Zellen des Paarungstyps *MTL α* durch synthetisches a-Pheromon in *C. albicans* direkt gezeigt werden konnte. Synthetisches a-Pheromon wurde aufgrund der Schwierigkeit der chemischen Synthese des posttranslational modifizierten Pheromons noch nicht für derartige Versuche verwendet (Yi *et al.*, 2008). Es bestätigt sich die notwendige Prenylierung des a-Pheromons in *C. albicans*, die anhand der Erforderlichkeit des strukturell zum Transmembrantransportprotein Ste6p von *S. cerevisiae* homologen Proteins Hst6p in *C. albicans* für die

Paarung von Zellen des Paarungstyps *MTLa* vorhergesagt worden war (Berkower *et al.*, 1994; Magee *et al.*, 2002). Durch das Anfügen eines Farnesylrestes an den C-Terminus des vorhergesagten Peptides war es möglich, durch chemische Synthese ein funktionelles Pheromon herzustellen. Dieses besitzt die Aminosäuresequenz AVRSVSTGNCCSTC, wobei das C-terminale Cystein den Farnesylrest trägt.

Die Bildung zweier strukturell unterschiedlicher Peptidpheromone, von denen nur eines prenyliert ist, ist charakteristisch für Ascomyceten (Bardwell, 2005) und unterstreicht die Ähnlichkeiten des Paarungsmechanismus von *S. cerevisiae* und *C. albicans*. Ein Vorteil der Produktion von Pheromonen mit unterschiedlichen chemischen Eigenschaften könnte in der unterschiedlichen Reichweite der Peptide im wässrigen Milieu liegen. So wirkt das nicht-prenylierte Pheromon über große Entfernungen, das prenylierte aufgrund seiner höheren Hydrophobizität nur über kurze Distanzen. Durch dieses Zusammenspiel könnte die physische Erreichbarkeit der Paarungspartner gewährleistet werden, ohne dass weiter voneinander entfernte Partner den Paarungsprozeß ohne eine Möglichkeit der gegenseitigen Erreichbarkeit initiieren (Dignard *et al.*, 2007). Die durch die Prenylierung des α -Pheromons gegebene Hydrophobizität könnte dabei auch eine Erklärung für die im Vergleich zu α -Pheromon notwendige höhere Konzentration für die Induktion der Pheromonantwort von α -Zellen bei Zugabe zum Medium sein (Abb. 53).

Für weitere Untersuchungen der Pheromonantwort von α -Zellen, die durch α -Pheromon ausgelöst wird, wäre dies ein geeigneter Ausgangspunkt, der weiter, z.B. durch die Identifikation dabei differentiell regulierter Gene, zum Verständnis des Paarungsvorganges in *C. albicans* beitragen würde.

PRY-Gene können auch einen negativen Einfluß auf die Paarung ausüben. In *S. cerevisiae* verhindert der Transkriptionsfaktor Ste12p (*C. albicans*-Homolog: Cph1p), der die Pheromonantwort bei der Paarung vermittelt, die Bildung des vollständigen Transkriptes des Gens *PRY3* nach Induktion durch α -Faktor. Dadurch wird die Bildung eines voll funktionsfähigen und sekretierten Pry3p-Proteins verhindert. Würde das verkürzte *PRY3*-Transkript translatiert, würde dem so entstandenen Protein sowohl die Signalsequenz als auch die für die Pry-Proteine charakteristische CAP-Domäne fehlen. Dieser Vorgang ist für eine effiziente Paarung von *S. cerevisiae* erforderlich, deren Effizienz durch ein ektopisch exprimiertes Pry3p-Protein voller Länge um etwa 40 bis 50% vermindert wird (Bickel and Morris, 2006). Ein ähnlicher Mechanismus ist für *C. albicans* bis jetzt noch nicht beschrieben worden. Allerdings wird die Expression des *PRY*-Gens *ORF19.2787* durch α -Pheromon in *opaque*-Zellen des Paarungstyps α in *C. albicans* reprimiert (Bennett and Johnson, 2006). Die Erfordernis der Repression von *ORF19.2787* durch α -Pheromon bzw. die mögliche Repression von *PRY*-Genen durch α -Pheromon in Zellen des Paarungstyps α für eine effiziente Paarung von *C. albicans* könnte durch die Überexpression der entsprechenden Gene in *opaque*-Zellen und anschließenden quantitativen Paarungsversuchen ermittelt werden.

Der *white/opaque*-Wechsel von *C. albicans* hat sich wahrscheinlich als Resultat der langen Assoziation des Organismus mit einem warmblütigen Wirtsorganismen entwickelt (Lott *et al.*, 2005). Möglicherweise ermöglicht die Ausbildung zweier unterschiedlicher Zellformen *C. albicans* das Überleben in der Umgebung eines sich entwickelnden angeborenen Immunsystems. Die beiden Zellformen unterscheiden sich in vielerlei Hinsicht. So sind viele Gene, die während des Phänotypwechsels differentiell reguliert werden, an möglichen Wechselwirkungen mit dem Wirtsorganismus beteiligt. Dazu gehören so unterschiedliche Funktionen wie Adhäsion, Wirkstoff-Resistenz, Virulenz, Metabolismus und Paarung (Lan *et al.*, 2002; Tsong *et al.*, 2003).

Die differentielle Regulierung der *PRY*-Gene während des *white/opaque*-Wechsels deutet auf eine mögliche Rolle bei den unterschiedlichen Eigenschaften der beiden Zellformen hin. Aufgrund ihrer sekretierten Natur hin kommt ihnen eine Funktion bei der Interaktion von Zellen gegensätzlichen Paarungstyps, der Ausbildung *opaque*-spezifischer Eigenschaften der Zelloberfläche oder der Wechselwirkung mit dem Wirt zu. Ferner könnte das Fehlen bestimmter *PRY*-Gene für eine effiziente Paarung erforderlich sein, vergleichbar mit der Notwendigkeit des Fehlens des vollständigen *PRY3*-Genproduktes in *S. cerevisiae*. Eine weitere mögliche Rolle besteht in der Interaktion von *opaque*-Zellen mit dem menschlichen Wirt. Da *opaque*-Zellen besser für die Infektion der Haut geeignet zu sein scheinen, könnten die in dieser Phase induzierten *PRY*-Gene bei dieser Wechselwirkung eine Rolle spielen (Kvaal *et al.*, 1999).

8. Die *PRY*-Gene *RBE1* und *RBT4* sind in einem klinischen *C. albicans*-Isolat nicht an der Filamentierung sowie der Adhäsion und Invasion *in vitro* beteiligt

Das *PRY*-Gen *RBT4* wurde in dem *ura3*-auxotrophen *C. albicans*-Stamm CAI4 als essentieller Faktor für die Infektions- und Invasionsfähigkeit von Wirtsgewebe durch *C. albicans in vivo* in einem Kaninchen-Corneamodell beschrieben (Braun *et al.*, 2000). Eine weitere Studie zeigt ein Dosis-abhängiges Ausmaß der Cornea-Infektion für denselben $\Delta rbt4$ -Deletionsstamm in einem Mausmodell der Cornea-Infektion. Dabei zeigt der $\Delta rbt4$ -Deletionsstamm bei einer Infektion mit 10^5 *C. albicans*-Zellen denselben Virulenzdefekt wie ein Kontrollstamm (CAF2-1; Genotyp: $\Delta ura3/URA3$) im Vergleich zum Wildtypstamm SC5314. Erst bei einer Infektion mit 10^6 Zellen zeigen der Elternstamm sowie SC5314 vergleichbar schwere Infektionsverläufe, der $\Delta rbt4$ -Deletionsstamm jedoch eine signifikant geringere, moderate Infektionsrate, die nach einem Zeitraum von 8 Tagen verschwindet. Nach einem Tag zeigt der $\Delta rbt4$ -Deletionsstamm nur wenige Pseudohyphen an der Corneaoberfläche, der Elternstamm sowie der Wildtypstamm SC5314 jedoch vergleichbar invasives Hyphenwachstum (Jackson *et al.*, 2007). Reversionsstämme im Deletionshintergrund zeigten in diesen Studien entweder keine erhöhte Virulenz im Vergleich zum Deletionsstamm (Braun *et al.*, 2000) oder wurden nicht verwendet (Jackson *et al.*, 2007). Bei dem Kontrollstamm CAF2-1, der in beiden Studien als Kontrolle verwendet wurde, handelt es

sich um einen Deletionsstamm für eine Kopie des *URA3*-Gens im Wildtyphintergrund SC5314 (Fonzi and Irwin, 1993). Bei den Reversionsstämmen für *RBT4* befindet sich das dabei ebenfalls integrierte *URA3*-Markergen am *RBT4*-Lokus (Braun *et al.*, 2000)

Die Verwendung von *URA3*-auxotrophen Stämmen von *C. albicans* für die Herstellung von Deletionstämmen ist nicht immer optimal, um bestimmte Phänotypen, wie Morphogenese, Adhäsion oder Virulenz in einem systemischen Mausmodell zu untersuchen. Einige dieser Prozesse erfordern ein hohes Expressionsniveau des *URA3*-Gens (Bain *et al.*, 2001; Kirsch and Whitney, 1991) (Brand *et al.*, 2004; Cheng *et al.*, 2003; Sundstrom *et al.*, 2002) und dieses ist vom Integrationsort des *URA3*-Gens im Genom abhängig (Brand *et al.*, 2004; Cheng *et al.*, 2003; Lay *et al.*, 1998; Sharkey *et al.*, 2005). So können Defekte bei der Morphogenese, der Adhäsion oder der Virulenz nicht von der Deletion eines bestimmten Gens von Interesse, sondern von einem niedrigen Expressionsniveau des *URA3*-Gens herrühren. Bis zu einem Drittel der bislang veröffentlichten Gendeletionen in *C. albicans* könnten von diesem Problem betroffen sein (Brand *et al.*, 2004). Ferner ist die 5-Fluororotsäure (5-FOA), die zur Entfernung des *URA3*-Markergens aus dem Genom für eine erneute Verwendung bei der Deletion des 2. Allels verwendet wird, selbst ein starkes Mutagen, das unerwünschte Chromosomenabnormalitäten verursachen kann (Wellington *et al.*, 2006).

Aus diesen Gründen wurden die *PRY*-Gene *RBE1* und *RBT4* in dieser Arbeit aus dem klinischen Isolat SC5314, dem Elternstamm von CAI4 (Fonzi and Irwin, 1993), entfernt. Die so konstruierten Stämme wurden auf eine mögliche Beteiligung der beiden Gene an den Prozessen der Morphogenese, der Adhäsion, der Invasion unter Laborbedingungen, sowie *in vivo* an der Virulenz in einem systemischen Mausmodell in *C. albicans* untersucht. Dafür wurden die beiden Gene jeweils einzeln sowie gemeinsam unter der Verwendung des dominanten Nourseothricin-Resistenzmarkers *SAT1* aus dem Genom von SC5314 entfernt (Reuss *et al.*, 2004), sowie für die Konstruktion entsprechender Kontrollstämmen an ihrem ursprünglichen Genort in den Deletionstämmen erneut integriert (Abb. 46, 47).

Die so hergestellten Deletionsstämmen für *RBE1* und *RBT4* zeigten im Vergleich zum klinischen Isolat keine Wachstums- und Morphogenesedefekte auf verschiedenen Labormedien, sowie keine Defekte bei der Adhäsion und Invasion humaner Epithelien *in vitro* (Abb. 49-52). Auch der in der Literatur verwendete $\Delta rbt4$ -Deletionsstamm im CAI4-Hintergrund zeigt keine Morphogenesedefekte auf Labormedien, wohl aber eine sehr stark verminderte Infektionsfähigkeit sowie praktisch kein invasives Wachstum in einem *in vivo*-Invasionsmodell (Braun *et al.*, 2000). Obwohl die Adhäsions- und Invasionsfähigkeit der $\Delta rbe1$ - und $\Delta rbt4$ -Deletionsstämmen in der vorliegenden Arbeit anhand verschiedener *in vitro*-Modelle untersucht wurde, lassen diese doch Rückschlüsse auf die *in vivo*-Situation zu (Sohn *et al.*, 2006). So wurde die in diesen Modellen verwendete kolorektale Adenokarzinom-Zelllinie Caco-2 in großem Umfang für das *in vitro*-Studium von Darmprozessen (Trotter and Storch, 1993) sowie für Adhäsionsstudien mit verschiedenen Mikroorganismen, *C. albicans* eingeschlossen, verwendet (Darfeuille-Michaud *et al.*, 1990; Dieterich *et al.*, 2002; Rigother

et al., 1991). Caco-2-Zellen weisen dabei viele morphologische und biochemische Ähnlichkeiten zu primären Enterozyten auf (Hidalgo *et al.*, 1989; Trotter and Storch, 1991), was sie für eine Darstellung der *in vivo*-Situation geeignet macht. Das in dieser Arbeit verwendete *in vitro*-Invasionsmodell für Darmepithel, welches Caco-2-Zellen verwendet, ist dabei für die Darstellung von Unterschieden in der Adhäsions- und Invasionsfähigkeit verschiedener *C. albicans*-Stämme an humane Epithelien geeignet (Dieterich *et al.*, 2002). So ist ein Deletionsstamm für *EFG1* in diesem Modell weniger adhärenz als der Wildtypstamm SC5314 und verliert seine Invasionsfähigkeit, während die Deletion von *CPHI* keinen Effekt auf diese Prozesse hat. Dies korreliert mit der im Vergleich zum Wildtypstamm verminderten Virulenz des $\Delta efg1$ -Deletionsstammes nicht jedoch des $\Delta cph1$ -Deletionsstammes im systemischen Mausmodell (Lo *et al.*, 1997). Um eine mögliche Rolle von Rbe1p und Rbt4p bei der Adhäsion und Invasion unter anderen im Wirt gegebenen Umweltbedingungen zu untersuchen, wurden die verwendeten *in vitro*-Modelle um eine epidermoide vulvo-vaginale Zelllinie (A431) bzw. um eine Mundschleimhaut-Zelllinie (TR146), die beide als stratifiziertes Epithel wachsen, erweitert. Auch unter diesen Bedingungen ließen sich keine phänotypischen Unterschiede zwischen den verschiedenen Deletionsstämmen und dem Wildtypstamm SC5314 beobachten. Dies führt zu dem Schluss, dass Rbe1p und Rbt4p in dem klinischen *C. albicans*-Isolat SC5314 *in vitro* weder einzeln noch gemeinsam an den Prozessen der Morphogenese, sowie der Adhäsion und Invasion humanen Epithelgewebes beteiligt sind.

Vor dem Hintergrund, dass es Braun *et al.* nicht möglich war, die Virulenz des konstruierten $\Delta rbt4$ -Deletionsstammes durch eine erneute Integration des *RBT4*-Gens in diesen Stamm wieder herzustellen und ein weiterer nicht-invasiver Deletionsstamm ($\Delta rbt1$) aus dieser Studie in der Studie von Jackson *et al.* bei einer Infektion mit 10^5 *C. albicans*-Zellen keine und bei einer Infektion mit 10^6 *C. albicans*-Zellen nur geringe Unterschiede in seinem Invasionsverhalten im Vergleich zum Elternstamm zeigt, sowie ein auf andere Weise hergestellter $\Delta rbt1$ -Deletionsstamm keinen Virulenzdefekt aufweist, erscheint es unwahrscheinlich, dass die beobachteten Defekte in dem verwendeten $\Delta rbt4$ -Deletionsstamm tatsächlich auf das Fehlen von *RBT4* zurückzuführen sind. Obwohl die verwendeten Stämme vergleichbare Wachstumsraten und keine Beeinträchtigung in ihrer Fähigkeit zur Filamentierung auf verschiedenen Labormedien zeigten, sind die beobachteten Virulenzdefekte möglicherweise auf andere Ursachen, die u.U. in der Stammkonstruktion begründet liegen, zurückzuführen. So kann es durch die Integration des *URA3*-Markergens am *RBT4*-Lokus zu Positionseffekten der *URA3*-Expression kommen, die zwar keine phänotypischen Defekte *in vitro*, wohl aber *in vivo* verursachen. Ferner kann die zur Regeneration des *URA3*-Markers verwendete 5-Fluororotsäure zu Chromosomenveränderungen führen, die sich nur *in vivo* manifestieren. Solche Veränderungen können sich z.B. auf die Oberflächenstruktur des Pilzes auswirken, wodurch dieser für das Immunsystem des Wirts leichter erkennbar oder besser angreifbar werden.

Ein Dosiseffekt bei der Invasionsfähigkeit der in dieser Arbeit konstruierten Deletionsstämmen, bei der durch die Verwendung hoher Zellzahlen keine Unterschiede zum

phänotypischen Verhalten des Wildtypstammes erkennbar wären, erscheint ebenfalls unwahrscheinlich. So bewegt sich das Infektionsverhältnis (*multiplicity of infection (MOI)*) von *C. albicans*- zu humanen Zellen bei den Adhäsions-, Invasions und Zytotoxizitätsversuchen mit einem Wert zwischen 0,1 und 0,01 in einem moderaten Bereich, bei dem der als Kontrolle verwendete Wildtypstamm SC5314 seine volle Adhäsions- und Invasionsfähigkeit entfaltet, ohne dass es zu einem Überwachsen der humanen Zellkulturen kommt (Abb. 50-52; (Dieterich *et al.*, 2002)).

9. Die *PRY*-Gene *RBE1* und *RBT4* zeigen in einem klinischen Isolat von *C. albicans* einen synergistischen Virulenzphänotyp

Die phänotypischen Untersuchungen wurden um ein Mausmodell für systemische Infektionen des Blutstroms erweitert, um eine mögliche Beteiligung der Pry-Proteine Rbe1p und Rbt4p an der Virulenz von *C. albicans in vivo* zu untersuchen. Dabei zeigten sowohl der $\Delta rbe1$ -Deletionsstamm als auch der $\Delta rbt4$ -Deletionsstamm moderate, aber signifikante Virulenzdefekte im Vergleich zu dem als Kontrollstamm verwendeten klinischen Isolat SC5314. In beiden Fällen war es möglich, das Virulenzniveau des Wildtypstammes durch eine Re-Integration der jeweils deletierten Genes in die Deletionsstämme wieder herzustellen (Abb. 54A und 54B). Diese Ergebnisse stehen im Falle von *RBT4* im Widerspruch zu der beobachteten Avirulenz des von Braun und Johnson konstruierten $\Delta rbt4$ -Deletionsstammes in demselben Mausmodell, bei dem der verwendete Kontrollstamm (CAF2-1; Genotyp: $\Delta ura3/URA3$) ebenso wie der in dieser Arbeit verwendete Kontrollstamm (SC5314) eine sehr hohe Virulenz aufweist (Braun *et al.*, 2000). Insofern sind die Bedingungen unter denen diese Studien durchgeführt wurden für beide Arbeiten vergleichbar. Dies führt zu der Schlussfolgerung, dass Rbt4p signifikant, aber nicht grundsätzlich an der Virulenz von *C. albicans in vivo* beteiligt ist. Dies wird ebenfalls von der Tatsache unterstützt, dass sich die Virulenz des von Braun und Johnson konstruierten $\Delta rbt4$ -Deletionsstammes im CAI-Stammhintergrund ($\Delta ura3::imm434/\Delta ura3::imm434$) durch eine Re-Integration von *RBT4* in diesen Stamm nicht erhöhen ließ. Dagegen führte die Re-Integration von *RBT4* in die in dieser Arbeit im Wildtyp-Stammhintergrund konstruierten Deletionsstämme zur Wiederherstellung der vollen Virulenz des Wildtypstammes (Abb. 54B). Neben den unter 4.8 diskutierten Punkten ist dies ein weiterer Beleg dafür, dass die von Braun und Johnson beobachtete Avirulenz dieses Stammes nicht in der Deletion des *RBT4*-Genes begründet liegt. Die beobachteten Virulenzdefekte der Deletionsstämme sprechen sowohl für Rbe1p als auch für Rbt4p für eine signifikante Beteiligung beider Proteine an der Ausbildung systemischer Kandidosen im Säugetierwirt, wobei jedes Protein für sich genommen jedoch nicht an essentiell an der Pathogenität von *C. albicans* beteiligt ist.

Ein dramatisch anderes Bild ergibt sich für die Virulenz des $\Delta rbe1/\Delta rbt4$ -Doppel-Deletionsstammes. Dieser zeigt drastische Virulenzdefekte im Vergleich zum klinischen Isolat, mit einer Überlebensrate von 80% der infizierten Mäuse über den gesamten Zeitraum

der Studie (30 Tage). Auch in diesem Fall konnte die hohe Virulenz des Wildtypstammes durch eine Re-Integration beider Gene in den Deletionsstamm wieder hergestellt werden (Abb. 54C). Das Fehlen beider Genprodukte hat einen stärkeren Effekt auf die Virulenzeigenschaften von *C. albicans in vivo*, als das Fehlen jeweils nur eines der beiden Genprodukte zusammen genommen. Dieser synergistische Effekt deutet auf eine ähnliche Funktion der beiden Pry-Proteine Rbe1p und Rbt4p während der Pathogenese einer systemischen *C. albicans*-Infektion im Wirt hin, die erst bei der Abwesenheit beider Genprodukte voll zum Tragen kommt und zu einem nahezu vollständigen Virulenzdefekt des Doppel-Deletionsstammes führt. Diese Schlussfolgerung wird von der Tatsache unterstützt, dass es zu einer kompensatorischen Induktion der Expression von *RBE1* im $\Delta rbt4$ -Deletionsstamm während des Hyphenwachstums, sowie von *RBT4* im $\Delta rbe1$ -Deletionsstamm während des Wachstums als Blastosporen kommt (Tab. 24). Dies deutet darauf hin, dass jeweils eines der beiden Pry-Proteine die Funktion des bei der jeweiligen Wachstumsbedingung normalerweise exprimierten Proteins übernimmt und so den entstandenen Defekt kompensiert. Dies ist eine Erklärung für den nur moderaten Virulenzdefekt der jeweiligen Einzel-Deletionsstämme im systemischen Infektionsmodell. Ein ähnlicher Wirkmechanismus der Pry-Proteine wurde ebenfalls bereits aufgrund der großen strukturellen Konservierung der ihnen gemeinsamen CAP-Domäne postuliert (vgl. Punkt 6). Der starke Virulenzphänotyp des von Braun und Johnson konstruierten $\Delta rbt4$ -Deletionsstammes ist möglicherweise auch darauf zurückzuführen, dass in dem verwendeten Stammhintergrund keine kompensatorische Induktion von *RBE1* erfolgt. Dies wäre jedoch keine Erklärung für die Unmöglichkeit der Reversion des Virulenzdefekts durch die Integration einer funktionellen *RBT4*-Kopie.

10. Mögliche Funktionen der Pry-Proteine bei der systemischen Infektion in *C. albicans*

Das intravenöse Mausmodell ist ein gut charakterisiertes Modell für das Studium systemischer Kandidosen, wobei der Zeitpunkt des Todes und die Belastung infizierten Gewebes mit lebenden Pilzzellen die Hauptunterschiede in der Virulenz verschiedener Pilzstämme darstellen. Wenige Minuten nach der Infektion sind *C. albicans*-Zellen in allen wichtigen Organen nachzuweisen, wobei das Gehirn und die Nieren die hauptsächlichen Infektionsorte sind (MacCallum and Odds, 2005). Obwohl die Nieren die am stärksten kolonisierten Organe sind, sterben die Versuchstiere nicht an Nierenversagen, sondern an einer fortschreitenden Sepsis. Dies gleicht der Situation systemischer Kandidosen des Menschen (Spellberg *et al.*, 2005).

Da die beiden Pry-Proteine Rbe1p und Rbt4p sekretierte Genprodukte in *C. albicans* (vgl. Punkt 5) sind, die wahrscheinlich *in vivo* nicht an der Adhäsions- und Invasionsfähigkeit epithelialen Wirtsgewebes beteiligt sind, ist die dramatische Reduktion der Virulenz des Doppel-Deletionsstammes für beide Gene im systemischen Mausmodell im Vergleich zum Wildtypstamm möglicherweise auf eine Beteiligung der beiden Proteine an einer direkten

Schädigung des Wirtsgewebes oder in der Modulation der Immunantwort des Wirtes zurückzuführen. Eine weitere mögliche Wirkungsweise wäre die Schädigung konkurrierender Mikroorganismen, wodurch sich ein Selektionsvorteil für *C. albicans* bei der Vermehrung im Wirt ergeben würde. Die häufige Assoziation der strukturell konservierten CAP-Proteine mit Immungeweben in Säugetieren und eine Funktion der PR-1-Proteine bei der systemischen erworbenen Resistenz in Pflanzen, ist jedoch ein Hinweis auf eine mögliche Beteiligung dieser Proteine an immunrelevanten Funktionen (Gibbs *et al.*, 2008; Szyperski *et al.*, 1998). Das frühe Auftauchen der CAP-Proteine in der Evolution und ihre hohe strukturelle Konservierung ist ein Hinweis auf eine fundamentale Funktion dieser Proteine (Szyperski *et al.*, 1998). Obwohl in dem nicht-pathogenen Pilz *S. cerevisiae* ebenfalls mehrere Mitglieder dieser Proteinfamilie konserviert sind, spricht die Existenz jeweils mehrerer Familienmitglieder in pathogenen Pilzen bis heute (Abb. 15) für eine mögliche Adaption ihrer Funktion bei der Wechselwirkung mit dem Wirt. Die Modulation der Immunantwort des Wirtes kann dabei entweder in der direkten Wechselwirkung mit Komponenten der Immunantwort, die normalerweise zu einer Eliminierung der Pathogene führt oder in dem Schutz der Pilzzellen vor diesen, z.B. durch Maskierung von Oberflächenstrukturen, die der Pathogenerkennung dienen, bestehen. Komponenten des Immunsystems, mit dem Pathogene in Wechselwirkung treten sind Moleküle, die Oberflächenstrukturen der Pathogene erkennen (z.B. Lektine oder Rezeptoren, wie die Familie der Toll-ähnlichen Rezeptoren (*TLR*, *toll-like receptors*), sezernierte Signalmoleküle (Zytokine) oder von diesen zum Ort der Infektion rekrutierte Zellen (z.B. polymorphonukleäre Leukozyten (PMNs, neutrophile Granulozyten), Makrophagen) (Jouault *et al.*, 2009; MacCallum, 2009; MacCallum *et al.*, 2009; Urban *et al.*, 2006). Weder Rbe1p noch Rbt4p weisen dabei wahrscheinlich eine Funktion als Protease auf (vgl. Punkt 6). Auf der anderen Seite könnte eine immun-relevante Funktion der Pry-Proteine auch in einer Verzögerung der Immunantwortes des Wirtes liegen, wodurch der Pilz einen Vorteil bei der Infektion des Wirtes erlangt (vgl. Punkt 6).

