

BERICHTE AUS FORSCHUNG UND ENTWICKLUNG NR. 047

Elena Lindemann

Identifizierung und vergleichende Charakterisierung eines zentralen Regulationsfaktors der Morphogenese und des Stickstoffmetabolismus in humanpathogenen Pilzen

Fraunhofer-Institut für
Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik IGB

Berichte aus Forschung und Entwicklung Nr. 047

Identifizierung und vergleichende
Charakterisierung eines zentralen
Regulationsfaktors der Morphogenese
und des Stickstoffmetabolismus in
humanpathogenen Pilzen

Elena Lindemann

FRAUNHOFER VERLAG

Kontaktadresse:

Fraunhofer-Institut für
Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik IGB
Nobelstraße 12
70569 Stuttgart
Telefon 07 11 9 70-40 00
Telefax 07 11 9 70-42 00
E-Mail info@igb.fraunhofer.de
URL www.igb.fraunhofer.de

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de> abrufbar.

ISBN: 978-3-8396-0473-1

D 93

Zugl.: Stuttgart, Univ., Diss., 2012

Druck: Mediendienstleistungen des
Fraunhofer-Informationszentrum Raum und Bau IRB, Stuttgart

Für den Druck des Buches wurde chlor- und säurefreies Papier verwendet.

© by **FRAUNHOFER VERLAG**, 2012

Fraunhofer-Informationszentrum Raum und Bau IRB
Postfach 80 04 69, 70504 Stuttgart
Nobelstraße 12, 70569 Stuttgart
Telefon 07 11 9 70-25 00
Telefax 07 11 9 70-25 08
E-Mail verlag@fraunhofer.de
URL <http://verlag.fraunhofer.de>

Alle Rechte vorbehalten

Dieses Werk ist einschließlich aller seiner Teile urheberrechtlich geschützt. Jede Verwertung, die über die engen Grenzen des Urheberrechtsgesetzes hinausgeht, ist ohne schriftliche Zustimmung des Verlages unzulässig und strafbar. Dies gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen sowie die Speicherung in elektronischen Systemen.

Die Wiedergabe von Warenbezeichnungen und Handelsnamen in diesem Buch berechtigt nicht zu der Annahme, dass solche Bezeichnungen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und deshalb von jedermann benutzt werden dürften. Soweit in diesem Werk direkt oder indirekt auf Gesetze, Vorschriften oder Richtlinien (z.B. DIN, VDI) Bezug genommen oder aus ihnen zitiert worden ist, kann der Verlag keine Gewähr für Richtigkeit, Vollständigkeit oder Aktualität übernehmen.

**Identifizierung und vergleichende Charakterisierung eines
zentralen Regulationsfaktors der Morphogenese und des
Stickstoffmetabolismus in humanpathogenen Pilzen**

**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
Elena Lindemann
geboren in Karaganda/Kasachstan**

**Hauptberichter: PD Dr. S. Rupp
Mitberichter: Prof. Dr. D. Wolf**

Tag der mündlichen Prüfung: 25. November 2011

Institut für Grenzflächenverfahrenstechnik der Universität Stuttgart

2011

Meinen Großeltern in liebevoller Erinnerung gewidmet

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	6
ZUSAMMENFASSUNG	7
ABSTRACT	9
EINLEITUNG.....	11
I. HUMANPATHOGENE ARTEN DER GATTUNG <i>CANDIDA</i>	14
I.1 <i>Candida albicans</i>	15
I.2 <i>Candida dubliniensis</i>	16
II. VIRULENZFAKTOREN VON <i>C. ALBICANS</i> – VERGLEICH MIT <i>C. DUBLINIENSIS</i>	17
II.1 Zellwand und Zelloberflächenproteine	18
II.2 Extrazelluläre hydrolytische Proteine.....	20
II.3 Stickstoffmetabolismus	22
II.4 Morphogenese.....	25
III. ZIELSETZUNG DER ARBEIT.....	31
MATERIAL UND METHODEN	32
I. MATERIAL.....	32
I.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien.....	32
I.2 Enzyme.....	32
I.3 Antibiotika und Antimycotika.....	33
I.4 Reaktions-Kitsysteme.....	33
I.5 Pufferlösungen.....	33
I.6 Kulturmedien.....	34
I.7 Oligonukleotide	35
I.8 Bakterienstamm.....	41
I.9 Plasmide	41
I.10 Humane Zell-Linien.....	41
I.11 <i>Candida</i> -Stämme	42
II. METHODEN	44
II.1 Kultivierung der Bakterien.....	44
II.2 Kultivierung der <i>Candida</i> -Stämme	44
II.3 Kultivierung humaner Epithelzellen.....	44
II.4 Phänotypische Charakterisierung der <i>Candida</i> -Stämme	45

II.5	<i>Präparation von Nukleinsäuren</i>	47
II.6	<i>Konzentrationsbestimmung und Integritätskontrolle von Nukleinsäuren</i>	49
II.7	<i>Elektrophoretische Auftrennung mittels der Agarose-Gelelektrophorese</i>	50
II.8	<i>Amplifikation von DNA-Abschnitten mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)</i>	51
II.9	<i>Aufreinigung von PCR-Produkten/DNA</i>	53
II.10	<i>Klonierung von DNA-Fragmenten in Vektoren</i>	54
II.11	<i>DNA-Sequenzierung</i>	56
II.12	<i>Transformation von Hefe-Zellen</i>	56
II.13	<i>Nachweis spezifischer DNA-Sequenzen mittels Southern Blot-Analyse</i>	58
II.14	<i>Nachweis spezifischer RNA-Sequenzen über Northern Blot-Analyse</i>	60
II.15	<i>Nachweis spezifischer mRNA-Sequenzen über quantitative RealTime PCR</i>	62
II.16	<i>Candida albicans DNA-Mikroarrays</i>	64
II.17	<i>5'-RACE (Rapid Amplification of 5'-cDNA-Ends</i>	65
II.18	<i>Bestimmung des Adhäsionsverhaltens der Candida-Stämme</i>	66
II.19	<i>Real-Time Impedanz-Messung von humanen Zellen nach Candida-Infektion mit dem xCELLigence RTCA System</i>	67
II.20	<i>Multidimensional Electrophoretic System of Separation for the Analysis of Gene Expression (MESSAGE)</i>	69
ERGEBNISSE		81
I.	GENEXPRESSIONSPROFILE BASIEREND AUF DER MESSAGE-TECHNOLOGIE	85
I.1	<i>Weiterentwicklung</i>	85
I.2	<i>Anwendung der Technologie für differentielle Genexpressionsanalysen</i>	91
II.	MOLEKULARE REGULATION MORPHOGENETISCHER PROZESSE IN CANDIDA DUBLINIENSIS	105
II.1	<i>Identifizierung von APSES-Proteinen in C. dubliniensis</i>	105
II.2	<i>Funktionelle Charakterisierung der APSES-Proteins Mom1p in C. dubliniensis</i>	106
II.3	<i>Vergleichende funktionelle Charakterisierung der beiden APSES-Proteine Mom1p aus C. dubliniensis und Efg1p aus C. albicans</i>	115
II.4	<i>Differentielle Genexpressionsanalyse mittels der MESSAGE-Technologie zur Identifizierung von MOM1-abhängigen Genen unter zwei verschiedenen Wachstumsbedingungen</i>	124
III.	WEITERFÜHRENDE, VERGLEICHENDE FUNKTIONELLE CHARAKTERISIERUNG DER WILDTYP- UND DELETIONSSTÄMME	128
III.1	<i>Adhäsionsverhalten von verschiedenen C. albicans und C. dubliniensis -Stämme auf unterschiedlichen Oberflächen</i>	128
III.2	<i>Analyse des Invasionsverhaltens von unterschiedlichen C. albicans sowie C. dubliniensis-Stämmen mittels xCelligence Real Time Cell Analyzer (RTCA)</i>	131

III.3	<i>Untersuchung der Zellwandstabilität.....</i>	133
III.4	<i>Unterschiede in der transkriptionellen Regulation von EFG1 und MOM1.....</i>	137
IV.	IDENTIFIZIERUNG EINER SCHLÜSSELFUNKTION DER APSES-PROTEINE IN DER VERWERTUNG VON STICKSTOFFVERBINDUNGEN.....	142
IV.1	<i>Einfluss unterschiedlicher Stickstoffverbindungen auf das Wachstumsverhalten von C. albicans und C. dubliniensis Wildtypstämmen.....</i>	142
IV.2	<i>Essentielle Funktion der APSES-Proteine bei der parallelen Verwertung von zwei Stickstickstoffverbindungen.....</i>	144
IV.3	<i>Spezielle Morphologie der mom1Δ-Deletionsstämmen in YCB-NH₄Cl-BSA.....</i>	146
IV.4	<i>Relative Expressionsanalyse einiger ausgewählter Gene unter verschiedenen Stickstoffbedingungen.....</i>	147
IV.5	<i>Analyse des Wachstumsverhalten der Stämme nach späterer Zugabe einer zweiten Stickstoffquelle.....</i>	149
IV.6	<i>Expressionskinetik ausgewählter Gene im C. albicans Wildtyp- und Δefg1- Deletionsstamm unter YCB-NH₄Cl-Medium nach Zugabe von BSA.....</i>	152
IV.7	<i>Einfluss des Mep2p auf den Wachstumsarrest.....</i>	155
	DISKUSSION.....	157
I.	<i>MESSAGE – EINE NEUE TECHNOLOGIE FÜR GENEXPRESSIONSANALYSEN.....</i>	158
II.	<i>SYSTEMATISCHER VERGLEICH DER MORPHOGENESE-REGULATION IN C. ALBICANS UND C. DUBLINIENSIS DURCH DIE APSES-PROTEINE EFG1P UND MOM1P.....</i>	163
III.	<i>REGULATION DES STICKSTOFFMETABOLISMUS UND DIE ROLLE DER APSES-PROTEINE.....</i>	168
III.1	<i>Proliferationsverhalten auf unterschiedlichen Stickstoffverbindungen als einzige Stickstoffquelle.....</i>	168
III.2	<i>Proliferationsverhalten der Stämme unter Bedingungen in denen unterschiedliche Stickstoffverbindungen vorliegen.....</i>	171
	LITERATURVERZEICHNIS.....	173
	ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	187
	TABELLENVERZEICHNIS.....	189
	DANKSAGUNG.....	190
	LEBENS LAUF.....	192
	PUBLIKATIONEN.....	193
	ERKLÄRUNG.....	195

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

1D	eindimensional	MOI	<i>Multiplicity of infection</i> , Multiplizität der Infektion
2D	zweidimensional	MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
°C	Grad Celcius	mRNA	<i>messenger RNA</i>
μ	10 ⁻⁶ (micro)	MW	<i>molecular weight</i> , Molekulargewicht (g/mol)
A	Adenin	Nou	Nourseothricin
α-MEM	Minimal Essential Medium Alpha	nt	Nukleotid
Amp	Ampicilin	OD_{600nm}	Optische Dichte gemessen bei 600 nm
APS	Ammoniumperoxodisulfat	ODD	<i>Ordered Differential Display</i>
AS	Aminosäure(n)	ORF	<i>open reading frame</i> , offener Leserahmen
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>	PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
bp	Basenpaar(e)	PBS	<i>phosphate buffered saline</i> , Phosphatpuffer mit Salz
BSA	bovines Serumalbumin	PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerasekettenreaktion
C	Cytosin	pH	negativ dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
CAP	Chloramphenicol	PVDF	Polyvinylidenfluorid
cDNA	komplementäre DNA	qRT-PCR	quantitative Real-Time PCR
CFW	Calcofluor White	RACE	<i>Rapid Amplification of cDNA Ends</i>
CR	Congo Red	RLCS	<i>Restriction Landmark cDNA Scanning</i>
DD	<i>Differential Display</i>	RNA	Ribonukleinsäure (-acid)
DEPC	Diethylpyrocarbonat	RT	Raumtemperatur
DTT	1,4-Dithiothreitol	s	Sekunde
DNA	Desoxyribonukleinsäure (-acid)	SAGE	<i>Serial Analysis of Gene Expression</i>
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat	ss-cDNA	<i>single-stranded cDNA</i> , Einzelstrang cDNA
DOX	Doxycyclin	SSH	Sonnenblumensamenhülsen
ds-cDNA	Doppelstrang-cDNA	SMART	<i>Switching Mechanism At 5'end of RNA Transcript</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	T	Thymin
et al.	<i>et alii, lat.</i> : und andere	TAE	Tris-Acetat-Puffer
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i> , Durchflusszytometrie	Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i> , fötales Kalbsserum	TE	Tris-EDTA
FRT	<i>FLP recognition target</i> , Erkennungssequenz der Flippase	TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethan-1,2-diamin
g	Gramm	T_m	Schmelztemperatur
x g	<i>gravity</i> , Erdbeschleunigung	Tris	Tris-(hydroxymethyl)-Aminomethan
G	Guanin	TU	<i>transcriptional unit</i> , transkriptionelle Einheit
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>	U	Unit (Enzymeinheit)
GPI	Glycosylphosphatidylinositol	ün	über Nacht
h	Stunde	ünK	über Nacht Kultur
H₂O_{mol.biol}	Molekularbiologisches Wasser	Upm	Umdrehungen pro Minute
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>	UTR	<i>untranslated region</i> , nicht-translatierter Bereich
kDa	Kilodalton	UV	Ultraviolettes Licht
LD-PCR	<i>Long Distance PCR</i>	V	Volt
mA	Milliampere	%V	Volumenprozent
MESSAGE	<i>Multidimensional Electrophoretic System of Separation for the Analysis of Gene Expression</i>	Vh	Voltstunde
mg	Milligramm	v/v	<i>volume per volume</i> , Volumenprozent
min	Minute	w/v	<i>weight per volume</i> , Gewichtsprozent
mJ	Millijoule	WT	Wildtyp
ml	Milliliter	YCB	<i>yeast carbon base</i> , Hefe-Kohlenstoff-Basis
mM	Millimolare Konzentration (mmol/l)	YPD	<i>yeast extract - peptone - dextrose</i> , Vollmedium für Hefen

ZUSAMMENFASSUNG

Von den etwa 200 verschiedenen Pilzen der Hefegattung *Candida* gilt insbesondere *Candida albicans* als der medizinisch bedeutendste Hefepilz, da er als fakultativ pathogener Erreger zwar bei 75% der Bevölkerung hauptsächlich den Gastrointestinaltrakt symptomlos besiedelt, jedoch bei immunsupprimierten Patienten über zwei Drittel aller invasiven, systemischen Infektionen auslöst, die eine Mortalitätsrate von über 30% aufweisen. Mit der Identifizierung von *Candida dubliniensis* wurde ein sehr naher Verwandter von *C. albicans* beschrieben, der trotz einer sehr engen phylogenetischen Verwandtschaft und ähnlichen phänotypischen Eigenschaften, in epidemiologischen Studien eine nur sehr geringe Prävalenz sowie eine deutlich reduzierte Virulenz aufweist. Ein Vergleich beider *Candida*-Spezies sollte daher die Grundlage bieten, Unterschiede zwischen den beiden Hefepilzen zu identifizieren, die zur verbesserten Adaptation von *C. albicans* gegenüber *C. dubliniensis* an den Wirtsorganismus führen und zu ihrer unterschiedlichen Pathogenität beitragen.

Durch eine vergleichende Analyse der beiden *Candida*-Arten insbesondere im Hinblick auf ihre unterschiedliche Induktion und Regulation von morphologischen Differenzierungsprozessen (z. B. der Transition von der sphärischen Blastopore zur filamentösen Wachstumsform, die in *C. albicans* als ein wichtiger Virulenzfaktor angesehen wird) wurde in dieser Arbeit ein zentraler Morphogeneseregulator in *C. dubliniensis* identifiziert, der signifikante Homologien zu einer konservierten Klasse von Transkriptionsfaktoren in Pilzen aufweist, die als APSES-Proteine bezeichnet werden. Die Deletion dieses Gens und nachfolgende funktionelle Charakterisierung konnte zeigen, dass die Deletionsstämme neben einer veränderten Morphologie sich in der Induktion des hyphalen Wachstums und der Chlamydosporen-Ausbildung vom Wildtypstamm deutlich unterscheiden. Aufgrund dieser Funktion als zentraler Morphogeneseregulator wurde das entsprechende Protein als Mom1 - „Modulator of Morphogenesis 1“ bezeichnet. Weiterführende Analysen konnten zeigen, dass *MOM1* außerdem einen großen Einfluss auf das Adhäsions- und Invasionsverhalten sowie den Zellwandaufbau der Zellen hat. Diese Eigenschaften sind vergleichbar mit der Funktion des Efg1p in *C. albicans*. Durch die ektopische Expression von *MOM1* im *efg1Δ*-Deletionsstamm oder die heterologe Integration von *EFG1* in den *mom1Δ*-Deletionsstamm konnte der morphologische Phänotyp sowie die Defekte in der Zellwandzusammensetzung funktionell komplementiert werden. Durch differenzielle Genexpressionsstudien von Wildtyp- und Deletionsstämmen unter zwei unterschiedlichen Wachstumsbedingungen mithilfe der ebenfalls in dieser Arbeit etablierten und validierten *MESSAGE*-Technologie, die auf einer hochauflösenden zweidimensionalen Auftrennung der ds-

cDNA-Fragmente basiert, konnte außerdem gezeigt werden, dass der Transkriptionsfaktor Mom1p – ähnlich wie Efg1p aus *C. albicans*– neben den Proteinen der Zellwand oder Zellmembran auch zahlreiche metabolische Prozesse reguliert. Je nach Bedingung wurden durch Deletionen von *MOM1* zahlreiche Gene z. B. der Ribosomenbiogenese oder des Kohlenhydrat-metabolismus differentiell exprimiert. In dieser Arbeit konnte zum ersten Mal auch eine konservierte Funktion der APSES-Proteine Mom1p und Efg1p im Stickstoffmetabolismus beschrieben werden. Beide Proteine scheinen dabei eine essentielle Rolle als Schalterproteine spielen, ob nieder- oder hochmolekulare Stickstoffquellen für den Wachstumsprozess verwertet werden.

Trotz der konservierten Funktion zeigten sich zwischen beiden *Candida*-Arten signifikante Unterschiede in der transkriptionellen Regulation dieser APSES-Gene. So wurden *MOM1* und *EFG1* in den entsprechenden Wildtyp-Stämmen unter zahlreichen Bedingungen und unabhängig von der Zellmorphologie entgegengesetzt exprimiert. Durch den Austausch der gesamten *MOM1*-Promotorregion durch den *EFG1*-Promotor konnte jedoch Art und Verlauf der *C. albicans* *EFG1*-Induktion auch in *C. dubliniensis* beobachtet werden. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die antagonistische Genexpression hauptsächlich auf verschiedene *cis*-regulatorische Elemente in den jeweiligen Promotorsequenzen von *MOM1* und *EFG1* zurückgeführt werden können. Interessanterweise konnten wir trotz der gleichen *C. albicans*-spezifischen Regulation des heterolog exprimierten *EFG1* mit Promotor im $\Delta mom1$ -Deletionshintergrund keine Induktion des hyphalen Wachstums in *C. dubliniensis* beobachtet werden. Dies kann darauf zurückgeführt werden, dass die morphologische Transition in *C. albicans* durch einen weiteren regulatorischen Signalweg induziert wird, der in *C. dubliniensis* entweder nicht vorhanden oder aktiviert ist.

Diese Aktivierung von verschiedenen Signaltransduktionswegen oder die differentielle Regulation von Genen können somit die Gründe dafür sein, weshalb so phylogenetisch nahe verwandte Arten sich in der Expression von Virulenzfaktoren und ihrer Pathogenität unterscheiden.

ABSTRACT

Among the 200 different known yeast species of the genus *Candida*, *Candida albicans* is considered to be the most important clinical fungus which colonizes as a facultative pathogen the gastrointestinal tract of 75% of the healthy population but causes over two thirds of all invasive, systemic infections in immunocompromised patients with a mortality rate over 30%. With the identification of *Candida dubliniensis*, a very close relative of *C. albicans* has been characterized, which in spite of a very close phylogenetical relationship and similar phenotypic traits exhibits only a lower prevalence and reduced virulence in epidemiological studies. Therefore, a comparison of both *Candida* species should allow the identification of species-specific differences of the two yeast species, which are responsible for a better adaptation of *C. albicans* to the host compared to *C. dubliniensis* and also to their different pathogenicity.

Using a comparative analysis of both *Candida* species especially with regard to their different induction and regulation of morphogenetic processes (e.g. the transition of the spherical blastospore to the filamentous growth form, which is considered to be an important virulence factor of *C. albicans*) this work focuses on the identification of a central morphogenetic regulator in *C. dubliniensis*, which shows significant homologies to a conserved class of transcription factors in fungi, being described as APSES proteins. The deletion of this gene and subsequent functional characterization could show that deletion strains express an altered morphology as well as a considerable different kind of induction of hyphal growth and chlamyospore development if compared with a wild type strain. Due to this function as a central regulator of morphogenesis the corresponding protein was termed Mom1p –“Modulator of Morphogenesis 1”. Further analyses could indicate that Mom1p has a significant impact on adhesion and invasion as well on the cell wall assembly. These characteristics are comparable with the function of Efg1p in *C. albicans*. The ectopic expression of *MOM1* in a *efg1Δ*-deletion strain or the heterologous integration of *EFG1* in the *mom1Δ*-deletions strain could functionally complement the morphological phenotype as well as the defects in cell wall composition. Applying differential gene expression profiling of the wildtype and the deletion strain under two different growing conditions using the *MESSAGE*-technology, which was also established and validated within the scope of this work and that is based on a high resolution, two-dimensional separation of ds-cDNA-fragments, we could also show, that the transcription factor Mom1p – alike Efg1p of *C. albicans* – regulates proteins of the cell wall or cell membrane in addition to numerous metabolic processes. Depending on the growth condition, various genes e. g. for ribosome biosynthesis or carbon metabolism were differentially expressed, when *MOM1* was deleted.

Within the scope of this work we could also describe for the first time a conserved function of the APSES proteins Mom1p and Efg1p in the nitrogen metabolism. Both proteins seem to have an essential function in the decision whether low- or high molecular nitrogen sources should be utilized for growth of the cell.

Despite of a conserved function, APSES proteins of both *Candida*-species revealed significant differences in their own transcriptional regulation. Thus, under various conditions *MOM1* and *EFG1* of the corresponding wildtype strain show an opposite expression pattern in a morphology-independent manner. However, the type and course of the *C. albicans EFG1* induction could also be restored in *C. dubliniensis* when the *MOM1*-promotor was replaced by the *EFG1*-promotor. These results indicate that the antagonistic gene expression could be mainly due to different *cis*-regulatory elements in the corresponding promotor sequence of *MOM1* and *EFG1*. Interestingly, although the heterologous expression of *EFG1* in the *mom1Δ*-deletion background could regulate the expression of *EFG1* in a *C. albicans*-specific manner, we could not observe any hyphal induction in *C. dubliniensis*, indicating that morphological transition in *C. albicans* is induced by a different regulatory pathway, which is not present or not activated in *C. dubliniensis*.

In conclusion, activation of different pathways or different type of regulation of virulence genes might be one of the main reasons, why so closely related species like *C. albicans* and *C. dubliniensis* might differ in their expression of virulence factors and their pathogenicity.

EINLEITUNG

Das phylogenetische Reich der Pilze ist sehr divers, bestehend aus Eukaryonten, die meistens durch eine filamentöse, in manchen Fällen aber auch einzellige, vegetative Zellform sowie eine heterotrophe, absorbierende Nahrungsaufnahme charakterisiert sind [McLaughlin, DJ *et al.* 2009]. Diese Eigenschaften erlauben es ihnen, in der Umwelt eine wichtige Funktion als Saprophyten, Symbionten oder Parasiten einzunehmen. So bilden sie symbiotische Lebensgemeinschaften mit Cyanobakterien oder Grünalgen in Flechten sowie als Endophyten oder in Form von Mykorrhiza mit Pflanzen- oder Wurzelzellen. Eine derartige Form von Mutualismus, bei dem beide Interaktionspartner voneinander profitieren, kann auch zwischen Pilz und tierischen Zellen auftreten (z. B. im Darm von Insekten, im Rumen oder Blinddarm herbivorer Säugetiere) [Galagan, JE *et al.* 2005; McLaughlin, DJ *et al.* 2009]. Neben der symbiotischen Lebensgemeinschaft haben parasitäre Pilze pflanzlicher und tierischer Organismen signifikante Auswirkungen auf den betroffenen Wirt und das entsprechende Ökosystem, was große wirtschaftliche Schäden nach sich zieht. So verursachen z. B. die Mitglieder der zur Gruppe der Ascomyceten (Schlauchpilzen) gehörenden Gattung *Taphrina* als Phytopathogene bei zahlreichen Kulturbäumen (u. a. Pflaume, Pfirsich, Kirsche) die Kräuselkrankheit der Blätter sowie Hypertrophien an Früchten, was durch die verursachten Ernteauffälle großen ökonomischen Schaden zur Folge hat. Auch der Befall verschiedener Süßgräser wie Weizen, Roggen und Mais mit *Fusarium graminearum* oder *Claviceps purpurea* führt weltweit zu großen Ernteverlusten. Von großem wirtschaftlichem Nutzen sind dagegen andere Mitglieder der Ascomyceten wie z. B. die Hefepilze der Gattung *Saccharomyces* (wie *S. cerevisiae* oder *S. ellipsoideus*). Diese sind u.a. von großer Bedeutung für die Lebensmittelindustrie, da ihre Stoffwechselprozesse (wie Gärung) insbesondere für die Herstellung von Brot, Käse oder alkoholischen Getränken ausgenutzt werden. Weiterhin werden Pilze heute für die Herstellung eines breiten Spektrums von medizinischen Produkten wie Antibiotika, Immunsuppressiva und Impfstoffen verwendet. Die außerordentliche Vielfalt der Pilze sowie ihre ökologische und ökonomische Bedeutung zeigt eine Übersicht in **Abbildung 1**.

Die genaue Artenzahl heute lebender Pilze ist unbekannt. Eine konservative Schätzung geht von einem absoluten Minimum von 712.000 weltweit existierenden Pilzarten aus [Schmit, JP, Mueller, G.M. 2007]. Die tatsächliche Anzahl der Pilze dürfte jedoch weit höher liegen. Eine progressive Schätzung liefert Hawksworth DL mit bis zu 1,5 Millionen [Hawksworth, DL 2001], von denen erst ca. 80.000 beschrieben worden sind [Schmit, JP, Mueller, G.M. 2007].



Abbildung 1: „Introduction to Fungi“ - Dr. M. Fayyaz & Kandis Elliot, University of Wisconsin

Abbildung zur Illustration der pilzlichen Vielfalt, das 2010 von der National Science Foundation und dem *Science*-Journal mit dem 1. „International Science and Engineering Visualization Challenge“-Preis ausgezeichnet worden ist
 Quelle: aus *Science*, **331**, 2011.

Überraschenderweise werden nur ca. 150 - 200 Pilzarten mit menschlichen Infektionen assoziiert, wobei von diesen nur etwa ein Dutzend über 90% aller pilzlichen Infekte auslösen [Edmond, MB *et al.* 1999].

Die wichtigsten Phyto- und humanpathogenen Arten verschiedener Abteilungen, deren Genome heute (vollständig) sequenziert worden sind, sind in der **Abbildung 2** dargestellt.

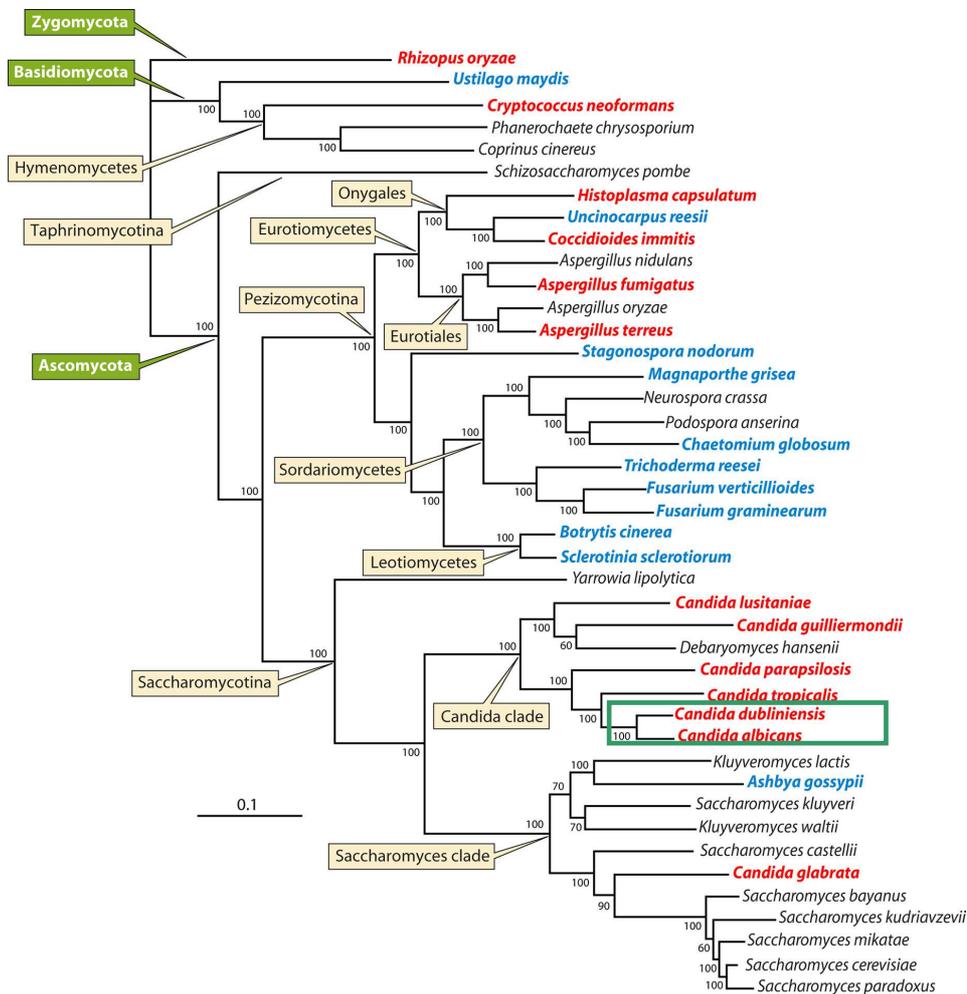


Abbildung 2: Phylogenie der Pilze.

Phylogenetischer Stammbaum der 42 bedeutendsten pathogenen Pilzarten mit voll sequenziertem Genom. Phytopathogene sind in blau und Tierpathogene in rot angegeben. Die beiden *Candida*-Arten, die im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden, sind eingerahmt. Aus Butler, Clin. Microbiology Reviews, 2010 [Butler, G 2010].

Eine große Anzahl humanpathogener Pilze wie z. B. der Schimmelpilz *Aspergillus fumigatus*, *Cryptococcus neoformans* und *Histoplasma capsulatum* kommen hauptsächlich in der Umwelt vor und infizieren nur gelegentlich den Menschen. Andere Arten sind dagegen besser an den menschlichen Wirt angepasst. Dazu zählen z. B. Dermatophyten der drei Gattungen *Microsporum*, *Trychophyton* und *Epidermophyton*, die meist oberflächliche Mykosen der Haut, Nägel und Haare hervorrufen. Ein weiterer Erreger von Hautkrankheiten ist der Hefepilz *Malassezia furfur*, der ein Bestandteil der Hautflora bei nahezu allen Menschen ist.

Auch einige Hefepilze der Gattung *Candida* gehören häufig zur normalen mikrobiellen Flora des Menschen. Bei einer Schwächung des Immunsystems können diese jedoch als klassische opportunistische Erreger neben oberflächlichen Mykosen auch lebensgefährliche, systemische Infektionen auslösen. Bei den oberflächlichen Mykosen handelt es sich meistens um Infektionen der Schleimhäute des Mund- und Rachenraums, des Verdauungstraktes oder von Geschlechtsorganen. Die entsprechenden Krankheitsbilder werden entweder als Soor oder Kandidose bezeichnet. Tritt der Erreger dagegen durch invasives Wachstum in das Blutsystem über (Kandidämie), findet eine direkte Verbreitung im Körper des Wirtes statt mit anschließender Besiedlung und Invasion von inneren Organen. In diesen Fällen handelt es sich um systemische Infektionen. Diese invasive Kandidosen sind schwerwiegende, lebensbedrohliche Erkrankungen, die nur äußerst schwer behandelbar sind und bei 50% der Infektionsfälle zum Tod führen [Wey, SB *et al.* 1988; Eggimann, P *et al.* 2003; Gudlaugsson, O *et al.* 2003; Pappas, PG 2006].

Insgesamt hat sich die Anzahl der durch opportunistische Pilze verursachten Sepsisfälle in den Vereinigten Staaten zwischen 1979 und 2000 verdreifacht [Martin, GS *et al.* 2003]. Neben *Candida* zählen auch Schimmelpilze der Gattungen *Aspergillus* und *Fusarium* sowie Gattungen *Cryptococcus*, *Trichosporon* und *Zygomyceten* (Jochpilze) zu den wichtigsten Erregern systemischer Infektionen [Pfaller, MA and Diekema, DJ 2007]. Nach Schätzungen einer Studie von 2002 belaufen sich die direkten Kosten für systemische Pilzinfektion alleine in den Vereinigten Staaten auf 2,6 Milliarden Dollar [Wilson, LS *et al.* 2002].

I. Humanpathogene Arten der Gattung *Candida*

Taxonomisch wird die Gattung *Candida* anhand vergleichender Sequenzuntersuchung - z. B. von rDNA-Sequenzen - dem Stamm der *Ascomyceten* (Schlauchpilze) und dort den *Saccharomycetales* zugeordnet, einer Ordnung zu der auch die Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* angehört [Petersen, RF *et al.* 2000]. Die Gattung umfasst derzeit über 200 Arten, von denen die meisten (über 65%) saprophytisch in der Umwelt leben und nicht mit Infektionen von Säugetieren assoziiert sind. Nur etwa 17 Arten sind in der Lage den Menschen als Wirt zu kolonisieren und Infektionen auszulösen, wobei über 90% aller invasiver Kandidosen nur wenigen Arten wie *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. krusei* und *C. glabrata* zugeschrieben werden [Hazen, KC 1995]. Alle anderen Spezies erfüllen die möglicherweise wichtigste Voraussetzung für eine Besiedelung im menschlichen Körper nicht, da sie bei einer Temperatur von 37°C kein Wachstum zeigen, so dass eine erfolgreiche Proliferation nicht gewährleistet werden kann [Calderone, RA 2002].

Für die Pathogenität opportunistischer *Candida spp.* ist der Zustand des Immunsystems des Wirts entscheidend. Bei einer Schwächung der natürlichen Widerstandskraft können sich die Pilze, die normalerweise von einem intakten Immunsystem unter Kontrolle gehalten werden, gegenüber dem Wirt durchsetzen und eine Infektion auslösen. Als prädisponierende Faktoren für eine Ausbreitung im Wirtsorganismus gelten Altersextreme (<1 und >70 Jahre), Erkrankungen des Immunsystems wie AIDS oder Neutropenie (Verminderung der neutrophilen Granulozyten im Blut), *Diabetes mellitus*, Schädigungen der natürlichen Schleimhaut- bzw. Hautbarrieren durch Wunden, Operationen oder der Einsatz von (intravaskulären) Kathetern. Auch der zunehmende Einsatz von Breitband-Antibiotika und zytotoxischer Chemotherapie erhöhen das Risiko opportunistischer Pilzkrankungen [Segal, BH *et al.* 2006].

Die meisten Pilzinfektionen des Menschen werden in heutiger Zeit von *C. albicans* verursacht, der in klinischen Studien nach bakteriellen Krankheitserregern wie *Streptokokken* und *Staphylokokken* der am häufigsten isolierte systemische Pilzpathogen ist. Im Vergleich zu anderen *Candida*-Arten (wie *C. glabrata*, *C. tropicalis*) galt insbesondere die Fähigkeit zwischen diversen morphologischen Wachstumsformen zu wechseln, als eine einzigartige Eigenschaft und der entscheidende Virulenzfaktor von *C. albicans*, der die Unterschiede dieses Pilzes in seiner Pathogenität gegenüber anderen Arten erklärte. Mit der Identifizierung von *C. dubliniensis* als eigenständige Spezies stellte sich die Frage nach unterschiedlichen Eigenschaften beider *Candida*-Arten, da sie aufgrund der sehr nahen evolutionären Verwandtschaft in der Lage sind, dieselben morphologische Wachstumsformen auszubilden, sich jedoch erheblich in ihrer Virulenz unterscheiden.

I.1 *Candida albicans*

Candida albicans ist der wichtigste Humanpathogen der Gattung *Candida*. Dieser Hefepilz ist normalerweise ein harmloser Kommensale epithelialen Wirtsgewebes und wird bei etwa 60% - 70% der gesunden Bevölkerung gefunden [Calderone, RA 2002]. Es ist in der Lage eine große Anzahl von Wirtsnischen zu besiedeln, die sich erheblich in ihren Lebensbedingungen unterscheiden. Abgesehen von einigen *C. albicans*-Funden aus den Sandstränden von Israel [Ghinsberg, RC *et al.* 1994] oder der Besiedlung von Polymeroberflächen (z.B. an Kathetern), wird *C. albicans* vergleichbar selten aus der (abiotischen) Umwelt isoliert. Sein Hauptreservoir ist die Haut sowie die Schleimhäute des oralen, gastrointestinalen sowie des urogenitalen Trakts [Hube, B 2004]. Dabei ist *C. albicans* nicht nur dem Konkurrenzdruck verschiedener anderer Mikroorganismen, sondern auch sehr unterschiedlichen äußeren Einflüssen wie neutralem pH-Wert im Blutkreislauf sowie saurem pH im Urogenitaltrakt, verschiedenen Temperaturen (auf

oder innerhalb des Körpers) sowie der Verfügbarkeit bzw. der Abwesenheit von Sauerstoff ausgesetzt, an die sich der Pilz adaptieren muss. Die Kolonialisierung erfolgt während oder kurz nach der Geburt [Reef, SE *et al.* 1998] und verläuft beim intakten Immunsystem unbemerkt. Ist dieser jedoch geschwächt, kann *C. albicans* oberflächliche Mykosen auslösen. Lebensbedrohende systemischen Infektionen treten dagegen erst bei Patienten mit gravierenden und dauerhaften Schwächungen/Störungen des Immunsystems (z. B. HIV-Infektionen, Organtransplantationen) auf [Hazen, KC 1995; Pfaller, MA and Diekema, DJ 2004]. Als ein am besten angepasster, opportunistischer Organismus bildet *C. albicans* mehr als eine Virulenzeigenschaft aus, die dem Pilz die Konversion von der passiven, kommensalen zur lebensbedrohenden, invasiven Lebensform erlaubt. Bei dieser Entwicklung des pathogenen Zustandes von *C. albicans* spielt eine Vielzahl von Genen in unterschiedlichen biologischen Prozessen eine entscheidende Rolle.

I.2 *Candida dubliniensis*

Die Erstbeschreibung von *C. dubliniensis* als eigenständige Spezies erfolgte 1995 von der Arbeitsgruppe um Coleman DJ. in Dublin [Sullivan, DJ *et al.* 1995]. *C. dubliniensis* zählt zu dem nächsten Verwandten von *C. albicans*, wobei beide Arten vor etwa 20 Millionen Jahren noch denselben Vorfahren hatten [Mishra, PK *et al.* 2007]. Die Verwandtschaft zwischen den beiden Arten ist noch ausreichend hoch, um den Paarungsprozess unter *in vitro*-Bedingungen durchzuführen [Pujol, C *et al.* 2004].

Mit einer Größe von 14,6 Mb ist das Genom vergleichbar mit dem von *C. albicans* (14,9 Mb), wobei insbesondere innerhalb der Protein-kodierenden Sequenzen eine sehr hohe Identität besteht. Von 5569 orthologen Genpaaren zeigen auf Nukleotidebene 44,4% (2470 Gene) eine über >90%ige Sequenzhomologie; 96,3% (5363 Gene) sind >80% identisch. Auch die Syntenie ist größtenteils kollinear, so dass 98,1% (5647 der Genpositionen) in beiden Spezies konserviert sind [Jackson, AP *et al.* 2009]. Neben dieser sehr nahen phylogenetischer Verwandtschaft, zeigen beide *Candida*-Arten auch sehr viele phänotypische Gemeinsamkeiten, die früher als charakteristische Attribute von *C. albicans* angesehen wurden. Erhebliche Unterschiede zeigen sich jedoch in der Pathogenität beider *Candida*-Spezies. *C. dubliniensis* wurde in seiner Erstbeschreibung als opportunistischer Erreger oropharyngealer Kandidosen in immundefizienten Personen und AIDS-Patienten beschrieben, wobei es bis heute vereinzelt auch von anderen anatomischen Stellen isoliert werden konnte [Sullivan, DJ *et al.* 1995; Sullivan, DJ *et al.* 2005]. Während *C. albicans* jedoch in über 60% der Fälle als Auslöser systemischer Kandidosen gilt, ist *C. dubliniensis* nur selten mit hämatogenen Infektionen assoziiert und wird in nur 2 – 3% aller *Candida*-Arten aus Blutproben isoliert [Kibbler, CC *et al.* 2003; Odds, FC *et al.* 2007]. Auch die

Prävalenz von *C. dubliniensis* in der gesunden Bevölkerung ist mit nur 3,5 % deutlich geringer als von *C. albicans*. Diese scheinbar stark verminderte Virulenz wurde durch vergleichende Studien mit systemischen und oro-gastrischen Mausinfektions- sowie an *ex vivo*- rekonstituierten oralen Humanepithel (RHE)-Modellen zum Nachweis der oberflächlichen Infektion nachgewiesen [Gilfillan, GD *et al.* 1998; Vilela, MM *et al.* 2002; Stokes, C *et al.* 2007; Asmundsdottir, LR *et al.* 2009; Spiering, M] *et al.* 2010].

Interessanterweise besiedelt *C. dubliniensis* häufig auch nicht-humane Organismen. So konnte der Pilz bereits auf einer Schildzecken-Art (*Ixodes uriae*), die hauptsächlich auf marinen Seevögel parasitiert, oder aus Exkrementen von Seevögel isoliert werden [Nunn, MA *et al.* 2007; McManus, BA *et al.* 2009]. Ein Vergleich der Mensch- und Vogelisolaten mithilfe der sog. „Multilocus sequence typing“ konnte meistens signifikante genetische Unterschiede zwischen den einzelnen Stämmen aufzeigen, wobei ein Vogelisolat (AV7) nicht differenziert werden konnte. Dies kann ein Hinweis dafür sein, dass eine Spezies-übergreifende Übertragung des genetischen Materials stattgefunden hat [McManus, BA *et al.* 2009]. Da *C. dubliniensis* im Insekteninfektionsmodell (*Galleria mellonella*, Große Wachsmotte) eine vergleichbare Pathogenität wie *C. albicans* aufweist, existieren Spekulationen, ob dieser Pilz nicht primär ein Insektenpathogen ist [Chen, YL *et al.* 2011].

II. Virulenzfaktoren von *C. albicans* – Vergleich mit *C. dubliniensis*

Die genaue Definition von Virulenzfaktoren in opportunistischen Krankheitserregern wie *Candida albicans* ist nicht eindeutig und noch umstritten. Dazu zählen heute Komponenten des Pathogens, die den Wirt schädigen. Virulenzfaktoren müssen in der Regel zwar nicht essentiell für die Viabilität des Erregers sein, sie werden nur für die Etablierung der Pathogenese im Wirt essentiell gebraucht. Virulenzfaktoren opportunistischer Krankheitserreger können verschiedenste Funktionen aufweisen und so z. B. die mikrobielle Anlagerung/Adhäsion, Invasion, Inhibierung der Phagozytose oder die Fähigkeit des Pathogens, intrazellulär zu überleben, bewirken. Im Gegensatz zu einigen pathogenen Bakterien reichen für die Pathogenität von *Candida* einzelne Toxine nicht aus. Der Pilz verfügt als opportunistischer Krankheitserreger über eine Reihe von Faktoren, deren komplexes Zusammenspiel es ermöglicht, beispielsweise dem Immunsystem des Wirts zu entgehen, in der Wirtsumgebung zu überleben, zu proliferieren, sowie neue Gewebe zu besiedeln und somit seine vollständige Pathogenität zu entfalten [Cutler, JE 1991; Calderone, RA 2002].

Trotz der sehr nahen phylogenetischen Verwandtschaft, zeigt *C. dubliniensis* in epidemiologischen Studien im Vergleich zu *C. albicans* eine signifikant geringe Pathogenität und Prävalenz in der gesunden Bevölkerung. Im Folgenden werden die wichtigsten Virulenzfaktoren von *C. albicans* dargestellt und diese mit *C. dubliniensis* verglichen.

II.1 Zellwand und Zelloberflächenproteine

Die erste Interaktion des Pilzes mit der Wirtszelle wird über Adhäsionsfaktoren der pilzlichen Zellwand vermittelt. Somit ist die Zellwand die erste zelluläre Komponente, die den Kontakt zwischen Wirt und Pathogen ausbildet und für den Infektionsverlauf entscheidend ist.

i) Aufbau und Regulation der Zellwand

Die Zellwand ist eine kohärente Struktur kovalent und nicht-kovalent verknüpfter Bestandteile, die der Zelle ihre charakteristische Form verleiht und sie gegen physikalische, chemische und biologische Einflüsse schützt. Im Vergleich zum Gesamt-Trockengewicht macht die Zellwand von *C. albicans* etwa 15-30% aus. Die Hauptbestandteile sind mit 80 – 90% Polysaccharide, zu denen verzweigte β -1,3- und β -1,6-verknüpfte Glukosepolymere (β -Glukane, 50-60%), Chitin (0,6 – 9%) sowie über die N- und O-glykosidische Bindung kovalent an die Zellwandproteine gebundene Mannosepolymere (Mannoproteine, 6 -25%) zugezählt werden. Mit 1 – 7% findet sich in der Zellwand auch ein geringer Anteil an Lipid [Chaffin, WL 2008]. Aufgebaut ist die Zellwand aus mehreren Schichten, wobei die innerste Schicht (zur Plasmamembran) aus Chitinfibrillen mit kovalent verknüpften β -1,3- und β -1,6-Glukanketten besteht, **Abbildung 3**. Dadurch wird eine dreidimensionale Netzwerkstruktur aufgebaut, die der Zelle Form und Stabilität verleiht. Die äußere Schicht besteht hauptsächlich aus Mannoproteinen, die ebenfalls in zwei Gruppen unterteilt werden können (lösliche und kovalent gebundene Zellwandproteine). Während die kovalent-gebundenen Zellwandproteine (z. B. GPI-Proteine) fest mit dem Glukangerüst verankert sind und sich nur durch die Zugabe von Enzymen oder chemischen Agenzien aus der Zellwand herausgelöst werden können, werden lösliche Proteine alleine durch die Zugabe von Detergenzien extrahiert [Urban, C *et al.* 2003]. Dies ist nur deshalb möglich, weil sie nur durch schwache Wechselwirkungen wie Wasserstoffbrückenbildung, Disulfidbrücken, hydrophobe und ionische Wechselwirkungen am Zellwandgerüst gebunden sind [Chaffin, WL *et al.* 1998].

Die Regulation und Kontrolle des Zellwandaufbaus erfolgt in *C. albicans* mithilfe von Signalwegen, die auch für die Morphogenese des Pilzes entscheidend sind sowie durch eine kontrollierte Expression von Zelloberflächenproteinen, die eine entsprechende Zellwandzusammensetzung in diversen morphologischen Formen von *C. albicans* ermöglichen (vgl. EINLEITUNG, II.4). So konnte durch umfassende Genexpressionsanalysen von Zellwandgenen gezeigt werden, dass z. B. der Transkriptionsfaktor Efg1p über den cAMP-Proteinkinase A-Signaltransduktionsweg sowohl während des hefe- wie auch hyphenförmigen Wachstums eine wichtige Rolle in der Induktion und Repression von Zellwandprotein-kodierenden Genen spielt [Sohn, K *et al.* 2003].

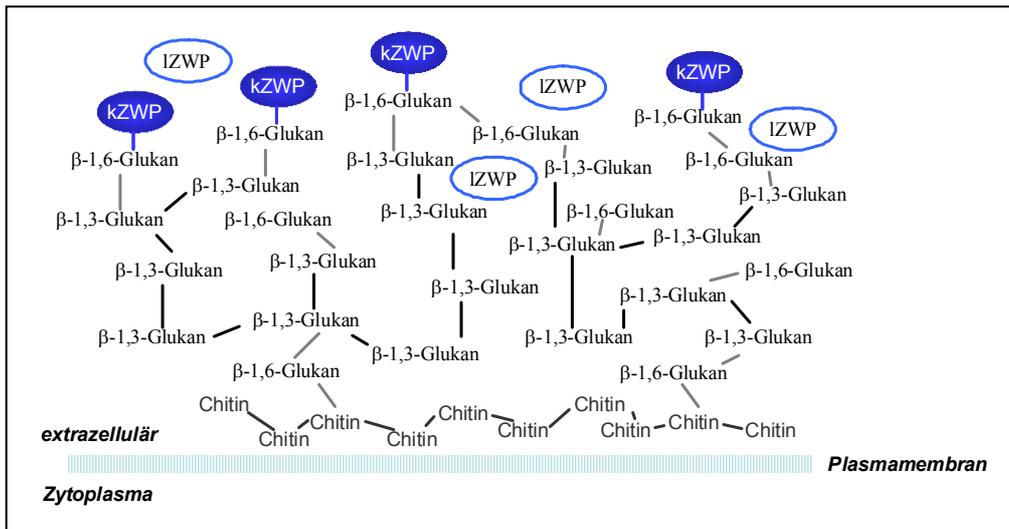


Abbildung 3: Zellwand-Aufbau in *Candida albicans*.

Vereinfachte schematische Übersicht der Zellwand-Zusammensetzung von *C. albicans*. kZWP: kovalent gebundenes Zellwandprotein, IZWP: lösliches (nicht-kovalent gebundenes) Zellwandprotein.

Abbildung aus [Röhm, M 2010] nach C. F. Urban, Fraunhofer IGB, Stuttgart.

Im Gegensatz zu *C. albicans* wurden für die Zellwand von *C. dubliniensis* bisher weder Studien zur Stabilität, Zusammensetzung (Polysaccharidgerüst, Zellwandproteine) noch über die Regulation der Zellwandbiogenese durchgeführt.

ii) Zelloberflächenproteine

Eines der ersten direkten Kontakte des Pilzes mit dem Wirt erfolgt - neben dem β-1,3-Glukan, das beispielsweise an den Transmembranrezeptor Dectin-1 bindet [Brown, GD 2006] - auch über spezifische Proteine an der Zelloberfläche, die für die Pathogenität des Pilzes entscheidend sein können. So sind sie z.B. für die Adhäsionseigenschaften der Zelloberfläche verantwortlich oder in der Lage - über ihre antigene Eigenschaften bzw. die direkte Interaktion mit den Immunzellen - die Immunantwort des Wirts zu modulieren/beeinflussen [Chaffin, WL 2008].

Zelloberflächenproteine können anhand ihrer Bindung an das Polysaccharidgerüst der Zellwand in zwei Klassen (kovalent und nicht-kovalent gebundene Proteine) unterteilt werden. Je nach Wachstumsbedingung können manche Proteine auch nur mit der Zellwand oder Zellmembran assoziiert sein oder in den extrazellulären Raum sekretiert werden. Zu kovalent gebundenen Zelloberflächenproteinen gehören die GPI-Zellwandproteine, Pir-Proteine (Pir = *proteins with internal repeats*) ohne den GPI-Anker oder bestimmte Mannoproteine [Ruiz-Herrera, J *et al.* 2006]. Entscheidende Charakteristika sind N-terminales, hydrophobes Sekretionsmotiv, Glykosylierungen oder interne Sequenzwiederholungen.

Zu den gut charakterisierten Zelloberflächenproteinen gehört eine Gruppe von Proteinen, sog. Adhäsine, die die Bindung an die Wirtszelle vermitteln und somit entscheidend für den Kolonisations- und Infektionsprozess sind [Hostetter, MK 1994; Chaffin, WL *et al.* 1998]. Adhäsine binden z.B. an Bestandteile der extrazellulären Wirtsmatrix wie Fibronectin, Laminin oder Kollagen I und IV, an Zuckerreste wie Fukose oder die Blutgruppenantigene auf der Oberfläche der Wirtszelle [Brassart, D *et al.* 1991; Silva, TM *et al.* 1995; Cameron, BJ and Douglas, LJ 1996]. Beispiele bekannter Adhäsine von *C. albicans* sind Hwp1 (*hyphal wall protein 1*) und die Proteine der ALS-Genfamilie. Hwp1 ist ein Mannoprotein, das hauptsächlich an den Spitzen der Hyphenzellwand verankert ist. Es fungiert als Substrat epithelialer Transglutinasen und spielt so eine Hauptfunktion in der Adhäsionsfähigkeit von *C. albicans* an menschliche Mundepithelzellen [Staab, JF *et al.* 1999; Sundstrom, P *et al.* 2002]. Interessanterweise konnte auch ein homologes Hwp1p in *C. dubliniensis* identifiziert werden. Ein Sequenzvergleich der beiden ORFs konnte jedoch nur 49% Identität und mehrere deletierte Bereiche (insbesondere im Prolin-, Glutamin- sowie Aspartatreichen Sequenzabschnitt, der für die Transglutaminase-Substrate Aktivität entscheidend ist) aufzeigen [Moran, G *et al.* 2004]. Diese Sequenzunterschiede in Hwp1 werden heute insbesondere in der molekularbiologischen Diagnostik ausgenutzt, um die beiden nah verwandte Arten *C. albicans* und *C. dubliniensis* unterscheiden zu können [Romeo, O and Criseo, G 2008].

Neben den Abweichungen in einigen Gensequenzen bestimmter Proteine, zeigen beide *Candida*-Arten - insbesondere in den Virulenz-assoziierten Genfamilien - signifikante Unterschiede. Als Beispiele können z. B. die Zelloberflächenproteine/Adhäsine der ALS- (α -agglutinin-like sequence) sowie die IFF-Genfamilie, wobei die letzteren für GPI-Proteine kodieren, zu denen auch das hyphenspezifische *C. albicans* Protein Hyr1 zugezählt wird, aufgeführt werden [Hoyer, LL 2001; Moran, G *et al.* 2004]. So zeigten vergleichende Analysen nicht nur wenig konservierte Sequenzbereiche in der 3'-Region der ALS-Gene, sondern auch große Unterschiede in der Anzahl verwandter Proteine in den entsprechenden Familien [Hoyer, LL 2001]. So fehlen z. B. vom ALS-Genrepertoire in *C. albicans* sowohl das ALS3- wie auch das

ALS5-Gen in *C. dubliniensis* [Jackson, AP *et al.* 2009]. Dem hyphenspezifischen Als3p aus *C. albicans* wird z. B. eine Invasin-ähnliche Eigenschaft und in *in vivo*-Infektionsmodellen eine wichtige Funktion für den Eisenentzug aus Ferritin zugeschrieben [Phan, QT *et al.* 2007; Almeida, RS *et al.* 2008]. So konnte eine Studie von Phan *et al.*, 2007 zeigen, dass der N-terminale Bereich des Als3p die Cadherine der Wirtszelloberfläche nachahmt, wodurch eine Bindung des Als3-Proteins an N-Cadherin endothelialer Zellen oder das E-Cadherin oraler Epithelzellen ermöglicht und eine Endozytose von *C. albicans* durch die Wirtszellen induziert wird [Phan, QT *et al.* 2007]. Ein Fehlen dieses Proteins kann demnach entscheidende Nachteile für die Initiation und Aufrechterhaltung des Infektionsprozesses in *C. dubliniensis* haben.

II.2 Extrazelluläre hydrolytische Proteine

Neben einigen Zelloberflächenproteinen können auch verschiedene hydrolytische Enzyme wie Proteinasen, Phospholipasen und Lipasen zur Etablierung der Pathogenese von *C. albicans* beitragen. Die Funktionen dieser sezernierter Proteine sind dabei sehr variabel und reichen z.B. von der Zerstörung der Zellmembranen und extrazellulären Matrices des Wirtes, der Ausbreitung und Gewebeinvasion des Pathogens bis hin zur Erschließung von neuen Nahrungsquellen.

i) Sekretierte Aspartylproteinasen (SAPs)

In *C. albicans* umfasst diese Genfamilie zehn Mitglieder, die unter verschiedenen Umweltbedingungen differentiell sekretiert werden [Hube, B and Naglik, J 2001; Naglik, J *et al.* 2004; Schaller, M *et al.* 2005]. So konnte z.B. gezeigt werden, dass Einzeldelationen von Sap1p-Sap3p, von denen Sap1p und Sap3p in Paarungskompetenten *opaque*-Zellen exprimiert werden und Sap2p, welches v. a. in Hefezellen und in Medien mit Protein als einzige Stickstoffquelle verstärkt exprimiert wird, zu einer reduzierten Virulenz von *C. albicans* im systemischen Mausmodell führen [Hube, B *et al.* 1997; Sanglard, D *et al.* 1997; Staib, P *et al.* 2002]. 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, A *et al.* 2006].

Vergleichende Analysen der beiden Pilzgenome zeigten nur 7 homologe *SAP*-Gene im Genom von *C. dubliniensis*. Während *C. albicans* drei sehr nah verwandte Gene, *SAP4*, *SAP5* und *SAP6* auf dem Chromosom 6 aufweist, besitzt *C. dubliniensis* mit *CdSAP4-6* nur ein orthologes Gen dieser Unterfamilie. Es wird angenommen, dass während der evolutiven Weiterentwicklung von *C. albicans* aufgrund eines Anpassungsprozesses das ursprüngliche *CdSAP4-6*-Gen zwei unabhängige Duplikationen sowie einen Teilinversionsprozess auf der entsprechenden Genregion des Chromosoms 6 durchlaufen hat, wodurch weitere funktionelle Proteine (*SAP5*, *SAP6*) gebildet werden konnten. Diese Orthologe werden in Abhängigkeit von der Morphologie reguliert (hyphenspezifisch) und sind entscheidend für die Etablierung einer systemischen Infektion [Jackson, AP *et al.* 2009; Moran, GP *et al.* 2011].

ii) Extrazelluläre Phospholipasen

C. albicans sekretiert eine Reihe von Phospholipasen, wie z.B. Lysophospholipase (z.B. Phospholipase B) oder Transacylasen. Plb1p hat eine wichtige Funktion bei der systemischen Infektion im Mausmodell [Leidich, SD *et al.* 1998]. Phospholipasen spielen möglicherweise eine Rolle beim Durchdringen der Zellmembranen des Wirts, sowie bei den Adhäsionseigenschaften von *C. albicans* [Price, MF and Cawson, RA 1977; Barrett-Bee, K *et al.* 1985].

Obwohl in der Genomsequenz von *C. dubliniensis* homologe Gene für Plb1p und Plb2p gefunden werden, konnte bisher jedoch keine Phospholipase Aktivität nachgewiesen werden [Fotedar, R and Al-Hedaithy, SS 2005].

II.3 Stickstoffmetabolismus

Entscheidend für das Pathogenitätsverständnis von opportunistischen Krankheitserregern ist auch die Fragestellung, wie der Erreger im Wirt seinen Nährstoffbedarf decken kann oder wie er sich auf unterschiedliche Bedingungen adaptiert. So ist bis heute nicht klar, welche Nährstoffe - z. B. welche Stickstoffquelle - während des Infektionsprozesses von *C. albicans* verwendet wird, da in diesem Fall mit Aminosäuren und Wirtsproteinen zwei naheliegende und abundante Stickstoffquellen vorliegen. Unter *in vitro* Bedingungen, beeinflusst die Konzentration und die Art der Stickstoffquelle im Medium die spezifische Zellantwort von *C. albicans*. So induziert z. B. die Stickstofflimitation über die Ammoniumpermease Mep2p den morphogenetischen Wechsel, während die Verfügbarkeit von Proteinen als einzige Stickstoffquelle zur Produktion der sekretierten Aspartylproteinasen (Saps) führt [Hube, B *et al.* 1994; Biswas, K and Morschhauser, J 2005]. Zahlreiche Studien konnten einen Zusammenhang zwischen Stickstoffverbindung und Virulenz in unterschiedlichen humanpathogenen Pilzen nachweisen. So konnte durch das Fehlen

des GATA-Transkriptionsfaktors AreA in *Aspergillus fumigatus* (Homolog des Gat1p von *C. albicans*) eine teilweise verminderte Virulenz im Mausinfektionsmodell für pulmonale Aspergillose zeigen [Hensel, M *et al.* 1998]. Ähnliche Ergebnisse konnten auch für das Gat1p von *C. albicans* beobachtet werden [Limjindaporn, T *et al.* 2003]. Leider ist bis heute nicht endgültig geklärt, wie die Stickstoffverwertung in *C. albicans* kontrolliert und reguliert wird.

Stickstoff ist für lebende Organismen ein essentielles Element, da es als Hauptkomponente komplexer Makromoleküle wie Proteine, Purine, Pyrimidine, Co-Faktoren von Enzymen, einige Kohlenhydrate und Lipide entscheidend für den Wachstumsprozess des Pilzes ist. Um bestimmte Stickstoffquellen verwerten zu können, müssen sowohl für den Transport oder den metabolischen Prozess spezielle Permeasen, Transporter bzw. Enzyme synthetisiert werden. Die Kontrolle dieser Stoffwechselwege unterliegt einer strengen Regulation. So sind bestimmte Substanzen wie Ammonium, Glutamat und Glutamin sog. primäre Stickstoffquellen, die von der Zelle bevorzugt aufgenommen werden, während andere (sekundäre) Stickstoffverbindungen wie Nitrat, Nitrit, Purine sowie die meisten Aminosäuren und Proteine nur dann verwendet werden, wenn sich die Konzentration primärer N-Quelle limitiert ist. Je nach vorliegender Konzentration wird Ammonium entweder passiv über Diffusion oder aktiv über spezielle evolutionär konservierte Familien von Permeasen (Ammoniumpermeasen Mep1p und Mep2p) aufgenommen (**Abbildung 4A**) [Andrade, SL and Einsle, O 2007; Morschhäuser, J 2011]. Die *MEP*-Gene unterliegen selber einer strengen Regulationskontrolle durch die GATA-Transkriptionsfaktoren Gat1p und Gln3p [Magasanik, B and Kaiser, CA 2002]. Ihre Expression ist unter stickstofflimitierenden Bedingungen wie z.B. niedrige NH_4^+ -Konzentrationen oder das Vorhandensein von sekundären Stickstoffquellen stark induziert. Innerhalb der Zelle wird das Ammonium mithilfe der NADP-abhängigen Glutamatdehydrogenase (Gdh1p) an das α -Ketoglutarat des Kohlenhydratmetabolismus gebunden und so das Glutamat generiert. Die Glutaminsynthetase (Gln1p) katalysiert die Inkorporation eines weiteren Ammoniums an Glutamat und somit die Synthese von Glutamin. Beide Aminosäuren können intrazellulär weiter metabolisiert werden.

Extrazelluläre Aminosäuren oder Proteine werden dagegen als sekundäre Stickstoffquelle über die Vermittlung des Liganden-aktivierten Rezeptorsystems (SPS-Sensorkomplex, bestehend aus Csy1p, Ptr3p und Ssy5) und die beiden Transkriptionsfaktoren Stp1p und Stp2p in die Zelle aufgenommen. Der SPS-Sensor besteht in *C. albicans* aus 12 Transmembrandomänen des Csy1p, das nach der Anbindung von Liganden (AS, Protein) durch die proteolytische Spaltung des negativen Regulationsmotivs am N-terminalen Ende die Migration der beiden Transkriptionsfaktoren in den Zellkern bewirkt (**Abbildung 4B**) [Forsberg, H *et al.* 2001; Martinez, P and Ljungdahl, PO 2005]. Das prozessierte Stp1 aktiviert die Expression von Genen,

die für die katabolische Verwertung von extrazellulären Proteinen notwendig sind [Martinez, P and Ljungdahl, PO 2005; Cottier, F and Muhlschlegel, FA 2009]. Dies sind Gene, die für die sekretorische Aspartylproteinase Sap2p oder die Oligopeptidtransporter Opt1p und Opt3 kodieren. Die Aktivierung des Transkriptionsfaktors Stp2p führt dagegen zur Expression von Genen für die Aminosäurenpermeasen AAP (*amino acids permeases*, wie Can2p, Gap2p und Gap1p) [Martinez, P and Ljungdahl, PO 2005].