Der Morphogenese wird eine wichtige Bedeutung bei der Virulenz von *C. albicans* zugeschrieben (Calderone, 2002; Calderone and Fonzi, 2001; Whiteway and Oberholzer, 2004). Während der filamentösen Wachstumsform eine Hauptrolle bei der Invasion des Wirtsgewebes zugeschrieben wird, spielen sowohl Blastosporen als auch Hyphen eine Rolle bei der Wechselwirkung mit dem Immunsystem sowie der Besiedelung von Organen (Gow *et al.*, 2002; Kumamoto and Vincles, 2005; Mitchell, 1998). Die Induktion von *RBT4* während des filamentösen Wachstums von *C. albicans* und die Sekretion des Genproduktes deutet auf Rbt4p als Hyphen-spezifischen Virulenzfaktor hin. Rbt4p wurde in dieser Arbeit zwar auch als von Blastosporen sekretiertes Gen gefunden (Tab. 22), vergleichbare Studien von *Sorgo et al.* deuten aber in semi-quantitativen Auswertungen auf eine Anreicherung von Rbt4p in den Überständen von Hyphen hin (Sorgo *et al.*, 2010). Rbt4p ist dabei ein Beispiel für ein – zum Großteil - Hyphen-spezifisches Protein, das zwar an der Virulenz, nicht aber an der Morphogenese von *C. albicans* beteiligt ist (diese Arbeit und (Braun *et al.*, 2000)). Im Gegensatz zu Rbt4p spricht die Induktion von *RBE1* und die Sekretion des entsprechenden Genproduktes während des Wachstums als Blastosporen (vgl. Punkt 5) sowie die Repression

während des Hyphenwachstums für eine Blastosporen-spezifische Funktion von Rbelp bei der Virulenz von *C. albicans* und damit für eine ebenso wichtige Funktion dieser Zellform bei der Infektion des Wirtsgewebes. Blastosporen verfügen möglicherweise über eigene spezifische Virulenz-faktoren. So sekretieren sie bestimmte Aspartylproteasen, die alle an der Virulenz von *C. albicans* beteiligt sind (Hube and Naglik, 2001). Blastosporen werden gemeinhin als geeigneter für den Transport der *C. albicans*-Zellen im Blutstrom angesehen. In den frühen Stadien der Besiedelung von Wirtsorganen können sekretierte Proteine dabei eine Rolle bei der komplexen chemischen Wechselwirkung von Komponenten des angeborenen Immunsystems, wie Leukozyten oder später Lymphozyten, bzw. von diesen sekretierten Chemokinen und Zytokinen, mit Pilz-spezifischen Komponenten spielen (MacCallum *et al.*, 2009). Die gegensätzliche Regulation der beiden Proteine bei der Morphogenese (vgl. Punkt 2) ist dabei ein weiterer Hinweis auf eine Wachstumsform-spezifische Funktion dieser beiden Pry-Proteine in *C. albicans*. Der synergistische Virulenzphänotyp des Doppel-Deletionsstammes deutet darauf hin, dass beide Proteine bei der Infektion *in vivo* in gleichem Maße aktiviert werden bzw. in ähnlichen Phasen des Zellzyklus exprimiert sind.

Der starke synergistische Effekt der beiden Pry-Proteine bei der Virulenz im systemischen Mausmodell ist ein geeigneter Ausgangspunkt für Aufklärung der Funktion der Pry-Proteine bei der Wirt-Pathogen-Interaktion, die möglicherweise Aufschluss über eine molekulare Funktion dieser Proteine und damit über die molekulare Funktion der Proteine der CAP-Superfamilie, welche in der konservierten CAP-Domäne begründet liegt, geben kann.

Literaturverzeichnis

- Akins, R.A. (2005) An update on antifungal targets and mechanisms of resistance in *Candida albicans*. *Med Mycol*, **43**, 285-318.
- Albrecht, A., Felk, A., Pichova, I., Naglik, J.R., Schaller, M., de Groot, P., Maccallum, D., Odds, F.C., Schafer, W., Klis, F., Monod, M. and Hube, B. (2006) Glycosylphosphatidylinositol-anchored proteases of *Candida albicans* target proteins necessary for both cellular processes and host-pathogen interactions. *J Biol Chem*, **281**, 688-694.
- Alonso-Monge, R., Roman, E., Arana, D.M., Pla, J. and Nombela, C. (2009) Fungi sensing environmental stress. *Clin Microbiol Infect*, **15 Suppl 1**, 17-19.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. and Lipman, D.J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res*, **25**, 3389-3402.
- Anderson, J.B., Wickens, C., Khan, M., Cowen, L.E., Federspiel, N., Jones, T. and Kohn, L.M. (2001) Infrequent genetic exchange and recombination in the mitochondrial genome of *Candida albicans*. *J Bacteriol*, **183**, 865-872.
- Andrianopoulos, A. and 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**, 2503-2515.
- Antoniw, J.F., Dunkley, A.M., White, R.F. and Wood, J. (1980) Soluble leaf proteins of virus-infected tobacco (*Nicotiana tabacum*) cultivars [proceedings]. *Biochem Soc Trans*, **8**, 70-71.
- Aramayo, R., Peleg, Y., Addison, R. and Metzberg, R. (1996) *Asm-1+*, a *Neurospora crassa* gene related to transcriptional regulators of fungal development. *Genetics*, **144**, 991-1003.
- Argimon, S., Wishart, J.A., Leng, R., Macaskill, S., Mavor, A., Alexandris, T., Nicholls, S., Knight, A.W., Enjalbert, B., Walmsley, R., Odds, F.C., Gow, N.A. and Brown, A.J. (2007) Developmental regulation of an adhesin gene during cellular morphogenesis in the fungal pathogen *Candida albicans*. *Eukaryot Cell*, **6**, 682-692.
- Asojo, O.A., Goud, G., Dhar, K., Loukas, A., Zhan, B., Deumic, V., Liu, S., Borgstahl, G.E. and Hotez, P.J. (2005) X-ray structure of Na-ASP-2, a pathogenesis-related-1 protein from the nematode parasite, *Necator americanus*, and a vaccine antigen for human hookworm infection. *J Mol Biol*, **346**, 801-814.
- Astrom, S.U., Kegel, A., Sjostrand, J.O. and Rine, J. (2000) *Kluyveromyces lactis* Sir2p regulates cation sensitivity and maintains a specialized chromatin structure at the cryptic alpha-locus. *Genetics*, **156**, 81-91.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. and Struhl, K. (1989) *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, New York.
- Bain, J.M., Stubberfield, C. and Gow, N.A. (2001) Ura-status-dependent adhesion of *Candida albicans* mutants. *FEMS Microbiol Lett*, **204**, 323-328.
- Barbaric, S., Munsterkotter, M., Svaren, J. and Horz, W. (1996) The homeodomain protein Pho2 and the basic-helix-loop-helix protein Pho4 bind DNA cooperatively at the yeast PHO5 promoter. *Nucleic Acids Res*, **24**, 4479-4486.
- Bardwell, L. (2005) A walk-through of the yeast mating pheromone response pathway. *Peptides*, **26**, 339-350.

- Barnett, J.A. (2008) A history of research on yeasts 12: medical yeasts part 1, *Candida albicans*. *Yeast*, **25**, 385-417.
- Barrett-Bee, K., Hayes, Y., Wilson, R.G. and Ryley, J.F. (1985) A comparison of phospholipase activity, cellular adherence and pathogenicity of yeasts. *J Gen Microbiol*, **131**, 1217-1221.
- Bassetti, M., Righi, E., Costa, A., Fasce, R., Molinari, M.P., Rosso, R., Pallavicini, F.B. and Viscoli, C. (2006) Epidemiological trends in nosocomial candidemia in intensive care. *BMC Infect Dis*, **6**, 21.
- Bassilana, M., Hopkins, J. and Arkowitz, R.A. (2005) Regulation of the Cdc42/Cdc24 GTPase module during *Candida albicans* hyphal growth. *Eukaryot Cell*, **4**, 588-603.
- Baxter, R.M., Crowell, T.P., George, J.A., Getman, M.E. and Gardner, H. (2007) The plant pathogenesis related protein GLIPR-2 is highly expressed in fibrotic kidney and promotes epithelial to mesenchymal transition in vitro. *Matrix Biol*, **26**, 20-29.
- Bennett, R.J. and Johnson, A.D. (2003) Completion of a parasexual cycle in *Candida albicans* by induced chromosome loss in tetraploid strains. *Embo J*, **22**, 2505-2515.
- Bennett, R.J. and Johnson, A.D. (2006) The role of nutrient regulation and the Gpa2 protein in the mating pheromone response of *C. albicans*. *Mol Microbiol*, **62**, 100-119.
- Bennett, R.J., Miller, M.G., Chua, P.R., Maxon, M.E. and Johnson, A.D. (2005) Nuclear fusion occurs during mating in *Candida albicans* and is dependent on the KAR3 gene. *Mol Microbiol*, **55**, 1046-1059.
- Bennett, R.J., Uhl, M.A., Miller, M.G. and Johnson, A.D. (2003) Identification and characterization of a *Candida albicans* mating pheromone. *Mol Cell Biol*, **23**, 8189-8201.
- Berkower, C., Loayza, D. and Michaelis, S. (1994) Metabolic instability and constitutive endocytosis of STE6, the a-factor transporter of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell*, **5**, 1185-1198.
- Berman, J. (2006) Morphogenesis and cell cycle progression in *Candida albicans*. *Curr Opin Microbiol*, **9**, 595-601.
- Bickel, K.S. and Morris, D.R. (2006) Role of the transcription activator Ste12p as a repressor of PRY3 expression. *Mol Cell Biol*, **26**, 7901-7912.
- Biswas, K., Rieger, K.J. and Morschhauser, J. (2003) Functional analysis of CaRAP1, encoding the Repressor/activator protein 1 of *Candida albicans*. *Gene*, **307**, 151-158.
- Biswas, S., Van Dijck, P. and Datta, A. (2007) Environmental sensing and signal transduction pathways regulating morphopathogenic determinants of *Candida albicans*. *Microbiol Mol Biol Rev*, **71**, 348-376.
- Blackwell, T.K. and Weintraub, H. (1990) Differences and similarities in DNA-binding preferences of MyoD and E2A protein complexes revealed by binding site selection. *Science*, **250**, 1104-1110.
- Bockmuhl, D.P., Krishnamurthy, S., Gerads, M., Sonneborn, A. and Ernst, J.F. (2001) Distinct and redundant roles of the two protein kinase A isoforms Tpk1p and Tpk2p in morphogenesis and growth of *Candida albicans*. *Mol Microbiol*, **42**, 1243-1257.
- Bramley, T.A., Menzies, G.S., Williams, R.J., Kinsman, O.S. and Adams, D.J. (1991) Characterization of a factor(s) from partially purified human gonadotrophin preparations which inhibit(s) the binding of radiolabelled human LH and human chorionic gonadotrophin to *Candida albicans*. *J Endocrinol*, **128**, 139-151.
- Brand, A., MacCallum, D.M., Brown, A.J., Gow, N.A. and Odds, F.C. (2004) Ectopic expression of URA3 can influence the virulence phenotypes and proteome of *Candida albicans* but can be overcome by targeted reintegration of URA3 at the RPS10 locus. *Eukaryot Cell*, **3**, 900-909.

- Brassart, D., Woltz, A., Golliard, M. and Neeser, J.R. (1991) In vitro inhibition of adhesion of *Candida albicans* clinical isolates to human buccal epithelial cells by Fuc alpha 1----2Gal beta-bearing complex carbohydrates. *Infect Immun*, **59**, 1605-1613.
- Braun, B.R., Head, W.S., Wang, M.X. and Johnson, A.D. (2000) Identification and characterization of TUP1-regulated genes in *Candida albicans*. *Genetics*, **156**, 31-44.
- Braun, B.R. and Johnson, A.D. (1997) Control of filament formation in *Candida albicans* by the transcriptional repressor TUP1. *Science*, **277**, 105-109.
- Braun, B.R. and Johnson, A.D. (2000) TUP1, CPH1 and EFG1 make independent contributions to filamentation in *Candida albicans*. *Genetics*, **155**, 57-67.
- Braun, B.R., Kadosh, D. and Johnson, A.D. (2001) NRG1, a repressor of filamentous growth in *C. albicans*, is down-regulated during filament induction. *Embo J*, **20**, 4753-4761.
- Braun, B.R., van Het Hoog, M., d'Enfert, C., Martchenko, M., Dungan, J., Kuo, A., Inglis, D.O., Uhl, M.A., Hogues, H., Berriman, M., Lorenz, M., Levitin, A., Oberholzer, U., Bachewich, C., Marcus, D., Marcil, A., Dignard, D., Iouk, T., Zito, R., Frangeul, L., Tekaia, F., Rutherford, K., Wang, E., Munro, C.A., Bates, S., Gow, N.A., Hoyer, L.L., Kohler, G., Morschhauser, J., Newport, G., Znaidi, S., Raymond, M., Turcotte, B., Sherlock, G., Costanzo, M., Ihmels, J., Berman, J., Sanglard, D., Agabian, N., Mitchell, A.P., Johnson, A.D., Whiteway, M. and Nantel, A. (2005) A human-curated annotation of the *Candida albicans* genome. *PLoS Genet*, **1**, 36-57.
- Brown, A.J. and Gow, N.A. (1999) Regulatory networks controlling *Candida albicans* morphogenesis. *Trends Microbiol*, **7**, 333-338.
- Brown, D.H., Jr., Giusani, A.D., Chen, X. and Kumamoto, C.A. (1999) Filamentous growth of *Candida albicans* in response to physical environmental cues and its regulation by the unique CZF1 gene. *Mol Microbiol*, **34**, 651-662.
- Buchman, A.R., Kimmerly, W.J., Rine, J. and Kornberg, R.D. (1988) Two DNA-binding factors recognize specific sequences at silencers, upstream activating sequences, autonomously replicating sequences, and telomeres in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, **8**, 210-225.
- Buffo, J., Herman, M.A. and Soll, D.R. (1984) A characterization of pH-regulated dimorphism in *Candida albicans*. *Mycopathologia*, **85**, 21-30.
- Cabezon, V., Llama-Palacios, A., Nombela, C., Monteoliva, L. and Gil, C. (2009) Analysis of *Candida albicans* plasma membrane proteome. *Proteomics*, **9**, 4770-4786.
- Calderone, R.A. (2002) *Candida and candidiasis*. ASM Press, Washington, D.C.
- Calderone, R.A. and Fonzi, W.A. (2001) Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends Microbiol*, **9**, 327-335.
- Caldwell, G.A., Naidler, F. and Becker, J.M. (1995) Fungal lipopeptide mating pheromones: a model system for the study of protein prenylation. *Microbiol Rev*, **59**, 406-422.
- Cameron, B.J. and Douglas, L.J. (1996) Blood group glycolipids as epithelial cell receptors for *Candida albicans*. *Infect Immun*, **64**, 891-896.
- Care, R.S., Trevethick, J., Binley, K.M. and Sudbery, P.E. (1999) The MET3 promoter: a new tool for *Candida albicans* molecular genetics. *Mol Microbiol*, **34**, 792-798.
- Carey, J. (1991) Gel retardation. *Methods Enzymol*, **208**, 103-117.
- Caro, L.H., Tettelin, H., Vossen, J.H., Ram, A.F., van den Ende, H. and Klis, F.M. (1997) In silico identification of glycosyl-phosphatidylinositol-anchored plasma-membrane and cell wall proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **13**, 1477-1489.

- Cartharius, K., Frech, K., Grote, K., Klocke, B., Haltmeier, M., Klingenhoff, A., Frisch, M., Bayerlein, M. and Werner, T. (2005) MatInspector and beyond: promoter analysis based on transcription factor binding sites. *Bioinformatics*, **21**, 2933-2942.
- Casadevall, A. and Pirofski, L. (2001) Host-pathogen interactions: the attributes of virulence. *J Infect Dis*, **184**, 337-344.
- Cassola, A., Parrot, M., Silberstein, S., Magee, B.B., Passeron, S., Giasson, L. and Cantore, M.L. (2004) *Candida albicans* lacking the gene encoding the regulatory subunit of protein kinase A displays a defect in hyphal formation and an altered localization of the catalytic subunit. *Eukaryot Cell*, **3**, 190-199.
- Cassone, A., Sullivan, P.A. and Shepherd, M.G. (1985) N-acetyl-D-glucosamine-induced morphogenesis in *Candida albicans*. *Microbiologica*, **8**, 85-99.
- Caticha, O., Grover, S., Winge, D. and Odell, W.D. (1992) Stimulation of *Candida albicans* transition by human chorionic gonadotrophin and a bacterial protein. *Endocr Res*, **18**, 133-143.
- Chaffin, W.L. (2008) *Candida albicans* cell wall proteins. *Microbiol Mol Biol Rev*, **72**, 495-544.
- Chaffin, W.L., Lopez-Ribot, J.L., Casanova, M., Gozalbo, D. and Martinez, J.P. (1998) Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: identification, function, and expression. *Microbiol Mol Biol Rev*, **62**, 130-180.
- Chen, C.G., Yang, Y.L., Cheng, H.H., Su, C.L., Huang, S.F., Chen, C.T., Liu, Y.T., Su, I.J. and Lo, H.J. (2006) Non-lethal *Candida albicans* cph1/cph1 efg1/efg1 transcription factor mutant establishing restricted zone of infection in a mouse model of systemic infection. *Int J Immunopathol Pharmacol*, **19**, 561-565.
- Chen, J., Chen, J., Lane, S. and Liu, H. (2002a) A conserved mitogen-activated protein kinase pathway is required for mating in *Candida albicans*. *Mol Microbiol*, **46**, 1335-1344.
- Chen, Y.C., Wu, C.C., Chung, W.L. and Lee, F.J. (2002b) Differential secretion of Sap4-6 proteins in *Candida albicans* during hyphae formation. *Microbiology*, **148**, 3743-3754.
- Cheng, S., Nguyen, M.H., Zhang, Z., Jia, H., Handfield, M. and Clancy, C.J. (2003) Evaluation of the roles of four *Candida albicans* genes in virulence by using gene disruption strains that express URA3 from the native locus. *Infect Immun*, **71**, 6101-6103.
- Cohen, S.N., Chang, A.C. and Hsu, L. (1972) Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **69**, 2110-2114.
- Cole, M.F., Bowen, W.H., Zhao, X.J. and Cihlar, R.L. (1995) Avirulence of *Candida albicans* auxotrophic mutants in a rat model of oropharyngeal candidiasis. *FEMS Microbiol Lett*, **126**, 177-180.
- Coppin, E., Debuchy, R., Arnaise, S. and Picard, M. (1997) Mating types and sexual development in filamentous ascomycetes. *Microbiol Mol Biol Rev*, **61**, 411-428.
- Cornelissen, B.J., Hooft van Huijsduijnen, R.A., Van Loon, L.C. and Bol, J.F. (1986) Molecular characterization of messenger RNAs for 'pathogenesis related' proteins la, lb and lc, induced by TMV infection of tobacco. *Embo J*, **5**, 37-40.
- Cornelissen, B.J., Horowitz, J., van Kan, J.A., Goldberg, R.B. and Bol, J.F. (1987) Structure of tobacco genes encoding pathogenesis-related proteins from the PR-1 group. *Nucleic Acids Res*, **15**, 6799-6811.
- Crews, S.T. (1998) Control of cell lineage-specific development and transcription by bHLH-PAS proteins. *Genes Dev*, **12**, 607-620.

- Csank, C., Makris, C., Meloche, S., Schroppel, K., Rollinghoff, M., Dignard, D., Thomas, D.Y. and Whiteway, M. (1997) Derepressed hyphal growth and reduced virulence in a VH1 family-related protein phosphatase mutant of the human pathogen *Candida albicans*. *Mol Biol Cell*, **8**, 2539-2551.
- Csank, C., Schroppel, K., Leberer, E., Harcus, D., Mohamed, O., Meloche, S., Thomas, D.Y. and Whiteway, M. (1998) Roles of the *Candida albicans* mitogen-activated protein kinase homolog, Cek1p, in hyphal development and systemic candidiasis. *Infect Immun*, **66**, 2713-2721.
- Cutler, J.E. (1991) Putative virulence factors of *Candida albicans*. *Annu Rev Microbiol*, **45**, 187-218.
- Daniels, K.J., Srikantha, T., Lockhart, S.R., Pujol, C. and Soll, D.R. (2006) Opaque cells signal white cells to form biofilms in *Candida albicans*. *Embo J*, **25**, 2240-2252.
- Darfeuille-Michaud, A., Aubel, D., Chauviere, G., Rich, C., Bourges, M., Servin, A. and Joly, B. (1990) Adhesion of enterotoxigenic *Escherichia coli* to the human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture. *Infect Immun*, **58**, 893-902.
- Davis, D., Edwards, J.E., Jr., Mitchell, A.P. and Ibrahim, A.S. (2000a) *Candida albicans* RIM101 pH response pathway is required for host-pathogen interactions. *Infect Immun*, **68**, 5953-5959.
- Davis, D., Wilson, R.B. and Mitchell, A.P. (2000b) RIM101-dependent and-independent pathways govern pH responses in *Candida albicans*. *Mol Cell Biol*, **20**, 971-978.
- Davison, B.L., Leighton, T. and Rabinowitz, J.C. (1979) Purification of *Bacillus subtilis* RNA polymerase with heparin-agarose. In vitro transcription of phi 29 DNA. *J Biol Chem*, **254**, 9220-9226.
- De Bernardis, F., Muhlschlegel, F.A., Cassone, A. and Fonzi, W.A. (1998) The pH of the host niche controls gene expression in and virulence of *Candida albicans*. *Infect Immun*, **66**, 3317-3325.
- De Groot, P.W., Hellingwerf, K.J. and Klis, F.M. (2003) Genome-wide identification of fungal GPI proteins. *Yeast*, **20**, 781-796.
- de Micheli, M., Bille, J., Schueller, C. and Sanglard, D. (2002) A common drug-responsive element mediates the upregulation of the *Candida albicans* ABC transporters CDR1 and CDR2, two genes involved in antifungal drug resistance. *Mol Microbiol*, **43**, 1197-1214.
- Deckert, J., Torres, A.M., Hwang, S.M., Kastaniotis, A.J. and Zitomer, R.S. (1998) The anatomy of a hypoxic operator in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **150**, 1429-1441.
- Delbruck, S. and Ernst, J.F. (1993) Morphogenesis-independent regulation of actin transcript levels in the pathogenic yeast *Candida albicans*. *Mol Microbiol*, **10**, 859-866.
- Devlin, C., Tice-Baldwin, K., Shore, D. and Arndt, K.T. (1991) RAP1 is required for BAS1/BAS2- and GCN4-dependent transcription of the yeast HIS4 gene. *Mol Cell Biol*, **11**, 3642-3651.
- Diekema, D.J. and Pfaller, M.A. (2004) Nosocomial candidemia: an ounce of prevention is better than a pound of cure. *Infect Control Hosp Epidemiol*, **25**, 624-626.
- Dieterich, C., Schandar, M., Noll, M., Johannes, F.J., Brunner, H., Graeve, T. and Rupp, S. (2002) In vitro reconstructed human epithelia reveal contributions of *Candida albicans* EFG1 and CPH1 to adhesion and invasion. *Microbiology*, **148**, 497-506.
- Dignard, D., El-Naggar, A.L., Logue, M.E., Butler, G. and Whiteway, M. (2007) Identification and characterization of MFA1, the gene encoding *Candida albicans* a-factor pheromone. *Eukaryot Cell*, **6**, 487-494.
- Doedt, T., Krishnamurthy, S., Bockmuhl, D.P., Tebarth, B., Stempel, C., Russell, C.L., Brown, A.J. and Ernst, J.F. (2004) APSES proteins regulate morphogenesis and metabolism in *Candida albicans*. *Mol Biol Cell*, **15**, 3167-3180.

- Dolan, J.W., Kirkman, C. and Fields, S. (1989) The yeast STE12 protein binds to the DNA sequence mediating pheromone induction. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **86**, 5703-5707.
- Dooijes, D., van de Wetering, M., Knippels, L. and Clevers, H. (1993) The Schizosaccharomyces pombe mating-type gene mat-Mc encodes a sequence-specific DNA-binding high mobility group box protein. *J Biol Chem*, **268**, 24813-24817.
- dos Santos, A.L., de Carvalho, I.M., da Silva, B.A., Portela, M.B., Alviano, C.S. and de Araujo Soares, R.M. (2006) Secretion of serine peptidase by a clinical strain of Candida albicans: influence of growth conditions and cleavage of human serum proteins and extracellular matrix components. *FEMS Immunol Med Microbiol*, **46**, 209-220.
- Dumitru, R., Navarathna, D.H., Semighini, C.P., Elowsky, C.G., Dumitru, R.V., Dignard, D., Whiteway, M., Atkin, A.L. and Nickerson, K.W. (2007) In vivo and in vitro anaerobic mating in Candida albicans. *Eukaryot Cell*, **6**, 465-472.
- Dutton, J.R., Johns, S. and Miller, B.L. (1997) StuAp is a sequence-specific transcription factor that regulates developmental complexity in Aspergillus nidulans. *Embo J*, **16**, 5710-5721.
- Eberle, H.B., Serrano, R.L., Fullekrug, J., Schlosser, A., Lehmann, W.D., Lottspeich, F., Kaloyanova, D., Wieland, F.T. and Helms, J.B. (2002) Identification and characterization of a novel human plant pathogenesis-related protein that localizes to lipid-enriched microdomains in the Golgi complex. *J Cell Sci*, **115**, 827-838.
- Edmond, M.B., Wallace, S.E., McClish, D.K., Pfaller, M.A., Jones, R.N. and Wenzel, R.P. (1999) Nosocomial bloodstream infections in United States hospitals: a three-year analysis. *Clin Infect Dis*, **29**, 239-244.
- Eggimann, P., Garbino, J. and Pittet, D. (2003) Management of Candida species infections in critically ill patients. *Lancet Infect Dis*, **3**, 772-785.
- Eisenberg, I., Barash, M., Kahan, T. and Mitrani-Rosenbaum, S. (2002) Cloning and characterization of a human novel gene C9orf19 encoding a conserved putative protein with an SCP-like extracellular protein domain. *Gene*, **293**, 141-148.
- Eisenhaber, B., Schneider, G., Wildpaner, M. and Eisenhaber, F. (2004) A sensitive predictor for potential GPI lipid modification sites in fungal protein sequences and its application to genome-wide studies for Aspergillus nidulans, Candida albicans, Neurospora crassa, Saccharomyces cerevisiae and Schizosaccharomyces pombe. *J Mol Biol*, **337**, 243-253.
- Ellenberger, T., Fass, D., Arnaud, M. and Harrison, S.C. (1994) Crystal structure of transcription factor E47: E-box recognition by a basic region helix-loop-helix dimer. *Genes Dev*, **8**, 970-980.
- Entian, K.D., Schuster, T., Hegemann, J.H., Becher, D., Feldmann, H., Guldener, U., Gotz, R., Hansen, M., Hollenberg, C.P., Jansen, G., Kramer, W., Klein, S., Kotter, P., Kricke, J., Launhardt, H., Mannhaupt, G., Maierl, A., Meyer, P., Mewes, W., Munder, T., Niedenthal, R.K., Ramezani Rad, M., Rohmer, A., Romer, A., Hinnen, A. and et al. (1999) Functional analysis of 150 deletion mutants in Saccharomyces cerevisiae by a systematic approach. *Mol Gen Genet*, **262**, 683-702.
- Ernst, J.F. (ed.). (2000a) *Regulation of dimorphism in Candida albicans*.
- Ernst, J.F. (2000b) Transcription factors in Candida albicans - environmental control of morphogenesis. *Microbiology*, **146**, 1763-1774.
- Errede, B. and Ammerer, G. (1989) STE12, a protein involved in cell-type-specific transcription and signal transduction in yeast, is part of protein-DNA complexes. *Genes Dev*, **3**, 1349-1361.
- Fernandez, C., Szyperski, T., Bruyere, T., Ramage, P., Mosinger, E. and Wuthrich, K. (1997) NMR solution structure of the pathogenesis-related protein P14a. *J Mol Biol*, **266**, 576-593.

- Ferre-D'Amare, A.R., Prendergast, G.C., Ziff, E.B. and Burley, S.K. (1993) Recognition by Max of its cognate DNA through a dimeric b/HLH/Z domain. *Nature*, **363**, 38-45.
- Fidel, P.L., Jr., Vazquez, J.A. and Sobel, J.D. (1999) *Candida glabrata*: review of epidemiology, pathogenesis, and clinical disease with comparison to *C. albicans*. *Clin Microbiol Rev*, **12**, 80-96.
- Filler, S.G., Swerdloff, J.N., Hobbs, C. and Lockett, P.M. (1995) Penetration and damage of endothelial cells by *Candida albicans*. *Infect Immun*, **63**, 976-983.
- Fogh, J., Fogh, J.M. and Orfeo, T. (1977) One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. *J Natl Cancer Inst*, **59**, 221-226.
- Fonzi, W.A. and Irwin, M.Y. (1993) Isogenic strain construction and gene mapping in *Candida albicans*. *Genetics*, **134**, 717-728.
- Forche, A., Alby, K., Schaefer, D., Johnson, A.D., Berman, J. and Bennett, R.J. (2008) The parasexual cycle in *Candida albicans* provides an alternative pathway to meiosis for the formation of recombinant strains. *PLoS Biol*, **6**, e110.
- Fradin, C., De Groot, P., MacCallum, D., Schaller, M., Klis, F., Odds, F.C. and Hube, B. (2005) Granulocytes govern the transcriptional response, morphology and proliferation of *Candida albicans* in human blood. *Mol Microbiol*, **56**, 397-415.
- Fradin, C., Kretschmar, M., Nichterlein, T., Gaillardin, C., d'Enfert, C. and Hube, B. (2003) Stage-specific gene expression of *Candida albicans* in human blood. *Mol Microbiol*, **47**, 1523-1543.
- Fried, M. and Crothers, D.M. (1981) Equilibria and kinetics of lac repressor-operator interactions by polyacrylamide gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res*, **9**, 6505-6525.
- Fu, Y., Ibrahim, A.S., Sheppard, D.C., Chen, Y.C., French, S.W., Cutler, J.E., Filler, S.G. and Edwards, J.E., Jr. (2002) *Candida albicans* Als1p: an adhesin that is a downstream effector of the EFG1 filamentation pathway. *Mol Microbiol*, **44**, 61-72.
- Furman, R.M. and Ahearn, D.G. (1983) *Candida ciferrii* and *Candida chiropterorum* isolated from clinical specimens. *J Clin Microbiol*, **18**, 1252-1255.
- Garner, M.M. and Revzin, A. (1981) A gel electrophoresis method for quantifying the binding of proteins to specific DNA regions: application to components of the *Escherichia coli* lactose operon regulatory system. *Nucleic Acids Res*, **9**, 3047-3060.
- Gasteiger, E., Gattiker, A., Hoogland, C., Ivanyi, I., Appel, R.D. and Bairoch, A. (2003) ExPASy: The proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Res*, **31**, 3784-3788.
- Gehring, W.J., Qian, Y.Q., Billeter, M., Furukubo-Tokunaga, K., Schier, A.F., Resendez-Perez, D., Affolter, M., Otting, G. and Wuthrich, K. (1994) Homeodomain-DNA recognition. *Cell*, **78**, 211-223.
- Ghannoum, M.A. (2000) Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. *Clin Microbiol Rev*, **13**, 122-143, table of contents.
- Ghannoum, M.A., Spellberg, B., Saporito-Irwin, S.M. and Fonzi, W.A. (1995) Reduced virulence of *Candida albicans* PHR1 mutants. *Infect Immun*, **63**, 4528-4530.
- Giaever, G., Chu, A.M., Ni, L., Connelly, C., Riles, L., Veronneau, S., Dow, S., Lucau-Danila, A., Anderson, K., Andre, B., Arkin, A.P., Astromoff, A., El-Bakkoury, M., Bangham, R., Benito, R., Brachat, S., Campanaro, S., Curtiss, M., Davis, K., Deutschbauer, A., Entian, K.D., Flaherty, P., Foury, F., Garfinkel, D.J., Gerstein, M., Gotte, D., Guldener, U., Hegemann, J.H., Hempel, S., Herman, Z., Jaramillo, D.F., Kelly, D.E., Kelly, S.L., Kotter, P., LaBonte, D., Lamb, D.C., Lan, N., Liang, H., Liao, H., Liu, L., Luo, C., Lussier, M., Mao, R., Menard, P., Ooi, S.L., Revuelta, J.L., Roberts, C.J., Rose, M., Ross-Macdonald, P., Scherens, B.,

- Schimmack, G., Shafer, B., Shoemaker, D.D., Sookhai-Mahadeo, S., Storms, R.K., Strathern, J.N., Valle, G., Voet, M., Volckaert, G., Wang, C.Y., Ward, T.R., Wilhelmy, J., Winzeler, E.A., Yang, Y., Yen, G., Youngman, E., Yu, K., Bussey, H., Boeke, J.D., Snyder, M., Philippsen, P., Davis, R.W. and Johnston, M. (2002) Functional profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Nature*, **418**, 387-391.
- Gianinazzi, S., Martin, C. and Vallee, J.C. (1970) [Hypersensitivity to viruses, temperature and soluble proteins in *Nicotiana Xanthi* n.c. Appearance of new macromolecules at the repression of viral synthesis]. *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D*, **270**, 2383-2386.
- Giard, D.J., Aaronson, S.A., Todaro, G.J., Arnstein, P., Kersey, J.H., Dosik, H. and Parks, W.P. (1973) In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J Natl Cancer Inst*, **51**, 1417-1423.
- Gibbs, G.M., Roelants, K. and O'Bryan, M.K. (2008) The CAP superfamily: cysteine-rich secretory proteins, antigen 5, and pathogenesis-related 1 proteins--roles in reproduction, cancer, and immune defense. *Endocr Rev*, **29**, 865-897.
- Gillum, A.M., Tsay, E.Y. and Kirsch, D.R. (1984) Isolation of the *Candida albicans* gene for orotidine-5'-phosphate decarboxylase by complementation of *S. cerevisiae* *ura3* and *E. coli* *pyrF* mutations. *Mol Gen Genet*, **198**, 179-182.
- Gimeno, C.J. and Fink, G.R. (1994) Induction of pseudohyphal growth by overexpression of PHD1, a *Saccharomyces cerevisiae* gene related to transcriptional regulators of fungal development. *Mol Cell Biol*, **14**, 2100-2112.
- Gimeno, C.J., Ljungdahl, P.O., Styles, C.A. and Fink, G.R. (1992) Unipolar cell divisions in the yeast *S. cerevisiae* lead to filamentous growth: regulation by starvation and RAS. *Cell*, **68**, 1077-1090.
- Gow, N.A., Brown, A.J. and Odds, F.C. (2002) Fungal morphogenesis and host invasion. *Curr Opin Microbiol*, **5**, 366-371.
- Graser, Y., Volovsek, M., Arrington, J., Schonian, G., Presber, W., Mitchell, T.G. and Vilgalys, R. (1996) Molecular markers reveal that population structure of the human pathogen *Candida albicans* exhibits both clonality and recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 12473-12477.
- Gudlaugsson, O., Gillespie, S., Lee, K., Vande Berg, J., Hu, J., Messer, S., Herwaldt, L., Pfaller, M. and Diekema, D. (2003) Attributable mortality of nosocomial candidemia, revisited. *Clin Infect Dis*, **37**, 1172-1177.
- Guo, M., Teng, M., Niu, L., Liu, Q., Huang, Q. and Hao, Q. (2005) Crystal structure of the cysteine-rich secretory protein *stecrisp* reveals that the cysteine-rich domain has a K⁺ channel inhibitor-like fold. *J Biol Chem*, **280**, 12405-12412.
- Guthrie, C. and Fink, G.R. (1991) *Guide to yeast genetics and molecular biology*. Academic Press, San Diego.
- Guthrie, C. and Fink, G.R. (2002) *Guide to yeast genetics and molecular and cell biology*. Academic Press, Amsterdam ; Boston ; London.
- Hagen, D.C., McCaffrey, G. and Sprague, G.F., Jr. (1991) Pheromone response elements are necessary and sufficient for basal and pheromone-induced transcription of the *FUS1* gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, **11**, 2952-2961.
- Hamada, K., Fukuchi, S., Arisawa, M., Baba, M. and Kitada, K. (1998a) Screening for glycosylphosphatidylinositol (GPI)-dependent cell wall proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet*, **258**, 53-59.

- Hamada, K., Terashima, H., Arisawa, M. and Kitada, K. (1998b) Amino acid sequence requirement for efficient incorporation of glycosylphosphatidylinositol-associated proteins into the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, **273**, 26946-26953.
- Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol*, **166**, 557-580.
- Hansson, K., Thamlitz, A.M., Furie, B., Furie, B.C. and Stenflo, J. (2006) A single gamma-carboxyglutamic acid residue in a novel cysteine-rich secretory protein without propeptide. *Biochemistry*, **45**, 12828-12839.
- Hazen, K.C. (1995) New and emerging yeast pathogens. *Clin Microbiol Rev*, **8**, 462-478.
- Heim, U., Tietze, E., Weschke, W., Tschape, H. and Wobus, U. (1989) Nucleotide sequence of a plasmid born streptothricin-acetyl-transferase gene (sat-1). *Nucleic Acids Res*, **17**, 7103.
- Henriksen, A., King, T.P., Mirza, O., Monsalve, R.I., Meno, K., Ipsen, H., Larsen, J.N., Gajhede, M. and Spangfort, M.D. (2001) Major venom allergen of yellow jackets, Ves v 5: structural characterization of a pathogenesis-related protein superfamily. *Proteins*, **45**, 438-448.
- Hernandez, R. and Rupp, S. (2009) Human epithelial model systems for the study of *Candida* infections in vitro: part II. Histologic methods for studying fungal invasion. *Methods Mol Biol*, **470**, 105-123.
- Herrick, G. (1980) Site-specific DNA-affinity chromatography of the lac repressor. *Nucleic Acids Res*, **8**, 3721-3728.
- Hidalgo, I.J., Raub, T.J. and Borchardt, R.T. (1989) Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability. *Gastroenterology*, **96**, 736-749.
- Higa, A. and Mandel, M. (1970) Actinomycin sensitive mutants of *Escherichia coli* K-12. *Mol Gen Genet*, **108**, 41-46.
- Hiller, E., Heine, S., Brunner, H. and Rupp, S. (2007) *Candida albicans* Sun41p, a putative glycosidase, is involved in morphogenesis, cell wall biogenesis, and biofilm formation. *Eukaryot Cell*, **6**, 2056-2065.
- Hoffman, C.S. and Winston, F. (1987) A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene*, **57**, 267-272.
- Hostetter, M.K. (1994) Adhesins and ligands involved in the interaction of *Candida* spp. with epithelial and endothelial surfaces. *Clin Microbiol Rev*, **7**, 29-42.
- Hoyer, L.L. (2001) The ALS gene family of *Candida albicans*. *Trends Microbiol*, **9**, 176-180.
- Hoyer, L.L., Payne, T.L., Bell, M., Myers, A.M. and Scherer, S. (1998) *Candida albicans* ALS3 and insights into the nature of the ALS gene family. *Curr Genet*, **33**, 451-459.
- Huang, G., Wang, H., Chou, S., Nie, X., Chen, J. and Liu, H. (2006) Bistable expression of WOR1, a master regulator of white-opaque switching in *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 12813-12818.
- Hube, B. (1996) *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases. *Curr Top Med Mycol*, **7**, 55-69.
- Hube, B. and Naglik, J. (2001) *Candida albicans* proteinases: resolving the mystery of a gene family. *Microbiology*, **147**, 1997-2005.
- Hube, B., Sanglard, D., Odds, F.C., Hess, D., Monod, M., Schafer, W., Brown, A.J. and Gow, N.A. (1997) Disruption of each of the secreted aspartyl proteinase genes SAP1, SAP2, and SAP3 of *Candida albicans* attenuates virulence. *Infect Immun*, **65**, 3529-3538.

- Hube, B., Stehr, F., Bossenz, M., Mazur, A., Kretschmar, M. and Schafer, W. (2000) Secreted lipases of *Candida albicans*: cloning, characterisation and expression analysis of a new gene family with at least ten members. *Arch Microbiol*, **174**, 362-374.
- Hull, C.M. and Johnson, A.D. (1999) Identification of a mating type-like locus in the asexual pathogenic yeast *Candida albicans*. *Science*, **285**, 1271-1275.
- Hull, C.M., Raisner, R.M. and Johnson, A.D. (2000) Evidence for mating of the "asexual" yeast *Candida albicans* in a mammalian host. *Science*, **289**, 307-310.
- Hulo, N., Bairoch, A., Bulliard, V., Cerutti, L., Cuche, B.A., de Castro, E., Lachaize, C., Langendijk-Genevaux, P.S. and Sigrist, C.J. (2008) The 20 years of PROSITE. *Nucleic Acids Res*, **36**, D245-249.
- Ishii, N., Yamamoto, M., Lahm, H.W., Iizumi, S., Yoshihara, F., Nakayama, H., Arisawa, M. and Aoki, Y. (1997) A DNA-binding protein from *Candida albicans* that binds to the RPG box of *Saccharomyces cerevisiae* and the telomeric repeat sequence of *C. albicans*. *Microbiology*, **143** (Pt 2), 417-427.
- Jackson, B.E., Mitchell, B.M. and Wilhelmus, K.R. (2007) Corneal virulence of *Candida albicans* strains deficient in Tup1-regulated genes. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **48**, 2535-2539.
- Janbon, G., Sherman, F. and Rustchenko, E. (1998) Monosomy of a specific chromosome determines L-sorbose utilization: a novel regulatory mechanism in *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 5150-5155.
- Jin, R., Dobry, C.J., McCown, P.J. and Kumar, A. (2008) Large-scale analysis of yeast filamentous growth by systematic gene disruption and overexpression. *Mol Biol Cell*, **19**, 284-296.
- Jones, T., Federspiel, N.A., Chibana, H., Dungan, J., Kalman, S., Magee, B.B., Newport, G., Thorstenson, Y.R., Agabian, N., Magee, P.T., Davis, R.W. and Scherer, S. (2004) The diploid genome sequence of *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 7329-7334.
- Joshi, P.B., Webb, J.R., Davies, J.E. and McMaster, W.R. (1995) The gene encoding streptothricin acetyltransferase (sat) as a selectable marker for *Leishmania* expression vectors. *Gene*, **156**, 145-149.
- Jouault, T., Sarazin, A., Martinez-Esparza, M., Fradin, C., Sendid, B. and Poulain, D. (2009) Host responses to a versatile commensal: PAMPs and PRRs interplay leading to tolerance or infection by *Candida albicans*. *Cell Microbiol*, **11**, 1007-1015.
- Jung, W.H. and Stateva, L.I. (2003) The cAMP phosphodiesterase encoded by CaPDE2 is required for hyphal development in *Candida albicans*. *Microbiology*, **149**, 2961-2976.
- Kadonaga, J.T. (1991) Purification of sequence-specific binding proteins by DNA affinity chromatography. *Methods Enzymol*, **208**, 10-23.
- Kadonaga, J.T. and Tjian, R. (1986) Affinity purification of sequence-specific DNA binding proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **83**, 5889-5893.
- Kadosh, D. and Johnson, A.D. (2001) Rfg1, a protein related to the *Saccharomyces cerevisiae* hypoxic regulator Rox1, controls filamentous growth and virulence in *Candida albicans*. *Mol Cell Biol*, **21**, 2496-2505.
- Kadosh, D. and Johnson, A.D. (2005) Induction of the *Candida albicans* filamentous growth program by relief of transcriptional repression: a genome-wide analysis. *Mol Biol Cell*, **16**, 2903-2912.
- Karihaloo, A., Nickel, C. and Cantley, L.G. (2005) Signals which build a tubule. *Nephron Exp Nephrol*, **100**, e40-45.
- Keleher, C.A., Redd, M.J., Schultz, J., Carlson, M. and Johnson, A.D. (1992) Ssn6-Tup1 is a general repressor of transcription in yeast. *Cell*, **68**, 709-719.

- Kerr, L.D. (1995) Electrophoretic mobility shift assay. *Methods Enzymol*, **254**, 619-632.
- Khalaf, R.A. and Zitomer, R.S. (2001) The DNA binding protein Rfg1 is a repressor of filamentation in *Candida albicans*. *Genetics*, **157**, 1503-1512.
- Khan, Z.U., Ahmad, S., Mokaddas, E., Al-Sweih, N. and Chandy, R. (2005) Sunflower seed husk agar: a new medium for the differentiation of *Candida dubliniensis* from *Candida albicans*. *Indian J Med Microbiol*, **23**, 182-185.
- Kim, S., Wolyniak, M.J., Staab, J.F. and Sundstrom, P. (2007) A 368-base-pair cis-acting HWP1 promoter region, HCR, of *Candida albicans* confers hypha-specific gene regulation and binds architectural transcription factors Nhp6 and Gcf1p. *Eukaryot Cell*, **6**, 693-709.
- Kinsman, O.S., Pitblado, K. and Coulson, C.J. (1988) Effect of mammalian steroid hormones and luteinizing hormone on the germination of *Candida albicans* and implications for vaginal candidosis. *Mycoses*, **31**, 617-626.
- Kirsch, D.R., Kelly, R. and Kurtz, M.B. (eds.). (1990) *The Genetics of Candida*. CRC Press Boston.
- Kirsch, D.R. and Whitney, R.R. (1991) Pathogenicity of *Candida albicans* auxotrophic mutants in experimental infections. *Infect Immun*, **59**, 3297-3300.
- Kjaerulff, S., Dooijes, D., Clevers, H. and Nielsen, O. (1997) Cell differentiation by interaction of two HMG-box proteins: Mat1-Mc activates M cell-specific genes in *S.pombe* by recruiting the ubiquitous transcription factor Ste11 to weak binding sites. *Embo J*, **16**, 4021-4033.
- Klekamp, M.S. and Weil, P.A. (1982) Specific transcription of homologous class III genes in yeast-soluble cell-free extracts. *J Biol Chem*, **257**, 8432-8441.
- Klis, F.M., de Groot, P. and Hellingwerf, K. (2001) Molecular organization of the cell wall of *Candida albicans*. *Med Mycol*, **39 Suppl 1**, 1-8.
- Kobayashi, S.D. and Cutler, J.E. (1998) *Candida albicans* hyphal formation and virulence: is there a clearly defined role? *Trends Microbiol*, **6**, 92-94.
- Kohler, J.R. and Fink, G.R. (1996) *Candida albicans* strains heterozygous and homozygous for mutations in mitogen-activated protein kinase signaling components have defects in hyphal development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 13223-13228.
- Konig, P., Giraldo, R., Chapman, L. and Rhodes, D. (1996) The crystal structure of the DNA-binding domain of yeast RAP1 in complex with telomeric DNA. *Cell*, **85**, 125-136.
- Korting, H.C., Hube, B., Oberbauer, S., Januschke, E., Hamm, G., Albrecht, A., Borelli, C. and Schaller, M. (2003) Reduced expression of the hyphal-independent *Candida albicans* proteinase genes SAP1 and SAP3 in the *efg1* mutant is associated with attenuated virulence during infection of oral epithelium. *J Med Microbiol*, **52**, 623-632.
- Koshikawa, N., Nakamura, T., Tsuchiya, N., Isaji, M., Yasumitsu, H., Umeda, M. and Miyazaki, K. (1996) Purification and identification of a novel and four known serine proteinase inhibitors secreted by human glioblastoma cells. *J Biochem*, **119**, 334-339.
- Krogh, A., Larsson, B., von Heijne, G. and Sonnhammer, E.L. (2001) Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J Mol Biol*, **305**, 567-580.
- Kubler, E., Mosch, H.U., Rupp, S. and Lisanti, M.P. (1997) Gpa2p, a G-protein alpha-subunit, regulates growth and pseudohyphal development in *Saccharomyces cerevisiae* via a cAMP-dependent mechanism. *J Biol Chem*, **272**, 20321-20323.
- Kumamoto, C.A. and Vinces, M.D. (2005) Contributions of hyphae and hypha-co-regulated genes to *Candida albicans* virulence. *Cell Microbiol*, **7**, 1546-1554.

- Kvaal, C., Lachke, S.A., Srikantha, T., Daniels, K., McCoy, J. and Soll, D.R. (1999) Misexpression of the opaque-phase-specific gene PEP1 (SAP1) in the white phase of *Candida albicans* confers increased virulence in a mouse model of cutaneous infection. *Infect Immun*, **67**, 6652-6662.
- Kvaal, C.A., Srikantha, T. and Soll, D.R. (1997) Misexpression of the white-phase-specific gene WH11 in the opaque phase of *Candida albicans* affects switching and virulence. *Infect Immun*, **65**, 4468-4475.
- Lachke, S.A., Lockhart, S.R., Daniels, K.J. and Soll, D.R. (2003) Skin facilitates *Candida albicans* mating. *Infect Immun*, **71**, 4970-4976.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Lan, C.Y., Newport, G., Murillo, L.A., Jones, T., Scherer, S., Davis, R.W. and Agabian, N. (2002) Metabolic specialization associated with phenotypic switching in *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 14907-14912.
- Lan, L. and Xu, J. (2006) Multiple gene genealogical analyses suggest divergence and recent clonal dispersal in the opportunistic human pathogen *Candida guilliermondii*. *Microbiology*, **152**, 1539-1549.
- Land, G.A., McDonald, W.C., Stjernholm, R.L. and Friedman, T.L. (1975) Factors affecting filamentation in *Candida albicans*: relationship of the uptake and distribution of proline to morphogenesis. *Infect Immun*, **11**, 1014-1023.
- Lane, S., Birse, C., Zhou, S., Matson, R. and Liu, H. (2001a) DNA array studies demonstrate convergent regulation of virulence factors by Cph1, Cph2, and Efg1 in *Candida albicans*. *J Biol Chem*, **276**, 48988-48996.
- Lane, S., Zhou, S., Pan, T., Dai, Q. and Liu, H. (2001b) The basic helix-loop-helix transcription factor Cph2 regulates hyphal development in *Candida albicans* partly via TEC1. *Mol Cell Biol*, **21**, 6418-6428.
- Langenbeck, B. (1839) Auffindung von Pilzen auf der Schleimhaut der Speiseröhre einer Typhus-Leiche. *Neue Notizen aus dem Gebiete der Natur- und Heilkunde*, **12**, 145-147.
- Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J.D., Gibson, T.J. and Higgins, D.G. (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, **23**, 2947-2948.
- Lay, J., Henry, L.K., Clifford, J., Koltin, Y., Bulawa, C.E. and Becker, J.M. (1998) Altered expression of selectable marker URA3 in gene-disrupted *Candida albicans* strains complicates interpretation of virulence studies. *Infect Immun*, **66**, 5301-5306.
- Leberer, E., H Marcus, D., Broadbent, I.D., Clark, K.L., Dignard, D., Ziegelbauer, K., Schmidt, A., Gow, N.A., Brown, A.J. and 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**, 13217-13222.
- Leberer, E., H Marcus, D., Dignard, D., Johnson, L., Ushinsky, S., Thomas, D.Y. and Schroppel, K. (2001) Ras links cellular morphogenesis to virulence by regulation of the MAP kinase and cAMP signalling pathways in the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Mol Microbiol*, **42**, 673-687.
- Leberer, E., Ziegelbauer, K., Schmidt, A., H Marcus, D., Dignard, D., Ash, J., Johnson, L. and Thomas, D.Y. (1997) Virulence and hyphal formation of *Candida albicans* require the Ste20p-like protein kinase CaCla4p. *Curr Biol*, **7**, 539-546.
- Ledent, V. and Vervoort, M. (2001) The basic helix-loop-helix protein family: comparative genomics and phylogenetic analysis. *Genome Res*, **11**, 754-770.