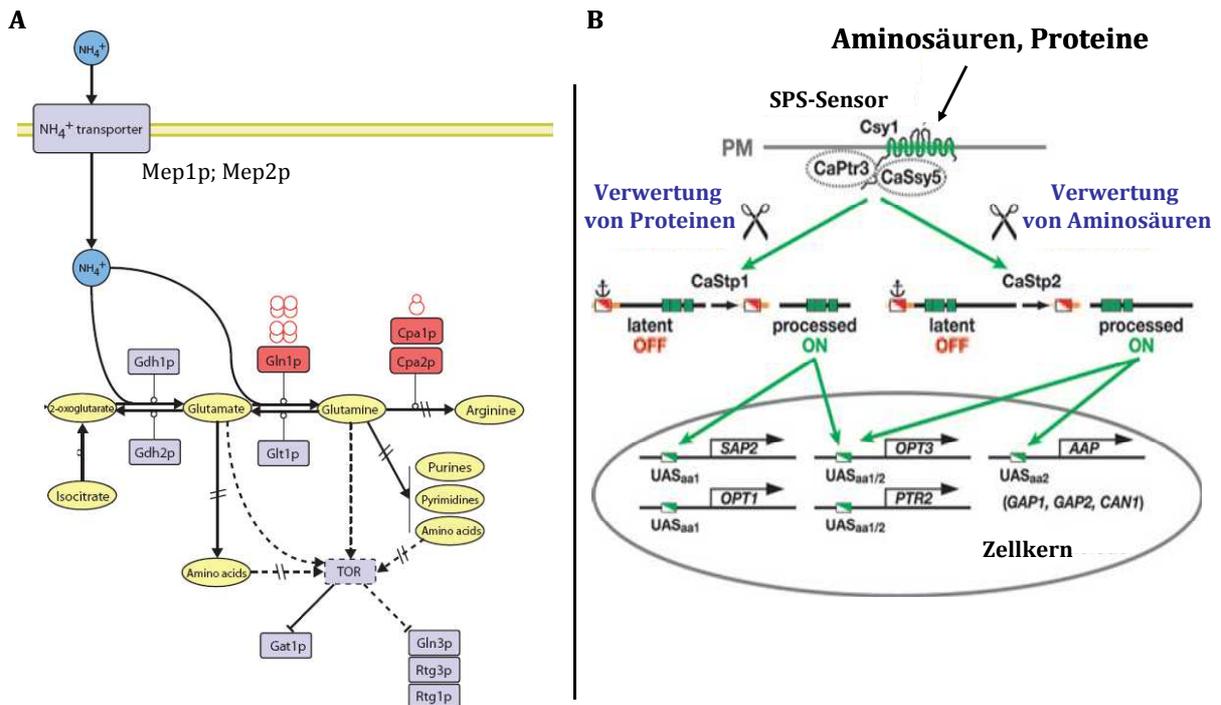


Abbildung 4: Verwertung von primärer oder sekundärer Stickstoffquelle in *Candida albicans*.

Schematische Übersicht über die beiden Stoffwechselprozesse innerhalb der Zelle, die entweder die Verwertung der primären Stickstoffquelle (Ammonium, Glutamat, Glutamin) oder der sekundären Stickstoffquelle (Proteine, Aminosäuren, Purine usw.) regulieren. Die Aufnahme von Ammonium erfolgt über spezielle Permeasen (Mep1p, Mep2p) und ihr Einbau in die beiden Stoffwechselprodukte α -Ketoglutarat und Glutamat. Abb. nach [Castrillo, JI *et al.* 2007] **(A)**.

Die Aufnahme von sekundären Stickstoffverbindungen erfolgt über das SPS-Sensorsystem. Nach der Bindung des Liganden an den SPS-Komplex erfolgt im Zytosol die proteolytische Spaltung der beiden Transkriptionsfaktoren Stp1p und Stp2p. Diese wandern in den Zellkern und aktivieren die Genexpression von sekretorischen Aspartylproteinasen und Oligopeptidtransporter für die Verwertung von Proteinen (Stp1p) sowie die Verwertung von Aminosäuren durch die induzierte Expression von Aminosäurepermeasen AAP (Stp2p). Abb. nach [Martinez, P and Ljungdahl, PO 2005] **(B)**.

Bisher ist nicht bekannt, wie der Stickstoffmetabolismus in *C. dubliniensis* reguliert wird. Ein Homologievergleich von verschiedenen stickstoffabhängigen Genen (*STP1*, *STP2*, *MEP2*, *MEP1*) in *C. albicans* zeigt, dass homologe Gensequenzen auch in *C. dubliniensis* vorliegen, die hoch konserviert sind. *C. dubliniensis* scheint sogar mehrere Mep2p aufzuweisen.

II.4 Morphogenese

Ein charakteristisches Merkmal von *Candida albicans* ist seine Fähigkeit verschiedene morphologische Zellformen anzunehmen, die es dem Pilz erlauben, unterschiedliche zelluläre Funktionen zu erfüllen. Aufgrund dieses breiten Spektrums an morphologischer Variabilität, kann *C. albicans* als „polymorph“ oder „pleomorph“ angesehen werden [Cutler, JE 1991; Sudbery, P *et al.* 2004; Sudbery, P 2007]. Zu den ausgebildeten, natürlichen Zellformen zählen neben den einzelligen, sphärischen Blastosporen, die sich durch Sprossung teilen, auch filamentöse Formen wie Pseudohyphen oder echte Hyphen (**Abbildung 5**). Die Ausbildung der Pseudohyphen erfolgt durch eine polarisierte Zellteilung, in dem sich die teilenden Hefezellen (Tochterzellen) elongieren, ohne sich nach der Zytokinese von der benachbarten Mutterzelle abzulösen. Unter bestimmten Bedingungen können Hefezellen zur Ausbildung von echten Hyphen angeregt werden, wobei sich zuerst Keimschläuche (germ tubes) entwickeln, die sich durch apikales Wachstum verlängern. Nach der Zellkernteilung erfolgt nur die Septenausbildung, die die einzelnen Zellkerne einer Zelle voneinander trennen [Timpel, C *et al.* 2000]. Weitere vorkommende Zellformen von *C. albicans* sind die *opaque*-Zellen, die charakteristische paarungskompetente Zellen darstellen, sowie Chlamydosporen, die sphärischen, stark lichtbrechenden, dickwandigen Zellformen entsprechen. Diese werden meistens unter suboptimalen Wachstumsbedingungen aus einer Suspensorzelle gebildet, wobei ihre Funktion bis heute nicht aufgeklärt ist [Fabry, W *et al.* 2003; Sudbery, P 2007; Whiteway, M and Bachewich, C 2007].

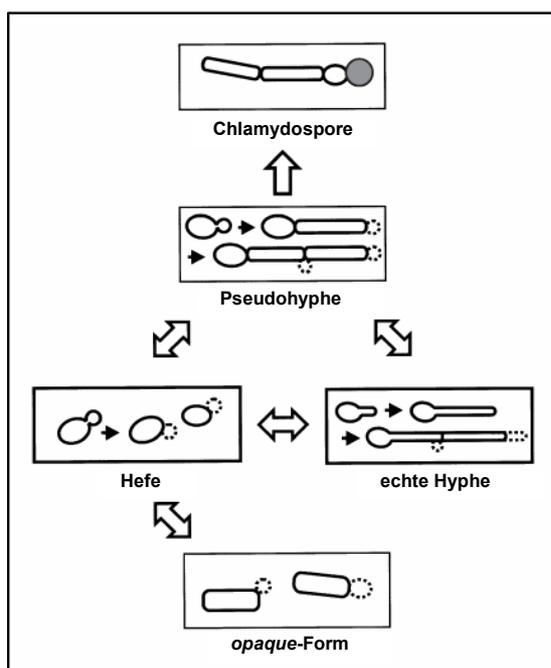


Abbildung 5: Vorkommende morphologische Formen von *Candida albicans*.

Abb. verändert nach Ernst, 2000 [Ernst, JF 2000]

Dieser Fähigkeit zum schnellen, reversiblen Morphologiewechsel wird dabei eine wichtige Bedeutung für die Virulenz von *C. albicans* zugeschrieben [Whiteway, M and Oberholzer, U 2004]. Die einzellige Hefeform erlaubt eine schnelle Proliferation und Ausbreitung des Erregers über die Blutbahn, während filamentöse Zellformen sowohl die Adhäsion an sowie die mechanische Invasion ins Wirtsgewebe ermöglichen. Hyphale Zellen sind außerdem in der Lage, Epithel- oder Endothelzellen nach der Endozytose sowie die Immunzellen des Wirtes (z. B. Neutrophile oder Makrophagen) nach der Phagozytose zu zerstören [Kumamoto, CA and Vincles, MD 2005]. Außerdem induzieren hyphale Zellen durch die spezifische Expression von Zelloberflächenmolekülen die eigene Endozytose durch die Wirtszellen, die normalerweise keine endozytotische Fähigkeiten besitzen [Filler, SG *et al.* 1995; Park, H *et al.* 2005].

Auch der phänotypische Wechsel von der physiologischen *white*- zur paarungskompetenten *opaque*-Zellform hat einen Einfluss auf die Virulenz des Pilzes. So unterscheiden sich beide Zellformen in ihrer Wechselwirkung mit dem Wirt, wobei die *white*-Zellen im Vergleich zu *opaque*-Zellen virulenter im systemischen Mausinfektionsmodell sind, *opaque*-Zellen jedoch geeigneter für die Infektion des murinen Hautmodells erscheinen [Kvaal, CA *et al.* 1997; Kvaal, C *et al.* 1999]. Mit diesem Wechsel ist auch die Änderung verschiedener Virulenzattribute von *C. albicans* wie z.B. die Expression von Adhäsinen oder von Sap-Proteinen sowie der Fähigkeit zur Hyphenausbildung assoziiert [Lockhart, SR *et al.* 2002]. Desweiteren stellt der *white-opaque* Wechsel eine zusätzliche phänotypische Variabilität des Pilzes dar und verleiht der Hefe die Fähigkeit zur Paarung, wodurch es den Zellen ermöglicht wird, eine sehr breite genetische Diversität innerhalb des Wirtes zu erreichen. Alle diese beschriebenen Faktoren tragen dazu bei, dass *C. albicans* sich in den unterschiedlichen Umgebungen erfolgreich adaptieren kann.

Die Fähigkeit zur Hyphen- und Chlamyosporenausbildung wurde bis zur Identifizierung von *C. dubliniensis* als das Alleinstellungsmerkmal von *C. albicans* angesehen, was häufig zur Missidentifikation von *C. albicans* und *C. dubliniensis* führte [Coleman, DC *et al.* 1997].

i) Faktoren zur Induktion der morphogenetischer Transition

Die schnelle, reversible, morphologische Transition repräsentiert meistens eine Antwort des Pilzes auf wechselnde Wachstumsbedingungen und ermöglichen so die schnelle Adaptation an diverse biologische Nischen und Laborbedingungen. Während das hefeförmige Wachstum bei 30°C in Vollmedium vorherrschend ist, lässt sich bereits durch eine Erhöhung der Temperatur auf 37°C, was der normalen Körpertemperatur des Menschen entspricht, ein pseudohyphales Wachstum induzieren. Induktoren des hyphalen Wachstums sind Serum in einer Konzentration von 5-20% (wobei Albumin als Hauptbestandteil des Serums nicht als Auslöser fungiert), N-Acetylglucosamin (GlcNAc), Prolin, Nährstoffmangel, CO₂, sowie bestimmte exogene Hormone des Menschen, wie Östradiol und Progesteron [Shepherd, MG *et al.* 1980; Kinsman, OS *et al.* 1988; Brown, AJ and Gow, NA 1999; Ernst, JF 2000], **(Abbildung 6)**. Auch der extrazelluläre pH-Wert spielt ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Induktion der Morphogenese. So wächst *C. albicans* unter sauren bis neutralen pH-Bedingungen in der Hefeform und induziert Hyphenausbildung im alkalischen Medium [Buffo, J *et al.* 1984; Davis, D 2003].

ii) Regulation der Morphogenese

Die Morphogenese wird in *C. albicans* durch mehrere parallel verlaufende Signalwege reguliert, die entweder einzeln oder in Kombination miteinander interagieren und die Weitergabe des äußeren Stimulus an der Plasmamembran zum Zellkern vermitteln **(Abbildung 6)**.

Ein wichtiger Signalweg, der in der Filamentierung des Pilzes eine wichtige Rolle spielt, ist die MAPK („mitogen-activated protein kinase“)-Kaskade. Im Allgemeinen sind MAP-Kinasen, die eine Anpassung der Zelle an sich verändernde Umweltbedingungen durch die Vermittlung externer Signale an die Transkriptionsmaschinerie des Zellkerns ermöglichen, in den Eukaryonten stark konserviert. Die Hauptkomponente des MAP-Kinase Signalwegs ist ein Modul dreier Kinasen, die sich infolge eines stimulierenden Signals in einer Phosphorylierungskaskade nacheinander aktivieren. Die letzte MAP-Kinase vermittelt das Signal in der Regel an Transkriptionsfaktoren, die für die adaptive Zellantwort spezifische Gene induzieren. MAP-Kinase-Signalwege sind in *C. albicans* neben der Morphogenese an verschiedensten Prozessen wie z. B. Adaptation an osmotischen oder oxidativen Stress, Zellwandbiogenese und -reparatur, Zellintegrität sowie Paarung beteiligt. Dabei unterscheiden sich die Signalwege der unterschiedlichen Prozesse in der Identität der jeweils aktivierten MAP-Kinasen und den jeweiligen Transkriptionsfaktoren. So reguliert z. B. der Cek1-Signalweg mit den entsprechenden Kinasen (Cst20p, Ste11, Hst7 und Cek1p) über den Transkriptionsfaktors Cph1p den Übergang von der Blastospore zu hyphalen Zellformen [Kohler, JR and Fink, GR 1996; Roman, E *et al.* 2007].

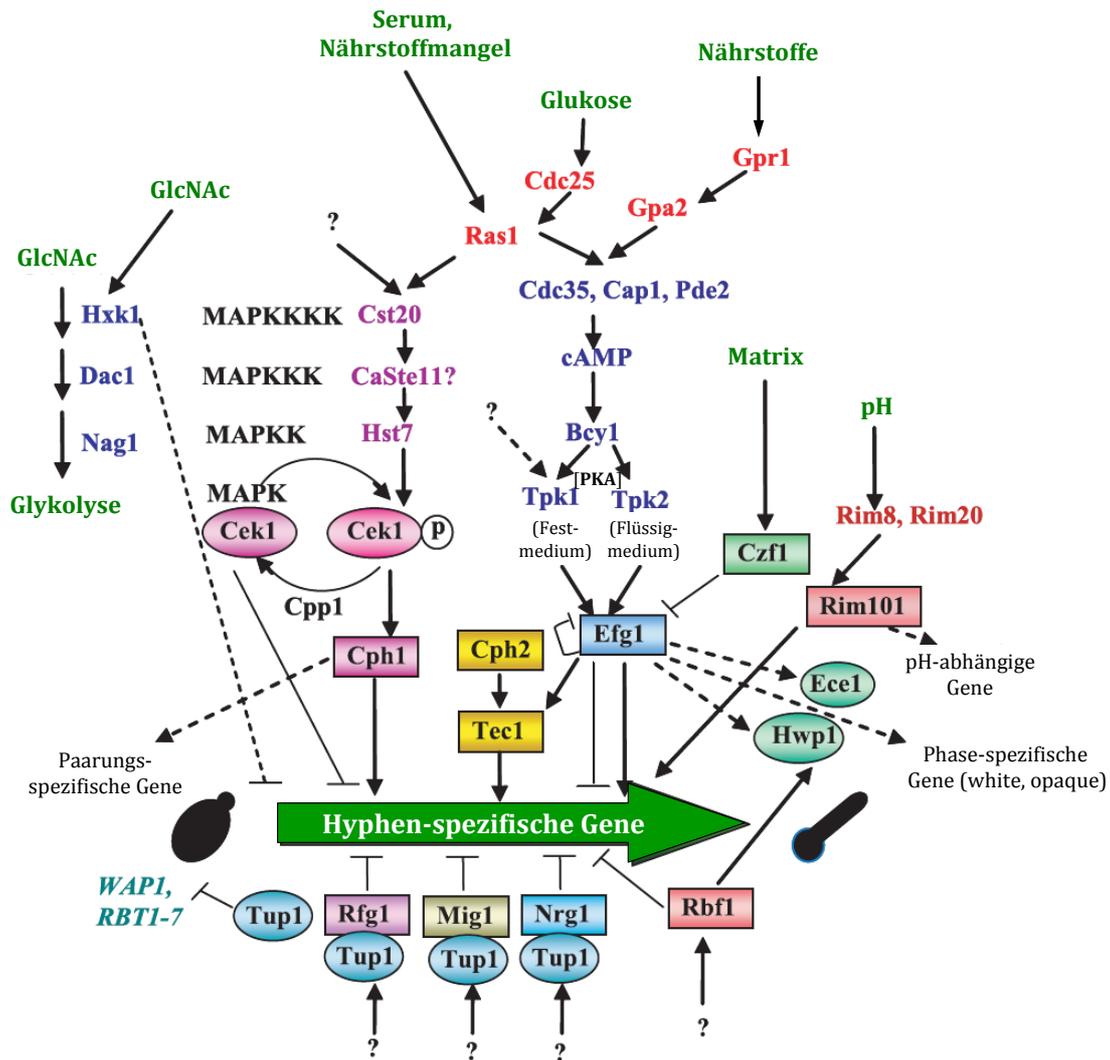


Abbildung 6: Induktion und Regulation morphogenetischer Prozesse in *Candida albicans* durch unterschiedliche Umweltsignale und Signaltransduktionswege.

Der Cph1p-vermittelte MAP-Kinase- sowie der Efg1p-vermittelte cAMP-Proteinkinase A-Signaltransduktionsweg wirken je nach Induktor entweder einzeln oder parallel, was zur Hyphenausbildung und Virulenz von *C. albicans* beiträgt. Beide Signalwege können durch das Ras1p aktiviert werden. Verändert nach Biswas S. *et al.*, 2007 [Biswas, S *et al.* 2007]

Der zweite wichtige Signalweg für die Regulation der Hyphenausbildung in *C. albicans* sowie der Filamentierung in anderen Pilzen (*Saccharomyces*, *Aspergillus*) ist eine in Abhängigkeit des intrazellulären cAMP-Spiegels aktivierte Proteinkinase A (PKA)- Signaltransduktionskaskade [Sabie, FT and Gadd, GM 1992; Lengeler, KB *et al.* 2000]. Nach der Bindung des extrazellulären Signalmoleküls an den entsprechenden, spezifischen G-Protein-gekoppelten Rezeptorsystem wird über die Aktivierung des G-Proteins Ras1p und der Adenylatcyclase (Cdc35p/Cap1p/Pde2p) der intrazelluläre cAMP-Spiegel reguliert. cAMP bindet anschließend an die regulatorische Untereinheit Bcy1p des Proteinkinase A-Komplexes, die darauf von den beiden katalytischen Untereinheiten Tpk1p und Tpk2p dissoziiert [Cassola, A *et al.* 2004]. Diese beiden

Isoformen nehmen in *C. albicans* unterschiedliche Funktionen wahr. So reguliert Tpk1p die Hyphenausbildung auf Festmedien, während Tpk2 die Filamentierung in Flüssigkulturen induziert [Sonneborn, A *et al.* 2000; Bockmuhl, DP *et al.* 2001]. Beide Proteinkinasen regulieren in *C. albicans* die Aktivität des Transkriptionsfaktors der APSES-Proteinfamilie Efg1p, der je nach vorherrschender Umweltbedingung Zielgene für die Induktion der Morphogenese (Hefe-Hyphe-Transition, Chlamydosporenausbildung, *white-opaque* Wechsel), den Kohlenhydrat-metabolismus sowie die Proteine der Zellwand aktivieren oder reprimieren kann [Lo, HJ *et al.* 1997; Stoldt, VR *et al.* 1997; Sohn, K *et al.* 2003; Doedt, T *et al.* 2004; Setiadi, ER *et al.* 2006].

Obwohl der cAMP-Proteinkinase A und der Cek1p-vermittelte MAP-Kinase-Signalweg in der Zelle – je nach Wachstumsbedingung – entweder einzeln oder parallel zur Hyphenausbildung und u. a. zur Virulenz des Pilzes beitragen, existieren weitere Signalwege, die insbesondere während der *in vivo* Infektion für den Filamentierungsprozess entscheidend sind. So konnte durch die Deletion der beiden Downstreamfaktoren Cph1p und Efg1p unter allen *in vitro*-Bedingungen ein Verlust der Filamentierungsfähigkeit und Avirulenz im systemischen Infektionsmodell festgestellt werden, wobei neuere Erkenntnisse mit diesen Stämmen *in vivo* dennoch lokalisierte Infektionen und filamentöses Wachstum zeigen konnten [Riggle, PJ *et al.* 1999; Chen, CG *et al.* 2006]. Eines dieser Efg1- und Cph1p-unabhängiger Signalwege kann z.B. die morphologische Anpassung an den extrazellulären pH-Wert über den Transkriptionsfaktor Rim101p sein [Davis, D *et al.* 2000; Davis, D *et al.* 2000].

iii) Die APSES-Proteinfamilie und das Efg1-Protein

Zelluläre, reversible Differenzierungsprozesse wie Paarungsverhalten, asexuelle Sporulation, dimorphisches Wachstum werden in Ascomyceten durch eine konservierte Klasse von Transkriptionsfaktoren reguliert, die zu den sog. APSES-Proteinen gezählt werden [Ramirez-Zavala, B and Dominguez, A 2008]. Mitglieder dieser Familie besitzen eine charakteristische DNA-Bindedomäne, die eine sog. basischen Helix-Loop-Helix (bHLH)- Domäne aufweist. Obwohl das bHLH-Motif auch in anderen eukaryotischen Proteinen wie Myc und Max gefunden werden kann, ist die APSES-Domäne nur auf Pilze beschränkt [Dutton, JR *et al.* 1997]. Es wird angenommen, dass sich die APSES-Domäne früh in der Evolution der Pilze von einem viralen Vorläufer aufgenommen worden ist, der die Wirtszelle infizierte. So ist die Domäne zwar verkürzt, zeigt jedoch signifikante Aminosäurehomologie zu der viralen Kila-N -Domäne, die durchgehend sowohl in bakteriellen wie eukaryotischen DNA-Viren verbreitet ist [Iyer, LM *et al.* 2002].

Die APSES-Proteinfamilie zeigt außerdem Homologien mit bHLH-Domäne der pilzlichen Transkriptionsfaktoren Swi4p und Mbp1p, die in der Zellzyklusregulation involviert sind [Dutton, JR *et al.* 1997].

In Ascomyceten gelten APSES-Proteine als Schlüsselregulatoren der pilzlichen Entwicklung. Sie kontrollieren u. a. auch die transkriptionelle Expression einiger Virulenzfaktoren. Die ursprünglich beschriebene Mitglieder (APSES: Asm1p, Phd1p, Sok2p, Efg1p und StuAp) wurden für die Charakterisierung dieser Proteingruppe verwendet. Sie fungieren als Regulatoren von Entwicklungsprozessen in ihrer jeweiligen Spezies [Miller, KY *et al.* 1992; Gimeno, CJ and Fink, GR 1994; Ward, MP *et al.* 1995; Aramayo, R *et al.* 1996; Stoldt, VR *et al.* 1997]. In *Neurospora crassa*, ist das Asm1p für die Sporenkeimung, myceliales Wachstum sowie die sexuelle wie auch asexuelle Sporulation notwendig [Aramayo, R *et al.* 1996]. Auch das StuAp von *Aspergillus nidulans* reguliert die Ausbildung von Strukturen und Zelltypen, die sowohl sexuelle wie asexuelle Reproduktion fördern. APSES-Proteine von Hemiascomyceten regulieren die morphologische Transition von der sphärischen zur elongierten Zellform. So erfolgt in der Bäckerhefe *S. cerevisiae* die Regulation des pseudohyphalen Wachstums über die beiden Proteine Phd1p und Sok2p. Beide Proteine haben einen antagonistischen Effekt auf das pseudohyphale Wachstumsverhalten. Während die Expression von Phd1p die Ausbildung von Pseudohyphen verstärkt, reprimiert die Expression von Sok2p die pseudohyphale Entwicklung Spezies [Miller, KY *et al.* 1992; Gimeno, CJ and Fink, GR 1994; Ward, MP *et al.* 1995; Aramayo, R *et al.* 1996; Stoldt, VR *et al.* 1997]. Auch *C. albicans* enthält zwei APSES-Proteine: Efg1p und Efh1p. Das Efg1 reguliert die Hefe-Hyphe-Transition, die phänotypische Transition von der physiologischen *white* zur Paarungskompetenten *opaque*-Zellform, wie auch Ausbildung von Chlamydosporen, die Proteinzusammensetzung der Zellwand, den Kohlenhydratmetabolismus sowie die Resistenz gegen diverse Wirkstoffe [Lo, HJ *et al.* 1997; Sohn, K *et al.* 2003], während unter bestimmten Bedingungen das Efh1p als Hilfsfaktor (auxiliary factor) agiert [Doedt, T *et al.* 2004].

Inwieweit APSES-Proteine auch in *C. dubliniensis* konserviert sind und welchen Einfluss sie auf die Induktion morphogenetischer Prozesse aufweisen, sollte im Rahmen dieser Arbeit analysiert werden.

III. Zielsetzung der Arbeit

Berücksichtigt man alle beschriebene Faktoren scheint - im Vergleich zu *C. dubliniensis* - *C. albicans* offensichtlich deutlich besser an die Anforderungen für eine Besiedlung des menschlichen Körpers angepasst zu sein und das obwohl beide Pilze eine sehr enge phylogenetische Verwandtschaft und ähnliche phänotypische Eigenschaften (wie z. B. die Morphogenese) aufweisen.

Ziel dieser Arbeit war es durch die Etablierung und Anwendung einer neuen Technologie für vergleichende Genexpressionsanalysen die Gemeinsamkeiten und Unterschiede in der transkriptioneller Antwort von *C. albicans* und *C. dubliniensis* während der morphologischen Transition von der sphärischen zur filamentösen Zellform herauszufinden. Dadurch sollten zentrale Regulationsfaktoren der Morphogenese (APSES-Proteine) in *C. dubliniensis* identifiziert und mit Hilfe von molekularbiologischen Methoden funktionell charakterisiert werden. Ferner sollten durch vergleichende Analysen dieser Regulationsfaktoren die Gemeinsamkeiten und Unterschiede beider humanpathogener Pilze z. B. bezüglich ihrer transkriptionellen Expression, ihrer Fähigkeit zur Induktion morphogenetischer Prozesse sowie ihrer Beteiligung am Metabolismus herausgearbeitet werden.

MATERIAL UND METHODEN

I. MATERIAL

I.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Chemikalien und Verbrauchsmaterialien wurden - wenn nicht anders vermerkt - von folgenden Firmen bezogen: Bio-Rad Laboratories GmbH, München; Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf; Carl Roth, Karlsruhe; Fermentas GmbH, St.Leon-Rot; Invitrogen (Molecular Probes, Gibco), Karlsruhe; New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main; Qiagen GmbH, Hilden; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen; Takara Bio Europe (Clontech), Saint-Germain-en-Laye, Frankreich; Th. Geyer GmbH & Co KG, Renningen, VWR International GmbH (Merck, Fluka), Darmstadt.

Bei Verbrauchsmaterialien oder Chemikalien, die für den Versuch wichtig waren, wurde die genaue Herkunftsangabe beim entsprechenden Protokoll angegeben.

I.2 Enzyme

Tabelle 1: Verwendete Enzyme.

Enzym	Firma/Referenz
Antarktische Phosphatase, Phusion High Fidelity DNA Polymerase Restriktionsendonukleasen, T4-DNA-Ligase	New England Biolabs, Frankfurt am Main
RNaseA	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Prime Script Reverse Transkriptase Advantage®2 Polymerase Mix	Takara Bio Europe (Clontech), Saint-Germain-en-Laye, Frankreich
Platinum® <i>Taq</i> DNA Polymerase	Invitrogen, Karlsruhe
<i>Taq</i> DNA Polymerase ¹	L. Schalwyk, ICRF, London

¹ *Taq* DNA Polymerase wurde nach Pluthero *et al.* isoliert [Pluthero, FG 1993].

I.3 Antibiotika und Antimycotika

Tabelle 2: Verwendete Antibiotika oder Antimycotica.

Substanz	Arbeitskonzentration	Firma/Referenz
Chloramphenicol	50 µg/ml	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Ampicillin	100 µg/ml	
Doxycyclinhyclat	40-50 µg/ml	
Nourseothricin (ClonNat)	200 µg/ml	Werner Bioagents, Jena

I.4 Reaktions-Kitsysteme

Tabelle 3: Verwendete Kit-Systeme.

Kit-System	Firma
LabelStar Kit	
MinElute PCR Purification Kit	
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen GmbH, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	
QIAprep Spin Miniprep Kit	
RNeasy® Mini /Midi Kit	
RNA 6000 Nano Kit	Agilent Technologies, Böblingen
PRIME-IT® II Random Primer Labeling Kit	
Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit	
Universal Probe Library	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Light Cycler 480 Probes Master	

1.5 Pufferlösungen

Die Herstellung von Puffer- und Stammlösungen erfolgte nach Standardprotokollen von Ausubel und Sambrook *et al.* [Ausubel, FM *et al.* 1989; Sambrook, J *et al.* 1989]. Alle Lösungen und Medien wurden mit doppelt-deionisiertem Wasser angesetzt. Die Sterilisation erfolgte durch das Autoklavieren oder die Sterilfiltration mit einen 0,22 µm -Filter.

Tabelle 4: Verwendete Pufferlösungen.

Puffer	Bestandteile	Konzentration
PBS-Puffer, pH 7,4	NaCl	140 mM
	KCl	3 mM
	Na ₂ HPO ₄	10 mM
	KH ₂ PO ₄	1,8 mM
SSC-Puffer (20x), pH 7,0	NaCl	3 M
	tri-Natriumcitrat-Dihydrat	300 mM
TAE-Puffer (50x)	Tris	2 M
	Eisessig	2 M
	EDTA	50 mM
6-fach DNA Ladepuffer	Bromphenolblau	0,25 % (w/v)
	Xylencyanol	0,25 % (w/v)
	Glycerin	30 % (v/v)

I.6 Kulturmedien

Tabelle 5: Verwendete Kulturmedien für Bakterien und Hefen.

Medium	Bestandteile	Konzentration
LB (Lysogeny Broth), pH 7,0 (Vollmedium für Bakterien)	Hefeextrakt	5 g/l
	Bacto Trypton	10 g/l
	NaCl	5 g/l
YPD (Vollmedium für Hefen)	Hefeextrakt	10 g/l
	Bacto Pepton (Difco)	20 g/l
	Glukose	20 g/l
YPM (Vollmedium mit Maltose zur Deletion der Integrationskassette)	Hefeextrakt	10 g/l
	Bacto Pepton (Difco)	20 g/l
	Maltose	20 g/l
YPD + 10% FCS (Vollmedium supplem. mit 10 % FCS)	Hefeextrakt	10 g/l
	Bacto Pepton (Difco)	20 g/l
	Glukose	20 g/l
	fötale Kälberserum (FCS)	10% (v/v)
ddH ₂ O + 10% FCS	fötale Kälberserum (FCS)	10% (v/v)
	Glukose	20 g/l
	ddH ₂ O	
YCB+BSA, pH 4,0	Hefe-Kohlenstoff-Basis (YCB), BD	23,4 g/l
	Rinderserumalbumin (BSA)	4,0 g/l

Medium	Bestandteile	Konzentration
YCB+BSA+Hefeextrakt, pH 4,0 [Wu, T <i>et al.</i> 1999]	Hefe-Kohlenstoff-Basis (YCB), Becton Dickinson Hefeextrakt Rinderserumalbumin (BSA)	23,4 g/l 2,0 g/l 4,0 g/l
YCB+NH ₄ Cl, pH 4,0	Hefe-Kohlenstoff-Basis (YCB), BD Ammoniumchlorid	23,4 g/l 12,5 g/l
YCB+BSA+NH ₄ Cl, pH 4,0	Hefe-Kohlenstoff-Basis (YCB), BD Rinderserumalbumin (BSA) Ammoniumchlorid	23,4 g/l 4,0 g/l 12,5 g/l
SSH-Medium, pH 5,5 (<i>Sunflower Seed Husk Medium</i>) [Khan, ZU <i>et al.</i> 2005]	zerkleinerte Sonnenblumensamenhülsen (in ddH ₂ O 30 min kochen, filtrieren) Glukose ddH ₂ O	25 g/l 10 g/l
SSH-Agar, pH 5,5 (<i>Sunflower Seed Husk Agar</i>) [Khan, ZU <i>et al.</i> 2005]	zerkleinerte Sonnenblumensamenhülsen in ddH ₂ O 30 min kochen, filtrieren Glukose Agar (Difco)	25 g/l 10 g/l 1,4 %
Staub-Medium, pH 5,5 [Staub, P and Morschhauser, J 1999]	pulverisierte <i>Guizotia abyssinica</i> -Samen (Vivara Naturschutzprodukte, Ratingen) in ddH ₂ O 30 min kochen, filtrieren Glukose KH ₂ PO ₄ Kreatinin Agar (Difco)	50 g/l 1 g/l 1 g/l 1 g/l 1,4 %

ii) Herstellung von Agarplatten

Falls nicht anders angegeben, wurden alle Medien in 2-facher Konzentration angesetzt und je nach Verwendungszweck entweder mit ddH₂O oder mit 4% Bacto-Agar auf die einfache Konzentration verdünnt (Endkonz. Agar: 2%).