- Lee, K.L., Buckley, H.R. and Campbell, C.C. (1975) An amino acid liquid synthetic medium for the development of mycelial and yeast forms of *Candida Albicans*. *Sabouraudia*, **13**, 148-153.
- Lee, S.A., Wormsley, S., Kamoun, S., Lee, A.F., Joiner, K. and Wong, B. (2003) An analysis of the *Candida albicans* genome database for soluble secreted proteins using computer-based prediction algorithms. *Yeast*, **20**, 595-610.
- Leidich, S.D., Ibrahim, A.S., Fu, Y., Koul, A., Jessup, C., Vitullo, J., Fonzi, W., Mirbod, F., Nakashima, S., Nozawa, Y. and Ghannoum, M.A. (1998) Cloning and disruption of caPLB1, a phospholipase B gene involved in the pathogenicity of *Candida albicans*. *J Biol Chem*, **273**, 26078-26086.
- Leng, P., Lee, P.R., Wu, H. and Brown, A.J. (2001) Efg1, a morphogenetic regulator in *Candida albicans*, is a sequence-specific DNA binding protein. *J Bacteriol*, **183**, 4090-4093.
- Lieb, J.D., Liu, X., Botstein, D. and Brown, P.O. (2001) Promoter-specific binding of Rap1 revealed by genome-wide maps of protein-DNA association. *Nat Genet*, **28**, 327-334.
- Lipke, P.N., Wojciechowicz, D. and Kurjan, J. (1989) AG alpha 1 is the structural gene for the *Saccharomyces cerevisiae* alpha-agglutinin, a cell surface glycoprotein involved in cell-cell interactions during mating. *Mol Cell Biol*, **9**, 3155-3165.
- Liu, H. (2001) Transcriptional control of dimorphism in *Candida albicans*. *Curr Opin Microbiol*, **4**, 728-735.
- Liu, H. (2002) Co-regulation of pathogenesis with dimorphism and phenotypic switching in *Candida albicans*, a commensal and a pathogen. *Int J Med Microbiol*, **292**, 299-311.
- Liu, H., Kohler, J. and Fink, G.R. (1994) Suppression of hyphal formation in *Candida albicans* by mutation of a STE12 homolog. *Science*, **266**, 1723-1726.
- Liu, H., Sadygov, R.G. and Yates, J.R., 3rd. (2004) A model for random sampling and estimation of relative protein abundance in shotgun proteomics. *Anal Chem*, **76**, 4193-4201.
- Lo, H.J., Kohler, J.R., DiDomenico, B., Loebenberg, D., Cacciapuoti, A. and Fink, G.R. (1997) Nonfilamentous *C. albicans* mutants are avirulent. *Cell*, **90**, 939-949.
- Lockhart, S.R., Daniels, K.J., Zhao, R., Wessels, D. and Soll, D.R. (2003a) Cell biology of mating in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell*, **2**, 49-61.
- Lockhart, S.R., Zhao, R., Daniels, K.J. and Soll, D.R. (2003b) Alpha-pheromone-induced "shmooing" and gene regulation require white-opaque switching during *Candida albicans* mating. *Eukaryot Cell*, **2**, 847-855.
- Lorenz, M.C. and Heitman, J. (1997) Yeast pseudohyphal growth is regulated by GPA2, a G protein alpha homolog. *Embo J*, **16**, 7008-7018.
- Lott, T.J., Fundyga, R.E., Kuykendall, R.J. and Arnold, J. (2005) The human commensal yeast, *Candida albicans*, has an ancient origin. *Fungal Genet Biol*, **42**, 444-451.
- Ma, P.C., Rould, M.A., Weintraub, H. and Pabo, C.O. (1994) Crystal structure of MyoD bHLH domain-DNA complex: perspectives on DNA recognition and implications for transcriptional activation. *Cell*, **77**, 451-459.
- MacCallum, D.M. (2009) Massive induction of innate immune response to *Candida albicans* in the kidney in a murine intravenous challenge model. *FEMS Yeast Res*, **9**, 1111-1122.
- MacCallum, D.M., Castillo, L., Brown, A.J., Gow, N.A. and Odds, F.C. (2009) Early-expressed chemokines predict kidney immunopathology in experimental disseminated *Candida albicans* infections. *PLoS One*, **4**, e6420.
- MacCallum, D.M. and Odds, F.C. (2005) Temporal events in the intravenous challenge model for experimental *Candida albicans* infections in female mice. *Mycoses*, **48**, 151-161.

- Machida, M., Jigami, Y. and Tanaka, H. (1989) Purification and characterization of a nuclear factor which binds specifically to the upstream activation sequence of *Saccharomyces cerevisiae* enolase 1 gene. *Eur J Biochem*, **184**, 305-311.
- Madhani, H.D. and Fink, G.R. (1997) Combinatorial control required for the specificity of yeast MAPK signaling. *Science*, **275**, 1314-1317.
- Madhani, H.D., Styles, C.A. and Fink, G.R. (1997) MAP kinases with distinct inhibitory functions impart signaling specificity during yeast differentiation. *Cell*, **91**, 673-684.
- Magee, B.B., Legrand, M., Alarco, A.M., Raymond, M. and Magee, P.T. (2002) Many of the genes required for mating in *Saccharomyces cerevisiae* are also required for mating in *Candida albicans*. *Mol Microbiol*, **46**, 1345-1351.
- Magee, B.B. and Magee, P.T. (2000) Induction of mating in *Candida albicans* by construction of MTL α and MTL α strains. *Science*, **289**, 310-313.
- Maidan, M.M., De Rop, L., Serneels, J., Exler, S., Rupp, S., Tournu, H., Thevelein, J.M. and Van Dijck, P. (2005) The G protein-coupled receptor Gpr1 and the Galpha protein Gpa2 act through the cAMP-protein kinase A pathway to induce morphogenesis in *Candida albicans*. *Mol Biol Cell*, **16**, 1971-1986.
- Malathi, K., Ganesan, K. and Datta, A. (1994) Identification of a putative transcription factor in *Candida albicans* that can complement the mating defect of *Saccharomyces cerevisiae* ste12 mutants. *J Biol Chem*, **269**, 22945-22951.
- Martin, G.S., Mannino, D.M., Eaton, S. and Moss, M. (2003) The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med*, **348**, 1546-1554.
- Martoglio, B. and Dobberstein, B. (1998) Signal sequences: more than just greasy peptides. *Trends Cell Biol*, **8**, 410-415.
- Massari, M.E. and Murre, C. (2000) Helix-loop-helix proteins: regulators of transcription in eucaryotic organisms. *Mol Cell Biol*, **20**, 429-440.
- Mean, M., Marchetti, O. and Calandra, T. (2008) Bench-to-bedside review: *Candida* infections in the intensive care unit. *Crit Care*, **12**, 204.
- Miller, K.Y., Wu, J. and Miller, B.L. (1992) StuA is required for cell pattern formation in *Aspergillus*. *Genes Dev*, **6**, 1770-1782.
- Miller, M.G. and Johnson, A.D. (2002) White-opaque switching in *Candida albicans* is controlled by mating-type locus homeodomain proteins and allows efficient mating. *Cell*, **110**, 293-302.
- Milne, T.J., Abbenante, G., Tyndall, J.D., Halliday, J. and Lewis, R.J. (2003) Isolation and characterization of a cone snail protease with homology to CRISP proteins of the pathogenesis-related protein superfamily. *J Biol Chem*, **278**, 31105-31110.
- Mitchell, A.P. (1998) Dimorphism and virulence in *Candida albicans*. *Curr Opin Microbiol*, **1**, 687-692.
- Miwa, T., Takagi, Y., Shinozaki, M., Yun, C.W., Schell, W.A., Perfect, J.R., Kumagai, H. and Tamaki, H. (2004) Gpr1, a putative G-protein-coupled receptor, regulates morphogenesis and hypha formation in the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Eukaryot Cell*, **3**, 919-931.
- Monge, R.A., Roman, E., Nombela, C. and Pla, J. (2006) The MAP kinase signal transduction network in *Candida albicans*. *Microbiology*, **152**, 905-912.
- Morris, A.J., Byrne, T.C., Madden, J.F. and Reller, L.B. (1996) Duration of incubation of fungal cultures. *J Clin Microbiol*, **34**, 1583-1585.

- Morrow, B., Srikantha, T., Anderson, J. and Soll, D.R. (1993) Coordinate regulation of two opaque-phase-specific genes during white-opaque switching in *Candida albicans*. *Infect Immun*, **61**, 1823-1828.
- Morrow, B., Srikantha, T. and Soll, D.R. (1992) Transcription of the gene for a pepsinogen, PEP1, is regulated by white-opaque switching in *Candida albicans*. *Mol Cell Biol*, **12**, 2997-3005.
- Morschhäuser, J., Blum-Oehler, G. and Jacker, J. (1997) Virulenz- und Resistenzmechanismen pathogener *Candida*-Spezies. *Med. Welt*, **48**, 352-357.
- Morschhäuser, J., Michel, S. and Staib, P. (1999) Sequential gene disruption in *Candida albicans* by FLP-mediated site-specific recombination. *Mol Microbiol*, **32**, 547-556.
- Muhlschlegel, F.A. and Fonzi, W.A. (1997) PHR2 of *Candida albicans* encodes a functional homolog of the pH-regulated gene PHR1 with an inverted pattern of pH-dependent expression. *Mol Cell Biol*, **17**, 5960-5967.
- Mulloy, B. and Forster, M.J. (2000) Conformation and dynamics of heparin and heparan sulfate. *Glycobiology*, **10**, 1147-1156.
- Mulloy, B., Forster, M.J., Jones, C. and Davies, D.B. (1993) N.m.r. and molecular-modelling studies of the solution conformation of heparin. *Biochem J*, **293 (Pt 3)**, 849-858.
- Murad, A.M., d'Enfert, C., Gaillardin, C., Tournu, H., Tekaiia, F., Talibi, D., Marechal, D., Marchais, V., Cottin, J. and Brown, A.J. (2001a) Transcript profiling in *Candida albicans* reveals new cellular functions for the transcriptional repressors CaTup1, CaMig1 and CaNrg1. *Mol Microbiol*, **42**, 981-993.
- Murad, A.M., Lee, P.R., Broadbent, I.D., Barelle, C.J. and Brown, A.J. (2000) CIP10, an efficient and convenient integrating vector for *Candida albicans*. *Yeast*, **16**, 325-327.
- 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. and Brown, A.J. (2001b) NRG1 represses yeast-hypha morphogenesis and hypha-specific gene expression in *Candida albicans*. *Embo J*, **20**, 4742-4752.
- Murphy, E.V., Zhang, Y., Zhu, W. and Biggs, J. (1995) The human glioma pathogenesis-related protein is structurally related to plant pathogenesis-related proteins and its gene is expressed specifically in brain tumors. *Gene*, **159**, 131-135.
- Murre, C., McCaw, P.S. and Baltimore, D. (1989a) A new DNA binding and dimerization motif in immunoglobulin enhancer binding, daughterless, MyoD, and myc proteins. *Cell*, **56**, 777-783.
- Murre, C., McCaw, P.S., Vaessin, H., Caudy, M., Jan, L.Y., Jan, Y.N., Cabrera, C.V., Buskin, J.N., Hauschka, S.D., Lassar, A.B. and et al. (1989b) Interactions between heterologous helix-loop-helix proteins generate complexes that bind specifically to a common DNA sequence. *Cell*, **58**, 537-544.
- Naglik, J., Albrecht, A., Bader, O. and Hube, B. (2004) *Candida albicans* proteinases and host/pathogen interactions. *Cell Microbiol*, **6**, 915-926.
- Naglik, J.R., Challacombe, S.J. and Hube, B. (2003) *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. *Microbiol Mol Biol Rev*, **67**, 400-428, table of contents.
- Naider, F. and Becker, J.M. (2004) The alpha-factor mating pheromone of *Saccharomyces cerevisiae*: a model for studying the interaction of peptide hormones and G protein-coupled receptors. *Peptides*, **25**, 1441-1463.
- Niderman, T., Genetet, I., Bruyere, T., Gees, R., Stintzi, A., Legrand, M., Fritig, B. and Mosinger, E. (1995) Pathogenesis-related PR-1 proteins are antifungal. Isolation and characterization of three 14-kilodalton proteins of tomato and of a basic PR-1 of tobacco with inhibitory activity against *Phytophthora infestans*. *Plant Physiol*, **108**, 17-27.

- Nielsen, K. and Heitman, J. (2007) Sex and virulence of human pathogenic fungi. *Adv Genet*, **57**, 143-173.
- Niewerth, M. and Korting, H.C. (2001) Phospholipases of *Candida albicans*. *Mycoses*, **44**, 361-367.
- Noffz, C.S., Liedschulte, V., Lengeler, K. and Ernst, J.F. (2008) Functional mapping of the *Candida albicans* Efg1 regulator. *Eukaryot Cell*, **7**, 881-893.
- Odds, F.C. (1988) *Candida and candidosis*. London : Baillière Tindall.
- Odds, F.C., Bougnoux, M.E., Shaw, D.J., Bain, J.M., Davidson, A.D., Diogo, D., Jacobsen, M.D., Lecomte, M., Li, S.Y., Tavanti, A., Maiden, M.C., Gow, N.A. and d'Enfert, C. (2007) Molecular phylogenetics of *Candida albicans*. *Eukaryot Cell*, **6**, 1041-1052.
- Ogawa, N., DeRisi, J. and Brown, P.O. (2000) New components of a system for phosphate accumulation and polyphosphate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* revealed by genomic expression analysis. *Mol Biol Cell*, **11**, 4309-4321.
- Oren, M., Winocour, E. and Prives, C. (1980) Differential affinities of simian virus 40 large tumor antigen for DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **77**, 220-224.
- Pan, X. and Heitman, J. (1999) Cyclic AMP-dependent protein kinase regulates pseudohyphal differentiation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, **19**, 4874-4887.
- Panwar, S.L., Legrand, M., Dignard, D., Whiteway, M. and Magee, P.T. (2003) MFalpha1, the gene encoding the alpha mating pheromone of *Candida albicans*. *Eukaryot Cell*, **2**, 1350-1360.
- Pappas, P.G., Rex, J.H., Sobel, J.D., Filler, S.G., Dismukes, W.E., Walsh, T.J. and Edwards, J.E. (2004) Guidelines for treatment of candidiasis. *Clin Infect Dis*, **38**, 161-189.
- Perepnikhatka, V., Fischer, F.J., Niimi, M., Baker, R.A., Cannon, R.D., Wang, Y.K., Sherman, F. and Rustchenko, E. (1999) Specific chromosome alterations in fluconazole-resistant mutants of *Candida albicans*. *J Bacteriol*, **181**, 4041-4049.
- Petersen, R.F., Marinoni, G., Nielsen, M.L. and Piskur, J. (2000) Molecular approaches for analyzing diversity and phylogeny among yeast species. *Contrib Microbiol*, **5**, 15-35.
- Pfaller, M.A. and Diekema, D.J. (2004) Rare and emerging opportunistic fungal pathogens: concern for resistance beyond *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. *J Clin Microbiol*, **42**, 4419-4431.
- Pfaller, M.A. and Diekema, D.J. (2007) Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev*, **20**, 133-163.
- Pfaller, M.A., Diekema, D.J., Mendez, M., Kibbler, C., Erzsebet, P., Chang, S.C., Gibbs, D.L. and Newell, V.A. (2006) *Candida guilliermondii*, an opportunistic fungal pathogen with decreased susceptibility to fluconazole: geographic and temporal trends from the ARTEMIS DISK antifungal surveillance program. *J Clin Microbiol*, **44**, 3551-3556.
- Pfaller, M.A., Diekema, D.J., Rinaldi, M.G., Barnes, R., Hu, B., Veselov, A.V., Tiraboschi, N., Nagy, E. and Gibbs, D.L. (2005) Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Study: a 6.5-year analysis of susceptibilities of *Candida* and other yeast species to fluconazole and voriconazole by standardized disk diffusion testing. *J Clin Microbiol*, **43**, 5848-5859.
- Phan, Q.T., Belanger, P.H. and Filler, S.G. (2000) Role of hyphal formation in interactions of *Candida albicans* with endothelial cells. *Infect Immun*, **68**, 3485-3490.
- Phan, Q.T., Myers, C.L., Fu, Y., Sheppard, D.C., Yeaman, M.R., Welch, W.H., Ibrahim, A.S., Edwards, J.E., Jr. and Filler, S.G. (2007) Als3 is a *Candida albicans* invasin that binds to cadherins and induces endocytosis by host cells. *PLoS Biol*, **5**, e64.

- Pitarch, A., Sanchez, M., Nombela, C. and Gil, C. (2002) Sequential fractionation and two-dimensional gel analysis unravels the complexity of the dimorphic fungus *Candida albicans* cell wall proteome. *Mol Cell Proteomics*, **1**, 967-982.
- Pittet, D., Monod, M., Suter, P.M., Frenk, E. and Auckenthaler, R. (1994) *Candida* colonization and subsequent infections in critically ill surgical patients. *Ann Surg*, **220**, 751-758.
- Pluthero, F.G. (1993) Rapid purification of high-activity Taq DNA polymerase. *Nucleic Acids Res*, **21**, 4850-4851.
- Pohl, M., Stuart, R.O., Sakurai, H. and Nigam, S.K. (2000) Branching morphogenesis during kidney development. *Annu Rev Physiol*, **62**, 595-620.
- Ponta, H., Ponta, U. and Wintersberger, E. (1971) DNA-dependent RNA polymerases from yeast. Partial characterization of three nuclear enzyme activities. *FEBS Lett*, **18**, 204-208.
- Pope, L.M. and Cole, G.T. (1982) Comparative studies of gastrointestinal colonization and systemic spread by *Candida albicans* and nonlethal yeast in the infant mouse. *Scan Electron Microsc*, 1667-1676.
- Poulain, D. and Jouault, T. (2004) *Candida albicans* cell wall glycans, host receptors and responses: elements for a decisive crosstalk. *Curr Opin Microbiol*, **7**, 342-349.
- Poulter, R.T. (1987) Natural auxotrophic heterozygosity in *Candida albicans*. *Crit Rev Microbiol*, **15**, 97-101.
- Price, M.F. and Cawson, R.A. (1977) Phospholipase activity in *Candida albicans*. *Sabouraudia*, **15**, 179-185.
- Pugh, D. and Cawson, R.A. (1977) The cytochemical localization of phospholipase in *Candida albicans* infecting the chick chorio-allantoic membrane. *Sabouraudia*, **15**, 29-35.
- Pujol, C., Daniels, K.J., Lockhart, S.R., Srikantha, T., Radke, J.B., Geiger, J. and Soll, D.R. (2004) The closely related species *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* can mate. *Eukaryot Cell*, **3**, 1015-1027.
- Pujol, C., Reynes, J., Renaud, F., Raymond, M., Tibayrenc, M., Ayala, F.J., Janbon, F., Mallie, M. and Bastide, J.M. (1993) The yeast *Candida albicans* has a clonal mode of reproduction in a population of infected human immunodeficiency virus-positive patients. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 9456-9459.
- Qian, J., Guo, Z.Y. and Chi, C.W. (2008) Cloning and isolation of a *Conus* cysteine-rich protein homologous to Tex31 but without proteolytic activity. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, **40**, 174-181.
- Ramon, A.M., Porta, A. and Fonzi, W.A. (1999) Effect of environmental pH on morphological development of *Candida albicans* is mediated via the PacC-related transcription factor encoded by PRR2. *J Bacteriol*, **181**, 7524-7530.
- Ray, T.L. and Payne, C.D. (1988) Scanning electron microscopy of epidermal adherence and cavitation in murine candidiasis: a role for *Candida* acid proteinase. *Infect Immun*, **56**, 1942-1949.
- Reef, S.E., Lasker, B.A., Butcher, D.S., McNeil, M.M., Pruitt, R., Keyserling, H. and Jarvis, W.R. (1998) Nonperinatal nosocomial transmission of *Candida albicans* in a neonatal intensive care unit: prospective study. *J Clin Microbiol*, **36**, 1255-1259.
- Reiss, E. and Morrison, C.J. (1993) Nonculture methods for diagnosis of disseminated candidiasis. *Clin Microbiol Rev*, **6**, 311-323.
- Reuss, O., Vik, A., Kolter, R. and Morschhauser, J. (2004) The SAT1 flipper, an optimized tool for gene disruption in *Candida albicans*. *Gene*, **341**, 119-127.

- Ribeiro, J.M. and Francischetti, I.M. (2003) Role of arthropod saliva in blood feeding: sialome and post-sialome perspectives. *Annu Rev Entomol*, **48**, 73-88.
- Riggle, P.J., Andrutis, K.A., Chen, X., Tzipori, S.R. and 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**, 3649-3652.
- Rigothier, M.C., Coconnier, M.H., Servin, A.L. and Gayral, P. (1991) A new in vitro model of *Entamoeba histolytica* adhesion, using the human colon carcinoma cell line Caco-2: scanning electron microscopic study. *Infect Immun*, **59**, 4142-4146.
- Rikkerink, E.H., Magee, B.B. and Magee, P.T. (1988) Opaque-white phenotype transition: a programmed morphological transition in *Candida albicans*. *J Bacteriol*, **170**, 895-899.
- Riviere, M.P., Marais, A., Ponchet, M., Willats, W. and Galiana, E. (2008) Silencing of acidic pathogenesis-related PR-1 genes increases extracellular beta-(1->3)-glucanase activity at the onset of tobacco defence reactions. *J Exp Bot*, **59**, 1225-1239.
- Robertson, L.S. and Fink, G.R. (1998) The three yeast A kinases have specific signaling functions in pseudohyphal growth. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 13783-13787.
- Robin, C. (1853) *Histoire naturelle des végétaux parasites qui croissent sur l'homme et sur les animaux vivants*. J. B. Baillière; New York, H. Baillière; [etc., Paris.
- Robinson, K.A. and Lopes, J.M. (2000) SURVEY AND SUMMARY: *Saccharomyces cerevisiae* basic helix-loop-helix proteins regulate diverse biological processes. *Nucleic Acids Res*, **28**, 1499-1505.
- Rocha, C.R., Schroppe, K., Harcus, D., Marcil, A., Dignard, D., Taylor, B.N., Thomas, D.Y., Whiteway, M. and Leberer, E. (2001) Signaling through adenylyl cyclase is essential for hyphal growth and virulence in the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Mol Biol Cell*, **12**, 3631-3643.
- Roman, E., Arana, D.M., Nombela, C., Alonso-Monge, R. and Pla, J. (2007) MAP kinase pathways as regulators of fungal virulence. *Trends Microbiol*, **15**, 181-190.
- Roman, E., Cottier, F., Ernst, J.F. and Pla, J. (2009) Msb2 signaling mucin controls activation of Cek1 mitogen-activated protein kinase in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell*, **8**, 1235-1249.
- Roman, E., Nombela, C. and Pla, J. (2005) The Sho1 adaptor protein links oxidative stress to morphogenesis and cell wall biosynthesis in the fungal pathogen *Candida albicans*. *Mol Cell Biol*, **25**, 10611-10627.
- Romeis, B., Böck, P. and Denk, H. (1989) *Romeis Mikroskopische Technik*. Urban und Schwarzenberg, München <etc.>.
- Rosenfeld, J., Capdevielle, J., Guillemot, J.C. and Ferrara, P. (1992) In-gel digestion of proteins for internal sequence analysis after one- or two-dimensional gel electrophoresis. *Anal Biochem*, **203**, 173-179.
- Rosenfeld, P.J. and Kelly, T.J. (1986) Purification of nuclear factor I by DNA recognition site affinity chromatography. *J Biol Chem*, **261**, 1398-1408.
- Rossignol, T., Lechat, P., Cuomo, C., Zeng, Q., Moszer, I. and d'Enfert, C. (2008) CandidaDB: a multi-genome database for *Candida* species and related *Saccharomycotina*. *Nucleic Acids Res*, **36**, D557-561.
- Rubin-Bejerano, I., Fraser, I., Grisafi, P. and Fink, G.R. (2003) Phagocytosis by neutrophils induces an amino acid deprivation response in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 11007-11012.

- Ruiz-Herrera, J., Elorza, M.V., Valentin, E. and Sentandreu, R. (2006) Molecular organization of the cell wall of *Candida albicans* and its relation to pathogenicity. *FEMS Yeast Res*, **6**, 14-29.
- Rustchenko, E.P., Howard, D.H. and Sherman, F. (1994) Chromosomal alterations of *Candida albicans* are associated with the gain and loss of assimilating functions. *J Bacteriol*, **176**, 3231-3241.
- Ryals, J., Uknes, S. and Ward, E. (1994) Systemic Acquired Resistance. *Plant Physiol*, **104**, 1109-1112.
- Saitou, N. and Nei, M. (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol*, **4**, 406-425.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Sanchez-Martinez, C. and Perez-Martin, J. (2002) Gpa2, a G-protein alpha subunit required for hyphal development in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell*, **1**, 865-874.
- Sanglard, D., Hube, B., Monod, M., Odds, F.C. and 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**, 3539-3546.
- Santos, M.A., Ueda, T., Watanabe, K. and Tuite, M.F. (1997) The non-standard genetic code of *Candida* spp.: an evolving genetic code or a novel mechanism for adaptation? *Mol Microbiol*, **26**, 423-431.
- Saporito-Irwin, S.M., Birse, C.E., Sypherd, P.S. and Fonzi, W.A. (1995) PHR1, a pH-regulated gene of *Candida albicans*, is required for morphogenesis. *Mol Cell Biol*, **15**, 601-613.
- Saunders, N. (2000) Funktion hyphenspezifisch exprimierter Proteine in *Candida albicans*. *Fraunhofer Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik*, Stuttgart.
- Saville, S.P., Lazzell, A.L., Monteagudo, C. and Lopez-Ribot, J.L. (2003) Engineered control of cell morphology in vivo reveals distinct roles for yeast and filamentous forms of *Candida albicans* during infection. *Eukaryot Cell*, **2**, 1053-1060.
- Schweizer, A., Rupp, S., Taylor, B.N., Rollinghoff, M. and Schroppel, K. (2000) The TEA/ATTS transcription factor CaTec1p regulates hyphal development and virulence in *Candida albicans*. *Mol Microbiol*, **38**, 435-445.
- Scott, M.P., Tamkun, J.W. and Hartzell, G.W., 3rd. (1989) The structure and function of the homeodomain. *Biochim Biophys Acta*, **989**, 25-48.
- Segal, B.H., Kwon-Chung, J., Walsh, T.J., Klein, B.S., Battiwalla, M., Almyroudis, N.G., Holland, S.M. and Romani, L. (2006) Immunotherapy for fungal infections. *Clin Infect Dis*, **42**, 507-515.
- Selmecki, A., Forche, A. and Berman, J. (2006) Aneuploidy and isochromosome formation in drug-resistant *Candida albicans*. *Science*, **313**, 367-370.
- Serrano, R.L., Kuhn, A., Hendricks, A., Helms, J.B., Sinning, I. and Groves, M.R. (2004) Structural analysis of the human Golgi-associated plant pathogenesis related protein GAPR-1 implicates dimerization as a regulatory mechanism. *J Mol Biol*, **339**, 173-183.
- Setiadi, E.R., Doedt, T., Cottier, F., Noffz, C. and Ernst, J.F. (2006) Transcriptional response of *Candida albicans* to hypoxia: linkage of oxygen sensing and Efg1p-regulatory networks. *J Mol Biol*, **361**, 399-411.
- Sharkey, L.L., Liao, W.L., Ghosh, A.K. and Fonzi, W.A. (2005) Flanking direct repeats of hisG alter URA3 marker expression at the HWP1 locus of *Candida albicans*. *Microbiology*, **151**, 1061-1071.