I.7 Oligonukleotide

Bis auf Oligonukleotide für qRT-PCR wurden alle Oligonukleotide von der Firma Thermo Scientific Biopolymers, Ulm oder von der Firma MWG Biotech AG, Ebersberg bezogen. Längere Oligonukleotide ab 40 bp wurden über PAGE, die restlichen entweder nur entsalzt (MWG) oder über RP-HPLC (Thermo Scientific) aufgereinigt. Oligonukleotide für qRT-PCR wurden von der Firma TIB Molbiol, Berlin im Maßstab von 0,01 µmol synthetisiert und über HPLC aufgereinigt.

Tabelle 6: Oligonukleotide für die Herstellung der Stämme.

Zusammenstellung der verwendeten Oligonukleotide für die Deletion und Reintegration von *MOM1*, für die heterologe Expression von *EFG1* (entweder nur als ORF oder zusammen mit Promotor) in *Candida dubliniensis*, die ektopische Expression von *MOM1*, *EFG1* oder *MEP2* unter Doxycyclin-induzierbarem *TET*-Promotor, sowie für die konstitutive Expression von *MEP2* unter *ACT1*-Promotor in *Candida albicans*.

Fragment	Oligonukleotid	Basensequenz (5'---> 3')	Produkt (nt)
<i>MOM1-Deletion / -Reintegration in Candida dubliniensis</i>			
FR1	FR1_for_KpnI	GGGGT <u>ACCC</u> CATTACATCCAGCCCATCCTG	423
	FR1_rev_XhoI	CCGCTCGAGCAAGTATTGTGGGAGGCAAAA	
FR2	FR2_for_NotI	ATAAGAATGCGGGCCGCCCCCAATCCATTGACATAA	426
	FR2_rev_SacII	TCCCGCGGGATTTTGTGTTGTACCTTCCGCATT	
FR3	FR3_for_KpnI	GGGGT <u>ACCC</u> CCCAAACCTTTGCAAGGAAAA	455
	FR3_rev_XhoI	CCGCTCGAGGAAGCAAGGGGTGAATGAGA	
FR1-MOM1	FR1_for_KpnI	GGGGT <u>ACCC</u> CATTACATCCAGCCCATCCTG	2251
	Rev_MOM1_XhoI	CCGCTCGAGACCAGTGGACGAGAACAAGG	
<i>Heterologe Expression von EFG1 in mom1Δ-Deletionsstämmen</i>			
MOM1Pr-FR4	HE_FR4_KasI_KpnI	GGGGT <u>ACCAT</u> CAGGCGCCATTACATCCAGCCCATCCTG	572
	HE_FR4_rev_ApaI	GCTCGGGCCCTAATGTGGGTTATATTCTGGGTAGTC	
HE_EFG1	HE_EFG1_for_ApaI	GCTCGGGCCCATGTCAACGTATTCTATACCCTATTACAATC	1658
	HE_EFG1_rev_ApaI	GCTCGGGCCCTTACTTTTCTTCTTTGGCAACAGTG	
HE_EFG1_ges	EFG1pr_65nt	GGGGT <u>ACCTGTTGCAACGAGGATGGTCCAACAAGATTCAAAAAA</u>	6260
	MOM1_KpnI_for	AAAGGAAAAAAGGGAATTTCTTACAATATGAGAACACCGCTTTTGGTTG	
	EFG1_ApaI_rev	GCTCGGGCCCATGGCAGAAAGCAGAAGGTG	
<i>Ektopische Expression von MOM1, EFG1 oder MEP2 unter Tet -Promotor in Candida albicans</i>			
EFG1-SalI-BamHI	EFG1/MOM1_SalI_for	AAATGTCGACAATGTCAACGTATTCTATACCCTATTACAATC	1678
	EFG1_BamHI_rev	TCGCGGATCCTTACTTTTCTTCTTTGGCAACAGTG	
MOM1-SalI-BglII	EFG1/MOM1_SalI_for	AAATGTCGACAATGTCAACGTATTCTATACCCTATTACAATC	1655
	MOM1_BglII_rev	AGGAAGATCTTACTGCTTTTCTTCTTACTAGCGT	
MEP2-XhoI-BglII	MEP2_XhoI_for	CCGCTCGAGTATGTCTGGAAATTTCACTGGAAC	1462
	MEP2_BglII_rev	AGGAAGATCTTAATTTTTAGCTTCTCCTGAGTCG	
<i>Expression von MEP2 unter Act1-Promotor in Candida albicans</i>			
ActPr_MEP2_ÜH	ActPr500 for KpnI	GGGGT <u>ACCG</u> CGTCAAAACTAGAGAATAATAAAGAAAAC	507
	ActPr500_rev_MEP2_ÜH	<u>CCTGTGCCTGTTCAGTGAAATTTCCAGACATTTTGAATGATTA</u> TATTTTTTTAATATTAATATCG	
MEP2_ohne_Tag	MEP2_for	ATGTCTGGAAATTTCACTGGAAC	1443
	MEP2_ohne Tag_rev_XhoI	CCGCTCGAGTTAATTTTTAGCTTCTCCTGAGTCGT	
ActT/3'FR	ActT/3'FR for NotI	ATAAGAATGCGGGCCGCGAGTGAAATTTCTGGAAATCTGG	642
	ActT/3'FR rev SacII	TCCCGCGGGCAACAACAATTTCAATCCATCAA	

Anmerkung:

Unterstrichen- Erkennungssequenz für die jeweilige Restriktionsendonuklease; Kursiv – 65 nt lange Sequenz von *MOM1*, die zur spezifischen Integration der Kassette in den *MOM1*-Genomlokalus gebraucht wird; Kursiv und unterstrichen: *MEP2*-Überhang (*MEP2*-ÜH) für die Fusions-PCR.

Tabelle 7: Oligonukleotide für Nachweis und Sequenzierung

Zusammenstellung der Oligonukleotide für die Sequenzierung oder den Nachweis der richtigen Integration der pNIM6- und der SAT1-Flipper-Kassette während der MOM1-Deletion sowie MOM1, EFG1 und MEP2- Integration.

Oligonukleotid	Anmerkung	Basensequenz (5'---> 3')	T _m (°C)
Sequenzierung oder Nachweis des EFG1 und MOM1-ORFs			
EFG1_Seq_for 1	EFG1-ORF, Start bei +434	CCCCATACCTTCCAATTCT	60,01
MOM1_Seq_for1	MOM1-ORF, Start bei +342	ACAACCACAACCACAGCATT	58,91
EFG1_Seq_for 2	EFG1-ORF, Start bei +892; 100%-Homol. in MOM1 (+862)	CCTTTGTTTGTCTCAGAGATATTAACG	59,55
MOM1_Seq_for3	MOM1-ORF, Start bei +1234	TCACAACAAGGCTCTGCAAC	60,03
EFG1_Seq_rev 1	EFG1-ORF, Start bei +616; rev.	CTCGTGGTCTGATTCTGGT	60,11
MOM1_Seq_rev1	MOM1-ORF, Start bei +508; rev.	TTGGTTGTTGCATTGTTCGAT	59,97
EFG1_Seq_rev 2	EFG1-ORF, Start bei +1000; rev.	GAGGAGCCGAAGCAGAAGT	57,69
MOM1_Seq_rev2	MOM1-ORF, Start bei +1022; rev.	CCACCAGTGATTTTGGGAGT	59,82
Promotor-spezifische Oligonukleotide			
MOM_spez_up		CACCGCCTTCTTGGATAAAAC	60,84
MOM1Pr_sp_1_for		CCCATCAACTTGACGAACAAA	60,91
EFG1Pr_sp_1_rev		TAGGGTAATGAAACCTTTTTCACA	59,00
EFG1Pr_sp_2_rev		TGAATTTTGCTTGAGTTCCAAA	59,74
EFG1Pr_sp_3_rev		CACCACTGAACACAAACCTACAA	59,98
EFG1Pr_sp_4_rev		TGTGGTGAAGTAAACAAAACC	60,30
EFG1Pr_sp_5_for		TTGTGAGACCTCAAAAACAATCA	59,64
EFG1Pr_sp_6_rev		TTTTCTAAAACTAAACTAACCCAATC	57,05
EFG1Pr_sp_7_for		ATCAAATCTTGTAATCTTGTATACCC	57,37
EFG1Pr_sp_8_rev		AGGGTATAACAAGATTACAAGATTTGA	57,89
Nachweis der Integration im MOM1-Genlokus			
MOM1_upstr_FR3	Pos. -1274 bez. MOM1-Start	TTTAGTTTGGTGGGAGCAAAA	59,61
MOM1_downstr_FR2	Pos. +2267 bez. MOM1-Start	CTGCAGGTATCCCAATGGTT	59,81
MOM1_FR2 unten	Pos. +3344 bez. MOM1-Start	GACGGCATTTTTCTTGAGAT	56,87
Nachweis der richtigen Integration vom MEP2 im ACT1-Genlokus			
ActPr_upstr_for	Pos. -1274 bez. ACT1-Start	GGCAAACCTGAACTTATCTGTG	60,05
ActT_dowstr_rev	Pos. +2498 bez. ACT1-Start	GCGTCGCTGTAACAAAACA	59,92
MEP2_+53_rev	Pos. +53 bez. MEP2-Start; rev.	TCGACTTTGAACACATCTCCAC	60,16
MEP2_+677_rev	Pos. +677 bez. MEP2-Start; rev.	ACAATGGAGGAAACCGAATG	59,79
MEP2_+900_rev	Pos. +900 bez. MEP2-Start; for.	GCTGGTTACGTTCCCGTTTA	60,00
Nachweis der SAT1-Flipper- oder pNIM6-Expressionskassette			
pSFS2_SAT1_for	im SAT1-Gen, 208 bp vor Ende der Kassette	GTGAAGTGTGAAGGGGAGA	60,09
pSFS2_MAL2_rev	im MAL2-Promotor, 280 bp nach Anfang der Kassette; rev.	CGTGGTTTTCAGTGGCTACAA	59,76
pNIM6_TEF3_PCR_for	im TEF3-Promotor 31 nt zum Zielgen; for.	GGGGGAGGGAATGAAAAA	59,66
pNIM6_OP4_rev	im OP4-Promotor 113 nt zum Zielgen; rev.	CAAATCAAATCAACAACTCTTTCA	59,58

Tabelle 8: Oligonukleotide & Sonden für qRT-PCR (für *C. albicans*)

Übersicht der verwendeten Oligonukleotide für quantitativen Nachweis der Transkription ausgewählter Gene von *C. albicans* mit den jeweiligen UPL-Sonden und den entsprechenden Amplifikationseffizienzen (E) der unterschiedlichen qRT-PCR-Ansätze.

	ORF	Name	Oligonukleotid_for	Oligonukleotid_rev	# UPL	E
<i>Candida albicans</i>	orf19.5007	ACT1	aaccaccggtattgtttgg	gcgtaaattggaacaacgtg	9	1,995
	orf19.868	ADAEC	aacctcaccccaattgactg	ctgctgctatggtggttg	119	1,742
	orf19.2355	ALS10	aatcagagagccaccaaac	gcagtggtataggattgagacca	77	1,919
	orf19.1891	APR1	ttgactattggggatttggt	tggttcggaggtagcttcag	162	1,761
	orf19.7284	ASR2	gccactcgcgatgtgaa	tgtttctggataccgtcagc	48	1,917
	orf19.3575	CDC19	actaccattggtgacaagattacc	tcagtggtgaagatcatttcgt	31	1,975
	orf19.1960	CLN3	cagttgaagctaaaacattgcta	tggtctcatacctaatttattctg	150	1,836
	orf19.1187	CPH2	ccaaatatctattccccgtatc	cggttgaccagaagattgtg	9	
	orf19.10201	CPS1	ggttctgataaatctttaaaccag	cttttgaactggaacggtg	136	1,915
	orf19.7561	DEF1	ggtggaccagtaccaccaa	agtactagctctgccaccttg	93	1,852
	orf19.610	EFG1	ccagcaacaattcctaatcaa	ttagatccattgtaatgctgaggt	76	1,729
	orf19.5788	EFT2	ttgcatgctgatgctatcc	actcttctcatggtgggatg	77	1,907
	orf19.395	ENO1	gtaacgtcggtgacgaaggt	ccaaagcttctttggagttt	50	1,815
	orf19.638	FDH1	ggtatcgctgccattgaagt	atcactgcgtgttcagcaac	36	1,930
	orf19.1275	GAT1	acatttctgagaccacatcgaat	ttccccgtgattcaagtta	9	1,954
	orf19.1358	GCN4	gaaccatcaccaaatcgtacc	actttctggactgttaatgatgaag	84	1,990
	orf19.3278	GSY1	cctgccgagtgtagcgttat	atgtaacacccaaatccagaca	119	1,833
	orf19.2023	HGT7	aagaaatggcaactctacgg	aaactgttctcttctggttt	9	1,969
	orf19.9571	HGT8	tatgttttctggtggccttg	gtggggattctggcattcta	119	1,781
	orf19.1614	MEP1	ttattacatgttgatgattcattgga	ccaacaactccggccata	113	1,775
	orf19.5672	MEP2	tggaaattcactggaacagg	tgttcattaaatcgactttgaacac	39	1,957
	orf19.7150	NRG1	tggttgcacgtgtcga	aacgaaggtaacgaagtgttga	86	1,934
	orf19.2765	PGA62	gctgaatctccccagctaa	cggtctttggagtggttct	146	1,946
	orf19.7610	PTP3	ttgccaaccaataacgagaa	agctgatgtagttggttgg	83	1,887
	orf19.1760	RAS1	tgatgatcaacaagtattattggatgt	ttctctatggccagatattctt	120	1,901
	orf19.5636	RBT5	aagaaaccactgctgctgaaa	aagttcagctggtgcagaac	66	1,942
	18S rRNA	RDN18	ccttaacgaggaacaattgga	tacgcttttggagctggaat	66	1,891
	orf19.5305	RHD3	gacagtcccccaatcacc	actggttccagcagccttg	145	1,925
	orf19.6286.2	RPS27	tgtgactctgttctactgttttg	tgaacaacctcagtaatttagc	131	1,955
	orf19.5714	SAP1	ggtgcttcaatcacaagca	cccttgaggaatagaagtcttg	140	1,845
	orf19.3708	SAP2	agatttcagtggtgaaaactcct	tggaaagtttaccttctgacca	48	2,016
	orf19.6001	SAP3	ttcacaaggacatggtataaaga	ggcaaatgttctttgtga	119	2,072
	orf19.5917	STP1	attgaaccattagatgacgagttg	tgatgtgtgagttcttgggtg	77	2,010
	orf19.4961	STP2	atgaaagtcttccaaagatagttc	tcagaatgcagtgagaatca	78	1,986
	orf19.2290	TOR1	ttgatttgaggccaaaagag	attctcgtgttgttctatcg	135	
	orf19.6109	TUP1	ggtcagtcagaatctgggactt	cttcgatcgacaaagtcaagg	118	
orf19.1949	VPS1	aagccaattctgtgttacg	gtggtgcaacaaaataaccattc	142	2,034	
orf19.4145	ZCF20	tcctccttgatagataacgatg	tgacatgaagccaatggtg	25	1,954	
orf19.1585	ZRT2	tggtttagcgctcagaaaatc	gaatcaaacacccccattggt	138	1,972	

Tabelle 9: Oligonukleotide & Sonden für qRT-PCR (für *C. dubliniensis*)

Übersicht der verwendeten Oligonukleotide für quantitativen Nachweis der Transkription ausgewählter Gene von *C. dubliniensis* mit den jeweiligen UPL-Sonden und den entsprechenden Amplifikationseffizienzen (E) der unterschiedlichen qRT-PCR-Ansätze.

	ORF	Name	Oligonukleotid_for	Oligonukleotid_rev	# UPL	E
<i>Candida dubliniensis</i>	<i>Cd36_61830</i>	<i>CdATG15</i>	acaacgagacagcaccatgt	atgagctacaaccgccaat	87	
	<i>Cd36_09130</i>	<i>CdMLS1</i>	aagagaaaagtccacgctcttg	ttcatcgctcttgattggaa	46	
	<i>Cd36_30420</i>	<i>CdFDH1</i>	attaatggtacttgggatgttc	ccttatctccaagtcaaattcgt	145	1,917
	<i>Cd36_83880</i>	<i>CdHTB1</i>	caaaaggccatgtccatcat	ttgtaagcagccaatttagaagc	59	
	<i>Cd36_28770</i>	<i>CdHXT5</i>	tggtcacgacgttgggtat	actggtcgacaccagaaagaa	8	1,654
	<i>Cd36_00070</i>	<i>CdTUP1</i>	cagtcgccgtctccttaaac	cgccactaccagtagcaaaaa	104	1,641
	<i>Cd36_34530</i>	<i>CdTUB1</i>	atttcccagaaccagtttact	caggaaggtttagacagacaaag	7	1,657
	<i>Cd36_19920</i>	<i>CdCDC19</i>	ggtaccactgttggtgacaaaag	cagtgggaagatcatttcgtg	31	1,980
	<i>Cd36_46050</i>	<i>CdPDC11</i>	ctgttggctacttgggtg	ctcttctttgggtccaattc	46	1,631
	<i>Cd36_00220</i>	<i>CdPHR2</i>	cggtactatttccggtgacca	tacatgtaacaataaccaccagacc	109	1,590
	X	<i>CdPGA48</i>	ttgcttagtgttggctgctt	caggacagtatgttataatcggtaa	77	
	<i>Cd36_27050</i>	<i>CdECM4</i>	catgggcacaccgtacttta	tgaacaacagacaatccaatga	141	1,661
	<i>Cd36_17870</i>	<i>CdEFT2</i>	tttgcattgctgatgctatcc	actcttctcatggtgggatg	77	1,959
	<i>Cd36_70930</i>	<i>CdRPP0</i>	cgaagaagctgccactgaa	cgaaacccatctcgtcatcag	74	1,690
	<i>Cd36_01550</i>	<i>CdLSC1</i>	gctgaagccatcaaagaagc	aagtgggtggggacaaaaa	59	1,913
	<i>Cd36_33560</i>	<i>MOM1</i>	ggggcccctataccttca	acctggtagtgggtgctgtt	31	1,759
	X	Transposon	tgcgtattagatcaacaatagtga	gctcgtctctatgtagaaaatcc	72	1,876
	<i>18S rRNA</i>	<i>CdRDN18</i>	ccttaacgaggaacaattgga	tacgctttggagctggaat	66	1,891
	<i>Cd36_52110</i>	<i>CdRET2</i>	ttctgctggtgctggtatg	atgggtcaggtgatccagtt	115	1,546
	<i>Cd36_01510</i>	<i>CdRPS4A</i>	tcatcaaattcgacactggtaga	gacaataacaccaactctacccaaa	131	1,903
X	<i>Cd_orf19.3053</i>	cttcaatcttaattggcatctg	caatgtttatcagtttcgtgtg	159	1,870	

Tabelle 10: Zusammenstellung der Oligonukleotide für die Probenvorbereitung der *MESSAGE*-Technologie

Oligonukleotide	Basensequenz (5'---> 3')
ODD_T_all	GCGAGTCGACCGTTTTTTTTTTTTTT
ODD_T_ext_AA	GCGAGTCGACCGTTTTTTTTTTTTTTAA
ODD_T_ext_AC	GCGAGTCGACCGTTTTTTTTTTTTTTAC
ODD_T_ext_AG	GCGAGTCGACCGTTTTTTTTTTTTTTAG
ODD_T_ext_AT	GCGAGTCGACCGTTTTTTTTTTTTTTAT
ODD_T_ext_CA	GCGAGTCGACCGTTTTTTTTTTTTTTCA
ODD_T_ext_CC	GCGAGTCGACCGTTTTTTTTTTTTTTCC
ODD_T_ext_CG	GCGAGTCGACCGTTTTTTTTTTTTTTCG
ODD_T_ext_CT	GCGAGTCGACCGTTTTTTTTTTTTTTCT
ODD_T_ext_GA	GCGAGTCGACCGTTTTTTTTTTTTTTGA
ODD_T_ext_GC	GCGAGTCGACCGTTTTTTTTTTTTTTGC
ODD_T_ext_GG	GCGAGTCGACCGTTTTTTTTTTTTTTGG
ODD_T_ext_GT	GCGAGTCGACCGTTTTTTTTTTTTTTGT
SMART_IV_Oligo	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTGGCCATTACGGCCGGG ^{a)}
A2-Sau3a	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT
Long_oligo_RsaI	GCGTGAAGACGACAGAAAGGGCGTGGTGC GGAGGGCGGT
Short_oligo_RsaI	ACCGCCCTCCGC
Adapter primer AP1	TGTAGCGTGAAGACGACAGAA
AdE_AA_RsaI	AGGGCGTGGTGC GGAGGGCGGTCCAA
AdE_AC_RsaI	AGGGCGTGGTGC GGAGGGCGGTCCAC
AdE_AG_RsaI	AGGGCGTGGTGC GGAGGGCGGTCCAG
AdE_AT_RsaI	AGGGCGTGGTGC GGAGGGCGGTCCAT
AdE_CA_RsaI	AGGGCGTGGTGC GGAGGGCGGTCCCA
AdE_CC_RsaI	AGGGCGTGGTGC GGAGGGCGGTCCCC
AdE_CG_RsaI	AGGGCGTGGTGC GGAGGGCGGTCCCG
AdE_CT_RsaI	AGGGCGTGGTGC GGAGGGCGGTCCCT
AdE_GA_RsaI	AGGGCGTGGTGC GGAGGGCGGTCCGA
AdE_GC_RsaI	AGGGCGTGGTGC GGAGGGCGGTCCGC
AdE_GG_RsaI	AGGGCGTGGTGC GGAGGGCGGTCCGG
AdE_GT_RsaI	AGGGCGTGGTGC GGAGGGCGGTCCGT
AdE_TA_RsaI	AGGGCGTGGTGC GGAGGGCGGTCCTA
AdE_TC_RsaI	AGGGCGTGGTGC GGAGGGCGGTCCTC
AdE_TG_RsaI	AGGGCGTGGTGC GGAGGGCGGTCCTG
AdE_TT_RsaI	AGGGCGTGGTGC GGAGGGCGGTCCTT
Ad_non_extendend	AGGGCGTGGTGC GGAGGGCGGT

^{a)} die drei markierten **GGG**s sind Ribonukleotide

I.8 Bakterienstamm

Escherichia coli Stamm DH5 α (F⁻, *endA1*, *hsdR17* (r_K⁻, m_K⁻), *supE44*, *thi-1*, *recA1*, *gyrA96*, *relA1*, Δ (*argF-lac*)U169, λ , ϕ 80*dlacZ* Δ M15) von Invitrogen, Karlsruhe wurde für alle bakteriellen Klonierungsexperimente eingesetzt [Hanahan, D 1983; Woodcock, DM *et al.* 1989].

I.9 Plasmide

Tabelle 11: In dieser Arbeit verwendete und hergestellte Plasmide

Plasmid	Ausgangsplasmid	Insert	Referenz
pSFS2A			[Reuss, O <i>et al.</i> 2004]
pMB2	pSFS2A	FR2	diese Arbeit
pMB21	pMB2	FR1	diese Arbeit
pMB23	pMB2	FR3	diese Arbeit
pCG24	pMB2	FR1-MOM1	diese Arbeit
pHEG22	pMB2	EFG1Pr-EFG1-ORF	diese Arbeit
pHEO9	pMB2	MOM1Pr-FR4	diese Arbeit
pHEO97	pHEO9	EFG1-ORF	diese Arbeit
pCTA17	pSFS2A	ActT/3'FR	diese Arbeit
pCTA17-MEP2	pCTA17	ActPr-MEP2	diese Arbeit
pNIM6			[Ramirez-Zavala, B <i>et al.</i> 2008]
pNIM6-EFG1	pNIM6	EFG1	diese Arbeit
pNIM6-MOM1	pNIM6	MOM1	diese Arbeit
pNIM6-MEP2	pNIM6	MEP2	diese Arbeit

I.10 Humane Zell-Linien

Tabelle 12: In dieser Arbeit verwendete Zelllinien

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

I.11 *Candida*- Stämme

Tabelle 13: Verwendete und hergestellte *Candida albicans* oder *Candida dubliniensis* –Stämme

Stamm	Ausgang	Genotyp	Referenz
SC5314		<i>Klinisches Isolat von Candida albicans</i>	[Gillum, AM <i>et al.</i> 1984]
HLC37 (<i>EFG1/efg1Δ</i>)		<i>ura3::1imm434/ura3::1imm434</i> <i>EFG1/efg1::hisG-URA3-hisG</i>	[Lo, H] <i>et al.</i> 1997]
HLC52 (<i>efg1Δ/efg1Δ</i>)		<i>ura3::1imm434/ura3::1imm434</i> <i>efg1::hisG/efg1::hisG-URA3-hisG</i>	[Lo, H] <i>et al.</i> 1997]
WO-1		<i>Klinisches Isolat von Candida albicans</i>	[Slutsky, B <i>et al.</i> 1987]
TS3		<i>ade2/ade2Δura3::ADE2/URA3</i>	Srikantha <i>et al.</i> (2000)
Efc25		<i>ade2/ade2Δura3::ADE2/Δura3::ADE2/</i> <i>Δefg1::hisG/Δefg1::CAT-URA3-CAT</i>	Srikantha <i>et al.</i> (2000)
Ef3.1		<i>ade2/ade2Δura3::ADE2/Δura3::ADE2/</i> <i>Δefg1::hisG-URA3-hisG/EFG1</i>	Srikantha <i>et al.</i> (2000)
CD36 (CBS7987)		<i>Klinisches Isolat von C. dubliniensis</i>	Sullivan <i>et al.</i> (1995)
Wü284		<i>Klinisches Isolat von C. dubliniensis</i>	Morschhäuser <i>et al.</i> (1999)
Wü296		<i>Klinisches Isolat von C. dubliniensis</i>	Morschhäuser <i>et al.</i> (1999)

***mom1Δ*-Deletions- und Reintegrationsstämme**

DBL52	CD36	<i>mom1_1Δ::SAT1-FLIP/MOM1_2</i>	diese Arbeit
DBL80	CD36	<i>MOM1_1/mom1_2Δ::SAT1-FLIP</i>	diese Arbeit
DBL525	DBL52	<i>mom1_1Δ::FRT/MOM1_2</i>	diese Arbeit
DBL803	DBL80	<i>MOM1_1/mom1_2Δ::FRT</i>	diese Arbeit
DBL27	DBL525	<i>mom1_1Δ::FRT/mom1_2Δ::SAT1-FLIP</i>	diese Arbeit
DBL6	DBL803	<i>mom1_1Δ::SAT1-FLIP /mom1Δ::FRT</i>	diese Arbeit
DBL275 (<i>mom1Δ/mom1Δ</i>)	DBL27	<i>mom1_1Δ::FRT/mom1_2Δ::FRT</i>	diese Arbeit
DBL64 (<i>mom1Δ/mom1Δ</i>)	DBL6	<i>mom1_1Δ::FRT/mom1_2Δ::FRT</i>	diese Arbeit
DGL12	DBL275	<i>mom1_1Δ::FRT/MOM1::SAT1-FLIP</i>	diese Arbeit
DGL122 (<i>mom1Δ/MOM1</i>)	DGL12	<i>mom1_1Δ::FRT/MOM1::FRT</i>	diese Arbeit
DGL3	DBL64	<i>MOM1::SAT1-FLP/mom1_2Δ::FRT</i>	diese Arbeit
DGL31 (<i>MOM1/mom1Δ</i>)	DGL3	<i>MOM1::FRT/mom1_2Δ::FRT</i>	diese Arbeit

Heterologe Expression von *EFG1* im *mom1Δ*-Deletionsstamm

DKEFG2	DBL275	<i>mom1_1Δ::FRT/mom1_2Δ::EFG1(-4634-</i> <i>stop) -SAT1-FLP</i>	diese Arbeit
DKEFG27 (<i>mom1Δ/EFG1-Pr+ORF</i>)	DKEFG2	<i>mom1_1Δ::FRT/mom1_2Δ::EFG1(-4634-</i> <i>stop)-FRT</i>	diese Arbeit
DKEFG1	DBL64	<i>mom1_1Δ::EFG1(-4634-stop)-SAT1-</i> <i>FLP/mom1_2Δ::FRT</i>	diese Arbeit
DKEFG12 (<i>EFG1-Pr+ORF/mom1Δ</i>)	DKEFG1	<i>mom1_1Δ::EFG1(-4634-stop)-</i> <i>FRT/mom1_2Δ::FRT</i>	diese Arbeit

Stamm	Ausgang	Genotyp	Referenz
DSEFG10	DBL275	<i>mom1_1Δ::FRT/mom1_2Δ::EFG1(start-stop)-SAT1-FLP</i>	diese Arbeit
DSEFG104 (<i>mom1Δ/EFG1_ORF</i>)	DSEFG10	<i>mom1_1Δ::FRT/mom1_2Δ::EFG1(start-stop)-FRT</i>	diese Arbeit
DSEFG8	DBL64	<i>mom1_1Δ::EFG1(start-stop)-SAT1-FLP/mom1_2Δ::FRT</i>	diese Arbeit
DSEFG89 (<i>EFG1_ORF/mom1Δ</i>)	DSEFG8	<i>mom1_1Δ::EFG1(start-stop)-FRT/mom1_2Δ::FRT</i>	diese Arbeit

Ektopische Expression von *MOM1* und *EFG1* in den *efg1Δ*-Stämmen unter Tet-induzierbarem Promotor

ALG1	HLC52	<i>ura3::1 imm434/ura3::1 imm434 efg1::hisG /efg1::hisG-URA3-hisG ADH1/adh1Δ::P_{tet}-GFP</i>	diese Arbeit
ALE41	HLC52	<i>ura3::1 imm434/ura3::1 imm434 efg1::hisG /efg1::hisG-URA3-hisG ADH1/adh1Δ::P_{tet}-EFG1</i>	diese Arbeit
ALE42	HLC52	<i>ura3::1 imm434/ura3::1 imm434 efg1::hisG /efg1::hisG-URA3-hisG ADH1/adh1Δ::P_{tet}-EFG1</i>	diese Arbeit
ALM102	HLC52	<i>ura3::1 imm434/ura3::1 imm434 efg1::hisG /efg1::hisG-URA3-hisG ADH1/adh1Δ::P_{tet}-MOM1</i>	diese Arbeit
ALM111	HLC52	<i>ura3::1 imm434/ura3::1 imm434 efg1::hisG /efg1::hisG-URA3-hisG ADH1/adh1Δ::P_{tet}-MOM1</i>	diese Arbeit

Ektopische Expression von *MEP2* (und *GFP*) im *C. albicans* SC5314 unter Tet-induzierbarem Promotor

EL142	SC5314	<i>ADH1/adh1Δ::P_{tet}-GFP</i>	diese Arbeit
EMEP22	SC5314	<i>ADH1/adh1Δ::P_{tet}-MEP2</i>	diese Arbeit
EMEP23	SC5314	<i>adh1Δ::P_{tet}-MEP2/ADH1</i>	diese Arbeit

Konstitutive Expression von *MEP2* am *ACT1*-Genlokus vom *C. albicans* SC5314

14AMEP2	SC5314	<i>ACT1/act1::ACTPrMEP2-SAT1-FLIP</i>	diese Arbeit
14AMEP25	14AMEP2	<i>ACT1/act1::ACTPrMEP2-FRT</i>	diese Arbeit
14AMEP16	SC5314	<i>act1::ACTPrMEP2-SAT1-FLIP/ACT1</i>	diese Arbeit
14AMEP167	14AMEP2	<i>act1::ACTPrMEP2-FRT/ACT1</i>	diese Arbeit

„*SAT1-FLIP*“ steht für die Integration der gesamten Deletionskassette mit Nourseothricin-Resistenz (*SAT1*), „*FRT*“ entspricht der 34 bp lange Erkennungssequenz der *FLP*-Rekombinase des Plasmids pSFS2, die nach dem Entfernen der Deletionskassette im Genom verbleibt. *ACT1PrMEP2* entspricht dem Fusionskonstrukt aus dem *ACT1*-Promotor und *MEP2*, das für die heterologe Expression von *MEP2* unter *ACT1*-Promotor gebraucht wird.