- Sharkey, L.L., McNemar, M.D., Saporito-Irwin, S.M., Sypherd, P.S. and Fonzi, W.A. (1999) HWP1 functions in the morphological development of *Candida albicans* downstream of EFG1, TUP1, and RBF1. *J Bacteriol*, **181**, 5273-5279.
- Sheppard, D.C., Yeaman, M.R., Welch, W.H., Phan, Q.T., Fu, Y., Ibrahim, A.S., Filler, S.G., Zhang, M., Waring, A.J. and Edwards, J.E., Jr. (2004) Functional and structural diversity in the Als protein family of *Candida albicans*. *J Biol Chem*, **279**, 30480-30489.
- Shore, D. (1994) RAP1: a protean regulator in yeast. *Trends Genet*, **10**, 408-412.
- Shore, D. and Nasmyth, K. (1987) Purification and cloning of a DNA binding protein from yeast that binds to both silencer and activator elements. *Cell*, **51**, 721-732.
- Shore, D., Stillman, D.J., Brand, A.H. and Nasmyth, K.A. (1987) Identification of silencer binding proteins from yeast: possible roles in SIR control and DNA replication. *Embo J*, **6**, 461-467.
- Slutsky, B., Staebell, M., Anderson, J., Risen, L., Pfaller, M. and Soll, D.R. (1987) "White-opaque transition": a second high-frequency switching system in *Candida albicans*. *J Bacteriol*, **169**, 189-197.
- Sobel, J.D. (2006) The Emergence of Non-*albicans* *Candida* Species as Causes of Invasive Candidiasis and Candidemia. *Curr Infect Dis Rep*, **8**, 427-433.
- Sohn, K. and Rupp, S. (2009) Human epithelial model systems for the study of *Candida* infections in vitro: part I. Adhesion to epithelial models. *Methods Mol Biol*, **470**, 95-104.
- Sohn, K., Senyurek, I., Fertey, J., Konigsdorfer, A., Joffroy, C., Hauser, N., Zelt, G., Brunner, H. and Rupp, S. (2006) An in vitro assay to study the transcriptional response during adherence of *Candida albicans* to different human epithelia. *FEMS Yeast Res*, **6**, 1085-1093.
- Sohn, K., Urban, C., Brunner, H. and Rupp, S. (2003) EFG1 is a major regulator of cell wall dynamics in *Candida albicans* as revealed by DNA microarrays. *Mol Microbiol*, **47**, 89-102.
- Soll, D.R. (1997) Gene regulation during high-frequency switching in *Candida albicans*. *Microbiology*, **143** (Pt 2), 279-288.
- Soll, D.R. and Pujol, C. (2003) *Candida albicans* clades. *FEMS Immunol Med Microbiol*, **39**, 1-7.
- Sonneborn, A., Bockmuhl, D.P. and Ernst, J.F. (1999a) Chlamyospore formation in *Candida albicans* requires the Efg1p morphogenetic regulator. *Infect Immun*, **67**, 5514-5517.
- Sonneborn, A., Bockmuhl, D.P., Gerads, M., Kurpanek, K., Sanglard, D. and Ernst, J.F. (2000) Protein kinase A encoded by TPK2 regulates dimorphism of *Candida albicans*. *Mol Microbiol*, **35**, 386-396.
- Sonneborn, A., Tebarth, B. and Ernst, J.F. (1999b) Control of white-opaque phenotypic switching in *Candida albicans* by the Efg1p morphogenetic regulator. *Infect Immun*, **67**, 4655-4660.
- Sorger, P.K. and Pelham, H.R. (1987) Purification and characterization of a heat-shock element binding protein from yeast. *Embo J*, **6**, 3035-3041.
- Sorgo, A.G., Heilmann, C.J., Dekker, H.L., Brul, S., de Koster, C.G. and Klis, F. (2010) Mass spectrometric analysis of the secretome of *Candida albicans*. *Yeast*.
- Spellberg, B., Ibrahim, A.S., Edwards, J.E., Jr. and Filler, S.G. (2005) Mice with disseminated candidiasis die of progressive sepsis. *J Infect Dis*, **192**, 336-343.
- Spellberg, B.J., Filler, S.G. and Edwards, J.E., Jr. (2006) Current treatment strategies for disseminated candidiasis. *Clin Infect Dis*, **42**, 244-251.
- Spellman, P.T., Sherlock, G., Zhang, M.Q., Iyer, V.R., Anders, K., Eisen, M.B., Brown, P.O., Botstein, D. and Futcher, B. (1998) Comprehensive identification of cell cycle-regulated genes

- of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* by microarray hybridization. *Mol Biol Cell*, **9**, 3273-3297.
- Srikantha, T., Borneman, A.R., Daniels, K.J., Pujol, C., Wu, W., Seringhaus, M.R., Gerstein, M., Yi, S., Snyder, M. and Soll, D.R. (2006) TOS9 regulates white-opaque switching in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell*, **5**, 1674-1687.
- Srikantha, T., Tsai, L.K., Daniels, K. and Soll, D.R. (2000) EFG1 null mutants of *Candida albicans* switch but cannot express the complete phenotype of white-phase budding cells. *J Bacteriol*, **182**, 1580-1591.
- Staab, J.F., Bradway, S.D., Fidel, P.L. and Sundstrom, P. (1999) Adhesive and mammalian transglutaminase substrate properties of *Candida albicans* Hwp1. *Science*, **283**, 1535-1538.
- Staab, J.F. and Sundstrom, P. (2003) URA3 as a selectable marker for disruption and virulence assessment of *Candida albicans* genes. *Trends Microbiol*, **11**, 69-73.
- Stintzi, A., Heitz, T., Prasad, V., Wiedemann-Merdinoglu, S., Kauffmann, S., Geoffroy, P., Legrand, M. and Fritig, B. (1993) Plant 'pathogenesis-related' proteins and their role in defense against pathogens. *Biochimie*, **75**, 687-706.
- Stoldt, V.R., Sonneborn, A., Leuker, C.E. and Ernst, J.F. (1997) Efg1p, an essential regulator of morphogenesis of the human pathogen *Candida albicans*, is a member of a conserved class of bHLH proteins regulating morphogenetic processes in fungi. *Embo J*, **16**, 1982-1991.
- Strathern, J.N. (1981) <<The>> *molecular biology of the yeast saccharomyces*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor.
- Su, Z., Osborne, M.J., Xu, P., Xu, X., Li, Y. and Ni, F. (2005) A bivalent dissectional analysis of the high-affinity interactions between Cdc42 and the Cdc42/Rac interactive binding domains of signaling kinases in *Candida albicans*. *Biochemistry*, **44**, 16461-16474.
- Sudbery, P., Gow, N. and Berman, J. (2004) The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. *Trends Microbiol*, **12**, 317-324.
- Sugimoto, A., Iino, Y., Maeda, T., Watanabe, Y. and Yamamoto, M. (1991) *Schizosaccharomyces pombe* *stel1+* encodes a transcription factor with an HMG motif that is a critical regulator of sexual development. *Genes Dev*, **5**, 1990-1999.
- Sundstrom, P. (2002) Adhesion in *Candida* spp. *Cell Microbiol*, **4**, 461-469.
- Sundstrom, P., Cutler, J.E. and Staab, J.F. (2002) Reevaluation of the role of HWP1 in systemic candidiasis by use of *Candida albicans* strains with selectable marker URA3 targeted to the ENO1 locus. *Infect Immun*, **70**, 3281-3283.
- Szyperski, T., Fernandez, C., Mumenthaler, C. and Wuthrich, K. (1998) Structure comparison of human glioma pathogenesis-related protein GliPR and the plant pathogenesis-related protein P14a indicates a functional link between the human immune system and a plant defense system. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 2262-2266.
- Tatusova, T.A. and Madden, T.L. (1999) BLAST 2 Sequences, a new tool for comparing protein and nucleotide sequences. *FEMS Microbiol Lett*, **174**, 247-250.
- Tavanti, A., Davidson, A.D., Fordyce, M.J., Gow, N.A., Maiden, M.C. and Odds, F.C. (2005) Population structure and properties of *Candida albicans*, as determined by multilocus sequence typing. *J Clin Microbiol*, **43**, 5601-5613.
- Taylor, J.W. and Berbee, M.L. (2006) Dating divergences in the Fungal Tree of Life: review and new analyses. *Mycologia*, **98**, 838-849.

- Taylor, P.R., Brown, G.D., Reid, D.M., Willment, J.A., Martinez-Pomares, L., Gordon, S. and Wong, S.Y. (2002) The beta-glucan receptor, dectin-1, is predominantly expressed on the surface of cells of the monocyte/macrophage and neutrophil lineages. *J Immunol*, **169**, 3876-3882.
- Tebarth, B., Doedt, T., Krishnamurthy, S., Weide, M., Monterola, F., Dominguez, A. and Ernst, J.F. (2003) Adaptation of the Efg1p morphogenetic pathway in *Candida albicans* by negative autoregulation and PKA-dependent repression of the EFG1 gene. *J Mol Biol*, **329**, 949-962.
- Terashima, H., Fukuchi, S., Nakai, K., Arisawa, M., Hamada, K., Yabuki, N. and Kitada, K. (2002) Sequence-based approach for identification of cell wall proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet*, **40**, 311-316.
- Torosantucci, A., Bromuro, C., Chiani, P., De Bernardis, F., Berti, F., Galli, C., Norelli, F., Bellucci, C., Polonelli, L., Costantino, P., Rappuoli, R. and Cassone, A. (2005) A novel glyco-conjugate vaccine against fungal pathogens. *J Exp Med*, **202**, 597-606.
- Torosantucci, A., Chiani, P., Bromuro, C., De Bernardis, F., Palma, A.S., Liu, Y., Mignogna, G., Maras, B., Colone, M., Stringaro, A., Zamboni, S., Feizi, T. and Cassone, A. (2009) Protection by anti-beta-glucan antibodies is associated with restricted beta-1,3 glucan binding specificity and inhibition of fungal growth and adherence. *PLoS One*, **4**, e5392.
- Trotter, P.J. and Storch, J. (1991) Fatty acid uptake and metabolism in a human intestinal cell line (Caco-2): comparison of apical and basolateral incubation. *J Lipid Res*, **32**, 293-304.
- Trotter, P.J. and Storch, J. (1993) Fatty acid esterification during differentiation of the human intestinal cell line Caco-2. *J Biol Chem*, **268**, 10017-10023.
- Tsong, A.E., Miller, M.G., Raisner, R.M. and Johnson, A.D. (2003) Evolution of a combinatorial transcriptional circuit: a case study in yeasts. *Cell*, **115**, 389-399.
- Tuch, B.B., Galgoczy, D.J., Hernday, A.D., Li, H. and Johnson, A.D. (2008) The evolution of combinatorial gene regulation in fungi. *PLoS Biol*, **6**, e38.
- Tzung, K.W., Williams, R.M., Scherer, S., Federspiel, N., Jones, T., Hansen, N., Bivolarevic, V., Huizar, L., Komp, C., Surzycki, R., Tamse, R., Davis, R.W. and Agabian, N. (2001) Genomic evidence for a complete sexual cycle in *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 3249-3253.
- Uemura, H., Watanabe-Yoshida, M., Ishii, N., Shinzato, T., Haw, R. and Aoki, Y. (2004) Isolation and characterization of *Candida albicans* homologue of RAP1, a repressor and activator protein gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **21**, 1-10.
- Uhl, M.A. and Johnson, A.D. (2001a) Development of *Streptococcus thermophilus lacZ* as a reporter gene for *Candida albicans*. *Microbiology*, **147**, 1189-1195.
- Uhl, M.A. and Johnson, A.D. (2001b) Development of *Streptococcus thermophilus lacZ* as a reporter gene for *Candida albicans*. *Microbiology*, **147**, 1189-1195.
- Urban, C., Sohn, K., Lottspeich, F., Brunner, H. and Rupp, S. (2003) Identification of cell surface determinants in *Candida albicans* reveals Tsa1p, a protein differentially localized in the cell. *FEBS Lett*, **544**, 228-235.
- Urban, C.F., Lourido, S. and Zychlinsky, A. (2006) How do microbes evade neutrophil killing? *Cell Microbiol*, **8**, 1687-1696.
- Ushinsky, S.C., Harcus, D., Ash, J., Dignard, D., Marcil, A., Morchhauser, J., Thomas, D.Y., Whiteway, M. and Leberer, E. (2002) CDC42 is required for polarized growth in human pathogen *Candida albicans*. *Eukaryot Cell*, **1**, 95-104.
- van Loon, L.C., Rep, M. and Pieterse, C.M. (2006) Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annu Rev Phytopathol*, **44**, 135-162.

- van Loon, L.C. and van Kammen, A. (1970) Polyacrylamide disc electrophoresis of the soluble leaf proteins from *Nicotiana tabacum* var. "Samsun" and "Samsun NN". II. Changes in protein constitution after infection with tobacco mosaic virus. *Virology*, **40**, 190-211.
- Vazquez, J.A., Skiest, D.J., Nieto, L., Northland, R., Sanne, I., Gogate, J., Greaves, W. and Isaacs, R. (2006) A multicenter randomized trial evaluating posaconazole versus fluconazole for the treatment of oropharyngeal candidiasis in subjects with HIV/AIDS. *Clin Infect Dis*, **42**, 1179-1186.
- Veses, V., Casanova, M., Murgui, A., Dominguez, A., Gow, N.A. and Martinez, J.P. (2005) ABG1, a novel and essential *Candida albicans* gene encoding a vacuolar protein involved in cytokinesis and hyphal branching. *Eukaryot Cell*, **4**, 1088-1101.
- Veses, V., Casanova, M., Murgui, A., Gow, N.A. and Martinez, J.P. (2009) *Candida albicans* ABG1 gene is involved in endocytosis. *FEMS Yeast Res*, **9**, 293-300.
- Vignais, M.L., Woudt, L.P., Wassenaar, G.M., Mager, W.H., Sentenac, A. and Planta, R.J. (1987) Specific binding of TUF factor to upstream activation sites of yeast ribosomal protein genes. *Embo J*, **6**, 1451-1457.
- Vinces, M.D. and Kumamoto, C.A. (2007) The morphogenetic regulator Czf1p is a DNA-binding protein that regulates white opaque switching in *Candida albicans*. *Microbiology*, **153**, 2877-2884.
- Visacka, K., Gerhold, J.M., Petrovicova, J., Kinsky, S., Joers, P., Nosek, J., Sedman, J. and Tomaska, L. (2009) Novel subfamily of mitochondrial HMG box-containing proteins: functional analysis of Gcf1p from *Candida albicans*. *Microbiology*, **155**, 1226-1240.
- Vogel, K. and Hinnen, A. (1990) The yeast phosphatase system. *Mol Microbiol*, **4**, 2013-2017.
- Ward, M.P., Gimeno, C.J., Fink, G.R. and Garrett, S. (1995) SOK2 may regulate cyclic AMP-dependent protein kinase-stimulated growth and pseudohyphal development by repressing transcription. *Mol Cell Biol*, **15**, 6854-6863.
- Wellington, M., Kabir, M.A. and Rustchenko, E. (2006) 5-fluoro-otic acid induces chromosome alterations in genetically manipulated strains of *Candida albicans*. *Mycologia*, **98**, 393-398.
- Wey, S.B., Mori, M., Pfaller, M.A., Woolson, R.F. and Wenzel, R.P. (1988) Hospital-acquired candidemia. The attributable mortality and excess length of stay. *Arch Intern Med*, **148**, 2642-2645.
- Whiteway, M. and Oberholzer, U. (2004) *Candida* morphogenesis and host-pathogen interactions. *Curr Opin Microbiol*, **7**, 350-357.
- Wilcox, C.M., Darouiche, R.O., Laine, L., Moskovitz, B.L., Mallegol, I. and Wu, J. (1997) A randomized, double-blind comparison of itraconazole oral solution and fluconazole tablets in the treatment of esophageal candidiasis. *J Infect Dis*, **176**, 227-232.
- Woodcock, D.M., Crowther, P.J., Doherty, J., Jefferson, S., DeCruz, E., Noyer-Weidner, M., Smith, S.S., Michael, M.Z. and Graham, M.W. (1989) Quantitative evaluation of *Escherichia coli* host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants. *Nucleic Acids Res*, **17**, 3469-3478.
- Wu, W., Pujol, C., Lockhart, S.R. and Soll, D.R. (2005) Chromosome loss followed by duplication is the major mechanism of spontaneous mating-type locus homozygosity in *Candida albicans*. *Genetics*, **169**, 1311-1327.
- Yamazaki, Y. and Morita, T. (2004) Structure and function of snake venom cysteine-rich secretory proteins. *Toxicon*, **44**, 227-231.
- Yi, S., Sahni, N., Daniels, K.J., Pujol, C., Srikantha, T. and Soll, D.R. (2008) The Same Receptor, G Protein, and Mitogen-activated Protein Kinase Pathway Activate Different Downstream

- Regulators in the Alternative White and Opaque Pheromone Responses of *Candida albicans*. *Mol Biol Cell*, **19**, 957-970.
- Yin, Q.Y., de Groot, P.W., Dekker, H.L., de Jong, L., Klis, F.M. and de Koster, C.G. (2005) Comprehensive proteomic analysis of *Saccharomyces cerevisiae* cell walls: identification of proteins covalently attached via glycosylphosphatidylinositol remnants or mild alkali-sensitive linkages. *J Biol Chem*, **280**, 20894-20901.
- Yoshikawa, K., Tanaka, T., Furusawa, C., Nagahisa, K., Hirasawa, T. and Shimizu, H. (2009) Comprehensive phenotypic analysis for identification of genes affecting growth under ethanol stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res*, **9**, 32-44.
- Yuan, Y.L. and Fields, S. (1991) Properties of the DNA-binding domain of the *Saccharomyces cerevisiae* STE12 protein. *Mol Cell Biol*, **11**, 5910-5918.
- Zaragoza, O., Rodriguez, C. and Gancedo, C. (2000) Isolation of the MIG1 gene from *Candida albicans* and effects of its disruption on catabolite repression. *J Bacteriol*, **182**, 320-326.
- Zhao, R., Daniels, K.J., Lockhart, S.R., Yeater, K.M., Hoyer, L.L. and Soll, D.R. (2005) Unique aspects of gene expression during *Candida albicans* mating and possible G(1) dependency. *Eukaryot Cell*, **4**, 1175-1190.
- Zheng, X., Wang, Y. and Wang, Y. (2004) Hgc1, a novel hypha-specific G1 cyclin-related protein regulates *Candida albicans* hyphal morphogenesis. *Embo J*, **23**, 1845-1856.
- Zordan, R.E., Galgoczy, D.J. and Johnson, A.D. (2006) Epigenetic properties of white-opaque switching in *Candida albicans* are based on a self-sustaining transcriptional feedback loop. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 12807-12812.
- Zordan, R.E., Miller, M.G., Galgoczy, D.J., Tuch, B.B. and Johnson, A.D. (2007) Interlocking transcriptional feedback loops control white-opaque switching in *Candida albicans*. *PLoS Biol*, **5**, e256.

Anhang

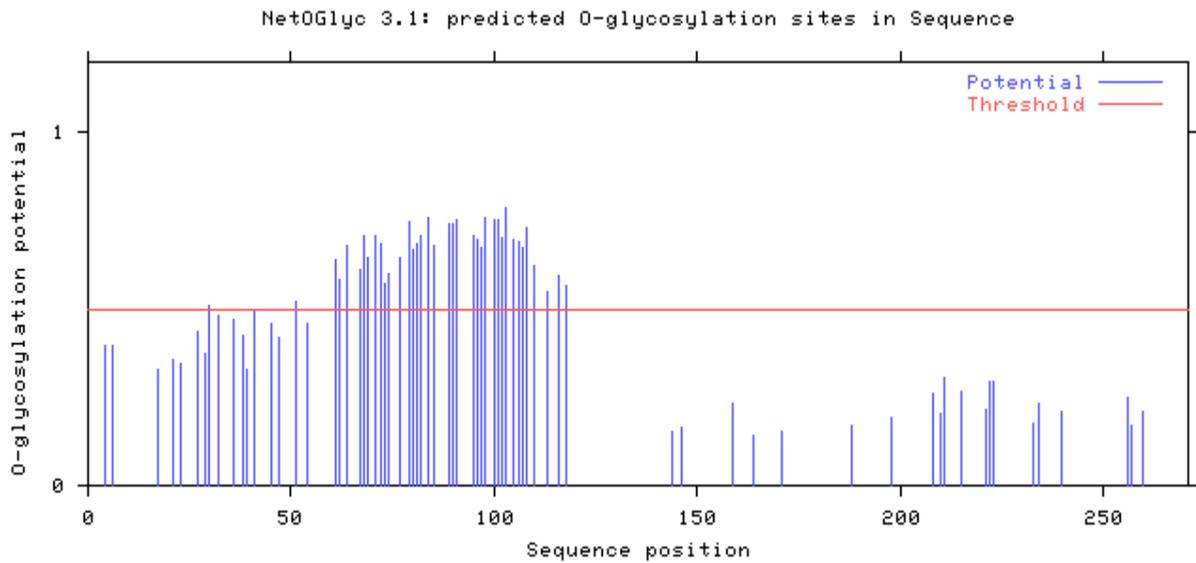
Potenzielle O-Glykosylierungs-Stellen (S/T-reiche Regionen) und hydrophobe Signalsequenzen (unterstrichen) der PRY-Gene RBE1, RBT4, ORF19.6200 und ORF19.2787 in C. albicans

(<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/>)

RBE1:

Länge: 271 AS

MKITNTLLNAAAALLAVTEAATITKFFTASTQTLFVVTQTSQTVVATKSFVETIYSAPPKQLTSKTQDSTSPTTSSVNSLTS
 SSATSIVETTTTPAPSSSTLTSTISSSTASEDSDATPTADVEFAEEILKEHNVKRALHGVPALSWSNKLAEYAQDYANTG
 FDCSNLNLKHSGGPYGENLAAGYMGGISPVDAWYDEISMVDWNNVDFTESTGHFTQLVWRSTTQVGCAMMCSTAWRQIT
 VCEYLPRGNVIGLNVTSGHSYFVDNVLPLK
T.....T.....TS.T..STS.TTSS..S.TS
 SS.TS...TTT...SSST.TTST.SSST.S..S..T.T.....

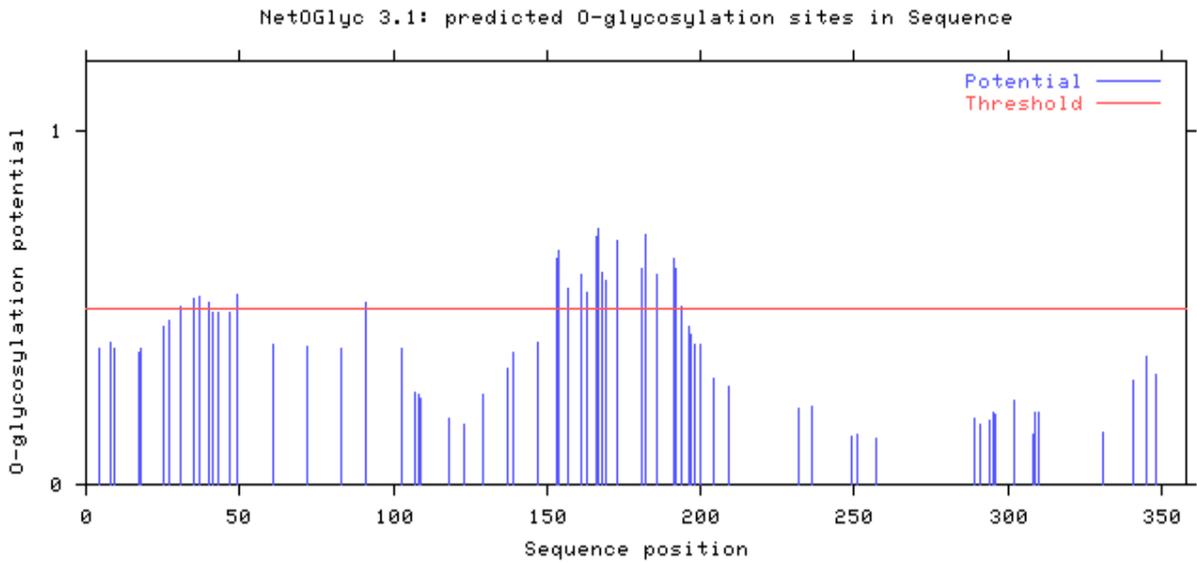


RBT4 (ORF19.13583):

Länge: 358 AS

MKFSQVATTAAIFAGLTTAEIAYVTQTRGVTVGETATVATTVTVGATVTGGGQGQDQVQQAPEADDIQQSAVPEADDI
QQSVVPEAEPTADADGGNGIAITEVFTTTIMGQEIVYSGVYYSYGEEHTYGDVQVQTLTIGGGGFPSSDDQYPTTEVSAEA
SPSAVTTSSAVATPDAKVPDSTKDASQPAATTASGSSSGSNDVSGVKDTKFAQQILDAHNQKRARHGVPDLTWDATVYQY
AQKFADQYSCSNLQHSGGKYGENLAVGYADGAAALQAWYEEAGKDGLSYSYGSSSVYNHFTQVVKSTTKLGCAYKDCR
AQNWGLYVVCSYDPAGNVMGTDPKTGKSYMAENVLRPQ

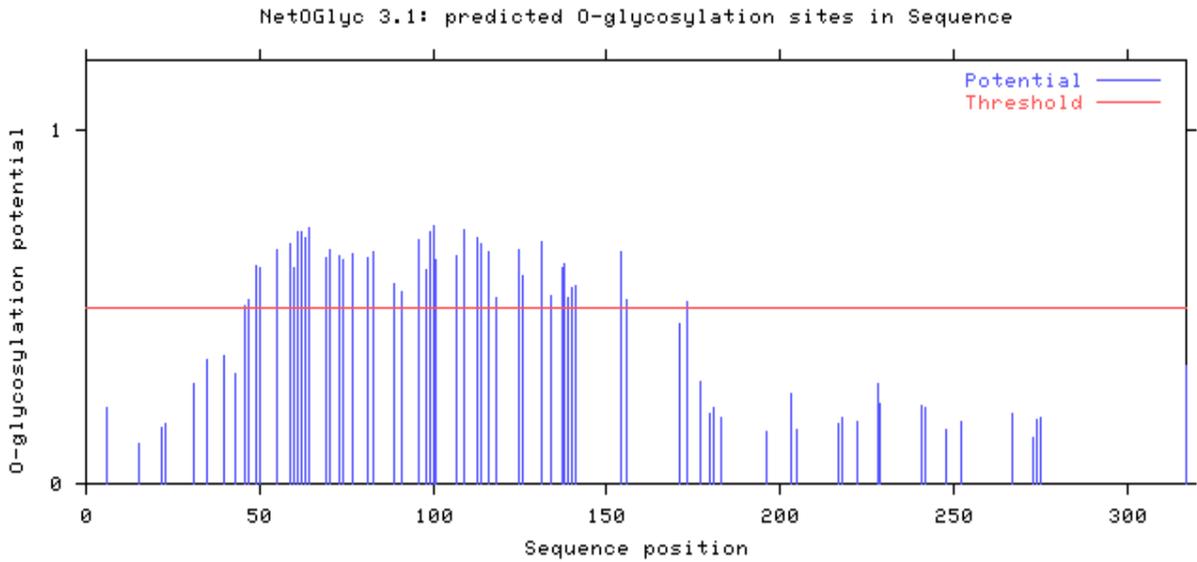
.....T...T.T..T.....T.....
.....T.....TT..S...
S.S..TTSS...T.....ST...S...TT.S.....
.....
.....



ORF19.6200:

Länge: 317 AS

MKFLQSFVILAVFSFAANLVSSKLVY EYETKYVTV EIVTIVSGETTYTTERLETNGPTSTTTTIVIPSSKPSPE SKPK
SDSQPMFQSPSPVQITPSTTSINNAPSPTK PETTIVTASPAVIAHTSVFVVT PNSAPTSSSPNIVQQVKAATPSAPKP
QPQPQPQENNSGTNDDSQLSSFSRQILEAHN IKRASHGVNPLTWSNELYNYANKVASSYDCSGNLRHTSGPYGENLALGY
SSGANAVSAWYSEGFNFGGAGKLNHFTQV VVKSTTQLGCAYKDCRAKGWGLYIICNYQKPGNIIGQELANILPLIRS
.....TT.TT...T...TSTTTT...SS..SS..S...
S.S.....S.S....T.STTS.....S.T...TT.T.S.....TS...T..S..TTSSS.....T.S....
.....T.....
.....

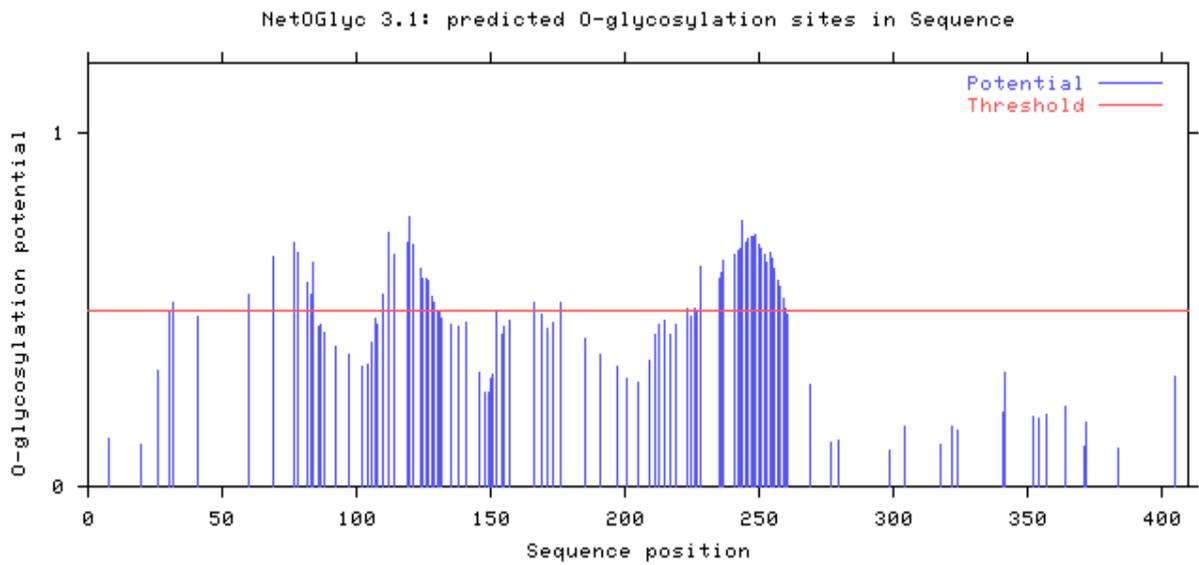


ORF19.2787:

Länge: 410 AS

MKQNYILSIILCYLLANVHSAPAIITVWQTVTDAQVAAGPTAAAPAANANANVQAAAAAPAPAPVASPAAPAPASSAP
QSSTPSSSGWLSNLFNSFFGGSDSDSSSGSDTASAAPASTSPQSSSSSSSSSGNSFLSFLSGLFGSGSSSSTPSSISQQQ
QQQQGSPASGSNSPNSAQPDAAAAANPVPQSNMNQGSGLGSGFGSGFGSGSGSDSDSGSGLPSASSSTIIQQQPSSSNIG
SSSTSSSSSSSSSSSSSSSSSGDIYAAISQCDGIDASFASEILDAHNKYRAQHKVGDLSWDVDTYNYAKNNADNYDCSGV
LTHTHGKFGENLAAGFKDGASTVAAWVDEPISYSDASFVYNHFTQVIWKGSTKVGCAKDCRKSNGWGLYVVCEYDPYGNV
IGQGSKNVFP

.....T.....S.....S.....SS..
.SST.....S.T.S...STS..SSSSSS.....
.....S.....S.....S..S.T.....SSS...
SSSTSSSSSSSSSSSSSSS.....
.....
.....



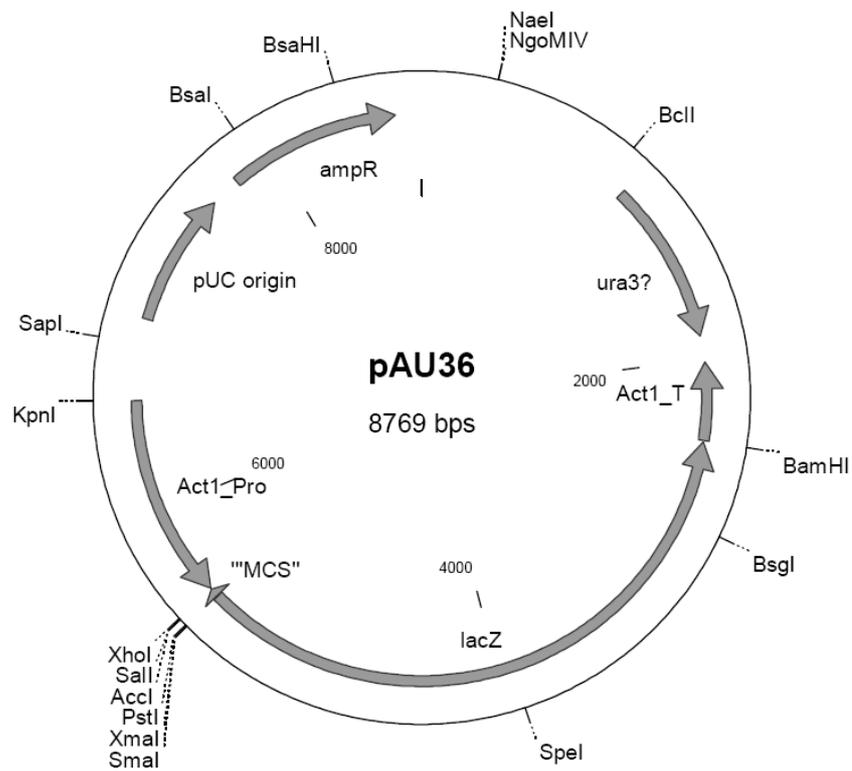
lacZ-Reporter-genvektor pAU36

Abb. 57. Plasmidkarte pAU36 (Uhl and Johnson, 2001a). Erstellt mit der Software „Clone Manager 5“

DNA-Sequenz des RBE1-Minimalpromotors (1039 bp)

5'-

TGGAACAAGTGGAAACAAAAACGGCAGATAGTTAATTAGTTCCATTGAACAATAAGAAACAAAG
ATAGAAAAAATAACCGCGAGATTTAATCTTTAAAGCAAGCAGAAATAATCTTTAAAAATAACC
TCTCACTAAAACCTTATGGACAAATCTTCGTAACCAGCCTAGCTGTGAATTAGCCAGTAATAGTAAA
TAACCATCAACTTACCAATTGATTCTATTTTTTAATTTAATTTATTATATTTTCTCCTATCCTTGCTTT
GTATCTGTTTTGATTTCTTGCTCGCAATAAAATACGAAGGAGAGAAACGCAAGCTTGCATATGTTT
ATATATAATTTTTCTTTTGATCGGTGCAGTGATGCCGATTAAGATGGAGATTGACATTCGGAGATCT
CTGGTATATTATAATTAGGTCTACTTCCAGATCATGCCACAAGTCTCCATTTCATCATAAGATTTAC
CAGTAACTCCGTATAACGTAAACTAACCCAAAAAGAAAAGCATTCAATCTATCACTCCGTGTTTAC
ACTCCTTAATTCTGTAGACAGAATAAAGTAAAAAATAAACAATATCTAAGTTTCTGGCGTT
ATTAATCTAGAACGATAATTTATTTTTGTTTCTGGATTGTTAAAGTGTGTTTTTAAACAATAGATAC
GTTTGGAATATATAACCTTTTGTGTTAGATATTTTAAACAACAAAGAAAACGTGAAAAGCCAAAA
AAAATCGTACGTACAGCCAACCTCTTTTGTGTAACAACAGACTATATCTGATTGCAAAAAATCTTA
GTTACTGGTCTTGTCCAACCCACCCACATACTCCCTAAAATTGATCGATATTATTTTTTTTTGGGAAT
TCACCAACGGTTGCATCTGTTTAAAAATCATTAAATAGAAATATAATTCCTAGAAAGATACCATTT
TTTTTTGTTAAGAAAAGGGTATATTTACTTTTACTTTTTTAAAATTCGAATCAATTCATACCCACC
GTTCTCACTGCCCTTGCTTTCCACTCGCTACTACAAC-3'

DNA-Sequenzen der Deletionsfragmente des *RBE1*-Promotors

RI (223 bp; Pos. -401 bp bis -179 bp):

```
TAAAGTGTGTTTTTAAACAATAGATACGTTTGGAAATATAAACCTTTTGTGTTAGATATTTTAAACAACAAAGAA  
AACGTGAAAAGCCAAAAAAAAATCGTACGTACAGCCAACCTCTTTTGTGTAACAACAGACTATATCTGATTGCAA  
AAAATCTTAGTTACTGGTCTTGTCCAACCCACCCACATACTCCCTAAAATTGATCGATATTATTTTTTTTTTGG
```

RII (203 bp; Pos. -604 bp bis -402 bp):

```
CCACAAGTCTCCCATTCATCATAAGATTTACCAGTAACTCCGTATAACGTAAACTAACCCAAAAAGAAAAGCATT  
CAATCTATCACTCCGTGTTTACTCTCTTAATTCTGTAGACAGAATAAAGTAAAAAAAAAAAAATAACAATATCTA  
AGTTTCTGGCGTTATTAATCTAGAACGATAATTTATTTTTTGTTCCTGGATTGT
```

RIII (174 bp; Pos. -778 bp bis -605 bp):

```
CTTTGTATCTGTTTTTTGATTTCTTGCTCGCAATAAAAATACGAAGGAGAGAAACGCAAGCTTGCATATGTTTCATAT  
ATAATTTTTCTTTTGATCGGTGCAGTGATGCCGATTAAGATGGAGATTGACATTCGGAGATCTCTGGTATATTAT  
AATTAGGTCTACTTCCAGATCATG
```

RIV (261 bp; Pos. -1039 bp bis -779 bp):

```
TGGAACAAGTGGAACAAAAACGGCAGATAGTTAATTAGTTCCATTGAACAATAAGAAACAAAGATAGAAAAAA  
AAAAACGCGAGATTTAATCTTTAAAGCAAGCAGAAAATAATCTTTAAAAATAACCTCTCACTAAAACCTTATGGAC  
AAATCTTCGTAACCAGCCTAGCTGTGAATTAGCCAGTAAATAGTAAATAACCATCAACTTACCAATTGATTCTATT  
TTTTAATTTAATTTATTATATTTTCTCCTATCCTTG
```

Für die Zuordnung zu Proteinen verwendete Peptide der massenspektrometrischen Analysen von *C. albicans*-Kulturüberständen

Tab. 25. Massenspektrometrisch identifizierte Peptide in den Kulturüberständen von Blastosporen des Wildtyp-Stammes SC5314 (Kultivierung: SC-Medium, 30°C, 6 h)

SC5314 – Blastosporen (SC-Medium, 30°C, 6 h)			
Protein-Name	ORF# ^a	Peptidsequenz	p-Wert ^b
Abg1p	<i>orf19.1597</i>	DKQSDNENDAEIEQEIER	6,3E-7
Bgl2p	<i>orf19.4565</i>	IFLVGSEALYR IFLVGSEALYREDLTASELASK	2,7E-4 5,4E-4
Cht2p	<i>orf19.3895</i>	TVLLSLGGGVGDYGFSDVASATK [#] LFVGVPAATSNIAGYVDTSK [#]	3,6E-6 1,4E-2
Cht3p	<i>orf19.7586</i>	LFVGVPASSR AAGSGYNDPSAVSQYLTSIDILNSK*	4,3E-4 1,8E-9
Coi1p	<i>orf19.5063</i>	LKDMDDVPAQVR YSCLLDVMK* EFEAETSECGFEFIEYNSASGCSSDATK [#]	2,7E-6 2,1E-2 2,4E-4
Dag7p	<i>orf19.4688</i>	CEGCAYNDLDFSPAADFCK SVDVTVVDRCEGCAYNDLDFSPAADFCK [#]	7,6E-12 4,8E-2
Ecm33p	<i>orf19.3010.1</i>	TIGGALQISDNSELR	7,4E-3
Eng1p	<i>orf19.3066</i>	DASNPSADDTYFPVSR	4,8E-5
Exg2p	<i>orf19.2952</i>	VMIDLHGAPNTQNGFDNSGLR	5,9E-4
Mp65p	<i>orf19.1779</i>	GITYSPYSDNGGCK* SESQIASEIAQLSGFDVIR	1,4E-10 6,6E-13
Msb2p	<i>orf19.1490</i>	ALGSFITTPGSAIYR AGAIGNFFR [#]	3,6E-7 2,7E-2
Pga4p	<i>orf19.4035</i>	YFQELGINTIR AGIYVILDVNTPHSSITR* TIPVGYSAAASVDEYR [#] LPSGLYFNCGDDDMAR [#]	3,9E-5 9,1E-4 2,4E-5 1,6E-3
Phr2p	<i>orf19.6081</i>	DIPYLEAVDTNVIR SIPVGYSANDDSAIR*	7,1E-7 1,7E-6
Plb4.5p	<i>orf19.1442</i>	DYQGINLGLAFSGGSYR NIDAFANHDMPPFVTGLGR* GLAHQLFPK [#] AHEDVALYKPNPFNSQYAK [#]	2,9E-5 1,7E-2 1E-3 2,5E-4
Rbe1p	<i>orf19.7218</i>	QITVCEYLPR LAEYAQDYANTGFDCSNLNLK [#]	1,3E-4 5,1E-10
Rbt4p	<i>orf19.6202</i>	SYMAENVLRPQ	4E-4
Rbt5p	<i>orf19.5636</i>	IYDQLPECAK	5,1E-7
Rhd3p	<i>orf19.5305</i>	HEGAAIDYLFLGK	5,5E-5
Scw11p	<i>orf19.3893</i>	DAGSYIVHQQQVAEICGGK SVLITETGYPSK* VTTSEPPATYLK [#]	6,4E-10 1,6E-5 1,5E-3
Sim1p	<i>orf19.5032</i>	TYLSLIPNPNNK APCSVVDGDTYFK DGYCYACQAGMSK YENGQYNGSGSDGCTVTVNSGSAK DVNFVSEISEDVAICR	7,1E-3 7,1E-3 1,5E-9 1,2E-13 2E-6

		TDYPGSENMNIPTLLSAGGK	2,7E-2
		SNTDNDYLCEWGSK [#]	4E-11
		IVGDDVNGDCKYENGQYNGSGSDGCTVTVNSGSAK [#]	2,9E-4
Sod4p	<i>orf19.2062</i>	TPAALELGDLSSGR	3,5E-9
Sun41p	<i>orf19.3642</i>	EGSYCSYACQSGMSK	1,7E-9
		IVGESGSTVSGSCSYANGK	2,3E-13
Tos1p	<i>orf19.1690</i>	SGEEYIIFSGSK	4,6E-10
		TLQYGEATCSCWK	1,2E-6
		TGCGELDLFEVLSSGSNK	5,9E-9
		GIGFSGSYMDVTNMDENTGK	1,1E-10
		CTQQLYSFSGNLSPLDEELSVHFR	2,6E-12
		FGNSLSYANADNSGGSSTPVPLEETIK	2,8E-20
		MISHLHDGQGSSQNSNNGGGGSQDYFERPTSGTFK	9E-16
Utr2p	<i>orf19.1671</i>	YGYYYAHIK	8,2E-5
Xog1p	<i>orf19.2990</i>	QISNLGLNFVR	5,3E-5
		QFFLDGYNSLR	7,5E-5
Ywp1p	<i>orf19.3618</i>	NLYGAGAVPFFQVHLEK	6,4E-4

^a Nummer des *open reading frame* (ORF) nach Assembly 21 der *C. albicans* Genom-Datenbank (www.candidagenome.org)

^b Erwartungswert (p) für die Sequenzübereinstimmung; Werte $\leq 0,05$ zeigen Identität oder signifikante Homologie; angegeben ist der jeweils niedrigste Wert aus drei biologischen Replikaten

* Peptid gefunden in 2 von 3 biologischen Replikaten

Peptid gefunden in 1 von 3 biologischen Replikaten

Tab. 26. Massenspektrometrisch identifizierte Peptide in den Kulturüberständen von Hyphen des Wildtyp-Stammes SC5314 (Kultivierung: MEM Alpha-Medium, 37°C, 6 h)

SC5314 – Hyphen (MEM-Alpha, 37°C, 6 h)			
Protein-Name	ORF ^{#a}	Peptidsequenz	p-Wert ^c
Als3p	<i>orf19.1816</i>	ISINVDFER	1,5E-5
		KISINVDFER	6E-6
		FTTSQTSVDLTAHGVK	2,2E-8
		CFTAGTNTVTFNDGGKK	4,4E-8
		TCSSNGIFITYK*	1,3E-3
		ALGTVTLPLAFNVGGTGSSVDLEDSK*	6,6E-11
Als5p	<i>orf19.5736</i>	ALGTVTLPIAFNVGGTGSSVDLEDSK	6,6E-11
Asm3p	<i>orf19.6037</i>	GDYYDFPLYR	2,3E-6
		SHYAGFSYVTNR	2,1E-7
		LRNESDIEFNQQYSNIR [#]	7E-9
		MEFSFYPPDAHYDENSQYIK [#]	5,1E-3
Bgl2p	<i>orf19.4565</i>	IFLVGSEALYR	1,5E-4
Cht2p	<i>orf19.3895</i>	LFVGVPATSNIAGYVDTSK	5,5E-4
Cht3p	<i>orf19.7586</i>	LFVGVPASSR*	1,2E-2
		TILLSLGGAAAGSYGFSDDATAK [#]	1,8E-4
		AAGSGYNDPSAVSQYLTSDILNSK [#]	6,7E-3
Coilp	<i>orf19.5063</i>	LKDMDDVPAQVR	3,2E-5
Ecm33p	<i>orf19.3010.1</i>	TIGGALQISDNSELR	1,8E-2
Ece1p	<i>orf19.3374</i>	DVAPAAPAAPADQAPTVPAPQEFNTAITKR	6,4E-5
		DGLEDFLDELLQR [#]	1,5E-6

Exg2p	<i>orf19.2952</i>	VMIDLHGAPNTQNGFDNSGLR	6,6E-5
Mp65p	<i>orf19.1779</i>	GITYSPYSDNGGCK SESQIASEIAQLSGFDVIR	3,8E-7 9,1E-17
Msb2p	<i>orf19.1490</i>	AGAIGNFFR ALGSFITTPGSAIYR [#]	3,7E-4 4,7E-4
<i>orf19.7076</i>	(-)	YNDRYQSSR	4,7E-2
Pho100p	<i>orf19.4424</i>	LKEAGHNVFLVAPVSQR	3,8E-4
Pga4p	<i>orf19.4035</i>	YFQELGINTIR AGIYVILDVNTPHSSITR	3,6E-4 1,7E-2
Phr1p	<i>orf19.3829</i>	GEYGVASFCSKDQR QIPVGYSSNDDEEIR GIAQQDAAGSVSSGYDADPNR GIAQQDAAGSVSSGYDADPNRK* IFSDAGIYIVADLSEPTVSINR* YNDPLADADACKR [#] LFQEIGTLYSDK [#]	1,6E-6 7,6E-8 6,1E-4 3,5E-6 1,1E-6 5,7E-3 7,6E-4
Plb4.5p	<i>orf19.1442</i>	DYQGINLGLAFSGGSYR	9,9E-5
Rbt4p	<i>orf19.6202</i>	SYMAENVLRPQ	7,2E-5
Rbt5p	<i>orf19.5636</i>	IYDQLPECAK IYDQLPECAKECVK [#]	2E-5 1,5E-2
Sap5p	<i>orf19.5585</i>	IRESEDNILGDNFLR NVDANTNVLLDSGTTISYFTR	4,7E-5 2,3E-7
Sim1p	<i>orf19.5032</i>	APCSVVDGDTYFK [#] DGYCYACQAGMSK [#]	2,1E-3 5E-4
Sod5p	<i>orf19.2060</i>	AATPAAHEVGLAGK GLPSDIGPFYPYHVHEKVPASK HGNIMGESYKTEYDDSYISLNEK TEYDDSYISLNEK [#]	3,2E-8 3,2E-9 1,7E-10 2,2E-2
Sun41p	<i>orf19.3642</i>	EGSYCSYACQSGMSK IVGESGSTVSGSCSYANGK	7,4E-10 3E-16
Tos1p	<i>orf19.1690</i>	SGEYIIFSGSK TLQYGEATCSCWK TGCGELDLFEVLSSGSNK GPLTLLQFGVYYPSSSGNSK GIGFSGSYMDVTNMDENTGK CTQQLYSFSGNLSPLDEELSVHFR FGNSLSYANADNSGGSSTPVPLEETTIK MISHLHDGQGSSQNSNNGGGGSQDYFERPTSGTFK	2,2E-9 1,3E-4 3,2E-8 4,5E-3 2,1E-6 7E-12 2,6E-13 3,6E-16
Xog1p	<i>orf19.2990</i>	QISNLGLNFVR QFFLDGYNSLR	1,3E-6 1,9E-7
Ywp1p	<i>orf19.3618</i>	NLYGAGAVPFFQVHLEK	4,3E-2

^a Nummer des *open reading frame* (ORF) nach Assembly 21 der *C. albicans* Genom-Datenbank (www.candidagenome.org)

^b Erwartungswert (p) für die Sequenzübereinstimmung; Werte $\leq 0,05$ zeigen Identität oder signifikante Homologie; angegeben ist der jeweils niedrigste Wert aus drei biologischen Replikaten

* Peptid gefunden in 2 von 3 biologischen Replikaten

[#] Peptid gefunden in 1 von 3 biologischen Replikaten

Tab. 27. Massenspektrometrisch identifizierte Peptide in den Kulturüberständen von Blastosporen des Doppel-Deletionsstammes für *RBE1* und *RBT4* (Kultivierung: SC-Medium, 30°C, 6 h)

<i>Δrbe1/Δrbt4</i> -Doppel-Deletionsstamm – Blastosporen (SC-Medium, 30°C, 6 h)			
Protein-Name	ORF# ^a	Peptidsequenz	p-Wert ^c
Abg1p	<i>orf19.1597</i>	DKQSDNENDAEIEQEIER	1,9E-2
Bgl2p	<i>orf19.4565</i>	IFLVGSEALYREDLTASELASK	7,3E-7
		IFLVGSEALYR*	5,9E-4
Cht2p	<i>orf19.3895</i>	LFVGV PATSNIAGYVDTSK	1,6E-5
		TVLLSLGGVGDYGFSDVASATK [#]	7,3E-7
Cht3p	<i>orf19.7586</i>	LFVGV PASSR	7,1E-5
		AAGSGYNDPSAVSQYLTS DILNSK	1,7E-8
Coi1p	<i>orf19.5063</i>	LKDMDDVPAQVR	1,4E-5
		YSCLLDVMK*	1,3E-2
Dag7p	<i>orf19.4688</i>	CEGCAYNDLDFSPA AFDK	9,7E-12
		SVDVTVVDRCEGCAYNDLDFSPA AFDK [#]	2E-3
Ecm33p	<i>orf19.3010.1</i>	TIGGALQISDNSEL R	3,8E-4
Eng1p	<i>orf19.3066</i>	DASNPSADDTYFPVSR	1,7E-5
Exg2p	<i>orf19.2952</i>	VMIDLHGAPNTQNGFDNSGLR	1,6E-3
Mp65p	<i>orf19.1779</i>	GITYSPYSDNGGCK	1,7E-10
		SESQIASEIAQLSGFDVIR	2,1E-16
Msb2p	<i>orf19.1490</i>	ALGSFITTPGSAIYR	1,3E-7
		AGAIGNFFR [#]	4,3E-3
Pga4p	<i>orf19.4035</i>	YFQELGINTIR	9,2E-5
		TIPVGYS AASVDEYR	8E-5
		AGIYVILDVNTPHSSITR	3,4E-5
		LPSGLYFNCGDDDMAR [#]	5,9E-3
Phr2p	<i>orf19.6081</i>	DIPYLEAVDTNVIR	6,5E-5
		SIPVGYSANDDSAIR*	5,1E-3
Plb4.5p	<i>orf19.1442</i>	DYQGINLGLAFSGGSYR	3,9E-10
		AHEDVALYKPNPFNSQYAK	1,5E-7
		GLAHQLFPK*	7,9E-3
		AMLNGAGQLMALDSR [#]	2E-2
Rbt5p	<i>orf19.5636</i>	IYDQLPECAK	1,6E-7
Rhd3p	<i>orf19.5305</i>	HEGAAIDYLFLGK	2,4E-8
		QSFTLGGDVYELGATDNFIPVTINK [#]	3,5E-3
Scw11p	<i>orf19.3893</i>	SVLITETGYPSK	3,3E-6
		VTTSEPPATYLK	9,6E-5
		GSTLGVNVSPENQEIAISSIIK	6,8E-10
		DAGSYIVHQQQVAEICGGK [#]	7,4E-6
Sim1p	<i>orf19.5032</i>	APCSVDGDYFK	1,6E-11
		SNTDNDYLCEWGSK	5,5E-5
		DGYYSYACQAGMSK	1,4E-11
		DVNFVSEISEDVAICR	1,5E-7
		YENGQYNGSGSDGCTVTVNSGSAK	2,1E-15
		TYLSLIPNPNK*	7,6E-6
		TDYPGSENMNIPTLLSAGGK*	4,3E-8
		IVGDDVNGDCKYENGQYNGSGSDGCTVTVNSGSAK*	3,5E-7
Sod4p	<i>orf19.2062</i>	TPAALELGDLGR	1,1E-8
Sun41p	<i>orf19.3642</i>	EGSYYSYACQSGMSK	8,4E-10
		IVGESGSTVSGSCSYANGK*	7,1E-12