II. METHODEN

II.1 Kultivierung der Bakterien

Die Kultivierung von Bakterien erfolgte bei 37°C im LB-Medium für 16-24 h. Festmedien enthielten eine Endkonzentration von 2% Agar. Die Selektion Plasmid-kodierter Antibiotika-Resistenz erfolgte in Gegenwart von 50 µg/ml Chloramphenicol (bei Verwendung des pSFS2-Plasmids) bzw. 100 µg/ml Ampicillin (beim pNIM6-Plasmid). Dauerkulturen von Bakterien wurden in 50 % Glycerin bei -80°C aufbewahrt.

II.2 Kultivierung der *Candida*-Stämme

Candida-Stämme wurden als Dauerkulturen in 30% Glycerin bei -80°C gehalten. Vorkulturen wurden aus den jeweiligen Dauerkulturen im YPD-Medium angeimpft und über Nacht im 30°C-Schüttelinkubator bei 160 Upm angezogen. Für das Wachstum im Induktionsmedium oder für phänotypische Charakterisierung der Stämme wurden die Kulturen in einem 100 ml-Rundkolben mit entsprechendem Medium zu einer optischen Dichte (OD_{600}) von 0,1 angeimpft. Insbesondere für die Untersuchung des Wachstumsverhaltens der Stämme unter unterschiedlichen Stickstoffquellen, wurden die Übernachtskulturen vor dem Animpfen zur Beseitigung der Nährstoffrückstände zweimal mit ddH₂O gewaschen. Die Inkubation erfolgte je nach Versuch bei 30°C oder für die Induktion von hyphalem Wachstum bei 37°C.

II.3 Kultivierung humaner Epithelzellen

- Dulbecco's Modified Eagle Medium (D-MEM) with High Glucose (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	1,0 mM

Humane colorectale Karzinomzellen (Caco-2), vulvovaginale Epithelzellen (A431) und Epithelzellen der Mundschleimhaut (TR146) wurden in T-75 Zellkulturflaschen (Caco-2: $5 \cdot 10^5$ Zellen; A431: $1 - 1,5 \cdot 10^6$ 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 Zellkulturflaschen überführt. Dafür wurden die Zellen mit PBS⁻-Puffer gewaschen und anschließend für 3 min (Caco-2; TR146) bzw. 8 min (A431) bei 37°C im 2,5 ml Trypsin/EDTA (0,25% Trypsin, 0,53 mM EDTA) - PBS⁻-Puffer abgelöst. Die Trypsinreaktion wurde durch Zugabe von 10 ml D-MEM gestoppt, die Zellen in ein 15 ml Röhrchen (Greiner) überführt, nach Zentrifugation (2000 x g, 3 min) in frischem, supplementiertem D-MEM aufgenommen und in neue Zellkulturflaschen passagiert.

II.4 Phänotypische Charakterisierung der *Candida*-Stämme

II.4.1 Bestimmung der Wachstumsrate

Zur Bestimmung der Wachstumsrate der *C. albicans* oder *C. dubliniensis* - Stämme in bestimmten Medien wurde in einer Zeitreihe zu unterschiedlichen Zeitpunkten jeweils ein Aliquot der Zellsuspension entnommen und die optische Dichte bei 600 nm bestimmt.

II.4.2 Bestimmung der Sedimentationsrate

Zur Bestimmung der Sedimentationsrate wurden verschiedene *Candida*-Stämme in YPD über Nacht bei 30°C angezogen. Diese stationär-wachsende Zellen wurden auf eine Optische Dichte bei 600 nm (OD_{600nm}) von 1,0 eingestellt. Jeweils 6 ml dieser Kultur wurde in Reagenzgläser überführt und 4 h bei Raumtemperatur sedimentieren lassen. Alle Untersuchungen erfolgten jeweils in Triplikaten.

Von jedem Reagenzröhrchen wurde die Differenz aus Gesamtmedium- und Pellet- oder Zellgrenzoberfläche ermittelt und der Wert vom Wildtyp als 1,0 (100%) festgelegt. Für alle anderen Stämme wurde die ermittelte Differenz auf diesen Wildtyp-Wert bezogen.

II.4.3 Probenvorbereitung für die Lichtmikroskopie

i) ohne Zellfixierung

Zu definierten Zeitpunkten wurden 10-15 µl der Wachstumskultur steril auf einen Objektträger aufgetragen und mit einem Deckgläschen bedeckt (bei Induktion von Hyphen oder Pseudohyphen wurde das Ende der Pipettenspitze abgeschnitten).

ii) mit Zellfixierung

Für die Fixierung der Zellen zu einem bestimmten Zeitpunkt wurde die Inkubationskultur im 3,7 % Formaldehyd (Carl Roth) für 10 min inkubiert. Anschließend wurden die fixierten Zellen pelletiert (Blastosporen bei 2000 – 2500 Upm / Hyphen: bis zu 6000 Upm), zum Entfernen des Formaldehyds mit 1-fachem PBS gewaschen und im Kaliumphosphat-Puffer/1,2 M Sorbitol aufgenommen. Je nach Zelldichte wurden zwischen 20 – 80 µl auf Polylysin - beschichtete Objektträger (Thermo Scientific) aufgetropft und die Zellen in einer „feuchten Kammer“ (Petrischale mit H₂O-durchtränktem Zellstoff) 1 – 2 h absetzen lassen. Der restliche Puffer wurde mit einer Pasteur-Pipette abgesaugt, die Zellen in Fluoromount (Sigma-Aldrich Chemie GmbH) eingebettet und mit Deckglas bedeckt. Nach mind. 1 – 2 h (bei 7°C) wurde das Deckglas mit Nagellack versiegelt und die Zellen mikroskopiert.

II.4.4 Lichtmikroskopische Aufnahmen

Lichtmikroskopische Aufnahmen erfolgten mithilfe des ZEISS Axiovert 25 Mikroskops und die Dokumentation mit der angeschlossenen Kamera AxioCam MRm. Die Auswertung erfolgte mittels der AxioVision Release 4.6.3 Software von ZEISS.

II.4.5 Charakterisierung der Stämme unter hypoxischen Bedingungen

Die phänotypische Charakterisierung der Stämme unter microaerophilen/hypoxischen Bedingungen erfolgte nach dem Protokoll von Brown *et al.*, 1999 [Brown, DH, Jr. *et al.* 1999]. Dafür wurden ca. 250 Zellen einer entweder exponentiell- oder stationär-wachsenden Kultur in 30 ml flüssigem YPS-Medium (handwarm) gemischt und in die Agarplatten gegossen. Nach 3 Tage Inkubation bei 30°C wurde die Koloniemorphologie lichtmikroskopisch analysiert.

II.4.6 Plattentest für die Analyse der Zellwandstabilität

Für die Analyse der Zellwandstabilität wurden stationär-wachsende Kulturen auf dieselbe Zelldichte von 2×10^7 Zellen/ml gebracht und in seriellen Verdünnungsschritten um den Faktor 10 verdünnt (bis 2×10^3 Zellen/ml). Jeweils 5 µl (entspricht einer Verdünnungsreihe von 10^5 - 10^1 Zellen/Verdünnung) wurden auf YPD-Platten supplementiert mit unterschiedlichen Konzentrationen von CalcofluorWhite (25 µg/ml – 500 µg/ml; Fluorescent Brightener 28; Sigma-Aldrich) und CongoRed (50µg/ml – 1,5 mg/ml; Sigma-Aldrich) ausgebracht und für bis zu 7 Tage bei 30°C inkubiert. Die Dokumentation der Koloniemorphologie erfolgte mit einer Digitalkamera (Kodak GmbH) oder einem Flachbettscanner (Epson Expression 1680 Pro).

II.5 Präparation von Nukleinsäuren

II.5.1 Plasmidisolation

Die Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte mit QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen). Eine 5 ml-Kultur mit entsprechendem Selektionsmedium (entweder LB_{AMP} oder LB_{CAP}) wurde über Nacht bei 37°C angezogen und die Bakterienzellen bei 3244 x g (4300 Upm, Heraeus Megafuge) 5 min pelletiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in Puffer P1 (7°C) resuspendiert und der Ansatz in ein 1,5 ml –Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 250 µl Puffer P1 zur Lyse der Bakterienzellen und anschließender Neutralisation mit 350 µl Puffer N3, wurde das Zellysate 10 min bei 16060 x g (13000 Upm, Heraeus Biofuge pico) zentrifugiert. Der Überstand wurde auf eine Säule gegeben und 1 min bei 16060 x g zentrifugiert, der Durchfluss verworfen und die Säule mit 750 µl Puffer PE gewaschen, um Salze zu entfernen. Nach einer weiteren Zentrifugation für 1 min bei 16060 x g wurde der Durchfluss verworfen und die Säule nochmals für 1 min bei 16060 x g trocken zentrifugiert. Nachdem die Säule in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß transferiert wurde, erfolgte die Elution der an die Säule gebundenen Plasmid-DNA durch Zugabe von 50 µl auf 65°C erwärmten Elutions-Puffer (10mM Tris-HCl, pH 8,5) oder mikrobiologisch reinem Wasser. Nach 1 min Inkubation wurde 1 min bei 16606 x g abzentrifugiert und die gelöste Plasmid-DNA in einem frischen 1,5 ml- Reaktionsgefäß aufgefangen. Die Konzentration der extrahierten Plasmid-DNA lag im Normalfall zwischen 200 - 250 ng/µl, bedingt durch die Bindekapazität der Säule. Die Aufbewahrung der Plasmid-DNA erfolgte bei –20°C.

II.5.2 Präparation genomischer DNA aus *Candida*- Kulturen

- Hefe-Lysispuffer (100 mM NaCl; 10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 1mM EDTA; 2% (v/v) Triton X-100; 1% (w/v) SDS)
- Roti®-Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1), Carl Roth
- TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 1mM EDTA)

Die Isolation genomischer DNA aus *C. albicans* oder *C. dubliniensis*-Stämmen erfolgte nach dem Protokoll von Hoffman und Winston [Hoffman, CS and Winston, F 1987]. Dafür wurden 10 ml einer Übernachtskultur 2 min bei 800 x g (2000 Upm, Heraeus Megafuge) zentrifugiert und der Zellausschlag in 0,5 ml Wasser gewaschen. Nach erneutem Zentrifugieren wurde für den Zellaufschluss das Pellet in 0,3 ml Hefe-Lysispuffer aufgenommen, diese Suspension in ein 2,0 ml Reaktionsgefäß (Safe-Lock, Eppendorf) überführt und dazu etwa 0,3 g Glasperlen (Ø 0,25–0,5 mm, Carl Roth) und 0,3 ml Roti®-Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol zugegeben. Der Aufschluss

erfolgte durch stark einwirkende Scherkräfte während des 15 min Mischvorgangs (Vortexen) der Suspension bei 7°C. Anschließend wurden die Zelltrümmer für 10 min bei 16060 x *g* in der Kühlzentrifuge (13000 Upm, Heraeus Biofuge fresco) bei 4°C pelletiert und der Überstand der wässrigen Phase 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 über Nacht 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 und mit 30 µg RNaseA (Sigma Aldrich Chemie) versetzt. Nach 10 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde die genomische DNA durch Zugabe von 1 ml 100%-igen Ethanol (-20°C) erneut gefällt, zentrifugiert (s. o.) und zur Entfernung der restlichen Salze mit 1 ml 70% EtOH (-20°C) gewaschen. Die niedergeschlagene DNA wurde für etwa 5 min bei 37°C luftgetrocknet, je nach Pelletgröße in 50 - 200 µl molekularbiologischem Wasser aufgenommen und für ein vollständiges Lösen für 5 min bei 65°C inkubiert. Lagerung der DNA erfolgte stets bei -20°C. Die DNA-Konzentration und Reinheit wurde mittels UV-Spektroskopie bestimmt.

II.5.3 Präparation von Gesamt-RNA aus *Candida*- Kulturen

Für die Präparation von Gesamt-RNA wurden die entsprechenden *Candida*-Stämme unter den Wachstumsbedingungen von Interesse angezogen und zum gewünschten Zeitpunkt in 50 ml PP-Röhrchen (Greiner) überführt und mittels Zentrifugation geerntet (Heraeus Megafuge; Blastosporen: 2 min, ca. 800 x *g* (2000 Upm); Hyphen: 4 min, ca. 3300 x *g* (4300 Upm)). Nach dem Dekantieren des Überstandes wurden die Zellen im verbliebenen Medium resuspendiert und tropfenweise in einem mit flüssigem Stickstoff befüllten 50 ml PP-Röhrchen schockgefroren. Die so gewonnenen Zellperlen wurden bei -80°C gelagert.

Der Aufschluss tiefgefrorener Zellperlen erfolgte mechanisch mit einer Labor-Schwingmühle (Retsch, Typ MM 200). Dabei wurden die bei -80°C gelagerten Zellperlen in zuvor mit 0,5% Na-Hypochlorit und 70% EtOH gewaschenen, mit flüssigem Stickstoff gekühlten Teflonbehältern mit jeweils einer Wolframkarbid-Kugel zu feinem Pulver zermahlen (eingestellte Schüttelfrequenz = 30/sec, Zeit = 2 min) und anschließend in den Lyse-Puffer überführt (Puffer RLT des RNeasy® Midi-, RNeasy® Mini oder RNeasy® Plus Mini Kits (Qiagen) versetzt mit 0,01% (v/v) β-Mercaptoethanol). Dieser stark denaturierende, Guanidinisothiocyanat enthaltende Puffer inaktiviert sofort die bei der Zellyse freiwerdenden RNasen, so dass insgesamt von einer Isolation einer intakten RNA (Molekülgröße über 200 bp) ausgegangen wurde. Zur Homogenisierung wurde das Lysat 1 min gevortext und die festen Zellbestandteilen durch das mehrmalige Pelletieren abgetrennt. Beim RNeasy Plus Mini Kit wurde die noch im Lysat

befindende genomische DNA über gDNA-Eliminator Säule entfernt. Anschließend wurde der Durchfluss bzw. Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 1 Vol. 70 % Ethanol (angesetzt mit DEPC-Wasser) versetzt und gut gemischt. Die gesamte Suspension wurde dann in Teilschritten (je nach Kitgröße) auf die RNeasy Midi bzw. Mini Spin-Säule gegeben, so dass durch vorherrschende chaotrope Bedingungen die RNA auf der Silicagel-Membran gebunden werden konnte. Nach Vorgaben des Herstellers wurde die Membran zuerst mit Puffer RW1, dann zwei Mal mit Puffer RPE gewaschen. Die Elution der Gesamt-RNA von der Säule erfolgte durch die Zugabe von RNase-freiem H₂O direkt auf die Membranoberfläche, 1 min Inkubation bei Raumtemperatur und anschließender Zentrifugation. Je nach erwarteter RNA-Ausbeute wurde dieser Elutionsschritt mit weiterer Zugabe von RNase-freiem H₂O oder zur RNA-Aufkonzentrierung mit dem ersten Eluat wiederholt. Die Lagerung der isolierten Gesamt-RNA erfolgte bei -80°C.

Für globale Transkriptionsprofile mittels DNA-Mikroarrays oder der *MESSAGE*-Technologie wurde die isolierte RNA mit 4 M Lithiumchlorid im Verhältnis 1:1 gemischt und über Nacht bei -20°C präzipitiert. Nach dem Abzentrifugieren bei 16060 x *g* (13000 Upm, Heraeus Biofuge fresco) wurde das RNA Pellet zweimal mit 70% EtOH-DEPC gewaschen, im RNase-freiem Wasser gelöst und bei -80°C aufbewahrt.

II.6 Konzentrationsbestimmung und Integritätskontrolle von Nukleinsäuren

II.6.1 Photometrische Konzentrationsbestimmung

Die Bestimmung der DNA oder RNA-Konzentration erfolgte photometrisch mittels Extinktionsmessung bei 260 nm (E_{260}) mit dem Jasco Spektralphotometer der V630-Serie. Je nach Art der vorliegenden Nukleinsäure konnten die entsprechenden Konzentrationen durch folgende Gleichungen berechnet werden:

$$\text{DNA - Konzentration in } \mu\text{g}/\mu\text{l} = 50 * \text{Verdünnungsfaktor} * E_{260} \text{ der Probe} / 1000$$

$$\text{RNA - Konzentration in } \mu\text{g}/\mu\text{l} = 40 * \text{Verdünnungsfaktor} * E_{260} \text{ der Probe} / 1000$$

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

II.6.2 Bioanalyser 2100, Agilent Technologies

Die Qualität und Konzentrationsbestimmung der Gesamt-RNA wurde mittels der Kapillarelektrophorese (Bioanalyser 2100, Agilent Technologies) unter der Verwendung des RNA 6000 Nano Kits bestimmt. Das Prinzip des Bioanalyzers basiert auf der Mikrofluidtechnik und der elektrophoretischer Auftrennung von Nukleinsäuren.

Nach dem Temperieren der Reagenzien auf Raumtemperatur, wurde zu 65 µl der filtrierten Gelmatrix jeweils 1 µl des Fluoreszenzfarbstoffs hinzugefügt und der Ansatz gut gemischt. Um die Homogenität des Gels zu gewährleisten, wurde die Gelmatrix bei 16060 x g für 10 min zentrifugiert und der Chip nach Hersteller-Vorschrift mit dem Gel beladen. Anschließend wurde in jede - für Probe und Leiter - vorgesehene Vertiefung im Chip 5 µl des Markers pipettiert. Das Auftragen der Proben und der RNA-Leiter (jeweils 1 µl) erfolgte nachdem die Ansätze zur Denaturierung der RNA-Sekundärstruktur 2 min bei 70°C inkubiert und dann sofort auf Eis abgekühlt worden sind. Anschließend wurde der beladene Chip 1 min bei 2400 rpm gevortext (IKA, MS2-S8) und zur Analyse in den Bioanalyser eingelegt. Die Auswertung erfolgte mit der 2100 Expert Software und „Eukaryote Total RNA Nano“ als Vorlage.

II.7 Elektrophoretische Auftrennung mittels der Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ist ein gängiges Verfahren der Molekularbiologie bei dem Nukleinsäure-Stränge (RNA oder DNA) nach ihrer Größe aufgetrennt werden. Für die DNA-Fragmente zwischen 1000 – 7000 bp ist eine Auftrennung in einem 0,8%-igen Agarose-Gel geeignet, bei kleineren DNA-Stücken (< 1000 bp) können höherprozentige Gele verwendet werden. Für kleine 0,8%-ige Gele (7 cm x 8 cm) wurden 0,4 g Agarose in 50 ml 1 x TAE und für große Gele (12 cm x 14 cm) 0,96 g Agarose in 120 ml 1 x TAE gegeben. Die Agarose-TAE-Mischung wurde in der Mikrowelle aufgeköcht, bis sich eine homogene, viskose Lösung bildete. Anschließend wurde das Gel im Schlitten gegossen und je nach Gel-Größe entweder mit 2,5 µl bzw. 5 µl Ethidiumbromid versetzt. Die DNA- (oder RNA-) Proben wurden im Verhältnis 6 zu 1 mit 6-fach Ladepuffer vermischt und auf das Gel aufgetragen. Als Größenstandard wurde eine DNA-Leiter von 100 bp bis 10 kb aufgetrennt. Die Auftrennung der Fragmente in der Elektrophorese-Kammer erfolgte bei 400 mA und einer Spannung zwischen 100 – 140 V. Die Elektrophoresedauer wurde an Spannung und Gelgröße angepasst, meistens erfolgte die Auftrennung zwischen 30 und 60 Minuten. Nach der Auftrennung wurden die DNA-Fragmente aufgrund der Ethidiumbromid-Einlagerung durch UV-Belichtung visualisiert und dokumentiert.

II.8 Amplifikation von DNA-Abschnitten mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die selektive *in vitro*-Vervielfältigung von DNA-Fragmenten erfolgte über die Methode der Polymerase-Kettenreaktion (engl. *Polymerase Chain Reaction, PCR*). Je nach Anwendung (z. B. Nachweis von bestimmten DNA-Abschnitten oder Amplifikation von DNA-Fragmenten für Klonierungsreaktionen) wurden verschiedene Amplifikationsprotokolle mit unterschiedlichen DNA-Polymerasen verwendet, die sich in Eigenschaften wie Prozessivität, Fehlerrate und Ausbeute deutlich unterscheiden. Die entsprechenden Protokolle werden im Folgenden beschrieben.

II.8.1 Amplifikation von DNA-Fragmenten mit der *Taq*-DNA-Polymerase

- 10-fach ThermoPol Reaction Buffer (mit oder ohne Triton als Detergenz), NEB (200 mM Tris-HCl; 100 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 100 mM KCl; 20 mM MgSO_4 ; ($\pm 1\%$ Triton); pH 8,8)
- dNTPs (Fermentas, jeweils 25 mM)

Die PCR-Ansätze enthielten standardmäßig ca. 50 - 200 ng genomische DNA (Plasmide: ca. 10 ng), 1-fach ThermoPol Reaction Buffer, 0,2 mM dNTPs, 20 pmol pro Oligonukleotid und 20 U *Taq* DNA-Polymerase in einem Volumen von 50 μl .

Der Programmablauf war generell: 1 min bei 95°C zur Denaturierung der Matrizen-DNA, anschließend 30 Zyklen bestehend aus 1 min Denaturierung bei 95°C, 1 min Hybridisierung der Oligonukleotide bei für die Primer spezifischen Temperatur (s. unten) und Elongation der Oligonukleotide entlang der Matrizen-DNA durch die *Taq* DNA-Polymerase bei 72°C. Ein anschließender Elongationsschritt bei 72°C für 5 min sollte das Auffüllen noch vorhandener Lücken gewährleisten.

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

II.8.2 Kolonie-PCR

Zur direkten Überprüfung des aufgenommenen Plasmids während der *E. coli*-Transformation oder zur Kontrolle der richtigen Integration eines DNA-Fragmentes ins *Candida*-Genom, konnten positive Klone direkt ohne vorherige Plasmid- oder DNA-Präparation mittels Kolonie-PCR selektiert werden. Hierfür wurde etwas Kolonie-Material mit einem Zahnstocher in das PCR-Reaktionsgefäß übertragen, das oben beschriebene Reaktionsgemisch zugegeben und – zum Aufschluss der Zellen – der erste Denaturierungsschritt bis auf 10 min verlängert.

II.8.3 Amplifikation mit der Phusion High-Fidelity DNA Polymerase

Im Vergleich zur *Taq*-DNA-Polymerase amplifiziert die Phusion High Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs GmbH) die DNA-Matrize mit einer deutlich höheren Prozessivität und Genauigkeit. So liegt die Fehlerrate beim Einsatz der Phusion Polymerase im entsprechenden Phusion HF-Puffer bei $4,4 \times 10^{-7}$, also etwa 50-mal niedriger als bei der *Taq*-DNA-Polymerase. Aus diesem Grund eignet sich die Phusion High Fidelity DNA Polymerase insbesondere zur Vervielfältigung von DNA-Fragmenten, die anschließend kloniert werden sollen, da während der Amplifikation wenige Fehler eingebaut werden. Auch sehr große DNA-Fragmente (zwischen 2 bis 7 kb), deren Vervielfältigung mit der *Taq*-DNA-Polymerase nur schwer möglich sind, können so synthetisiert werden.

Im 50 µl Reaktionsansatz wurden zwischen 50 -250 ng komplexe genomische DNA (oder 1 pg – 10 ng Plasmid-DNA) als DNA-Matrize mit 1-fach Phusion HF Puffer, dNTPs (je 200 µM), Oligonukleotiden (je 0,5 µM) und 1 U Phusion High Fidelity DNA Polymerase amplifiziert. Der PCR-Programmablauf erfolgte generell nach folgendem Schema: Anfängliche Denaturierung der DNA bei 98°C für 30 sec, anschließend 25 – 35 Zyklen bestehend aus 5–10 sec Denaturierung, 10 – 30 sec Hybridisierung der Oligonukleotide und einem Elongationsschritt bei 72°C für 15-30 sec /1 kb. Nach einem abschließenden Verlängerungsschritt bei 72°C für 5-10 min, wurde die Reaktion durch das Abkühlen des Ansatzes auf 4°C für 15 min gestoppt.

Aufgrund der speziellen Eigenschaft der Phusion DNA Polymerase, die Oligonukleotid-Matrize-Hybridisierungen zu stabilisieren, wurde zur Bestimmung der Hybridisierungstemperatur folgende Regel angewandt: Bei Oligonukleotiden mit einer Länge >20nt wurde als Hybridisierungstemperatur die Temperatur 3°C über dem Oligonukleotid mit der niedrigsten Schmelztemperatur (T_m) gewählt. Bei Oligonukleotide von ≤ 20 nt-Länge, wurde für die Hybridisierung die identische Temperatur benützt, wie die des Oligonukleotids mit der niedrigsten Schmelztemperatur.

II.9 Aufreinigung von PCR-Produkten/DNA

II.9.1 Säulenaufreinigung (QIAquick PCR Purification Kit)

Die Aufreinigung von DNA Fragmenten aus PCR- und Restriktionsansätzen erfolgte nach dem Protokoll des QIAquick™ PCR Purification Kits von Qiagen. Alle Zentrifugationsschritte wurden bei 16060 x g (13000 Upm) für 1 min in der Heraeus, Biofuge pico durchgeführt.

Zum aufzureinigenden Ansatz wurde das fünffache Volumen des chaotrope Ionen enthaltenden Puffers PB zugegeben und die Suspension nach dem Mischen auf die Säule aufgetragen. Während der anschließenden Zentrifugation wurden die DNA-Fragmente (größer als 40 bp) an die Säulenmatrix (Silikagelmembran) gebunden. Der Durchfluss wurde verworfen und die gebundene DNA mit 750 µl ethanolversetztem Puffer PE gewaschen. Nach dem Dekantieren des Durchflusses wurde die Silikagelmembran trocken-zentrifugiert und die Säule in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß übertragen. Die Eluation der DNA erfolgte, indem 30–50 µl Eluationspuffer EB (10 mM Tris-HCl, pH 8,5, erwärmt auf 65°C) direkt auf die Membran pipettiert und die Säule nach 1 min Inkubation abzentrifugiert wurde. Das Eluat konnte dann direkt für nachfolgende Reaktionen (Restriktionsverdau, Ligationsansatz oder Sequenzierungsreaktion) weiterverwendet oder bei -20°C gelagert werden.

II.9.2 Gelaufreinigung/-extraktion

Bei einer PCR-Reaktion entstehen unter Umständen unspezifische Nebenprodukte. Sollten amplifizierte DNA-Fragmente anschließend kloniert werden, war es in diesem Fall notwendig, die gewünschten DNA-Fragmente über eine Gelaufreinigung zu isolieren. Dies traf auch für DNA Fragmente aus Restriktionsansätzen zu.

Für die Aufreinigung wurde der gesamte 50 µl PCR-oder Restriktionsansatz in einem Agarose-Gel elektrophoretisch separiert. Die Prozentigkeit des Gels richtete sich nach der Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente (0,8% bei Fragmenten über 1000 bp bzw. 1% -1,5% bei Fragmenten unter 1000 bp). Um eine möglichst definierte Auftrennung zu erhalten, wurde bei 100 V eine Laufzeit von 1 bis 2 h eingestellt. Die gewünschte Bande wurde bei kurzer UV-Belichtung ausgeschnitten und die DNA mittels QIAquick Gel Extraction Kit nach Herstellerangaben extrahiert. Dabei wurde das ausgeschnittene Gelstück im 3-fachen Volumen des GC-Puffers für 10 min bei 50°C aufgelöst und die Suspension nach Zugabe von 1-fachem Volumen Isopropanol (100%) auf eine DNA-Bindungssäule übertragen. Die nachfolgenden Schritte (Waschen der an die Säulenmatrix gebundenen DNA, Elution) entsprach dem Protokoll von QIAGEN PCR Purification Kits (s. oben).

II.10 Klonierung von DNA-Fragmenten in Vektoren

II.10.1 Verdau der DNA mit Restriktionsendonukleasen

Für die Integration eines DNA-Fragments ins entsprechende Plasmid (Vektor) wurde dieser, sowie das zu inserierende DNA-Fragment (Insert) in jeweils 50 µl Gesamtvolumen mit Restriktionsenzymen (bis zu 20 U) im entsprechenden Puffer über Nacht sowie am folgenden Tag noch einmal für 2 Stunden geschnitten. Für die meisten Restriktionsenzyme wurden die Reaktionsansätze - soweit nicht anders vom Hersteller angegeben - bei 37°C inkubiert, bei Verwendung von *ApaI* erfolgte die Inkubation bei 25°C.

II.10.2 Dephosphorylierung des Vektors

Um eine Religation des Vektors zu vermeiden, wurden die Plasmide durch zweimalige Zugabe von je 5 U Antarktische Phosphatase (NEB) für jeweils 20 min bei 37°C dephosphoryliert. In einigen Fällen wurde der geschnittene Vektor über die Gelextraktion aufgereinigt, in 30 µl H₂O_{mol.biol.} eluiert und im Antarktischen Phosphatase Puffer (50 mM Bis-Tris-Propan-HCl, 1 mM MgCl₂, 0,1 mM ZnCl₂, pH 6,0; NEB) mit 10 U Antarktischen Phosphatase dephosphoryliert. Anschließend wurde der Ansatz für 10 min bei 70°C inaktiviert und dieser dephosphorylierte Vektor, sowie der Restriktionsansatz des Inserts, über QIAquick® PCR Purification Kit (Qiagen) aufgereinigt und in 30 - 50 µl Elutions-Puffer (10mM Tris, pH 8,5) eluiert.

II.10.3 Ligation des Vektors

Für die Abschätzung der für die Ligation benötigten Volumina wurden auf dem Agarose-TAE-Gel vom aufgereinigten Vektor und Insert jeweils 2 µl elektrophoretisch aufgetrennt und die Bandenintensität des Vektors und Inserts visuell bestimmt. Für die Ligation wurden die Volumina so gewählt, dass unter der Berücksichtigung der Größe der Fragmente das molare Verhältnis freier Enden von Vektor zu Insert 1:1 oder 1:10 betrug. Pro Ligationsansatz wurde auch ein Ansatz des dephosphoryliertem Vektors ohne Insert als Negativkontrolle pipettiert, um die Religationsrate zu bestimmen.

Die Ligation von Vektor und Insert-DNA erfolgte im T4-DNA-Ligase Puffer (NEB) mit 3 U T4-DNA-Ligase in einem Gesamtvolumen von 20 µl. Die Ligation erfolgte entweder über Nacht bei 7°C oder bei Raumtemperatur für 1 h.

II.10.4 Transformation des Ligationsansatzes in kompetente DH5 α -*E. coli*-Zellen

i) Preparation kompetenter DH5 α -Zellen

- TFB1-Puffer (30 mM KOAc; 50 mM MnCl₂; 10 mM KCl; 10 mM CaCl₂; 15 % (v/v) Glycerin)
- TFB2-Puffer (10 mM Na-MOPS, pH 7,0; 75 mM CaCl₂; 10 mM KCl; 15 % (v/v) Glycerin)

Für die Herstellung kompetenter DH5 α -Zellen wurden 500 ml LB-Medium 1:200 mit *E. coli*-Vorkultur angeimpft und bei 37°C bis zu einer OD_{600nm} von 0,6 inkubiert. Die Kultur wurde bei 3000x g (Beckmann Zentrifuge, JA-10 Rotor) für 15 min bei 4°C pelletiert und die Zellen in 100 ml TFB1-Puffer resuspendiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt bei 3000x g für 10 min bei 4°C wurde das Zellpellet in 20 ml TFB2-Puffer aufgenommen und in Aliquots bei -80°C gelagert.

ii) Transformation in kompetente Zellen

Die Transformation von *E. coli*-Stämmen erfolgte nach den Protokollen von Mandel und Higa sowie Cohen *et al.* [Higa, A and Mandel, M 1970; Cohen, SN *et al.* 1972].

Vor jeder Transformation wurde ein Aliquot kompetenter Zellen für 20 min auf Eis aufgetaut, davon jeweils 100 μ l zu jedem 20 μ l Ligationsansatz hinzupipettiert und für 20 min auf Eis inkubiert. Für die Transformation wurde der Ansatz für genau 1 min bei 42°C (Wasserbad) erhitzt. Nach dem sofortigen Abkühlen (5 min, Eis) wurde 900 μ l LB-Medium (ohne Selektionsdruck) zu den transformierten Zellen hinzupipettiert und der Ansatz für die Regeneration und Expression des integrierten Resistenzmarkers für 45 min bei 37°C und 180 rpm inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 5 sec bei 13000 rpm pelletiert und die 900 μ l Medium wieder abgenommen. Der Zellniederschlag wurde in der verbleibenden Flüssigkeit resuspendiert und auf eine LB-Agarplatte mit 100 μ g/ml Ampicillin oder 50 μ g/ml Chloramphenicol ausplattiert. Diese wurde über Nacht bei 37°C inkubiert, bis deutliche Kolonien detektiert werden konnten.