Tos1p	<i>orf19.1690</i>	SGEYYIIFSGSK	2,5E-11
		TLQYGEATCSCWK	4,3E-6
		TGCGELDLFEVLSSGSNK	2,9E-9
		GIGFSGSYMDVTNMDENTGK	4,6E-10
		FGNSLSYANADNSGGSSTPVPLEETIK	7,4E-21
		MISHLHDGQGSSQNSNNGGGGSQDYFERPTSGETFK	5,7E-22
		CTQQLYSFSGNLSPLDEELSVHFR*	1,4E-11
Utr2p	<i>orf19.1671</i>	YGYYYAHIK	6,8E-5
Xog1p	<i>orf19.2990</i>	QISNLGLNFVR	3,8E-7
		QFFLDGYNSLR	1,8E-4
		DSYNFQNGDNTQVTLNVLNTIFKK*	1,1E-2
Ywp1p	<i>orf19.3618</i>	NLYGAGAVPFFQVHLEK	7,9E-7

^a Nummer des *open reading frame* (ORF) nach Assembly 21 der *C. albicans* Genom-Datenbank (www.candidagenome.org)

^b Erwartungswert (p) für die Sequenzübereinstimmung; Werte $\leq 0,05$ zeigen Identität oder signifikante Homologie; angegeben ist der jeweils niedrigste Wert aus drei biologischen Replikaten

* Peptid gefunden in 2 von 3 biologischen Replikaten

Peptid gefunden in 1 von 3 biologischen Replikaten

Tab. 28. Massenspektrometrisch identifizierte Peptide in den Kulturüberständen von Hyphen des Doppel-Deletionsstammes für *RBE1* und *RBT4* (Kultivierung: MEM Alpha-Medium, 37°C, 6 h)

***Δrbe1/Δrbt4*-Doppel-Deletionsstamm – Hyphen (MEM-Alpha, 37°C, 6 h)**

Protein-Name	ORF [#]	Peptidsequenz	p-Wert ^c
Als1p	<i>orf19.5741</i>	STVDPSGYLYASR	1,3E-4
		YTTSQTSVDLTADGVK	2,8E-7
Als3p	<i>orf19.1816</i>	ISINVDFER	5,7E-7
		KISINVDFER	4,4E-8
		FTTSQTSVDLTAHGVK	9,6E-12
		CFTAGTNTVTFNDGGKK	5,1E-13
		TCSSNGIFITYK [#]	1,4E-3
		ALGTVTLPIAFNVGGTGSSVDLEDSK [#]	4,6E-20
Als5p	<i>orf19.5736</i>	ALGTVTLPIAFNVGGTGSSVDLEDSK	4,6E-20
Asm3p	<i>orf19.6037</i>	FNDNFDSGIK	3,3E-8
		GDYYDFPLYR	8E-8
		SHYAGFSYVTNR	3,5E-9
		LRNESDIEFNQQYSNIR	3,4E-9
		SLIEEYDPKSHLVSLLLFK	1,2E-8
		MEFSFYPPDAHYDENSQYIK	5,7E-7
		QVGSVNFFDNDLHMLK*	7,9E-4
		VIGLNSNAYYQK [#]	5,8E-6
Bgl2p	<i>orf19.4565</i>	IFLVGSEALYR	1,4E-5
		IFLVGSEALYREDLTASELASK*	8,9E-4
		DVSTFEGDLDFLK [#]	2,7E-2
Cht2p	<i>orf19.3895</i>	LFVGV PATSNIAGYVDTSK	3,3E-9
		TVLLSLGGGVGDYGFSDVASATK*	8,8E-16
Cht3p	<i>orf19.7586</i>	LFVGV PASSR*	3,6E-3
		AAGSGYNDPSAVSQYLTS DILNSK*	2,1E-4
Coi1p	<i>orf19.5063</i>	LKDMDDVPAQVR	1,4E-5
Crh11p	<i>orf19.2706</i>	FDNGLGPHFESLKK	1,4E-2

Ecm33p	<i>orf19.3010.1</i>	TIGGALQISDNSELR	1,6E-7
Ece1p	<i>orf19.3374</i>	DVAPAAPAAPADQAPTVPAPQEFNTAITKR*	2,9E-9
		DVAPAAPAAPADQAPTVPAPQEFNTAITK [#]	2,9E-5
		DGLEDFLDELLQR [#]	1,7E-7
Exg2p	<i>orf19.2952</i>	VMIDLHGAPNTQNGFDNSGLR	1,9E-6
Hak1p	<i>orf19.6249</i>	MVESSASIRK	4,8E-2
Mp65p	<i>orf19.1779</i>	SESQIASEIAQLSGFDVIR	4,2E-20
Msb2p	<i>orf19.1490</i>	AGAIGNFFR	4,4E-6
		ALGSFITTPGSAIYR	1,1E-7
<i>orf19.480</i>	(-)	QRASIGNHHLK	2,3E-2
Pho100p	<i>orf19.4424</i>	LKEAGHNVFLVAPVSQR	5,9E-6
		EAGHNVFLVAPVSQR [#]	3,8E-3
Pga4p	<i>orf19.4424</i>	YFQELGINTIR	4,5E-4
		TIPVGYSAAASVDEYR [#]	2,4E-2
Phr1p	<i>orf19.3829</i>	YNDPLADADACKR	9,6E-4
		QIPVGYSSNDDEEIR	1,6E-7
		LSYVLNQYYLDQDKK	1,6E-6
		GIAYQQDAAGSVSSGYDADPNR	1,9E-7
		GIAYQQDAAGSVSSGYDADPNRK	9,2E-9
		IFSDAGIYIVADLSEPTVSINR	2,1E-9
		GEYGVASFCSDKDR*	3,2E-5
		LFQEIGTLYSK [#]	7,4E-4
		VAIADYFSCGSLDDR [#]	1,8E-2
		VYAIDPKDHEECMK [#]	6E-3
Plb4.5p	<i>orf19.1442</i>	DYQGINLGLAFSGGSYR	1,6E-9
		AHEDVALYKPNPFNSQYAK [#]	6,8E-7
Rbt5p	<i>orf19.5636</i>	IYDQLPECAK	9,6E-7
		IYDQLPECAKECVK [#]	8,3E-4
Sap5p	<i>orf19.5585</i>	IRESEDNILDGNFLR	1,9E-6
		NVDANTNVLLDSGTTISYFTR	9E-8
		ESEDNILDGNFLR*	2E-4
		KGILGIGFQSGEATEFDYDNLPISLR [#]	8,9E-4
Sim1p	<i>orf19.5032</i>	APCSVVDGDTYFK	2,2E-5
		DGYCYACQAGMSK	3,6E-7
Sod5p	<i>orf19.2060</i>	HGNIMGESYKTEYDDSYISLNEK	1,1E-14
		GLPSDIGPPYHVHEKVPVASK*	1,2E-8
		TEYDDSYISLNEK [#]	2,4E-5
		SYIGGLSIVIHANNGTR [#]	3E-2
Sun41p	<i>orf19.3642</i>	EGSYCSYACQSGMSK	7,4E-7
		IVGESGSTVSGSCSYANGK	4,8E-9
		SNYLCEWGVK [#]	1,9E-3
Tos1p	<i>orf19.1690</i>	SGEYIIFSGSK	5E-11
		TLQYGEATCSCWK	1,1E-6
		GIGFSGSYMDVTNMDENTGK	1,7E-9
		CTQQLYSFSGNLSPLDEELSVHFR	1E-14
		FGNSLSYANADNSGGSSTPVPLEETIK	6,5E-20
		MISHLHDGQGSSQNSNNGGGGSQDYFERPTSGTFK	3,9E-19
		TGCDELDFEVLSSGSNK*	7,8E-9
		GPLTLLQFGVYYPSSSGNSK*	7,1E-6
Xog1p	<i>orf19.2990</i>	QISNLGLNFVR	7,7E-8
		QFFLDGYNSLR	3,7E-7

		DSYNFQNGDNTQVTLNVLNTIFK	4,2E-6
		DSYNFQNGDNTQVTLNVLNTIFKK	1,1E-7
Ywp1p	<i>orf19.3618</i>	NLYGAGAVPFFQVHLEK	2,8E-7

^a Nummer des *open reading frame (ORF)* nach Assembly 21 der *C. albicans* Genom-Datenbank (www.candidagenome.org)

^b Erwartungswert (p) für die Sequenzübereinstimmung; Werte $\leq 0,05$ zeigen Identität oder signifikante Homologie; angegeben ist der jeweils niedrigste Wert aus drei biologischen Replikaten

* Peptid gefunden in 2 von 3 biologischen Replikaten

Peptid gefunden in 1 von 3 biologischen Replikaten

Zusammensetzung Minimum Essential Medium (MEM) Alpha-Medium, 1-fach, flüssig
(Invitrogen)

Tab. 29. Zusammensetzung von MEM Alpha-Medium, 1-fach, flüssig (Invitrogen)

Bestandteile	Molekulargewicht	Konzentration (mg/L)	mM
Aminosäuren			
Glycin	75	50	0.667
L-Alanin	89	25	0.281
L-Arginin	211	105	0.498
L-Asparagin-H ₂ O	150	50	0.333
L-Aspartylsäure	133	30	0.226
L-Cystein-Hydrochlorid-H ₂ O	176	100	0.568
L-Cystin 2HCl	313	31	0.099
L-Glutaminsäure	147	75	0.51
L-Glutamin	146	292	2
L-Histidin	155	31	0.2
L-Isoleucin	131	52.4	0.4
L-Leucin	131	52	0.397
L-Lysin	183	73	0.399
L-Methionin	149	15	0.101
L-Phenylalanin	165	32	0.194
L-Prolin	115	40	0.348
L-Serin	105	25	0.238
L-Threonin	119	48	0.403
L-Tryptophan	204	10	0.049
L-Tyrosin Di-Natriumsalz	225	52	0.231
L-Valin	117	46	0.393
Vitamine			
Ascorbinsäure	176	50	0.284
Biotin	244	0.1	0.00041
Cholin-Chlorid	140	1	0.00714
D-Calcium-Pantothenat	477	1	0.0021
Folsäure	441	1	0.00227
Niacinamid	122	1	0.0082
Pyridoxal-Hydrochlorid	204	1	0.0049
Riboflavin	376	0.1	0.000266
Thiamin-Hydrochlorid	337	1	0.00297
Vitamin B12	1355	1.36	0.001
i-Inositol	180	2	0.0111
Anorganische Salze			
Calcium-Chlorid (CaCl ₂) (anhyd.)	111	200	1.8
Magnesium-Sulfat (MgSO ₄) (anhyd.)	120	97.67	0.814
Kalium-Chloride (KCl)	75	400	5.33
Natrium-Bicarbonat (NaHCO ₃)	84	2200	26.19
Natrium-Chlorid (NaCl)	58	6800	117.24
Natrium-Phosphat (NaH ₂ PO ₄ -H ₂ O) monobasisch	138	140	1.01
Andere Bestandteile			
D-Glukose (Dextrose)	180	1000	5.56
Liponsäure	206	0.2	0.000971
Phenol Rot	376.4	10	0.0266
Natriumpyruvat	110	110	1

Aufbau der „SAT1-Flipper-Kassetten“ für die Deletion von Genen im Wildtyp-Stammhintergrund in den Plasmiden pSFS1 (7613 bp) und pSFS2 (7072 bp)

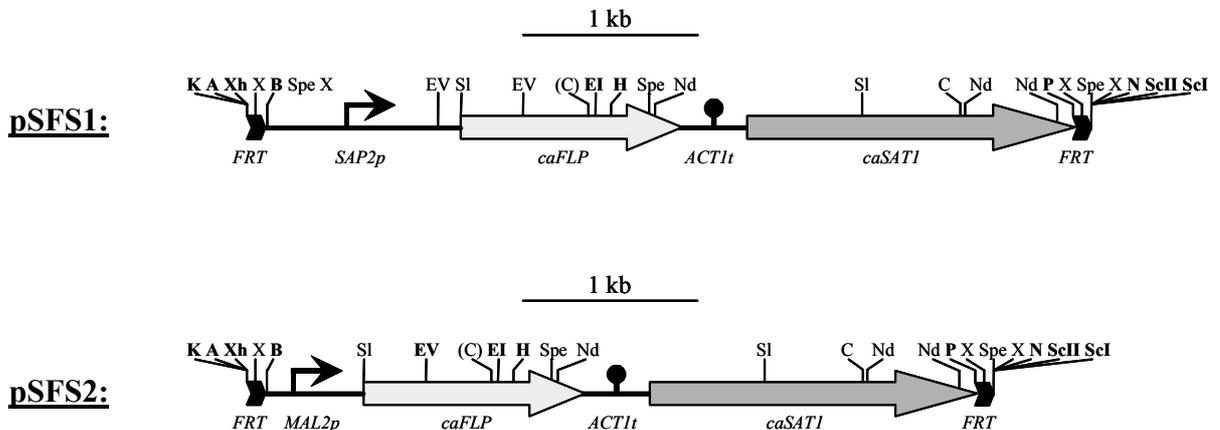
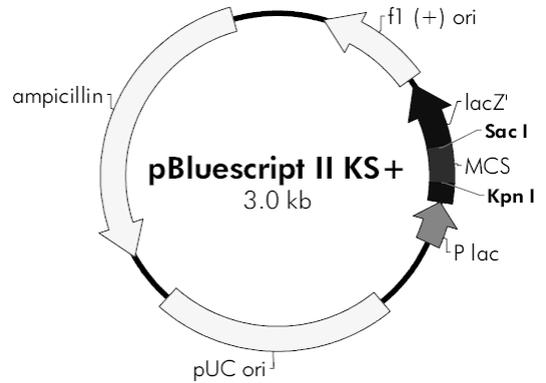


Abb. 58. Organisation der „SAT1-Flipper-Kassetten“ in den Plasmiden pSFS1 und pSFS2 (Reuss *et al.*, 2004). Plasmidhintergrund: pBluescript II KS. Restriktionsschnittstellen (singuläre Stellen fettgedruckt): A, *Apa*I; B, *Bam*HI; C, *Cl*aI; EI, *Eco*RI; EV, *Eco*RV; H, *Hind*III; K, *Kpn*I; N, *Not*I; Nd, *Nde*I; P, *Pst*I; ScI, *Sac*I; ScII, *Sac*II; SI, *Sal*I; Spe, *Spe*I; X, *Xba*I; Xh, *Xho*I. Die *Cl*aI-Schnittstelle in Klammern wird in *dam*⁺ *E.coli*-Stämmen wie DH5 α methyliert. Die gesamte „SAT1-Flipper-Kassette“ einschließlich der *poly*linker besitzt eine Größe von 4758 bp (pSFS1) bzw. 4217 bp (pSFS2).

Zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. J. Morschhäuser, Universität Würzburg.

Plasmidkarte von pBluescript II KS+ (Stratagene)

f1 (+) origin 135–441
 β-galactosidase α-fragment 460–816
 multiple cloning site 653–760
 lac promoter 817–938
 pUC origin 1158–1825
 ampicillin resistance (*bla*) ORF 1976–2833



pBluescript II KS (+/-) Multiple Cloning Site Region (sequence shown 598–826)

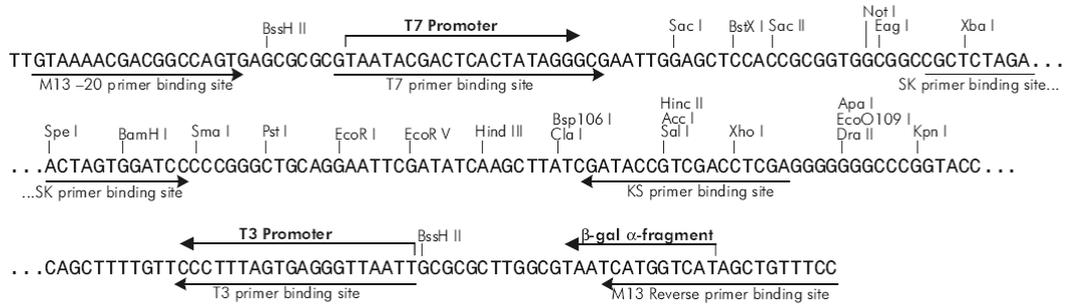


Abb. 59. Plasmidkarte von pBluescript II KS+ (Stratagene). Plasmidhintergrund der *SAT1*-Deletionskassetten (Abb. 58).

Eine Methode zur *de novo*-Identifikation spezifisch Promotor-bindender Proteine

Die in dieser Arbeit identifizierten regulatorischen DNA-Fragmente des *RBE1*-Promotors können auch für eine direkte biochemische Anreicherung der an sie bindenden Proteine oder Proteinkomplexe verwendet werden. Dies kann mittels aufeinander folgender Chromatographieschritte mit steigender Spezifität erfolgen. Dabei werden jeweils diejenigen Chromatographiefraktionen, in denen Bindeaktivität an die entsprechenden DNA-Fragmente enthalten ist mit Hilfe von Bindungsstudien identifiziert (*Electrophoretic Mobility Shift Assays* (EMSAs), s. Kap. 3.3) und für weitere Anreicherungsschritte verwendet (Rosenfeld and Kelly, 1986; Shore and Nasmyth, 1987).

Da sich eine direkte Bindung der heterolog exprimierten und aufgereinigten Transkriptionsfaktoren Efg1p und Tec1p, welche an der Regulation von *RBE1 in vivo* beteiligt sind (Abb. 19), an die regulatorischen Elemente des *RBE1*-Promotors in Bindungsstudien nicht eindeutig nachweisen ließ (Kap. 3.3), wurden erste Experimente zur Etablierung von Methoden zur direkten biochemischen Anreicherung der an diese Elemente bindenden regulatorisch wirkenden Proteine aus Gesamtzellextrakten von *C. albicans*, durchgeführt (Abb. 60).

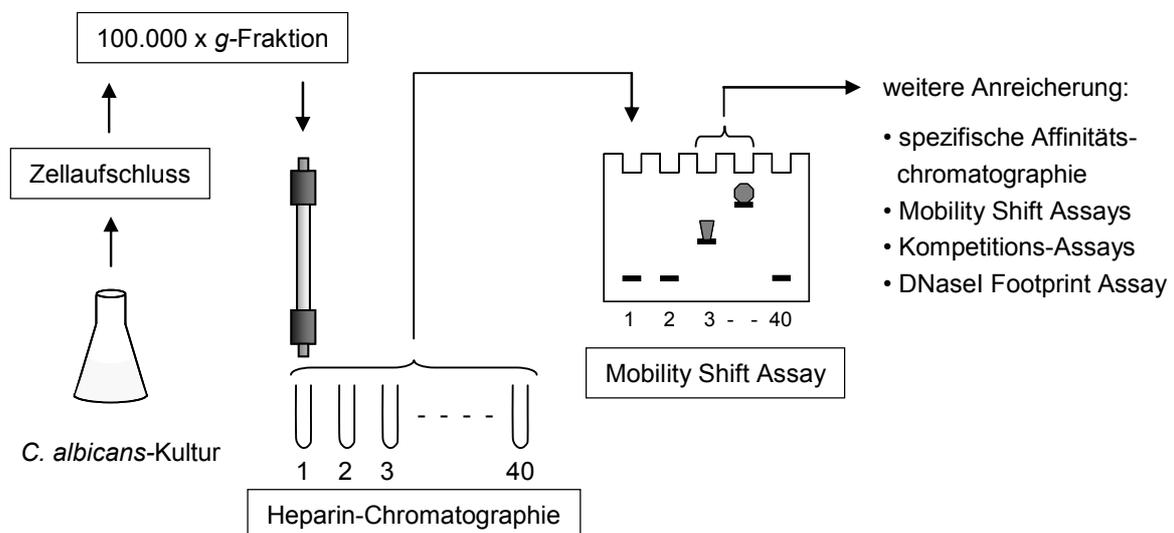


Abb. 60. Schematische Darstellung der Anreicherung DNA-bindender Proteine aus Gesamtzellextrakten. Zellfreie Proteinpräparationen aus Gesamtzellextrakten von *C. albicans* werden mittels Zentrifugation bei 100.000 x g gewonnen. Darin enthaltene allgemein DNA-bindende Proteine werden gefällt und in einem ersten Chromatographieschritt durch Bindung an eine Heparinmatrix angereichert. Fraktionen der Chromatographie, die Bindeaktivität an regulatorische Fragmente des *RBE1*-Promotors enthalten, werden mit Hilfe von Bindungsstudien (EMSAs; *Electrophoretic Mobility Shift Essays*) identifiziert und können für die weitere Aufreinigung der regulatorischen DNA-bindenden Proteine verwendet werden

Die einzelnen Aufreinigungsschritte sollen im Folgenden erläutert werden:

Aufreinigung von Kernproteinen aus *Candida albicans*

Von verschiedenen getesteten Methoden zur Aufreinigung von Kernproteinen aus Blastosporen bzw. Hyphen von *C. albicans* (u.a. Sphäroblastierung der Zellen durch Abbau der Zellwand mit Glukanase oder Aufschluss der Zellen mittels *French Pressure Cell Press* und anschließender Anreicherung der Kerne mittels differentieller Zentrifugation) erwies sich der mechanische Aufschluss der Zellen mittels *French Pressure Cell* bzw. *Bead Beater*, die anschließende Präparation eines zellfreien Proteinextraktes mittels Ultrazentrifugation bei $100.000 \times g$, der sog. S100-Fraktion, sowie die Fällung der darin enthaltenen Proteine mit 35% (w/v) Ammoniumsulfat am effizientesten für die Gewinnung präparativer Mengen von Kernproteinen.

Anreicherung DNA-bindender Proteine mittels Heparin-Affinitätschromatographie

Aufgrund der sehr geringen Abundanz regulatorischer Proteine – sie machen u.U. nur 0,001% des gesamten Proteingehalts einer Zelle aus - ist eine biochemische Aufreinigung dieser Proteine aus Gesamtzellextrakten in mindestens 2 Schritten erforderlich (Kadonaga, 1991; Kadonaga and Tjian, 1986; Rosenfeld and Kelly, 1986). Zunächst ist eine partielle Aufreinigung DNA-bindender Proteine durch Chromatographie mit niedriger Affinität von Vorteil. Dies dient u.a zur Abreicherung von Nukleasen und anderen Aktivitäten, die die Aufreinigung der regulatorischen Proteine durch eine spezifische Affinitätschromatographie in einem zweiten Schritt negativ beeinflussen könnten.

Der erste, unspezifische Anreicherungsschritt DNA-bindender Proteine erfolgte in dieser Arbeit mittels Heparin-Chromatographie. Heparin ist ein Polysaccharid (Glykosaminoglykan), das abwechselnd aus negativ geladenen Hexuronsäure- und D-Glucosaminresten besteht. Bei den Hexuronsäureresten kann es sich entweder um D-Glucuronsäure oder um deren C-5 Epimer L-Iduronsäure handeln (Abb. 61).

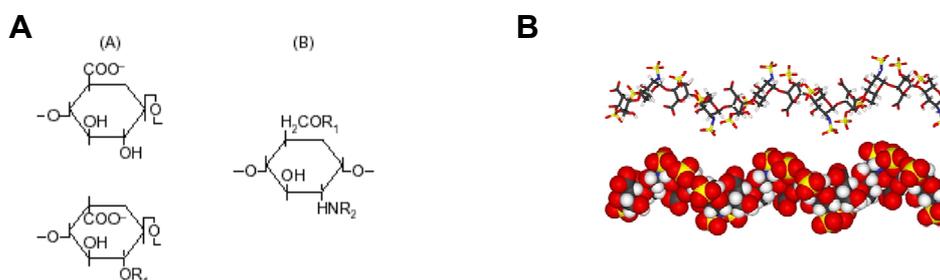


Abb. 61. Bausteine und Struktur von Heparin. A. Hexuronsäurereste. (A): D-Glucuronsäure (oben) und deren C-5 Epimer L-Iduronsäure (unten); D-Glucosaminrest (B) (Abb. aus: „Affinity Chromatography – Principles and Methods“, Amersham Pharmacia Biotech, S. 59 ff). B. Struktur von Heparin in Lösung, NMR-Spektroskopie (Mulloy *et al.*, 1993) (Mulloy and Forster, 2000)

DNA-bindende Proteine können reversibel an Heparin binden, da dieses die polyanionische Helix-Struktur der DNA imitiert. Durch eine Erhöhung der Ionenstärke in einem

Elutionsgradienten können die reversiblen Wechselwirkungen DNA-bindender Proteine mit der Heparinmatrix geschwächt und die Proteine so von der Matrix eluiert werden (Davison *et al.*, 1979; Shore *et al.*, 1987).

Für die Heparinchromatographie wurden Proteinpräparation der Gesamtzellextrakte (S100-Fraktion) aus Blastosporen bzw. Hyphen des *C. albicans*-Wildtypstammes SC5314 mit 35 % (w/v) Ammoniumsulfat in 50 mM Ammoniumsulfat-Puffer gefällt und anschließend mittels einer Heparinsepharose-Säule von zunächst 20 ml, später 100 ml Matrixvolumen (Bindekapazität: 40 mg bzw. 200 mg BSA) durch *Fast Protein Liquid Chromatography* (FPLC) aufgetrennt. Nach Bindung der Proteine an die Säulenmatrix wurden nicht-bindende Proteine ausgewaschen und die auf der Säule verbliebenen Proteine mit einem Gradienten von i.d.R. 50 mM bis 500 mM Ammoniumsulfat eluiert. Die so erhaltenen Fraktionen wurden zunächst mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) visualisiert (Abb. 62).