II.10.5 Selektion von rekombinanten *E. coli*-Stämmen

Zur Kontrolle der richtigen Integration des DNA-Fragments in die entsprechende Position des Plasmids, wurden die nach der Transformation gewachsenen Kolonien zum einen auf einer neuen Agarplatte vereinzelt und zur ersten Eingrenzung positiver Klone mittels der Kolonie-PCR überprüft. Zur weiteren Kontrolle wurde die richtige Insert-Integration mit Hilfe der Restriktionsanalyse bestätigt. Um Sequenzfehler des integrierten DNA-Fragments auszuschließen, wurden die isolierte Plasmid-DNA von der Firma GATC-Biotech sequenziert.

II.11 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung von Plasmid-DNA und PCR-Produkten erfolgte bei der Firma GATC Biotech, Konstanz.

Mengen:

30 μ l Plasmid-DNA (30 -100 ng/ μ l) oder 30 μ l aufgereinigte PCR-Produkt (10 – 50 ng/ μ l)

30 μ l Sequenzierungsprimer (10 μ M)

II.12 Transformation von Hefe-Zellen

II.12.1 Transformation mittels Elektroporation

- TE-Puffer (10mM Tris-HCl;1 mM EDTA; pH 7.5)
- 1M Lithiumacetat, pH7,5 (Sigma-Aldrich Chemie)
- 1M DTT (Sigma-Aldrich Chemie)

Die Transformation des *C. albicans* Wildtyp-Stamms SC5314 sowie von allen *C. dubliniensis* Stämmen erfolgte mittels Elektroporation nach dem Protokoll von Reuss *et al.* [Reuss, O *et al.* 2004].

Dazu wurden die Zellen einer YPD-Vorkultur 10^{-4} -fach in 50 ml YPD-Medium verdünnt und über Nacht bei 30°C bis zu einer OD_{600} zwischen 1,6 und 2,2 inkubiert. Nach dem Abzentrifugieren bei 2000 Upm für 2 min (Megafuge, Heraeus) wurde der Zelniederschlag in 8 ml Wasser resuspendiert, mit 1 ml TE-Puffer und 1 ml 1 M Lithiumacetat versetzt und für 1 h geschüttelt. Eine weitere Inkubation für 30 min bei 30°C erfolgte nach Zugabe von 250 μ l 1 M DTT. Nach Zugabe von 40 ml ddH₂O wurde der Ansatz bei 4°C (Heraeus Megafuge fresco) und 2000 Upm für 2 min pelletiert und die kompetenten Zellen anschließend mit 25 ml eiskaltem H₂O und 5 ml eiskaltem 1 M Sorbitol gewaschen, im restlichen Sorbitol resuspendiert und bis zur Verwendung auf Eis gehalten. 40 μ l der Zellsuspension wurden in zuvor mit 0,5%-iger Natrium-Hypochloritlösung und 70% EtOH gewaschenen Elektroporationsküvetten (0,4 cm Elektrodenabstand) überführt, mit 7,5 - 15 μ l des zu transformierenden DNA-Konstrukts (entspricht etwa 0,75 - 1,5 μ g geschnittenem Plasmid) versetzt und zur Anlagerung der DNA an die Zelloberfläche für 10 min auf Eis inkubiert. Nach der Elektroporation (MicroPulser™, Bio-Rad GmbH) mit einem elektrischen Puls von 1,5 kV (vorprogrammierte Einstellung „Fungi“) und einer Pulsdauer von ca. 5,5 ms wurden die Zellen in 1 ml eiskaltem 1 M Sorbitol aufgenommen,

die Zellsuspension in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und für 2 min bei 2000 Upm zentrifugiert (Heraeus Biofuge). Das Zellpellet wurde in 1 ml YPD-Medium aufgenommen und zur Expression der Resistenz gegen Nourseothricin für 4 Stunden bei 30°C inkubiert. Nach dem Pelletieren der Zellen wurden 900 µl der Überstandes abgenommen, die Zellen in den verbleibenden 100 µl resuspendiert und auf YPD-Platten supplementiert mit 200 µg/ml Nourseothricin (YPD-Nou^{200µg/ml}) ausgestrichen. Die Platten wurden bei 30°C inkubiert, bis deutliche Kolonien sichtbar waren.

II.12.2 Transformation nach Lithium-Acetat-Methode

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

Bei Stämmen, die sich - wie die *efg1Δ*-Deletionsstämme - mittels Elektroporation nicht transformieren ließen, wurde eine modifizierte Lithium-Acetat-Methode für die Transformation verwendet [Braun, BR and Johnson, AD 1997], wobei die Zellen nach Zugabe der zu transformierenden DNA über Nacht bei 30°C rotiert wurden.

Etwa 10 µg der Transformationskassetten (entspricht ca. 10 µl Plasmid-DNA im 100 µl Restriktionsansatz) wurden für die Transformation mittels der Lithium-Acetat-Methode verwendet. Dazu wurden 10 ml YPD-Medium 1:100 mit einer Vorkultur angeimpft ($OD_{600} \sim 0,05$) und die Kultur bis zu einer OD_{600} von ca. 0,2-0,3 wachsen gelassen. Dann wurden die Zellen 2 min bei 800 x g (2000 Upm, Heraeus Biofuge) zentrifugiert, der Niederschlag mit Lithiumacetat-Puffer gewaschen und die Zellen anschließend in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Es wurden 10 µl 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 zur Anlagerung der DNA an die Zellwände die Zellen über Nacht bei 30°C rotiert. Am nächsten Tag erfolgte der Hitzeschock durch Inkubation der Zellen für 1 h bei 42°C im Wasserbad. Anschließend wurden die Zellen wie bereits beschrieben zentrifugiert, mit 1 ml TE-Puffer gewaschen und zur Expression des Resistenzmarkers für 4 h in YPD (ohne Nourseothricin) unter Schütteln (160 rpm; 30°C) inkubiert. Dann wurden die Zellen pelletiert, 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 ein Selektionsmedium vereinzelt.

II.13 Nachweis spezifischer DNA-Sequenzen mittels Southern Blot-Analyse

II.13.1 DNA-Transfer

- 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)
- SSC-Puffer (20-fach und 2-fach)

Die genomische Konstitution der *Candida*-Stämme wurde mittels Southern Blot-Analyse überprüft. Etwa 20 µg genomischer DNA wurden über Nacht mit bis zu 20 U Restriktionsenzym und am nächsten Tag noch einmal für 2 h mit gleicher Menge Enzym in 40 µl Gesamtvolumen geschnitten. Nach Zugabe von 6-fach DNA-Ladepuffer wurden die geschnittene DNA-Fragmente für 2 h bei 100 V und 400 mA in einem 0,8%-igen TAE-Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Qualität der Fragmentierung wurde mittels UV-Belichtung kontrolliert.

Die Übertragung der DNA auf eine Nylonmembran (Hybond-N, GE Healthcare) erfolgte mit Hilfe eines Kapillar-Blots. Dafür wurde das Gel zunächst folgender Vorbehandlung unterzogen:

i) Depurinierung

Das Gel wurde zunächst für 10 min vorsichtig im Depurinierungspuffer geschwenkt, um die N-glykosidischen Bindung zwischen der Desoxy-Ribose im Zucker-Phosphat-Gerüst und einer Purin-Base (Adenin oder Guanin) zu hydrolysieren und auf diese Weise Strangbrüche in der DNA zu erzeugen. Dieser Schritt war essentiell, um DNA-Fragmente über 5 kb-Länge effizient auf die Membran transformieren zu können. Vor dem nächsten Schritt wurde das Gel kurz mit Wasser gewaschen.

ii) Denaturierung

Die Trennung der ds-DNA in Einzelstränge erfolgte während der 30 min-Inkubation des Gels unter Schütteln im Denaturierungspuffer. Der Vorgang der Denaturierung fand aufgrund des hohen Salzgehalts und des basischen pHs statt. Diese Einzelstrang-DNA war für die anschließende Hybridisierung mit radioaktiv markierter Sonde geeignet.

iii) Neutralisierung

Durch die Inkubation des Gels für 30 min unter Schütteln im Neutralisierungspuffer wurde der stark alkalische pH-Wert des Gels neutralisiert. Dieser Neutralisierungsschritt steigerte die Bindungsfähigkeit der DNA an die Nylonmembran. Durch die hohe Salzkonzentration im Puffer wurde jedoch eine Renaturierung der DNA-Einzelstränge verhindert.

Für den Transfer der DNA-Fragmente aus dem Gel auf die Nylonmembran, wurde dieses mit seiner Oberseite nach unten luftblasenfrei auf einen passend zugeschnittenen Stapel aus Filterpapier (Whatman, VWR) gelegt, der zur Hälfte in Transferpuffer (20-fach SSC-Puffer) getaucht war. Darauf wurde eine zuvor im Wasser äquilibrierte, passend zugeschnittene Nylonmembran gelegt, ebenfalls unter Vermeidung von Luftblasen zwischen Gel und Membran. Bei diesem Vorgang wurde darauf geachtet, dass die Membran nur einmal in der entsprechenden Position auf das Gel aufgelegt wurde, da der DNA-Transfer bereits beim ersten Kontakt stattfindet. Die Membran wurde am Rand mit Parafilm abgedeckt, um zu gewährleisten, dass der Transferpuffer ausschließlich durch das Gel und die Membran strömt und anschließend mit 3 weiteren Filterpapieren – ebenfalls im Transferpuffer getränkt – überdeckt. Nach dem Auflegen eines etwa 5-7 cm hohen Stapels Papiertücher wurde der Blot mit einem Gewicht von ca. 500 g beschwert.

Über Kapillarkräfte, die ein Strömen des Transferpuffers aus dem Reservoir in die Papiertücher bewirken, wurde die DNA dann über Nacht aus dem Gel auf die Nylonmembran übertragen. Diese durch elektrostatische Wechselwirkungen immobilisierte DNA wurde am nächsten Tag durch zweimalige Bestrahlung mit 120 mJ/cm² UV-Licht (Stratalinker®, Stratagene) kovalent auf der Membran gebunden. Die Membran wurde anschließend mit 2-fach SSC-Puffer gewaschen und bei RT getrocknet. Die trockene Membran wurde in Folie eingeschweißt und bei -20°C bis zur Verwendung gelagert.

Die genomische Konstitution der Transformanten wurde durch die Hybridisierung der Membran mit radioaktiv markierten DNA-Fragmenten überprüft.

II.13.2 Hybridisierung mit radioaktiv-markierten DNA-Fragmenten

- Church-Puffer (7% (w/v) SDS; 1% (w/v) BSA; 1 mM EDTA; 250 mM Na-Phosphat-Puffer, pH 7,2)
- 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)
- 0,1-fach SSC-Puffer/1% SDS (w/v)

i) Radioaktive Markierung der DNA-Fragmente

Die Herstellung radioaktiv markierter Sonden erfolgte mittels des PRIME-IT® II Random Primer Labeling Kits (Stratagene). 4,5 µl der entsprechenden Amplifizierungs-Reaktion (Sonden-PCR) wurden mit 5 µl von zufällig bindenden 9mer-Oligonukleotiden im 20 µl Gesamtvolumen für 5 min bei 95°C inkubiert und die Reaktion anschließend auf Eis gestellt. Die Markierung der Fragmente erfolgte nach Zugabe von 5 µl 5x Puffer (ohne dCTP!) und 2,5 µL (25 µCi) 5'-(α-³²P)-dCTP mit 5 U Exo(-) Klenow-Enzym für 10 min bei 37°C. Nicht eingebaute Nukleotide wurden mittels Sephadex-Säulenchromatographie (ProbeQuant™ G-50 Micro Columns, GE Healthcare) abgetrennt. Dabei wird die radioaktiv-markierte Probe auf die vorbereitete Resin-Säule (1 min, 3700x g; im 1,5 ml-Gefäß) zugegeben. Nach der 2 min Zentrifugation bei 3700x g befindet sich die markierte Sonde im 1,5ml-Gefäß und kann entweder bei -20°C gelagert werden oder sofort für die Hybridisierung verwendet werden.

ii) Hybridisierung

Die Hybridisierung der markierten Sonde an die auf der Nylonmembran immobilisierten genomischen DNA erfolgte nach der Vorinkubation der Membran für 1 h bei 65°C im 12 ml des vorgewärmten Church Puffers. Die Hybridisierung erfolgte dann im frischen Church-Puffer (10-12 ml) über Nacht bei 65°C im Hybridisierungssofen. Nach dem zweimaligen Waschen der Membran mit 12 ml 1-fach SSC-Puffer / 0,1% SDS (w/v) und einmaligen Inkubieren im 0,1-fach SSC-Puffer/1% SDS (w/v) für 15 min bei 65°C wurde die Membran eingeschweißt und anhand filmloser Autoradiografie (MS Phosphorbildplatten, Fujifilm) für ca. 4 – 16 h (abhängig von der Radiaktivitätsintensität) exponiert. Die Auswertung erfolgte mit Fluoreszenz-Laser-Scanner FLA 5100 (Fuji) bei einer Anregungswellenlänge von $\lambda=635\text{nm}$ und dem IP-Filter detektiert. Die Auflösung, mit der Platten eingescannt worden sind, war 100 µm bei 16 bit/Pixel.

II.14 Nachweis spezifischer RNA-Sequenzen über Northern Blot-Analyse

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

RNase-Kontaminationen in den verwendeten Puffern wurden durch das Versetzen des verwendeten Wassers mit 0,1% (v/v) Diethylpyrocarbonat (DEPC) vermieden. DEPC ist ein sehr starker RNase-Inhibitor, der vorhandene RNasen durch kovalente Modifikation der Histidin-Reste inaktiviert. Durch das Autoklavieren zerfällt die Chemikalie in Ethanol, CO₂ und Wasser.

II.14.1 Denaturierendes Agarosegel zur Auftrennung von RNA

Die Auftrennung der RNA erfolgte elektrophoretisch in einem denaturierenden 1%-igen Agarosegel entweder für 4 – 5 h bei 40 Volt oder für 16 h bei 12 Volt. Dazu wurde 1 g Agarose in 72 ml DEPC-H₂O aufgekocht 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 dem Erhärten des Gels wurde die Kammer in einen ebenfalls mit RNase-ZAP gereinigten Laufbehälter platziert und mit 1-fach MOPS-Puffer überschichtet.

II.14.2 Probenvorbereitung

10 – 15 µg RNA wurden im 10 µl Volumen (mit DEPC-H₂O) mit 30 µl Ladepuffer versetzt und zur Denaturierung für 15 min bei 55°C inkubiert. Die Proben wurden anschließend 10 sec zentrifugiert und auf das Gel aufgetragen.

II.14.3 Qualitätskontrolle

Die Integrität der präparierten RNA sowie die Qualität der Auftrennung erfolgte durch die Dokumentation des Gels bei UV-Belichtung. Als interne Marker dienten die durch Einlagerung von Ethidiumbromid sichtbaren Banden der 28S- und der 18S-rRNA.

II.14.4 Kapillarblot- Transfer der RNA auf die Membran

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 an die Nylonmembran erfolgte unter denselben Bedingungen und mit dem gleichen apparativen Aufbau wie für die Southern Blot-Analyse (siehe oben).

Die Membran wurde je nach Bedarf in UV-durchlässige Plastikfolie eingeschweißt und bei –80°C aufbewahrt.

II.15 Nachweis spezifischer mRNA-Sequenzen über quantitative Real Time Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR)

Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (*real-time PCR*, RT-PCR) beruht auf der herkömmlichen Polymerasekettenreaktion (PCR), erlaubt aber die Quantifizierung der vervielfältigten DNA-Fragmente in unterschiedlichen Bedingungen durch Fluoreszenz-Messungen, die während jedes Zykluses der PCR – also in Echtzeit – vorgenommen werden. Für quantitative Analysen wurde das Universal Probe Library (UPL)-System von Roche verwendet. Das System basiert auf der Verwendung einer zweifach-markierten, 8-9 nt langen Hydrolysierungssonde (Probe), deren Spezifität und hohe Schmelztemperatur T_m durch den Einbau von DNA-Nukleotid-Analoga LNA (Locked Nucleic Acid) erreicht wird. Die Fluoreszenz wird am 5'-Ende durch den Einbau von Fluorescein (FAM) ermöglicht, während am 3'-Ende ein dunkler Quencher-Farbstoff eingebaut wird, der das Fluoreszenzsignal supprimiert [Petersen, M and Wengel, J 2003]. Durch die 5'-Nuklease-Aktivität der DNA-Polymerase wird bei jedem Amplifikationszyklus zunehmend markierte Hydrolysierungssonde gespalten, wodurch der Quencher und das Fluoreszenzmolekül freigesetzt wird, der bei einer entsprechender Anregung eine messbare Fluoreszenz emittiert.

II.15.1 Synthese komplementärer DNA (cDNA)

Je nach Experiment wurden 500 - 1000 ng RNA für die Synthese der komplementären DNA mittels des Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit (Roche, Mannheim) verwendet. Dafür wurde die entsprechende Menge an RNA zunächst in Gegenwart der im Kit enthaltenen Anchored-Oligo(dT)₁₈-Primer (Endkonzentration: 2,5 μ M) für 10 min bei 65°C denaturiert und die Reaktion sofort auf Eis gestellt. Die Synthese der cDNA erfolgte im 20 μ l Reaktionsvolumen mit 1x Reverse Transkriptase Puffer (mit 8 mM MgCl₂ als Endkonz.), 20 U Protector RNase Inhibitor, 1 mM dNTP-Mix, 5 mM DTT und 10 U Transcriptor High Fidelity Reverse Transkriptase für 30 min bei 50°C, mit einem abschließenden Denaturierungsschritt von 5 min bei 85°C. Die synthetisierte cDNA wurde bis zur Verwendung bei -20°C aufbewahrt.

II.15.2 quantitative RT-PCR (qRT-PCR)

i) Assay-Design und Bestimmung der Effizienz

Für jedes zu analysierende Gen wurde mit Hilfe des *Universal ProbeLibrary Assay Design Centers* (<https://www.roche-applied-science.com>) eine geeignete Kombination von UPL-Sonde und Oligonukleotiden ausgesucht (**Tabelle 8 und 9**). Die dafür benötigten Oligonukleotide wurden von der Firma TIB Molbiol, Berlin synthetisiert und über HPLC aufgereinigt. Die

Bestimmung der Effizienz des entsprechenden Assays und somit der Kinetik der genspezifischen Amplifikation erfolgte durch die Erstellung einer Standardkurve. Dabei wurde von der entsprechenden cDNA einer Bedingung, in der eine Expression des Gens stattfindet, eine serielle Verdünnungsreihe mit mindestens 5 Verdünnungsstufen (Verdünnung zwischen 10^{-1} und 10^{-5}) angefertigt und jeweils in Triplikaten mittels des LightCycler®480 amplifiziert. Statt der cDNA diente $H_2O_{mol.biol}$ als Negativkontrolle. Über die ermittelten Cp-Werte (Crossing Point) jedes Verdünnungsansatzes konnte über die Steigung der Regressionsgerade die Effizienz des jeweiligen Assays bestimmt werden.

ii) qRT-PCR

Quantitative Real Time PCR-Experimente erfolgten in 96 well-Platten (Light Cycler 480 Multiwell Plate 96, Roche) im 20 µl Reaktionsvolumen mit 1x Light Cycler 480 Probes Master (Roche) mit jeweils 0,2 µM *forward* und *reverse*-Oligonukleotid sowie mit 0,2 µM einer bestimmten Hydrolysierungssonde des *Universal ProbeLibrary Set, Human* (UPL-Sonden # 1 – 90) oder des *Universal ProbeLibrary Extension Set* (UPL-Sonden # 91 – 165). Jeweils 2 µl von der - entweder 1:10 (bei 500 ng) oder 1:20 (bei 1 µg Ausgangs-RNA) - verdünnter cDNA- Matrize wurde zu jedem Ansatz hinzupipettiert. Alle Reaktionen wurden mindestens in Duplikaten durchgeführt. Als Negativkontrolle wurden die entsprechenden Reaktionen mit Wasser statt mit cDNA durchgeführt. Vor der Amplifikation wurde die PCR-Platte mit einer Folie (Light Cycler 480 Sealing Foil, Roche) versiegelt und für 2 min bei 600 Upm zentrifugiert (Heraeus Megafuge).

Die Amplifikation erfolgte nach folgendem Programm: 95°C für 5 min, 40-60 Zyklen bestehend aus 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.

iii) Auswertung

Für relative Quantifizierungen der cDNA-Menge eines bestimmten Gens unter unterschiedlichen Bedingungen diente zur Normalisierung der eingesetzten cDNA-Menge ein nicht-reguliertes Referenzgen. Dieser war je nach *Candida*-Art oder Bedingung entweder das Gen *RDN18* (sowohl für *C. albicans* wie auch *C. dubliniensis*) oder *ENO1* (für *C. albicans*). Die Bestimmung des Expressionsniveaus erfolgte nach der „2nd derivative max“-Methode mittels der Light Cycler Software1.5.

II.16 *Candida albicans* DNA-Mikroarrays

Die Validierung der Expressionsdaten aus der *MESSAGE*-Technologie erfolgte mithilfe der genomweiten *Candida albicans* DNA-Mikroarrays bestehend aus spezifischen Sonden für 7231 ORFs des Assembly 6 der Stanford *C. albicans* Genomdatenbank (<http://www-sequence.stanford.edu/group/candida/>) [Sohn, K *et al.* 2003]. Die Herstellung der Mikroarrays erfolgte durch das Spotten der PCR-amplifizierten, aufgereinigten DNA-Fragmenten auf Aminosilanbeschichtete Objektträger (Nexterion Slides A+) und ihre kovalente Bindung an die Oberfläche durch UV-Bestrahlung [Hauser, NC *et al.* 2009].

II.16.1 Markierung der cDNA mit Fluoreszenz-Farbstoffen

Das Labeling der cDNA während der Reversen Transkription erfolgte durch den Einbau der fluoreszenzmarkierten Cy5- oder Cy3-dUTP (GE Healthcare/Amersham) nach der Anleitung des LabelStar Kits von Qiagen. Dazu wurden 25 µg Gesamt-RNA einer Wachstumsbedingung auf 18 µl mit RNase-freiem Wasser aufgefüllt und mit 2 µl Denaturation Solution Plus versetzt. Dieser Ansatz wurde zur Denaturierung der Sekundärstruktur für 5 min auf 65°C erhitzt und danach sofort auf Eis gestellt. Der Reaktionsansatz wurde mit 5 µl des 10-fach Puffer RT, 5 µl des 5 mM dNTPs-Mix, 5 µl des 20 mM Oligo-dT-Primers, 0,5 µl des RNase Inhibitors (40 Units/µl), 1 µl Cy3- oder Cy5-dUTP und 2,5 µl LabelStar Reverse Transcriptase im 50 µl Volumen versetzt und der Ansatz bei 37°C für 120 min inkubiert. Die Reaktion wurde durch die Inkubation auf Eis gestoppt. Die Ansätze wurden über MinElute Spin Säulen (Roche) aufgereinigt und in 20 µl EB-Puffer eluiert. Die Reaktionsansätze aus zwei unterschiedlichen Bedingungen (mit unterschiedlichen Farbstoffen markiert) wurden anschließend vereinigt und für die Hybridisierung verwendet. Um ein heterogenes Einbau und die unterschiedliche Fluoreszenzintensität der Cy-Farbstoffe verrechnen zu können, wurde dieselbe RNA in zwei unterschiedlichen Ansätzen sowohl mit dem Cy3- wie mit Cy5-dUTPs versetzt (Dye-Swap).

II.16.2 Hybridisierung der Slides

Die beiden vereinigten Eluate (40 µl) wurden mit 13 µl 20 x SSC und 6,5 µl 1% SDS versetzt und nach der Denaturierung bei 100°C für 3 min zur Hybridisierung der Mikroarrays verwendet. Die Hybridisierung erfolgte in der Hybridisierungskammer bei 65°C im Wasserbad für 16 - 20 h. Die Slides wurden gewaschen und anschließend mit einem Epifluoreszenzscanner (Array Worx, Applied Precision) im Cy3- und Cy5-Kanal ausgelesen. Die einzelne Intensität der Spots wurde im 16-bit-Format als TIFF-Bilder gespeichert.

II.16.3 Auswertung der Mikroarrays

Die Quantifizierung der Spots und die Überlagerung der beiden Kanäle erfolgten mit der AIDA Image Analyzer Software (Raytest, Straubenhardt). Die Analyse der Datenqualität, Normalisierung und statistische Auswertung wurde mit dem M-CHIPS Auswertungspaket (<http://www.dkfzheidelberg.de/tbi/services/mchips>) durchgeführt. Die dargestellten Ergebnisse entsprachen dem Median aus zwei technischen Replikaten mit jeweils zwei Spot-Replikaten pro DNA-Mikroarray und dem jeweiligen Dye-Swap.

II.17 5'-RACE (Rapid Amplification of 5'-cDNA-Ends)

Die Synthese der cDNA für 5'-RACE-Experimente erfolgte nach dem Erststrang cDNA Synthese Protokoll, das unter *MESSAGE* beschrieben ist. 5 µl der 1:10 verdünnter cDNA wurde im 100 µl RACE-PCR Ansatz mithilfe des Advantage 2 PCR Protokolls für Long-Distance (LD-) PCR (Takara Bio Europe/Clontech) durchgeführt (vgl. Material und Methoden, II.20.1, *ii*).

Für die 5'-RACE-PCR-Reaktion wurde der A2-Sau3A- und ein genspezifischer Oligonukleotid, das möglichst in der Nähe des 3'-Endes der kodierenden Sequenz bindet, verwendet. Das Amplifikationsprotokoll war wie folgt: 27 bis 30 Zyklen einer Denaturierung bei 94°C für 30sec, Hybridisierung der Oligonukleotide bei 68°C für 30 sec und dem Extensionschritte bei 72°C für 1 min. Jeweils ein Aliquot aus den PCR-Ansätzen wurde im 1,5 % TAE-Agarosegel auf die Synthese eines spezifischen Produkts überprüft. Positive Ansätze wurden über die Säulen des QIAquick PCR Purification Kit aufgereinigt und im 30 µl Volumen eluiert. Anschließend wurde das aufgereinigte 5'-RACE PCR Produkt von der GATC Biotech GmbH, Konstanz sequenziert.

II.18 Bestimmung des Adhäsionsverhaltens der *Candida*-Stämme

Das Adhäsionsverhalten von *C. albicans* und *C. dubliniensis*-Wildtyp- sowie von der *mom1Δ*-Deletions- und Reversionsstämmen an verschiedenen Oberflächen wurde in quantitativen Adhäsionstests über einen Zeitverlauf unter Verwendung eines *in vitro*-Modells, dass für die Quantifizierung der Adhäsion von *C. albicans* etabliert worden ist, untersucht [Sohn, K *et al.* 2006; Sohn, K and Rupp, S 2009].

Für die Quantifizierung des Adhäsionsverhaltens der verschiedenen *Candida*-Stämme wurden humane colorectale Karzinom- (Caco-2), vulvovaginale Epithel- (A431) oder Mundschleimhautzellen (TR146) in 24 *well*-Platten überführt (2×10^5 Zellen pro *well*) und bis zu 100%-konfluentem Wachstum für 2 Tage bei 37°C, 5% CO₂ inkubiert. Nach dem Waschen der Zellen mit PBS-Puffer wurden 250 µl D-MEM-Medium supplementiert mit 10% FCS und 1 mM Natriumpyruvat zu den Zellen hinzugefügt. Für die Untersuchung des Adhäsionsverhaltens auf Polyesteroberfläche wurden 250 µl Medium in leere *wells* (ohne Zellen) pipettiert.

Für die Infektion der verschiedenen Oberflächen wurden über-Nacht-Kulturen der verschiedenen *Candida*-Stämmen 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 der Zentrifugation bei 3000 x g für 3 min wurden die *Candida*-Zellen in 10 ml supplementiertem D-MEM aufgenommen und auf eine Konzentration von 6×10^3 -Zellen/ml verdünnt. Für die Infektion wurden 50 µl dieser Verdünnung in jedes *well* gegeben (entspricht ca. 300 *Candida*-Zellen). Als Ausgangsgröße für die Gesamtzahl nicht-adhärenter Zellen zum Zeitpunkt $t = 0$ wurde der Überstand der Infektionskultur direkt nach der Infektion mit den *Candida*-Zellen abgenommen und die Kolonien nach 1 – 2 Tage Inkubation auf YPD-Medium mit Ampicillin ausgezählt. Zu verschiedenen Zeitpunkten der 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 ausplattiert. Nach dem 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 zur Kolonienbildung auf YPD-Medium mit Ampicillin ausplattiert. Die betreffenden Platten wurden nach Inkubation bei 30°C über Nacht ausgezählt.

II.19 Real-Time Impedanz-Messung von humanen Zellen nach *Candida*-Infektion mit dem xCELLigence RTCA System

Das xCELLigence RTCA System (Roche Applied Science, Mannheim und ACEA Biosciences, San Diego, USA) basiert auf einer kontinuierlichen Messung der elektrischen Impedanz und bietet eine innovative Möglichkeit Zellvorgänge wie Adhäsion, Proliferation, Zellausbreitung oder den Zelltod in Echtzeit zu messen und zu quantifizieren. Dadurch kann die Reaktion der humanen Zellen auf die Infektion mit verschiedenen *Candida*-Stämmen beobachtet und anhand der Zellindex-Änderung das Invasionsverhalten der Hefezellen gemessen werden.

Das System besteht aus 4 Hauptkomponenten: dem Real-Time Cell Analyzer (RTCA) Computer mit integrierter Software, dem RTCA Analyzer, der RTCA Single Plate (SP)-Station zur Signaldetektion und der E-Platte 96 (einer Standard 96-Well-Platte mit Glasboden, deren Well-Oberfläche zu ca. 80% mit Kapillar-Goldelektroden bedeckt ist), die dadurch eine relativ gleichmäßige Verteilung des elektrischen Feldes und eine maximale Sensitivität der Zelloberflächen-Detektion ermöglichen. Die Spannung, die an den Elektroden während der RTCA-Messung angelegt wird, liegt bei etwa 20 mV, die Impedanz wird bei 3 unterschiedlichen Frequenzen (10, 25 oder 50 kHz) gemessen. Diese ist abhängig von der Elektrodengeometrie sowie von der lokalen Ionen-Konzentration an der Grenzfläche zwischen Elektrode und (Puffer-) Lösung/Medium. Für die Bestimmung des Ausgangswerts wurde die Impedanz der *wells* nur mit dem Medium aufgenommen. Adhärenente Zellen wirken als Isolatoren, die die Ionen-Konzentration an der Grenzfläche lokal ändern und auf diese Weise die Impedanz erhöhen. Proliferation oder die Ausbreitung der Zellen auf der Elektrode führen zur weiteren Impedanzänderung, die vom xCELLigence System in einem dimensionslosen Parameter, dem sog. Zellindex ZI, angegeben wird. Berechnet wird der Zellindex nach der Formel: $ZI = (Z_i - Z_o) / 15$. Z_i ist die Impedanz zu einem individuellen Zeitpunkt des Experiments, wohingegen Z_o den Messwert des reines Mediums (ohne Zellen) als Hintergrundwert beschreibt (gemessen vor der Zellaussaat). Der Wert 15 entspricht dem angelegten Widerstand in Ohm.

Für die Analyse des Invasionsverhaltens verschiedener *Candida*-Stämme wurden 2×10^4 Epithelzellen (A-431 oder TR146) pro 96er-*well* ausgesät und bis zum konfluenten Wachstum bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Die Zelladhäsion und -ausbreitung wurde in jedem *well* über den gesamten Zeitverlauf mittels RTCA gemessen. Bei dieser Zellzahl war ab der 22-ten Stunde keine Impedanz-Zunahme detektierbar, was auf Konfluenz der Zellen hindeutete. Nach 24 h wurde das Zellkulturmedium abgenommen und die Epithelzellen mit einem MOI von 1 (also

2×10^4) *Candida*-Zellen in 100 μ l D-MEM-Medium mit 10% FCS und 1 mM Natriumpyruvat infiziert. Die untersuchten Hefestämme waren sowohl der *C. albicans* Wildtyp SC5314 und der *efg1 Δ* -Deletionsstamm HLC52, sowie die *C. dubliniensis* Stämme CD36 (Wildtyp), DBL64 (*mom1 Δ /mom1 Δ*) und DGL122 (*mom1 Δ /MOM1*). Zur Kontrolle wurden die entsprechenden Epithelzellen nur mit dem Zellkulturmedium versetzt. Jede Analyse erfolgte in 3 unabhängigen Replikaten. Die Messung der Impedanz in jedem *well* fand während der nachfolgenden 20 h automatisch alle 5 Minuten statt. Zur Visualisierung der Reaktion der humanen Zellen auf die Infektion mit verschiedenen *Candida*-Stämmen wurde aus den 3 einzelnen ZI-Datenpunkten der Mittelwert berechnet und im Graph dargestellt. Um geringfügige Unterschiede des Zellindex z. B. durch minimale Ungleichheiten der Zellzahl auszugleichen, wurde der Wert bei 22 h vor der *Candida*-Zugabe auf 100 gesetzt und als normalisierter Zellindex-Wert angegeben. Der entsprechende Ausschlag bei 24 h entsprach dem Zeitpunkt bei dem die Epithelzellen mit den *Candida*-Stämmen infiziert worden sind. Dieser kommt durch die Herausnahme der Platte von 37°C auf die Raumtemperatur zustande, was zur kurzfristigen Änderung der Zellmorphologie und somit zur Impedanzänderung führte.

II.20 Multidimensional Electrophoretic System of Separation for the Analysis of Gene Expression (*MESSAGE*)

Die *MESSAGE*-Technologie setzt sich hauptsächlich aus drei Schritten zusammen, die schematisch in **Abbildung 7** dargestellt sind. Ausgehend von Gesamt-RNA werden mithilfe der Reversen Transkription und PCR-Reaktionen zuerst definierte 3'-ds-cDNA-Fragmente hergestellt (Schritt I: Probenvorbereitung), die anschließend hochauflösend mittels zweidimensionaler DNA-Gelelektrophorese aufgetrennt werden (Schritt II: Zweidimensionale Auftrennung). Die elektrophoretische Separation der ds-cDNA erfolgt dabei nach zwei unabhängigen Kriterien. In der ersten Dimension findet eine Auftrennung nach Molekulargewicht und in der zweiten nach dem entsprechenden GC-Gehalt statt. Nach qualitativer und/oder quantitativer Auswertung werden interessante DNA-Fragmente (Spots) aus der Gelmatrix eluiert, reamplifiziert und anschließend zur Identifikation sequenziert (Schritt III: Auswertung und Identifikation).

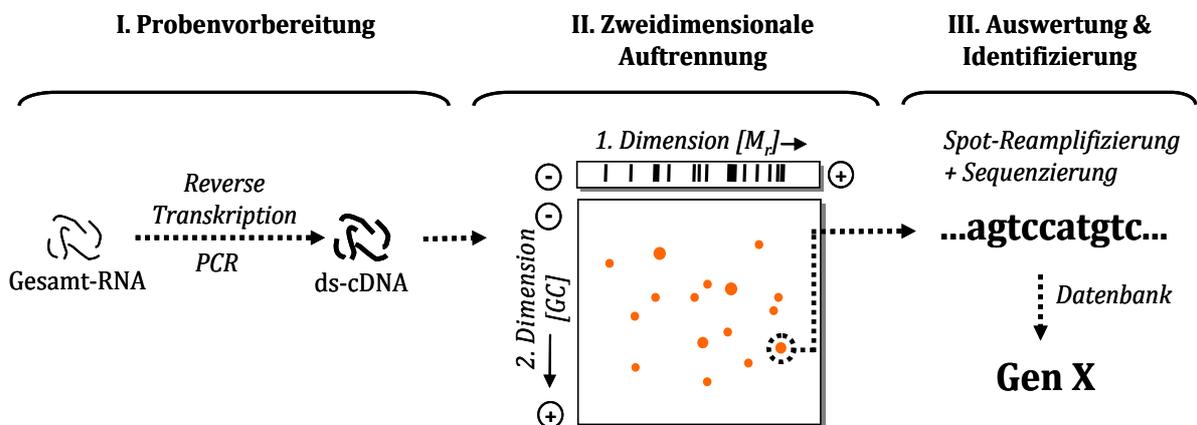


Abbildung 7: Schematische Übersicht der *MESSAGE*-Technologie.

Während der Probenvorbereitung wird die RNA zuerst in cDNA- und anschließend zu ds-cDNA umgeschrieben. Durch die Fragmentierung der ds-cDNA mittels des Restriktionsenzym *RsaI* werden so definierte Fragmente synthetisiert und anschließend mittels PCR vervielfältigt. Im zweiten Schritt werden diese ds-cDNA-Fragmente zweidimensional nach dem Molekulargewicht und GC-Gehalt aufgetrennt. Die Visualisierung der Fragmente erfolgt durch die Färbung des Gels mittels des Fluoreszenzfarbstoffs SYBR Gold. Interessante Fragmente werden aus dem Gel ausgeschnitten und nach Reamplifizierung zur Identifikation sequenziert. Ein Homologievergleich der Sequenz mit bereits bestehenden Datenbanken ermöglicht die Identifizierung des entsprechenden Fragments.

II.20.1 Probenvorbereitung

i) Erststrang-cDNA Synthese

Für die Erststrang-cDNA-Synthese wurde in einem RNase-freiem Reaktionsgefäß 1-3 µl RNA (standardgemäß 1,0 µg Gesamt-RNA, durch minimale Veränderungen im Protokoll (s. u.) konnte die RNA-Konzentration bis auf 10 ng reduziert werden) mit jeweils 10 µM SMART IV- und ODD_T_all-Oligonukleotid versetzt und die Reaktion auf ein Gesamtvolumen von 5 µl mit DEPC-Wasser aufgefüllt. Zur Denaturierung der RNA-Sekundärstruktur wurde der Ansatz 2 min bei 72°C inkubiert und dann sofort für 2 min auf Eis abgekühlt. Anschließend wurden 2 µl des 5 x Erststrang Puffer (250 mM Tris-HCl, pH 8,3; 30 mM MgCl₂; 375 mM KCl), 1 µl 20 mM DTT, 1 µl 10 mM dNTP Mix und 100 Units der PrimeScript Reverse Transkriptase (Clontech-Takara Bio Europe) hinzugegeben und die Komponenten durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren gemischt. Die Reverse Transkriptase-Reaktion erfolgte für 1 h bei 42°C und wurde durch die Überführung auf Eis gestoppt.

Diese Erststrang-cDNA konnte entweder direkt in die Zweitstrangsynthese eingesetzt werden oder wurde bei -20°C bis zu 3 Monaten gelagert.

ii) Zweitstrang (ds-cDNA)- Synthese mittels Long Distance (LD)- PCR

Die Zweitstrangsynthese erfolgte nach dem Advantage 2 PCR Protokoll für Long Distance (LD)- PCR. Im 100 µl Gesamtvolumen wurden 2 µl Erststrang-cDNA, 80 µl molekularbiologisches H₂O, 10 µl 10x Advantage 2 PCR Puffer, 2 µl 50x dNTP Mix (jeweils 10 mM), 2 µl A2-Sau3A und 2 µl ODD_T_all-Primer (10 pmol) mit 2 µl 50x Advantage™ 2 Polymerase Mix zusammengegeben, kurz gevortext und damit anschließend eine Long Distance (LD) - PCR durchgeführt. Während des Hot Starts der PCR denaturierte bei 95°C für 25 sec neben der Sekundärstruktur der ss-cDNA auch der an die DNA-Polymerase gebundene Antikörper. Im anschließenden Reaktionschritt bei 68°C für 6 min fand sowohl die Hybridisierung der Oligonukleotide wie auch die Elongation der cDNA statt. Bei 95°C für 5 sec denaturieren die synthetisierten DNA-Hybride für eine weitere Elongationsrunde bei 68°C. Nach diesen insgesamt 2 PCR-Zyklen wurden auf diese Weise hauptsächlich Voll-Längen ds-cDNAs synthetisiert, die für den cDNA-Fingerprint eingesetzt werden konnten.

Sollte die ds-cDNA zusätzlich amplifiziert werden (z. B. wenn weniger als 1 µg Gesamt-RNA in der Erstrang cDNA-Synthese eingesetzt wurde), wurde während der LD-PCR die Zyklenanzahl der Ausgangsmenge angepasst. So wurde die Anzahl der PCR-Runden bei 10 ng Ausgangs-RNA auf 10 erhöht.

PCR-Programmablauf für die LD-PCR (Hot Start):

1.	95°C	0:20 min	}	→	2 Zyklen für die ds-cDNA-Synthese
2.	95°C	0:05 min			
3.	68°C	6:00 min			
				→	5-21 Zyklen zur ds-cDNA-Amplifikation

iii) Aufreinigung der ds-cDNA

Die Aufreinigung der ds-cDNA erfolgte nach dem bereits beschriebenen Protokoll der Säulenaufreinigung über QIAquick™ PCR Purification Kit von Qiagen (s. Material und Methoden, II.9.1). Die Elution der DNA erfolgte, indem 96 µl (50 µl + 46 µl) des Eluationspuffer EB (10 mM Tris-HCl, pH 8,5) direkt auf die Membranmitte aufgetragen und die Säule nach jeweils 1 min Inkubation zentrifugiert wurde. Das Eluat konnte dann direkt für die nachfolgende Reaktion weiterverwendet werden.

iv) Restriktionsspaltung der ds-cDNA mit *RsaI*

Für die Restriktionsspaltung der ds-cDNA mit der Restriktionsendonuklease *RsaI* wurden im 120 µl-Ansatz 96 µl des aufgereinigten Eluats mit 12 µl 10x NEB-Puffer1 (100 mM Bis-Tris-Propane-HCl, pH 7,0; 100 mM MgCl₂; 10 mM Dithiothreitol) und 120 µg BSA versetzt und der Ansatz nach Zugabe von 30 U des Enzyms *RsaI* für 2 h bei 37°C inkubiert. Nach einer weiteren Zugabe von 15 U *RsaI* für 1 h konnte die geschnittene ds-cDNA gefällt werden. Dies erfolgte durch die direkte Zugabe von 0,1 Vol. 3 M Natriumacetat, pH 5,3 und 2,5 Vol. 100% EtOH (-80°C) zum Restriktionsansatz. Nach 2 h Fällung bei -20°C wurde die fragmentierte ds-cDNA durch eine 25 min Zentrifugation bei 16060 x g (Heraeus Biofuge fresco) und 4°C pelletiert, der Überstand mittels Wasserstrahlpumpe abgezogen und das Pellet etwa 5 min bei 37°C getrocknet und anschließend in 10 µl molekularbiologischem H₂O aufgenommen. Davon wurden 10 µl für die Adaptorligation eingesetzt, der Rest bei -20°C eingefroren.

v) Adaptersynthese

Für die Herstellung eines 20 µM-Adapter-Stocks (ODD_Adapter_*RsaI*) wurden äquimolare Mengen (jeweils 20 µl) des 100 µM Long_Oligo_*RsaI*- und des 100 µM Short_Oligo_*RsaI*-Oligonukleotids im 100 µl Gesamtvolumen mit 10 µl des 10 x T4-DNA Ligase Puffers (50 mM Tris-HCl, pH 7,5; 10 mM MgCl₂; 10 mM Dithiothreitol; 1 mM ATP; 25 µg/ml BSA) versetzt. Durch eine Denaturierung bei 95°C für 3 min und langsamen Abkühlung (ca. 8 h) bei RT hybridisieren die komplementäre Nukleotidsequenzen zu doppelsträngigen Adaptoren (=ODD_Adapter_*RsaI*), die für die Ligation an *RsaI*-verdaute ds-cDNA-Fragmentenden eingesetzt werden können.

vi) Adapterligation

10 µl der, nach dem *RsaI*-Verdau gefällten, ds-cDNA werden für die Adapterligation eingesetzt. Für die Ligation wurde 1 µl der 20 µM Adapter-Stocklösung (ODD_Adapter_RsaI), 1 µl 10x T4-Ligase-Puffer (500 mM Tris-HCl, pH 7,5; 100 mM MgCl₂; 100 mM Dithiothreitol; 10 mM ATP; 250 µg/ml BSA), 5 µl ds-cDNA und 200 U der T4-DNA-Ligase im 10 µl Gesamtvolumen gemischt und in bei 16°C inkubiert. Die Aktivität der Ligase wurde durch die Hitzeinaktivierung (10 Minuten bei 65°C) gestoppt. Anschließend wurde der 10 µl-Ligationsansatz mit 90 µl H₂O auf 100 µl aufgefüllt und mittels QIAquick PCR Purification Kit aufgereinigt. Die Elution der Fragmente von der Säule erfolgte mit 30 µl Elutionspuffer EB (10 mM Tris-HCl, pH 8,5).

vii) Suppressions-PCR (ADAPTER-PCR I)

Während der sogenannten Suppressions-PCR mit dem Oligo(dT) ODD_T_all und dem Adapterspezifischen-Oligonukleotid AP1 fand eine selektive Amplifikation der 3'-terminalen Fragmenten der mit *RsaI*-verdauten, adapterligierten cDNA statt. Eine Vervielfältigung von cDNA-Fragmenten, die beidseitig ligierten Adaptoren trugen, wurde durch die Ausbildung von „Pfannenstiel“-artigen Sekundärstrukturen supprimiert/unterdrückt [Siebert et al., 1997; Matz et al., 1997].

vii-1) Zyklenuptimierung

Wird eine komplexe Probe amplifiziert, findet ab einem bestimmten PCR-Zyklus und somit ab einer bestimmten Produktmenge ein sogenannter „hochmolekularen Shift“ statt, bei dem es zu einer artifiziellen Amplifikation höhermolekularer cDNA-Fragmente kommt und niedermolekulare PCR-Fragmente zunehmend an Intensität verlieren. Es ist davon auszugehen, dass ab diesem PCR-Zyklus Fehlhybridisierungen stattfinden und eine definierte Amplifikation dadurch unterbunden wird. Die genauen Ursachen des hochmolekularen Shifts sind nicht eindeutig geklärt. Neben einer abnehmenden Substratkonzentration (insbesondere durch Limitierung der Nukleotide und Primer), zunehmender Inaktivierung der Polymerase, zunehmender Konkurrenz der entstehenden Produkte wird auch eine Endprodukthemmung durch die Akkumulation des entstehenden Pyrophosphats als mögliche Gründe für das Zustandekommen dieses Effekts angesehen. Aus diesem Grund muss sowohl bei der Suppressions-, wie auch der nachfolgenden Spezifischen PCR zuerst der optimale Zyklus bestimmt werden.

Die Zyklenoptimierung während der Suppressions-PCR erfolgte nach folgendem Protokoll: In einzelnen 25 µl PCR-Ansätzen wurden jeweils 1 µl des Eluats der aufgereinigten Adapterligierten ds-cDNA mit jeweils 2,5 µl des 10x PCR-Puffer (200 mM Tris-HCl, pH 8,4; 500 mM KCl; Invitrogen), 0,75 µl 50 mM MgCl₂ (Invitrogen), 0,5 µl von 5 mM dNTPs, 0,25 µl 10 µM ODD_T_all-Primer, 0,25 µl 10 µM AP1-Primer, 19,35 µl molekularbiologisches H₂O sowie 2 U Platinum® *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen) vermischt und anschließend mit folgendem PCR-Programm amplifiziert:

1. Denaturierung:	95°C	- 0:05 min	} <i>Zyklenoptimierung der Suppressions-PCR:</i> Ab Zyklus 18 wurde bis zum Zyklus 26 bei einer Extension-Zeit von 0:50 jeweils ein PCR-Reaktionsansatz entnommen
2. Hybridisierung:	65°C	- 0:30 min	
3. Extension:	72°C	- 1:00 min	

Die Bestimmung des „optimalen“ Zykluses erfolgte durch die Analyse des gesamten 25 µl PCR-Ansatzes von jedem Zyklus nebeneinander auf einem nicht-denaturierenden 8%-igen Polyacrylamidgel (PAGE). Der Zyklus vor dem beginnenden hochmolekularen Shift wurde als optimal angesehen und für die entsprechende Suppressions-PCR im größeren Ansatz verwendet.

vii-2) Suppressions-PCR bis zum „optimalen“ Zyklus

In 2 x 100 µl PCR-Ansätzen wurden jeweils 4 µl des Eluats mit 10 µl 10x PCR-Puffer, 3 µl 50 mM MgCl₂, 2 µl 5 mM dNTPs, je 1 µl AP1- und ODD_T_all-Oligonukleotiden (10 µM), 77,4 µl H₂O_{mol.biol.} und 1,6 µl Platinum® *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen) vermischt und anschließend bis zum bestimmten „optimalen“ Zyklus amplifiziert. Nach der PCR wurden die beiden Ansätze vereinigt und für die nachfolgende Spezifische PCR (*ADAPTER-PCR II*) 1:30 mit molekularbiol. H₂O verdünnt.

viii) Spezifische PCR (ADAPTER-PCR II)

Die amplifizierten, 3'-terminalen cDNA-Fragmente wurden anschließend in einer zweiten PCR (*ADAPTER-PCR II*) spezifisch vervielfältigt, wodurch auf diese Weise die Komplexität der Probe reguliert und definiert werden konnte. Bei dieser spezifischen PCR wurden sogenannte „Anchored Primer“ verwendet. Diese Oligonukleotide waren so konstruiert, dass sie mit 2 Basen in die Zielsequenz „hineingreifen“. Ausgehend von der Adapterseite waren mit den Adapter-spezifischen Oligonukleotiden AdE_NN_RsaI (5'-AGGGCGTGTTGCGGAGGGCGGTCCNN-3', wobei *N* A, G, C oder T repräsentieren kann) 16 Primer-Variationen möglich. Von der 3'-terminalen Seite wurden die Oligo(dT)_Primer ODD_T_ext_VN (5'-GCGAGTCGACCGTTTTTTTTTTTTTTVVN-3') verwendet. Diese Oligonukleotide hatten am 3'-Ende ein *VN*, wobei *V* A, G oder C und *N* A, G, C

und T repräsentierte, so dass von der Oligo(dT)-Seite nur 12 Primer-Varianten verwendet werden konnten.

Durch die Wahl der entsprechenden Primerkombination konnten so bis zu 192 Subpopulationen amplifiziert werden, die je nach gewünschter Komplexität der Probe für die nachfolgende zweidimensionale Auftrennung entweder als Pool oder einzeln analysiert werden konnten (vgl. **Abbildung 8**). Während ein Pool aus 192 einzelnen Subpopulationen das gesamte Transkriptom repräsentiert, kann dieser – je nach zu untersuchendem Organismus – eine sehr hohe Komplexität ausmachen, die zweidimensional nicht mehr aufgetrennt werden kann. Für die Analyse des *C. albicans* oder *C. dubliniensis*-Transkriptoms musste die Komplexität auf $\frac{1}{4}$ reduziert werden. Aufgrund der höheren Spezifität wurden für die Analyse 48 Subpopulationen vereinigt, die jeweils mit 12 verschiedenen ODD_T_ext_VN- und 4 AdE_NN_RsaI-Oligonukleotiden amplifiziert worden sind, deren letzter Ankernukleotid (X) definiert und nur der vorletzte Nukleotid (N) variabel war. Aufgrund der hohen Komplexität des humanen Transkriptoms z. B. durch eine deutlich höhere Anzahl der Transkripte oder durch das Vorkommen des alternativen Splicings, konnten statt 48 nur 12 Subpopulationen zum $\frac{1}{16}$ tel des Transkriptoms vereinigt werden. Dazu eigneten sich vor allem Subpopulationen, die mit Primerkombinationen aus einem bestimmten AdE_NN_RsaI- und den 12 verschiedenen ODD_T_ext_VN-Oligonukleotiden amplifiziert worden sind.

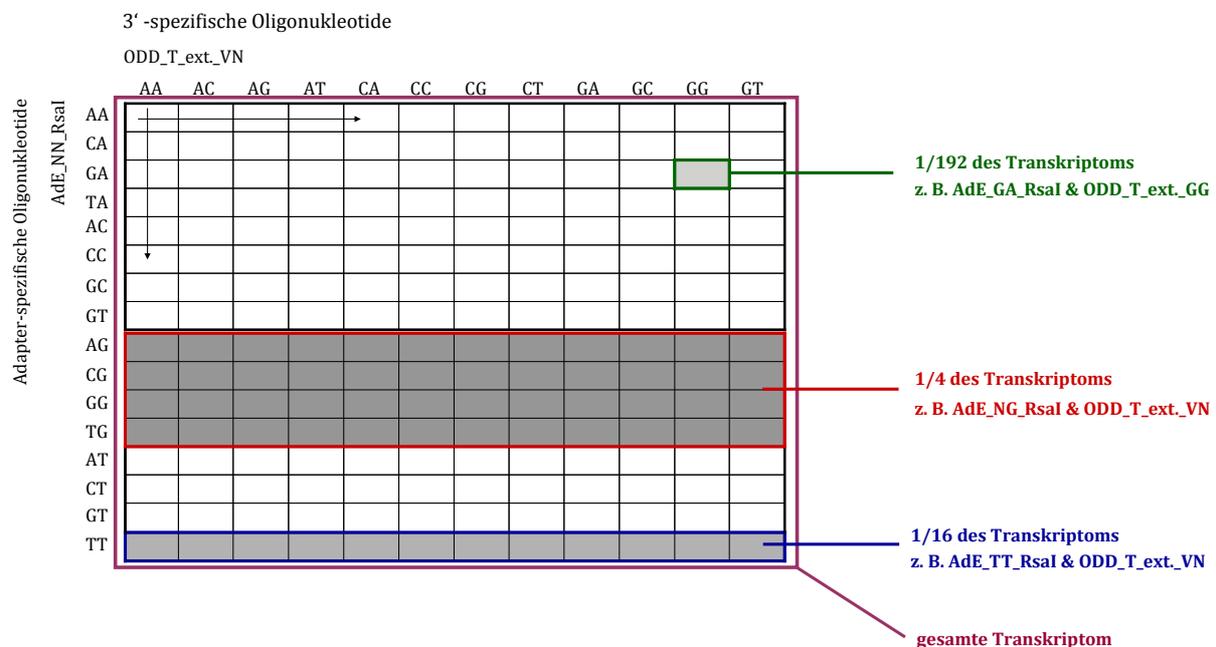


Abbildung 8: Übersicht verschiedener Subpopulationen.

Übersicht der Masterplatte mit 192 verschiedenen Oligonukleotidkombinationen für die spezifische PCR. Für jede Kombination wurden ein spezifischer AdE_NN_RsaI und ein spezifischer ODD_T_ext_VN-Oligonukleotid verwendet. Je nach Komplexität des zu untersuchenden Organismus konnten dann unterschiedliche Subpopulationen vereinigt werden.

viii-1) Zyklusoptimierung

Wie bereits bei der Suppressions-PCR wurde auch während der spezifischen PCR eine Zyklusoptimierung durchgeführt. Für die Bestimmung des Zykluses vor dem hochmolekularen Shift wurde folgender Protokoll durchgeführt:

10 µl der 1:30 verdünnten cDNA (nach ADAPTER-PCR I) wurden im 100 µl PCR-Ansatz mit 10 µl 10x PCR-Puffer, 3 µl 50 mM MgCl₂, 4 µl dNTPs (je 5 mM), jeweils 2,5 µl AdE_NN_RsaI und Oligo(dT)-Primer ODD_T_ext_VN (je 10 µM), 65,5 µl molekularbiologischem H₂O sowie 20 U Taq-Polymerase vermischt und anschließend mit folgendem PCR-Programm amplifiziert:

PCR-Programm:

1. Denaturierung: 95°C	- 0:05 min	} <i>Zyklusoptimierung der Spezifischen-PCR:</i> Ab Zyklus 15 wurde bis zum Zyklus 26 jeweils 7 µl PCR-Reaktionsvolumen entnommen und mittels PAGE analysiert.
2. Hybridisierung: 65°C	- 0:30 min	
3. Extension: 72°C	- 1:00 min	

viii-2) Spezifische PCR (ADAPTER-PCR II)

Aus der gleichen cDNA-Verdünnung wurden nach dem gleichen Protokoll die einzelnen Subpopulationen bis zum entsprechenden Zyklus amplifiziert.

ix) Vereinigung und Fällung der PCR-Produkte

Je nach gewünschter Komplexität wurden die entsprechenden PCR Ansätze vereinigt und durch direkte Zugabe von 0,1 Vol. 3 M Natriumacetat, pH 5,3 und 2,5 Vol. 100% EtOH (-80°C) über Nacht bei -20°C gefällt. Für die Analyse des Transkriptoms wurden jeweils 48 PCR-Ansätze vereinigt (vgl. **Abb. 8**) und für die Fällung in Corex-Röhrchen überführt. Pelletierung der DNA erfolgte für 20 min bei 10000 rpm (Beckman Zentrifuge, JA-20-Rotor). Nach dem Waschen mit 70% EtOH wurden die gefällten 3'-terminalen ds-cDNA Fragmente in molekularbiol. H₂O aufgenommen und zweidimensional aufgetrennt.

II.20.2 Zweidimensionale Auftrennung

i) 1. Dimension (Auftrennung nach Molekulargewicht im nicht-denaturierenden Polyacrylamidgel)

- 6-10%-ige Acrylamidlösung (30 % Acrylamid- Bisacrylamid-Lösung (37,5:1 w/w), Biorad)
- 1 x TAE
- 10%-iges APS und TEMED (Biorad)
- 6 x GLD

In der ersten Dimension wurden die ds-cDNA-Fragmente in einem nicht-denaturierenden Polyacrylamidgel nach ihrem Molekulargewicht (M_r) aufgetrennt. Die Prozentigkeit des Gels variierte dabei in der ersten Dimension je nach Anwendung oder Organismus zwischen 6-10% Acrylamid. Die Geldimensionen waren 16 x 16 cm, bei einer Geldicke von 1,0 mm (für anschließende zweidimensionale Auftrennung) oder 1,5 mm (für eindimensionale Analyse während der Zyklusoptimierung). Die Gele wurden mit Hilfe der dafür vorgesehenen Apparatur PROTEAN II xi - System vorbereitet. Je nach Bedarf wurden die entsprechenden Acrylamidlösungen in benötigter Menge vorgelegt (bei 1,0 mm Spacerstärke: 28 ml; bei 1,5 mm-Geldicke: 40 ml), mit 0,001 Vol. TEMED und 0,01 Vol. 10% APS versetzt, vorsichtig und luftblasenfrei gemischt und in die vorbereitete Apparatur gegossen. Nach mind. 1 h Polymerisation bei RT wurden die Käbme entfernt, die Taschen mit 1x TAE gewaschen und die Gele mit 6xGLD-versetzten Proben beladen (Verhältnis Probe zu 6xGLD 5:1). Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte in 1x TAE als Laufpuffer bei einer konstanten Spannung von 200 V – je nach Anwendung und Prozentigkeit des Gels – für 2-4,5 Stunden.

ii) 2. Dimension (Auftrennung nach GC-Gehalt im denaturierenden Gradienten Polyacrylamidgel)

- 8%-ige denaturierende Acrylamidlösung mit unterschiedlichen Denaturierungskonzentrationen an Harnstoff und Formamid, je nach Organismus
(10% Denaturierungskonzentration: 4% (v/v) Formamid und 0,7 M Harnstoff;
40% Denaturierungskonzentration: 16% (v/v) Formamid und 2,8 M Harnstoff)
- 1 x TAE
- 10%-iges APS und TEMED
- H₂O-gesättigtes n-Butanol
- 4% Agarose

Für die Auftrennung der ds-cDNA in der 2. Dimension mittels einer denaturierenden Gradientengelelektrophorese (DGGE) wurde die Spur der ersten Dimension in voller Länge (16 cm) mit einem Messer ausgeschnitten. Mithilfe einer Overheadfolie wurde das Gel von der Glasplatte abgelöst und anschließend auf ein bereits auspolymerisiertes Denaturierungsgradientengel (vorbereitet mit der PROTEAN II xi - Apparatur) übertragen. Diese Gele (Größe: 16x16cm, Geldicke: 1,5mm), wiesen einen - parallel zur Elektrophoreserichtung - kontinuierlichen Denaturierungsgradienten bestehend aus Harnstoff und Formamid auf, der mithilfe des Gradientenmischers von BIORAD gegossen wurde. Je nach vorliegendem GC-Gehalt des Probenmaterials variierte der Denaturierungsgradient im Gel. So wurde für die *Candida*-Proben ein Denaturierungsgradient zwischen 10-40% gewählt werden. Der Gradientenmischer bestand aus zwei säulenartigen Gefäßen, die über einen Kanal miteinander verbunden waren. Die Säule, die mit der niedrig-konzentrierten Lösung gefüllt wurde, verfügte über den Ausgang zur Gelkammer. Das Prinzip des Gradientenmischers bestand darin, dass die verschiedenen konzentrierten Lösungen in den entsprechenden Säulen über die Verbindung der Gefäße durch kontinuierliches Zufließen und ständiges Rühren in dem Gefäß mit der niedrigkonzentrierten Lösung vermischt wurden und somit kontinuierlich der Gradient zunahm, während die Acrylamid-Lösung in die vorbereitete Gelkammer gefüllt wurde. Um minimale Änderungen der Gradientenzusammensetzung zu minimieren und somit für eine höhere Reproduzierbarkeit der Gele für die differentielle Transkriptionsanalyse zu gewährleisten, wurden in der Multigel-Gießapparatur bis zu 8 Gele parallel gegossen. Je nach verwendeter Gel-Anzahl variierten die entsprechenden Volumina der niedrig- und höherkonzentrierten Denaturierungslösungen. Für 4 Gele wurden in zwei verschiedenen Messzylindern zunächst jeweils 150 ml, für 8 Gele jeweils 230 ml der entsprechenden Denaturierungslösungen vorgelegt und zuerst die höher-konzentrierte Denaturierungs-Acrylamidlösung mit 115 µl bzw. 163 µl TEMED sowie 1150 µl bzw. 1630 µl der 10%ige APS-Lösung versetzt. Die Lösung wurde vorsichtig gemischt und in die entsprechende Säule des Gradientenmischers gefüllt. Anschließend wurde mit der niedrigkonzentrierten Denaturierungslösung identisch verfahren.

Um die in voller Länge ausgeschnittene Gelspur der ersten Dimension auch in der zweiten Dimension auftrennen zu können, wurde vom oberen Rand ca. 1 cm Platz für die Gelspur der 1. Dimension gelassen. Direkt nach dem Gießen wurde das Gels mit H₂O-gesättigtem n-Butanol überschichtet und mind. 1 h auspolymerisieren lassen. Anschließend wurden die Gele mit Wasser und mit 1x TAE ausgewaschen und mit der Gelspur aus der 1. Dimension belegt. Damit die Gelspur nicht herausgewaschen werden konnte, wurde die Gelspur mit handwarmen 4%igen-Agarose überschichtet.

Die denaturierende Gradientengelelektrophorese erfolgte bei einer konstanten Temperatur von 60°C im 1 x TAE als Laufpuffer für 1500 – 1650 Vh entweder in der Apparatur PROTEAN Plus Dodeca Cell (Biorad) oder mithilfe des Hoefer Dalt 2-D-Elektrophorese System (Amersham Pharmacia Biotech).

iii) Detektion der DNA-Fragmente

Nach ihrer ein- oder zweidimensionalen Auftrennung wurden die Gele zur Visualisierung der DNA-Fragmente 1 h in einer 10 000-fachen Verdünnung des Nukleinsäurefarbstoffs SYBR Gold (Molecular Probes/Invitrogen) in 1 x TAE unter Schütteln bei RT gefärbt und die DNA-Fragmente mit Hilfe des Fluoreszenz-Laserscanners FLA5100 bei einer Anregungswellenlänge von $\lambda=473$ nm und dem FITC-Emissionsfilter detektiert. Die Auflösung, mit der die Gele eingescannt worden sind, betrug 100 μm bei 16 bit/Pixel.