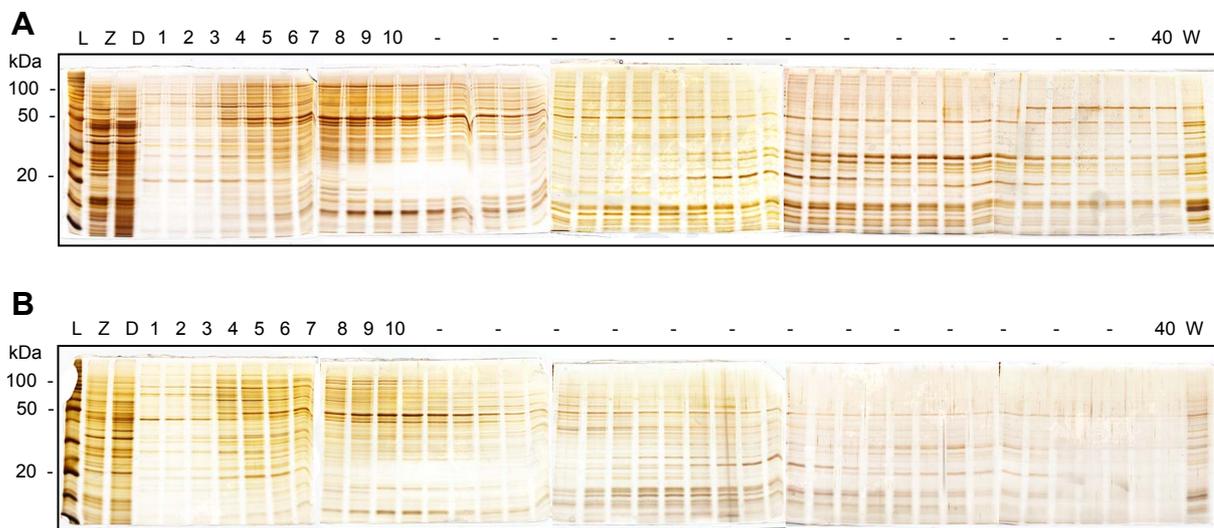


Abb. 62. Heparinchromatographie. SDS-PAGE (12%-ig) der Fraktionen (Silberfärbung); Auftrennung von etwa 450 mg (A) bzw. 330 mg (B) Gesamtproteinextrakt aus Blastosporen (A) bzw. Hyphen (B) des *C. albicans*-Wildtypstammes SC5314; Aufschluss mittels *French Press*; Elution in 50 mM – 500 mM Ammoniumsulfat in 40 Fraktionen à 10 ml (1-40); L = Leiter, Z = Zellaufschluss (20-50 µg), D = Durchfluss, W = Waschschrift mit 2 M NaCl

Die Gele zeigen vergleichbare Muster für die von der Heparinsäule eluierten Proteine aus der S100-Fraktion von Blastosporen (Abb. 62, A) und Hyphen (Abb. 62, B). Der für die Chromatographie verwendete Gesamtproteinextrakt (Z) zeigt dasselbe Muster wie der Durchfluss (D) der Säule, was darauf hindeutet, dass der Großteil der isolierten Proteine nicht an die Heparinmatrix bindet und somit abgereichert wird. Hingegen zeigen die von der Säule eluierten Fraktionen ein zum Gesamtproteinextrakt deutlich unterschiedliches Bandenmuster, was auf die spezifische Anreicherung bestimmter Proteine hinweist. Der Hauptanteil der von der Säule eluierten Proteine befindet sich dabei in den Fraktionen 5 bis 10. Dies zeigt auch das UV-Spektrogramm der Elution, sowie die Konzentrationsbestimmung nach Fällung der Fraktionen mit 35 % (w/v) Ammoniumsulfat (Daten nicht gezeigt). Bei Fraktion 10 beträgt

die Konzentration des Elutions-Puffers ca. 160 mM Ammoniumsulfat; d.b., die meisten der allgemein DNA-bindenden Proteine lösen sich bei dieser Ionenstärke von der Säule.

Durch die Verwendung des *Bead Beaters* für den Aufschluss größerer Zellmengen (200-300g Naßzellgewicht aus 10 l Flüssigkultur) konnte die Menge der gewonnenen Proteine im Vergleich zum Zellaufschluss mittels *French Pressure Cell* von etwa 350-450 mg auf bis zu 7 g Gesamtproteinextrakt in der S100-Fraktion erhöht werden. Auf diese Weise gewonnene Proteinpräparationen wurden ebenfalls mittels Heparinchromatographie fraktioniert und die so gewonnenen Fraktionen mittels SDS-PAGE analysiert. Die Auftrennung ergab ein dem Zellaufschluss mittels *French Pressure Cell* vergleichbares Muster, so dass von einer vergleichbaren Qualität der durch beide Methoden gewonnenen Proteinpräparationen ausgegangen werden kann (Daten nicht gezeigt).

Eine Bestimmung der Proteinkonzentration der Fraktionen der Heparinchromatographie zeigt, dass etwa 1 % (20 ml-Heparinsäule: 40 mg eluierte Proteine aus 4 g Gesamtzellextrakt nach Aufschluss mittels *Bead Beater* bzw. 4 mg von 350-350 mg Zellaufschluss mittels *French Pressure Cell*) bzw. etwa 6,6% (100 ml-Heparinsäule: 400 mg eluierte Proteine aus etwa 6 g bis 7 g Gesamtzellextrakt) der auf die Säulen gegebenen Proteine an die Heparinmatrix binden. Dies entspricht einer 100- bzw. 15-fachen Anreicherung allgemein DNA-bindender Proteine bei diesem Chromatographie-Schritt.

Für eine weitere Aufreinigung der regulatorischen Proteine in einer zweiten, spezifischen Affinitätschromatographie, müssen zunächst diejenigen Fraktionen der Heparinchromatographie identifiziert werden, die Bindeaktivität an die identifizierten regulatorischen Fragmente des *RBEI*-Promotors enthalten. Dies erfolgte mit Hilfe radioaktiv markierter DNA-Fragmente in Bindungsstudien (EMSAs; Abb. 63).

Im Folgenden wurden nur diejenigen Fraktionen der Heparinchromatographie für die Bindungsstudien an die Fragmente RI und RIV des *RBEI*-Promotors verwendet, die im UV-Spektrogramm während der Elution von der Heparinsäule eine nachweisbare Menge an Proteinen enthielten (Abb. 63).

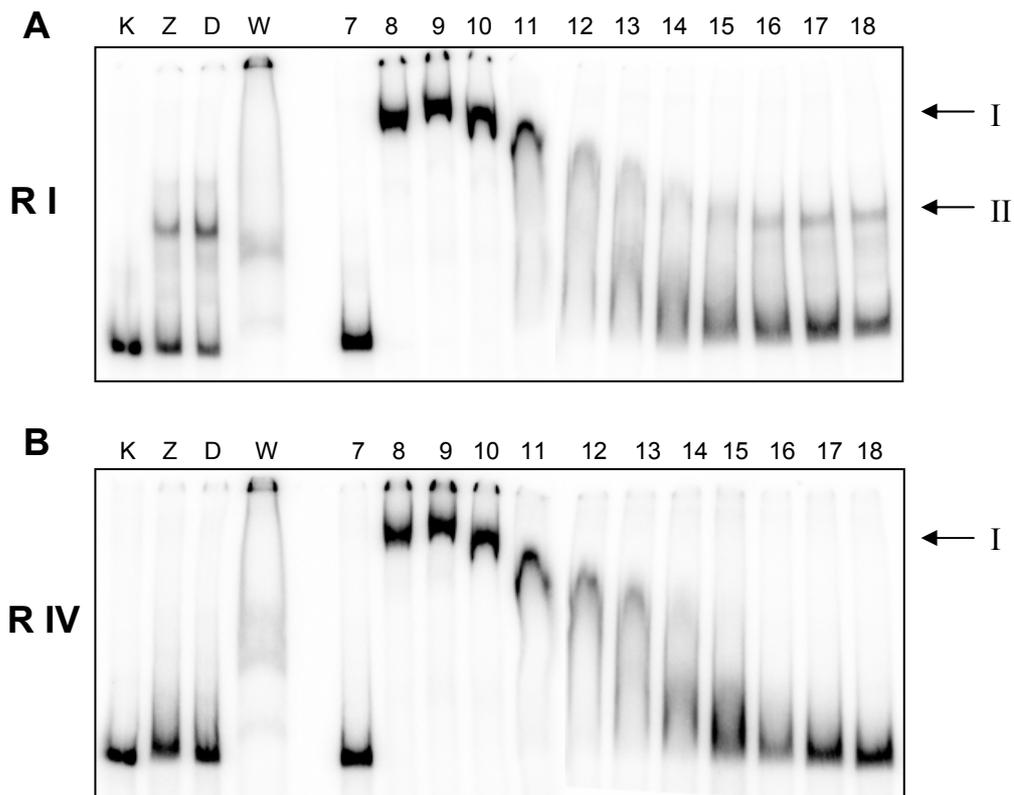


Abb. 63. Bindungsstudien mit den Fraktionen der optimierten Heparin-Chromatographie einer Proteinisolation aus *C. albicans* Blastosporen mit Promotor-Fragment RI (A) und RIV (B). Auftrennung von ca. 6 g Gesamtproteinextrakt auf einer Heparinsäule von 100 ml Säulenvolumen; Elution mittels Ammoniumsulfatgradient (50 mM bis 400 mM); K: Fragment I ohne Proteinzugabe, Z: Zellaufschluss, D: Durchfluss, W: Waschschrift mit 2 M NaCl; Spuren 7-18: Fraktionen der Heparin-Chromatographie; Proteinmengen in den einzelnen Fraktionen: Fraktion 8: 16,5 µg, 9: 17 µg, 10: 15 µg, 11: 14,5 µg, 12: 13,5 µg; Pfeile: DNA-Proteinkomplexe I und II

Für die Bindungsversuche wurden – soweit möglich - jeweils vergleichbare Mengen an eluierten Proteinen verwendet (zwischen 13,5 µg und 17 µg). DNA-Proteinkomplexe in Form deutlicher „Gelshifts“ sind für beide verwendeten regulatorischen Fragmente des *RBE1*-Promotors in den Fraktionen 8 bis 10 der Heparinchromatographie zu erkennen (Komplex I). Diese Fraktionen enthalten allgemein DNA-bindende Proteine und die überwiegende Menge der von der Säule eluierten Proteine (Abb. 62).

Nach Optimierung der Isolation von Gesamtprotein aus *C. albicans* (s. o.) konnte die Menge der in diesen Fraktionen eluierten Proteine mit Bindeaktivität an die Promotorfragmente von zunächst insgesamt etwa 0,5 – 2 mg (Zellaufschluss mittels *French Pressure Cell*) auf ca. 25 mg bzw. auf bis zu 140 mg erhöht werden (Zellaufschluss mittels *Bead Beater*; Heparinsäule mit 20 ml bzw. 100 ml Matrixvolumen). Die Proteinmenge in den jeweiligen Fraktionen ist dabei ausreichend für einen spezifischen Gelshift in dem begrenzten Volumen der EMSA-Ansätze von 20 µl ohne vorherige Präzipitation der betreffenden Fraktionen.

Bei den Bindungsstudien mit der reprimierenden Domäne des *RBE1*-Promotors (RI) erscheint zusätzlich zu den DNA-Proteinkomplexen in den Fraktionen 8 bis 10 der

Heparinchromatographie ein distinkter DNA-Proteinkomplex II in Form einer Bande niedrigeren Molekulargewichts in den Fraktionen 16 bis 18. Dieser Komplex ist bereits im Gesamtproteinextrakt (Z) sowie dem Durchfluss (D) der Säule zu beobachten. In den späteren Fraktionen der Chromatographie eluieren aufgrund der höheren Ionenstärke durch den ansteigenden Salzgradienten Proteine, die eine höhere Bindeaffinität an die DNA besitzen. Daher könnte es sich bei diesem DNA-Proteinkomplex bereits um ein spezifisch an das Fragment RI des *RBE1*-Promotors bindendes Protein handeln.

Nachweis der Spezifität der angereicherten DNA-bindenden Proteine: Wettbewerbsversuche

Die mit Hilfe der Bindungsstudien identifizierten Fraktionen der Heparinchromatographie, die Bindeaktivität an die beiden regulatorischen Fragmente RI und RIV des *RBE1*-Promotors enthalten (Abb. 63), können für die weitere Aufreinigung der regulatorischen Proteine verwendet werden, falls die in ihnen enthaltene Bindeaktivität spezifisch für die beiden Promotorfragmente ist. Die Spezifität dieser Bindeaktivität wurde daher zunächst mit Hilfe von Wettbewerbsversuchen überprüft. Dabei findet die Bindung an das jeweilige DNA-Fragment einmal in Gegenwart eines hohen molaren Überschusses an unmarkiertem Promotorfragment (spezifische Konkurrenz) sowie einmal in Gegenwart eines entsprechenden Überschusses eines unmarkierten beliebigen DNA-Fragments statt (unspezifische Konkurrenz).

Um ein optimales Verhältnis zwischen markierten DNA-Fragmenten und bindenden Proteinen für die Wettbewerbsversuche einzustellen, wurden zunächst die jeweiligen Mengen, die für einen eindeutigen „Gelshift“ erforderlich sind, titriert. Dafür wurden die in den Bindungsstudien identifizierten Fraktionen der Heparinchromatographie mit Bindeaktivität an die beiden Promotorfragmente RI und RIV vereinigt (Fraktionen 8 bis 10, Abb. 63). Da sich beide Fragmente in den Bindungsstudien annähernd gleich verhalten, wurden diese Versuche nur mit Fragment RIV durchgeführt (Abb. 64).

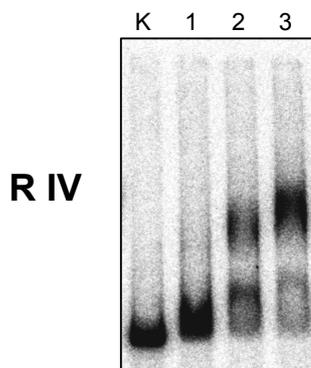


Abb. 64. Titration der Proteinmenge für die Bindungsstudien. EMSAs mit den vereinigten Fraktionen 8 bis 10 der Heparinchromatographie mit Promotor-Fragment RIV; K: Fragment I ohne Proteinzugabe; Spuren 1, 2, 3: Zugabe von 2, 3 und 4 μg Protein der Heparin-Chromatographie

Die Titrations zeigen, dass ca. 4 fmol an markierter DNA ausreichend und mind. 4 μg angereicherter Proteinfraction für einen eindeutigen „Gelshift“ erforderlich sind.

Für die Wettbewerbsversuche wurden daher 4 μg der Heparinfraktionen mit Bindeaktivität verwendet. In weiteren Titrations konnte die Menge an radioaktiv markiertem DNA-

Fragment noch einmal um die Hälfte auf ca. 2 fmol reduziert werden (Daten nicht gezeigt). Für die spezifische bzw. die unspezifische Konkurrenz wurde zusätzlich zu den markierten Promotorfragmenten ein hoher molares Überschuss an spezifischem, nicht radioaktiv markiertem Promotorfragment bzw. eines nicht radioaktiv markierten, unspezifischen DNA-Fragmentes (PCR-Produkt des Actin-Genes) zu den Ansätzen gegeben. Die molaren Überschüsse betragen dabei das 1600-, 3200- und 6400-fache der Menge des verwendeten markierten Promotorfragments (Abb. 65).

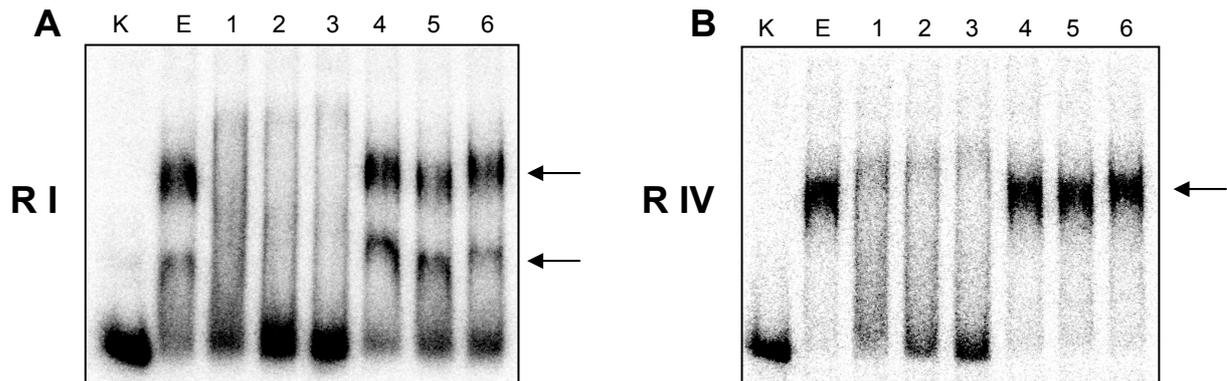


Abb. 65. Wettbewerbsversuche. EMSAs mit angereicherten Proteinen der Heparin-Chromatographie mit Promotor-Fragmenten RI (A) und RIV (B); K: Fragment ohne Proteinzugabe, E: EMSA; Spuren 1 - 6: Zugabe von 1600x-, 3200x- und 6400-fachem molarem Überschuss an nicht markiertem Promotorfragment (Spuren 1, 2 und 3: spezifische Konkurrenz) bzw. nicht markiertem Fragment des Actin-Genes (Spuren 4, 5 und 6: unspezifische Konkurrenz)

Die spezifischen Wettbewerbsversuche zeigen, dass ab einem etwa 1600-fachen molaren Überschuss an nicht-radioaktiv markiertem Promotorfragment, das entsprechende markierte Fragment aus den gebildeten DNA-Proteinkomplexen verdrängt wird und die Bande des freien DNA-Fragmentes - wie in der Kontrollspur ohne Protein (K) - wieder erscheint (Spur 1). Eine vollständige Verdrängung des markierten Fragmentes lässt sich mit einem etwa 6400-fachen molaren Überschuss an spezifischem DNA-Fragment erreichen (Spur 3). Eine Verdrängung des Promotorfragmentes aus dem DNA-Proteinkomplex durch einen entsprechenden molaren Überschuss an unspezifischem, nicht-radioaktiv markiertem DNA-Fragment ist dahingegen nicht möglich (Spuren 4 bis 6).

Dies zeigt, dass die durch die Heparinchromatographie angereicherte Bindeaktivität spezifisch an die beiden regulatorischen Promotorfragmente des *RBE1*-Promotors bindende Proteine enthält. Diese Proteine konnten auf diese Weise um das bis zu 100-fache angereichert werden. Auch bei den Wettbewerbsstudien zeigen sich wie bereits bei den Bindungsstudien mit den Fraktionen der Heparinchromatographie zwei distinkte DNA-Proteinkomplexe in den Gelshifts mit Fragment RI. In beiden Fällen lässt sich das markierte DNA-Fragment durch einen Überschuss an spezifischem Fragment aus dem Komplex konkurrieren. Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass die angereicherten Kernproteine zwei spezifische Bindungsaktivitäten für Fragment RI des *RBE1*-Promotors enthalten. Für Fragment RIV zeigt sich eine Bindeaktivität, die derjenigen größeren Molekulargewichts bei Fragment RI entspricht. Dabei handelt es sich entweder um zwei verschiedene Proteine gleichen Molekulargewichts oder es

besteht die Möglichkeit, dass dasselbe Protein an beide Fragmente des *RBE1*-Promotors bindet

Eine weitere Eingrenzung der spezifischen Erkennungssequenz der DNA-bindenden Proteine innerhalb der Fragmente RI und RIV durch Kompetitionsversuche mit einem molaren Überschuss unterschiedlicher Teilstücke dieser Promotorfragmente war nicht möglich (Daten nicht gezeigt). Dies legt den Schluss nahe, dass entweder mehrere Proteinbindungsstellen innerhalb der Fragmente RI und RIV für eine stabile Bindung regulatorischer Proteine erforderlich sind oder die Bindung mehrerer Proteine, deren Bindungsstellen innerhalb der Fragmente verteilt sind, für die Bildung eines stabilen DNA-Protein-Komplexes erforderlich ist.

Ausblick: Aufreinigung der spezifisch an die regulatorischen Domänen des RBE1-Promotors bindenden Proteine

DNA-bindende Proteine können durch Affinitätschromatographie unter Verwendung von Matrices, die die tatsächlichen Erkennungssequenzen dieser Proteine enthalten, zu großer Reinheit aufgereinigt werden (Herrick, 1980; Oren *et al.*, 1980; Rosenfeld and Kelly, 1986; Sorger and Pelham, 1987). Die Reinheit der so aufgereinigten Proteine hängt dabei stark von den gewählten Bedingungen für die Affinitätschromatographie, wie Ionenstärke, Art der Metallionen, pH-Wert, Menge und Art der kompetitiven DNA, Menge und Reinheit der verwendeten Proteinproben, ab (Kadonaga and Tjian, 1986).

Im Vergleich zur unspezifischen Anreicherung DNA-bindender Proteine, z.B. durch die in dieser Arbeit verwendete Heparinchromatographie, ist die für die Elution der spezifisch bindenden Proteine von einer spezifischen Affinitätsmatrix benötigte Ionenstärke aufgrund der höheren Affinität der Proteine zu ihrer Erkennungssequenz auf der DNA höher. Da unspezifisch DNA-bindende Proteine, die noch in der verwendeten Probe vorhanden sind, bereits bei geringeren Ionenstärken von der Matrix eluieren, können diese stark abgereichert und die spezifisch bindenden Proteine zu großer Reinheit angereichert werden.

Die Verwendung von Matrices, die die regulatorischen Domänen des *RBE1*-Promotors enthalten, sollte die Aufreinigung der bis hierher angereicherten spezifisch an diese bindenden Proteine bis zur Reinheit ermöglichen (Rosenfeld and Kelly, 1986; Shore and Nasmyth, 1987). Dabei können die DNA-Fragmente entweder direkt oder nach der Ligation in ein Plasmid auf einer Chromatographiematrix immobilisiert werden. Die letztere Methode hat dabei den Vorteil, dass die Zahl der so auf der Matrix immobilisierten Bindungsstellen zum einen durch die Ligation mehrerer Fragmente in ein Plasmid, zum anderen der Gewinnung großer Mengen entsprechender Plasmide dramatisch erhöht werden kann.

Danksagung

Ich möchte mich sehr herzlich bei Herrn Prof. Dr. Herwig Brunner für die Übernahme der Betreuung dieser Doktorarbeit und die Möglichkeit der Durchführung am Institut für Grenzflächenverfahrenstechnik der Universität Stuttgart unter hervorragenden Arbeitsbedingungen bedanken.

Bei Herrn Prof. Dr. D. Wolf möchte ich mich herzlich für die Übernahme des Koreferats bedanken.

Ein sehr großer Dank gilt Dr. Kai Sohn für die Übernahme der fachlichen Betreuung dieser Arbeit und niemals endende Inspiration, Motivation und Unterstützung.

Ebenfalls sehr großer Dank gebührt der PETER und TRAUDL ENGELHORN-STIFTUNG zur Förderung der Biotechnologie und Gentechnik für die Gewährung eines Promotionsstipendiums und die großzügige finanzielle Unterstützung dieser Arbeit.

Ich danke Dr. E. Hiller für die massenspektrometrischen Analysen der in dieser Arbeit erzeugten Proben.

Ein herzlicher Dank gilt Dr. Constantin Urban und Dipl. Biol. Elena Lindemann für zahllose konstruktive Gespräche und fortwährenden Beistand.

Bei der ganzen Arbeitsgruppe Functional Genomics möchte ich mich für die ausgesprochen gute Arbeitsatmosphäre und die zahlreichen wertvollen fachlichen Diskussionen bedanken.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mir das Studium der Biologie und damit auch die Anfertigung dieser Doktorarbeit ermöglicht haben.

Lebenslauf

von Marc Röhm,
geboren am 23. Februar 1971
in Stuttgart

Ausbildung

- September 1981 – Friedrich-Schiller-Gymnasium, Marbach/Neckar
Mai 1990 Abschluss: Allgemeine Hochschulreife
- Oktober 1990 – Ersatzdienst; Baumann-Klinik, Stuttgart
Dezember 1991
- November 1992 – Studium der Biologie (Diplom) an der Universität Erlangen
März 1993
- März 1993 – Studium der Biologie (Diplom) an der Universität Hohenheim
März 2001 Hauptfach: Pflanzenphysiologie
Nebenfächer: Mikrobiologie, Genetik, Biochemie
- August 2000 – Praktikum an der Akademie für Technikfolgenabschätzung in
September 2000 Baden-Württemberg bei Dr. M. Morrosini
- Oktober 2000 – Praktikum beim Niedersächsischen Landesamt für Ökologie –
November 2000 Forschungsstelle Küste, Norderney
- Dezember 2000 – Diplomarbeit am Fraunhofer IGB in Stuttgart bei PD Dr. S. Rupp
November 2001 Titel: Verifikation potenzieller Virulenzfaktoren in *Candida albicans*
- Dezember 2001 – Projektarbeit am Fraunhofer IGB in Stuttgart bei PD Dr. S. Rupp
November 2002
- seit Promotion am Fraunhofer IGB und an der Universität Stuttgart bei
Dezember 2002 Dr. K. Sohn und Prof. Dr. H. Brunner

Publikationen

1. **Sohn, K., Roehm, M., Urban, C., Saunders, N., Rothenstein, D., Lottspeich, F., Schröppel, K., Brunner, H., Rupp, S.**

Identification and Characterization of Cor33p, a Novel Protein Implicated in Tolerance towards Oxidative Stress in *Candida albicans*

Eukaryotic Cell: 2005, Dec;4(12): 2160–9.

2. **M. Roehm, E. Lindemann, E. Hiller, D. Ermert, D. Trkulja, O. Sogukpinar, H. Brunner, S. Rupp, C. F. Urban, K. Sohn**

A family of secreted pathogenesis-related proteins in *Candida albicans*

Manuskript eingereicht.

Erklärung:

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbst und lediglich unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel verfasst habe. Sie wurde weder in dieser noch in ähnlicher Form bei einer anderen Institution vorgelegt

Stuttgart, Mai 2010

Marc Röhm