II.20.3 Auswertung und Identifizierung

i) Qualitative und quantitative bioinformatische Auswertung

Die qualitative und quantitative Auswertung der zweidimensional aufgetrennten DNA-Fragmente erfolgte mittels des Software-Programms Delta2D von DECODON (Greifswald, Deutschland). Dazu wurden für jede Subpopulation des Transkriptoms sowohl die technischen wie biologische Replikate aus unterschiedlichen Bedingungen mithilfe der „group warping strategy“ und dem „exact“-Modus innerhalb und zwischen den einzelnen Gruppen überlagert und mittels des Fusionstyps „union“ zu einem virtuellem Bild fusioniert [Luhn, S *et al.* 2003]. Die Spottedetektion erfolgte auf dem Fusionsbild mit folgenden Parametern wie die Bestimmung des lokalen Hintergrundwerts (vorgegeben bei ca. 50), einer durchschnittlichen Spotgröße von 2 sowie 100% Sensitivität. Alle detektierten Spots auf dem Fusionsbild wurden anschließend auf alle einzelnen Gelbilder übertragen, die für die Überlagerung verwendet worden sind. Durch diese Vorgehensweise konnte so sichergestellt werden, dass abweichende Spotgrößen die Expressionsdaten nicht beeinflussen. Interessante DNA-Fragmente wurden anschließend für die nachfolgende Identifizierung gekennzeichnet. Die Spotintensität (angegeben als Volumen, V) entsprach dem Produkt aus der durchschnittlichen Pixelintensität (als 16-bit) und der entsprechende Spotfläche (Area). Wir definierten Volumenprozent (% V) jedes detektierten Spots als ein Maß für die relative Spotintensität und somit für die normalisierte Transkripthäufigkeit eines (Sub-)Transkriptoms. Das Volumenprozent (% V) eines bestimmten Spots wurde berechnet als der Quotient der Spotintensität (V) relativ zu der Gesamtintensität von allen detektierten Spots des vorliegenden 2D-Gels. Dieser Normalisierungsschritt erlaubte den reproduzierbaren Vergleich der relativen Spotintensitäten von verschiedenen Experimenten

auf unterschiedlichen Gelen. Alle Spots mit einem %V unter 0,001 wurden als Background definiert und ihr Wert auf 0,001 gesetzt. Zur Bestimmung der differentiellen Genexpression wurde für jedes Transkript der Quotient des %V von jedem entsprechenden Spot aus unterschiedlichen experimentellen Bedingungen berechnet und anschließend in \log_2 -Wert überführt. Diese wurde dann für die Validierung der *MESSAGE*-Technologie mit unabhängigen Genexpressionstechnologien wie DNA-Microarrays und qRT-PCR mittels Regressionsanalysen und für die Berechnung des Pearson Korrelationsfaktors verwendet [Zou, KH *et al.* 2003].

ii) Identifikation der cDNA-Fragmente

ii-1) Reamplifikation

- 10 x PCR-Puffer
- dNTP-Mix (5 mM jeweils)
- Taq-Polymerase
- QIAquick PCR Purification Kit

Nach der Auswertung der Spots wurden interessante cDNA-Fragmente auf dem UV-Tisch bei einer Anregungswellenlänge von $\lambda = 312$ nm des Camilla-Dokumentationssystems (raytest) manuell mithilfe einer Glaskapillare (Biorad, München), die in einer 1 ml Einwegspritze gefüllt mit 50-100 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{mol.biol.}}$ eingerastet war, aus dem Polyacrylamidgel ausgestochen. Sowohl das Gelfragment wie auch die in der Einwegspritze befindende Flüssigkeit wurden anschließend in ein 1,5 ml- Reaktionsgefäß überführt. Die Elution der DNA aus dem Gel erfolgte für mind. 2 h (bis zu 72 h) bei 56°C. Jeweils 10 μl des Eluats wurden im 100 μl PCR-Volumen nach Zugabe von 10 μl 10 x PCR-Puffer, 2 μl dNTP-Mix (5 mM jeweils), 74,5 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{mol.biol.}}$, jeweils 1 μl des 10 μM Ad_non-ext.- und des ODD-T_all_Oligonukleotids mit 20 U Taq Polymerase reamplifiziert. Das PCR-Programm war wie folgt:

Denaturierung bei 95°C für 5 sec, Annealing bei 65°C für 30 sec und Extension bei 72°C für 1 min für nachfolgende 25 -30 Zyklen. Zur Kontrolle des Reamplifikationsprodukts wurde jeweils ein 10 μl – Amplifikat-Aliquot auf einem 1,5% Agarose-TAE-Gel analysiert und nur die PCR-Reaktionen mit einem definierten Produkt weiter über Säulen aufgereinigt (QIAquick PCR Purification kit, QIAGEN).

ii-2) Sequenzierung

Das gesamte 30µl-Eluat wurde anschließend entweder mit dem Ad_non_ext. oder dem ODD_T_all-Oligonukleotid von der Firma GATC Biotech AG, Konstanz mittels ABI-Sequencer sequenziert.

ii-3) Identifizierung durch Homologie-Abgleich

Für die Identifizierung der sequenzierten 3'-terminalen ds-cDNA-Fragmenten von *C. albicans* wurden die Sequenzen (im FASTA-Format) mithilfe der WU-BLAST 2.0 Software und dem Nucleotide-Nucleotide Blast (BLASTN)-Algorithmus der Candida Genome Database (<http://www.candidagenome.org>) sowohl der chromosomalen wie mitochondriellen DNA des *C. albicans*-Genoms (Assembly 19) zugeordnet. Die Identifizierung der Transkripte von *C. dubliniensis* erfolgte mit dem BLASTN-Suchalgorithmus gegen die *Candida dubliniensis* GeneDB (<http://www.genedb.org/genedb/cdubliniensis>), die vom Wellcome Trust Sanger Institute verwaltet wird. Als eindeutig identifizierte Fragmente wurden alle Sequenzen angesehen, die einen e-value (Expect-Value) kleiner als 10^{-6} aufwiesen.

ERGEBNISSE

Candida-Infektionen sind ein Problem mit wachsender klinischer Bedeutung, da ihre Häufigkeit innerhalb der letzten 25 Jahre dramatisch zunahm. Dabei zählt insbesondere *Candida albicans* zu dem wichtigsten Pathogen dieser Gattung. Der Pilz besiedelt zwar als kommensaler Organismus bei etwa 70% der gesunden Bevölkerung symptomlos den menschlichen Gastrointestinal- und Urogenitaltrakt, verursacht jedoch Infektionen, wenn natürliche Barrieren des Menschen geschädigt oder das Immunsystem geschwächt ist. *C. albicans* zählt daher als klassischer opportunistischer Krankheitserreger. Zur Risikogruppe zählen vor allem Frühgeborene, Personen mit Stoffwechselerkrankungen (z. B. mit Diabetes) oder Patienten mit erblichen und erworbenen Schädigungen der zellulären Immunantwort, wie es z. B. bei HIV-Infektionen der Fall ist. Auch Langzeittherapien mit Antibiotika oder Chemotherapeutika können prädisponierende Faktoren für eine Erkrankung sein. Das Krankheitsspektrum von *C. albicans* reicht von oberflächlichen Haut- und Schleimhautinfektionen wie z.B. den oropharyngealen und vulvovaginalen Kandidosen bis hin zu lebensbedrohenden invasiven, systemischen Infektionen, die mit 28–59 % eine hohe Mortalitätsrate aufweisen.

Mit der Identifizierung von *Candida dubliniensis* wurde ein weiterer opportunistischer humanpathogener Hefepilz der Gattung *Candida* beschrieben, der zwar eine sehr nahe evolutionäre Verwandtschaft zu *C. albicans* aufweist, nach weltweiten epidemiologischen Studien jedoch hauptsächlich nur bei oropharyngealen Kandidosen der HIV-infizierten Bevölkerung identifiziert werden konnte [Sullivan, DJ *et al.* 1995; Coleman, DC *et al.* 1998; Jabra-Rizk, MA *et al.* 2001; Sullivan, DJ *et al.* 2005; Jewtuchowicz, VM *et al.* 2008]. Die Prävalenz von *C. dubliniensis* in der gesunden Bevölkerung liegt bei max. 5%. Auch der Anteil dieser Hefeart an invasiven, systemischen Mykosen ist mit 2% deutlich geringer als bei *C. albicans*. Diese offensichtlich stark verminderte Virulenz konnte ebenfalls durch vergleichende Studien mit Mausinfektionsmodellen bestätigt werden [Gilfillan, GD *et al.* 1998; Vilela, MM *et al.* 2002]. Dies ist bemerkenswert, da beide Arten nicht nur eine sehr hohe Homologie, sondern auch fast identische phänotypische Eigenschaften besitzen. So sind die beiden *Candida*-Stämme unter normalen Wachstumsbedingungen in Vollmedium morphologisch nicht voneinander zu unterscheiden (**Abbildung 9**). Diese große Ähnlichkeit führte häufig zu Missidentifikationen von *C. dubliniensis* und *C. albicans*. Eine Studie von Coleman *et al.* aus dem Jahr 1997 zeigte, dass von allen isolierten *Candida*-Stämmen aus dem oralen Bereich der HIV-infizierten Bevölkerung ca. 16,5 % der *C. dubliniensis*-Stämme fälschlicherweise als *C. albicans* identifiziert worden sind [Coleman, DC *et al.* 1997].

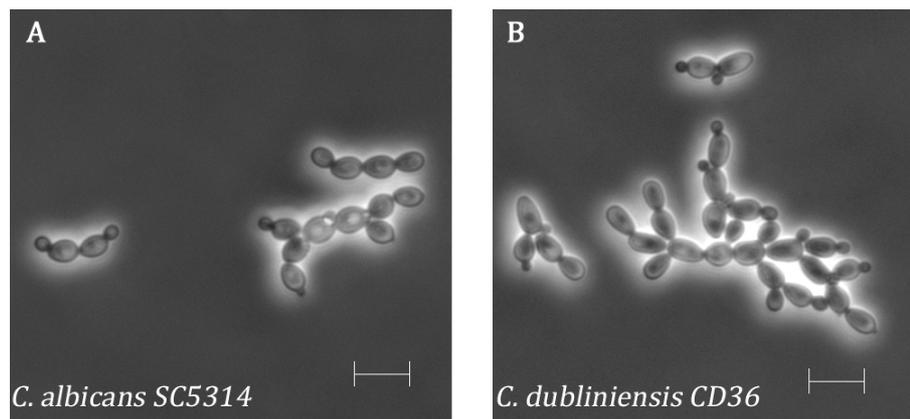


Abbildung 9: Morphologie der klinischen Isolate von *Candida albicans* und *Candida dubliniensis*.

Vollmedium (YPD). Maßstabsbalken: 10 μ m

Mit der Pathogenität von *C. albicans* werden mehrere mögliche Virulenz-assoziierte Faktoren in Verbindung gebracht. Zu diesen Virulenzfaktoren zählt u. a. die Fähigkeit zur Sekretion von extrazellulären hydrolytischen Enzymen, zu denen v. a. die Aspartatproteinasen (Sap), Phospholipasen oder Lipasen gezählt werden, die neben der Bereitstellung von Nährstoffen auch in eine Reihe von weiteren Prozessen involviert sind, die für die Pathogenität von *C. albicans* entscheidend sind [Ghannoum, MA ; Naglik, JR *et al.*]. So sind die Sap-Proteine z. B. an der Zellzerstörung und Gewebeinvasion durch die Hydrolyse von Wirtspoteinen wie Keratin oder Kollagen, an der Adhäsion ans Wirtsgewebe, der Biofilm-Ausbildung sowie der Interaktion mit dem Immunsystem beteiligt [Naglik, J *et al.*]. Mehrere Studien konnten außerdem eine differenzielle Genexpression der verschiedenen *SAP*-Gene während des phänotypischen Wechsels (von der physiologischen „white“ zur Paarungskompetenten „opaque“ Form) sowie der morphologischen Transition (von der sphärischen Blastospore zur filamentösen Wuchsform) zeigen [White, TC and Agabian, N 1995]. Die Fähigkeit zum Wechsel der Morphogenese unter bestimmten äußeren Einflüssen (wie z. B. einer Temperaturerhöhung von 30 auf 37°C, Erhöhung des pH-Werts, Zellkulturmedium, Serum) wurde bis zur Identifizierung von *C. dubliniensis* als entscheidender und einzigartiger Virulenzfaktor von *C. albicans* angesehen. Mit der Charakterisierung von *C. dubliniensis* als eigenständige Spezies konnte jedoch ein weiterer Hefepilz beschrieben werden, der neben *C. albicans* in der Lage ist, diesen Wechsel zu untergehen und neben Blastosporen sowohl filamentöse Wachstumsformen (echte Hyphen oder Pseudohyphen) als auch sogenannte Chlamydoosporen (Chlamydoconidien) auszubilden.

In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst die Induktion der Morphogenese von *C. albicans* und *C. dubliniensis* unter verschiedenen Bedingungen charakterisiert. Dabei zeigten sich große Unterschiede zwischen beiden Stämmen in den Induktions-Bedingungen (vgl. **Abbildung 10**). Klinische Isolate von *C. dubliniensis* (wie CD36, Wü284, Wü296) zeigten nur unter stark nährstofflimitierten Bedingungen in reinem Wasser, supplementiert mit 10% (v/v) fötalem Kalbsserum (FCS) und einer Inkubationstemperatur von 37°C eine beinahe 100%-ige Ausbildung von „echten“ Hyphen (**Abb. 10A und B**). Das Vorhandensein von Glukose in einer Endkonzentration von 2% hatte dabei keinen Einfluss auf die Morphologie. Bei definierten Medien-Zusammensetzungen, wie YNB- oder SC-Medium supplementiert mit 10% FCS, konnten *C. dubliniensis*-Stämme dagegen keine echte Hyphen ausbilden, sondern zeigten vereinzelt filamentöses Wachstum in Form von Pseudohyphen. Verglichen mit *C. dubliniensis* wies *C. albicans* dagegen im Allgemeinen eine stärker ausgeprägte Filamentierung auf. Die Induktion des hyphalen Wachstums war bereits in Vollmedium (YPD) mit 10% FCS (**Abb. 10C**) oder Zellkulturmedien wie α -MEM, DMEM oder RPMI möglich. Unter diesen Bedingungen wuchsen *C. dubliniensis* Wildtyp-Stämme ausschließlich in der Blastosporen-Form (**Abb. 10D**). Eine Besonderheit von *C. dubliniensis*-Stämmen war ihre Fähigkeit zur Chlamydosporenausbildung unter bestimmten Pflanzensamenextrakte-enthaltenden Medien. Diese konnten z. B. Sonnenblumensamenhülsen (SSH) oder wie bei Staib-Medium die Samen von *Guizotia abyssinica*

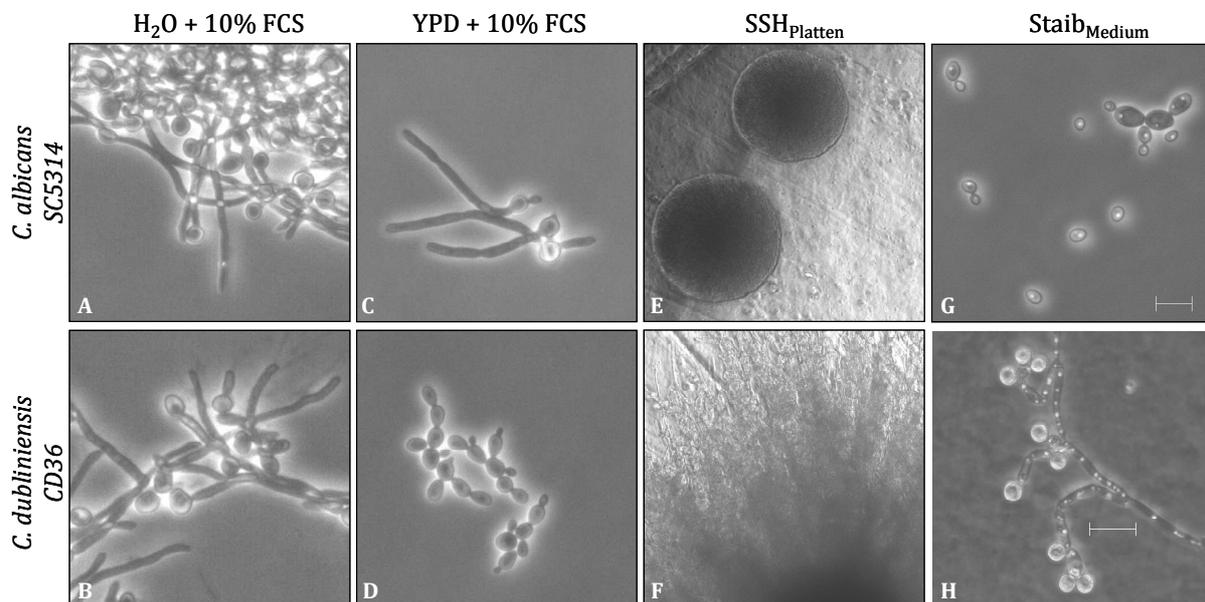


Abbildung 10: Morphologie von *C. albicans* und *C. dubliniensis* Wildtypstämmen unter verschiedenen Wachstumsbedingungen.

Auswahl verschiedener *in vitro*-Wachstumsbedingungen, unter denen die beiden *Candida*-Wildtypstämme *C. albicans* SC5314 und *C. dubliniensis* CD36 vergleichbare bzw. unterschiedliche Morphologien aufweisen.

Die untersuchten Bedingungen waren in **(A)/(B)** Wasser, supplementiert mit 10% (v/v) fötalem Kälberserum (FCS) bei 37°C nach 6 h; Vollmedium (YPD), supplementiert mit 10% FCS bei 37°C nach 4 h **(C)/(D)**; Koloniemorphologie der Stämme auf dem Sonnenblumensamenhülsen (SSH)-Agar nach 2 Tagen Wachstum bei 30°C in **(E)/(F)** sowie im Staib-Flüssigmedium nach 24 h bei 30°C in **(G)/(H)**. Maßstabsbalken entsprechen 10 μ m.

sein. Sowohl auf Fest- wie Flüssigmedien mit diesen Extrakten zeigten nur Stämme von *C. dubliniensis* pseudohyphales Wachstum mit ausgeprägter Chlamydosporen-Produktion, die sich z. B. auf Festmedien durch undefinierte Kolonieränder zeigte (**Abb. 10F und H**). Der untersuchte *C. albicans* Wildtyp-Stamm SC5314 wies dagegen unter diesen Wachstumsbedingungen nur eine glatte Kolonierandmorphologie auf. Lichtmikroskopische Untersuchung der Kolonieränder oder Suspensionszellen von *C. albicans* unter diesen Flüssigkulturen konnten, verglichen mit *C. dubliniensis*, weder pseudohyphale Strukturen noch Chlamydosporen, sondern eine ovale Zellmorphologie als Blastosporen aufweisen (**Abb. 10 E und G**). Unter anderen Bedingungen wie Maismehl-Agar supplementiert entweder mit 1% Tween-80 oder mit 5% Milch differenzierten sich jedoch auch die *C. albicans*-Blastosporen nach 72 h Wachstum bei 28 - 30°C zu Chlamydosporen [Zavalza-Stiker, A 2006].

Wie diese Ergebnisse zeigen, können sowohl *C. albicans* als auch *C. dubliniensis* vergleichbare morphologische Formen ausbilden, beide Arten unterscheiden sich jedoch hauptsächlich in der Induktion dieser Prozesse. Da solche Morphologiewechsel mit großen Veränderungen der globalen Genexpression einhergehen, sollten zur Identifizierung der Art-übergreifenden Gemeinsamkeiten bzw. der Art-spezifischen Unterschiede die Genexpression während des Hefe-Hyphe-Übergangs in *C. albicans* und *C. dubliniensis* analysiert werden. Zu Beginn dieser Arbeit bestand keine Möglichkeit zur differentiellen Genexpressionsanalyse in *C. dubliniensis*. Das *C. dubliniensis*-Genom war zu dieser Zeit weder vollständig sequenziert noch annotiert, so dass *C. dubliniensis* spezifische DNA-Mikroarrays nicht hergestellt werden konnten. Mit der Etablierung der *MESSAGE*-Technologie konnte im Rahmen dieser Arbeit ein neues Verfahren beschrieben werden, dass die Erstellung von Transkriptionsprofilen von *Candida dubliniensis* ermöglichte. Nach der Etablierung und Validierung der *MESSAGE*-Technologie anhand des *C. albicans*-Transkriptom wurde zum ersten Mal die differentielle Genexpression des Hefe-Hyphe-Übergangs für *C. dubliniensis* durchgeführt.

I. Genexpressionsprofile basierend auf der *MESSAGE*-Technologie

I.1 Weiterentwicklung

Die *MESSAGE*-Technologie (Multidimensional Electrophoretic System of Separation for the Analysis of Gene Expression/Multidimensionales Elektrophoretisches System der Separation zur Analyse der Genexpression) wurde in ihren Grundprinzipien während der Diplomarbeit am Fraunhofer Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik entwickelt [Lindemann, E 2006]. In dieser Arbeit erfolgte eine Weiterentwicklung dieser Technologie hinsichtlich der Durchsatzsteigerung und Etablierung eines Auswertungssystems. Es handelt sich dabei um eine offene Technologieplattform, die die Erstellung von globalen Transkriptionsprofilen von jedem eukaryontischen Organismus erlaubt, ohne dass dessen Genom sequenziert noch annotiert ist oder eine aufwendige Laborausstattung und Bioinformatik-Infrastruktur vorliegt. Somit ist *MESSAGE* eine (kostengünstige) Alternative zu bereits bestehenden Methoden der Genexpressionsanalyse wie DNA-Mikroarrays, Differential Display (DD), SAGE (=Serielle Analyse der Genexpression) oder RNA-Seq.

Das Grundprinzip von *MESSAGE* (**Abbildung 11**) beruht auf einer definierten Herstellung von 3'-terminalen Doppelstrang-cDNA-Fragmenten (3'-ds-cDNAs) aus Gesamt-RNA, die anschließend in einem zweidimensionalen Gelsystem hochauflösend aufgetrennt werden. Die Separation erfolgt in der 1. Dimension nach dem Molekulargewicht (M_r) und in der 2. Dimension nach dem GC-Gehalt der Fragmente. Nach der Auswertung des Gelmusters werden DNA-Fragmente von Interesse aus dem Gel ausgestochen, reamplifiziert und durch Sequenzierung identifiziert.

Insbesondere die Synthese von 3'-terminalen ds-cDNA-Fragmenten stellt eine wichtige Voraussetzung für eine reproduzierbare Auftrennung der Fragmente in Form eines Punktmusters dar und ist demzufolge ein entscheidendes Kriterium für die Anwendung der *MESSAGE*-Technologie für differenzielle Genexpressionsstudien. Die synthetisierten Fragmente einer RNA-Spezies müssen bezüglich ihrer Länge sowie ihrer Sequenzzusammensetzung definiert sein. Heterogenität der Fragmente, hervorgerufen durch geringe Prozessivität des Enzyms Reverse Transkriptase während des Umschreibeprozesses der RNA in cDNA, wird durch eine selektive Amplifikation von 3'-terminalen Restriktionsfragmenten der ds-cDNA unterbunden. Für diesen sogenannten 3'-Fingerprint werden ausgehend von 1 µg Gesamt-RNA, mit Hilfe der sogenannten SMART-Technologie (= Switching Mechanism At 5'End of RNA Transcript) [Chenchik, A *et al.* 1996; Matz, M *et al.* 1999; Zhu, YY *et al.* 2001; Zhumabayeva, B *et*

al. 2001] während der Reversen Transkriptase-Reaktion in erster Linie einzelsträngige cDNA-Moleküle (ss-cDNA) generiert, die die vollständige Länge der mRNA-Matrize aufweisen. Dieses System nutzt besondere Eigenschaften der PrimeScript - Reversen Transkriptase aus. Bei diesem Enzym handelt es sich um eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, die aufgrund einer einzigen Aminosäuresubstitution ihre RNaseH-Aktivität verloren hat, wodurch ein vorzeitiger Abbau der umzuschreibenden mRNA verhindert wird. Durch eine zusätzliche terminale Transferaseaktivität dieses Enzyms werden am 3'-Ende der cDNA weitere Nukleotide - hauptsächlich Deoxycytidine - eingefügt, die als Matrize für die Bindung eines spezifischen Oligonukleotids (SMART IV-Oligonukleotids) dienen.

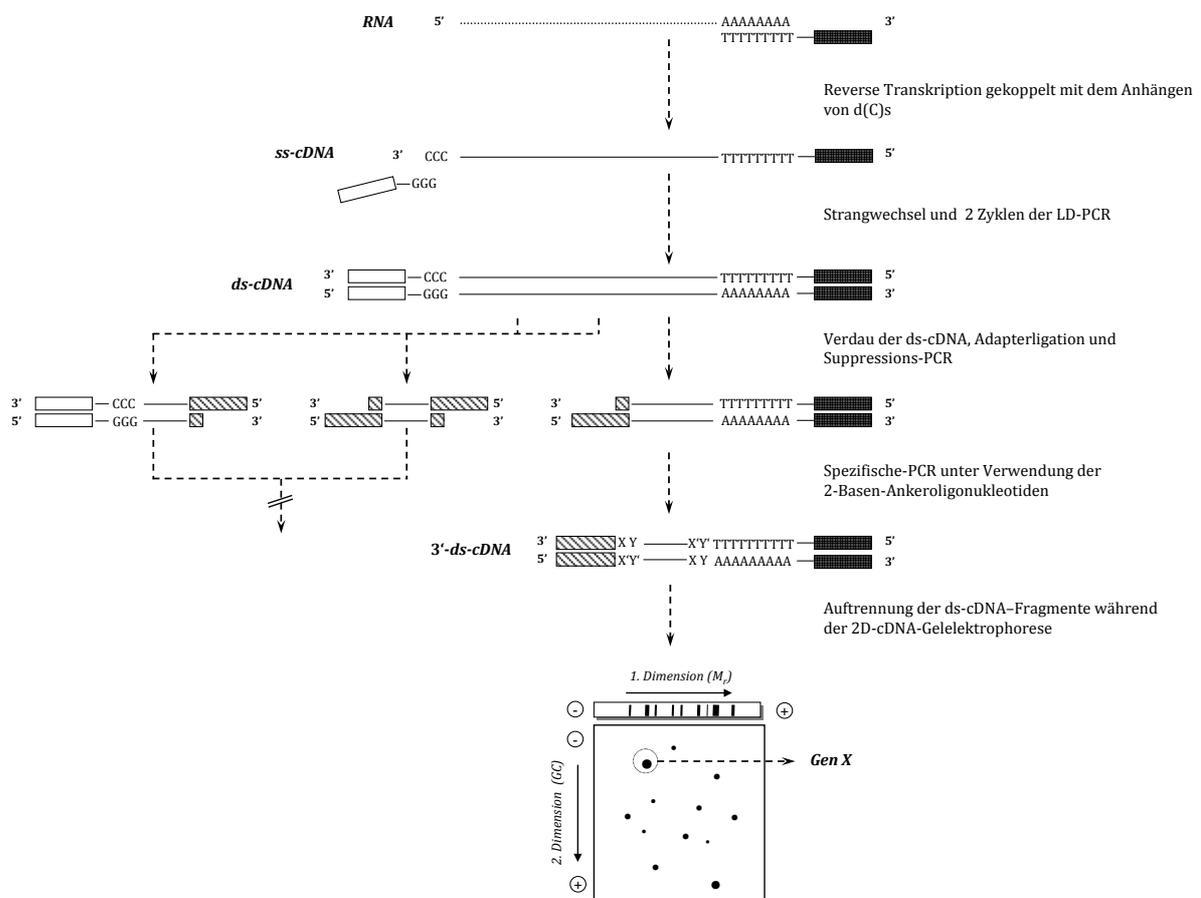


Abbildung 11: Prinzip der MESSAGE-Technologie.

Die Synthese der ds-cDNA erfolgt ausgehend von Gesamt-RNA mithilfe der SMART-Technologie. Nach der Spaltung der ds-cDNA mit der Restriktionsendonuklease *RsaI* (Erkennungssequenz: GTAC) und nachfolgender Adapterligation, werden durch selektive Amplifizierung mittels Suppressions-PCR nur 3'-terminale ds-cDNA-Fragmente angereichert. Während der Spezifischen-PCR wird durch den Gebrauch von sog. Anker-Oligonukleotiden (mit zwei Basen-Überhang) das gesamte Transkriptom in 192 mögliche Subpopulationen unterteilt, die je nach Komplexität des zu untersuchenden Organismus in unterschiedlicher Anzahl vereinigt werden können. Anschließend werden die angereicherte 3'-terminalen ds-cDNA-Fragmente im zweidimensionalen Gelsystem bezüglich ihres Molekulargewichts (M_r) in der 1. Dimension und nach ihrem spezifischen GC-Gehalt in der 2. Dimension elektrophoretisch aufgetrennt. Durch das Färben der Gele mit dem Fluoreszenzfarbstoff SYBR Gold werden die komplexen Spotmuster visualisiert. Zur Identifizierung der entsprechenden Transkriptionseinheiten, werden interessante Spots aus dem Gel ausgeschnitten, mittels PCR vervielfältigt und sequenziert.

Durch die Struktur des SMART IV_Oligonukleotids, das am 3'-terminalen Ende 3 Guanosine aufweist, erfolgt eine Anbindung an den Deoxycytidin-Überhang, ein Umspringen der Reversen Transkriptase von der mRNA-Matrize auf das Oligonukleotid sowie dessen Verlängerung. Dadurch wird – neben dem polyadenylierten 5'-Ende – auch das 3'-Ende der neu-synthetisierten ss-cDNA genau definiert, so dass diese Information in einer nachfolgenden „long-distance“ (LD)-PCR zur Synthese des komplementären Stranges und - falls notwendig - zur Amplifizierung der cDNA verwendet werden kann. Die entstehende ds-cDNA wird dann mittels der Restriktionsendonuklease *RsaI* (Erkennungssequenz GT`AC, erzeugt nicht-überhängende Enden) geschnitten. Im Anschluss findet eine selektive Amplifikation der 3'-terminalen Restriktionsfragmente statt. Dazu wurde eine Methode verwendet, die von M. Matz als „Ordered Differential Display“ (ODD) zum systematischen Vergleich der Genexpressionsprofilen eingeführt/etabliert wurde [Matz, M *et al.* 1997] und bereits an zahlreichen biologischen Modellen erfolgreich bestätigt werden konnte [Hirate, Y *et al.* 2001; Kim, DS *et al.* 2001; Kuja-Panula, J *et al.* 2003]. Diese Methode ermöglichte die selektiven Anreicherung von 3'-terminalen Fragmenten, bedingt durch die Ligation eines pseudo-doppelsträngigen Adapters an alle entstehenden Enden der mit Hilfe von *RsaI*-fragmentierten ds-cDNA [Chenchik, A *et al.* 1996; Matz, M *et al.* 1997]. Durch die besondere Adapter-Struktur (bestehend aus einem 39 Basen langen Long_Oligo_RsaI- und am 5'-Enden komplementären 12 Basen kurzen Short_Oligo_RsaI Oligonukleotid) findet während der ersten Adapter PCR-Reaktion ein sogenannter Suppressions-Effekt statt [Siebert, PD *et al.* 1995]. Durch invertierte, terminale Sequenzwiederholungen (Repeats) im doppelt so langen Long_Oligo_RsaI hybridisieren diese Adapter-Enden während der ersten Adapter-PCR bevorzugt mit sich selbst statt mit dem Adapterprimer AP1, was zur Ausbildung von sogenannten „Pfannenstiel“- („panhandle-like“) Strukturen [Matz, M *et al.* 1997] führt, durch die die Amplifikation von „internen“ Fragmenten des Restriktionsschnitts, die Adapter an beiden Seiten tragen, unterdrückt wurde. 5'-terminale ds-cDNA-Enden konnten ebenfalls nicht amplifiziert werden, da das SMART IV-Oligonukleotid während der Suppressions PCR nicht verwendet wurde.

In der nachfolgenden spezifischen PCR konnte die komplexe Mischung der 3'-ds-cDNA-Fragmente in 192 einzelne Subpopulationen aufgeteilt werden, indem bei der Amplifikation sogenannte Anker-Oligonukleotide mit zwei Basen als Überhang (16 spezifische AdE_NN_RsaI und 12 verschiedene ODD_T_ext_VN-Primer) verwendet wurden. Diese Oligonukleotide hybridisierten nicht nur mit den flankierenden Bereichen, sondern durch die zusätzlichen 2 Basen spezifisch mit der Zielsequenz der jeweiligen cDNA. Für die nachfolgende zweidimensionale Auftrennung wurden entsprechende PCR-Ansätze entweder einzeln oder durch Vereinigung von verschiedenen Subpopulationen gemeinsam analysiert.

Die elektrophoretische Separation der 3'-terminalen ds-cDNA Fragmente erfolgte nach zwei Kriterien: in der ersten Dimension nach dem Molekulargewicht (M_r) in einem nicht-denaturierenden Polyacrylamidgel und in der zweiten Dimension nach der Basenzusammensetzung (GC-Gehalt) mittels einer denaturierenden Gradientengelelektrophorese, bestehend aus einem Formamid/Harnstoff-Gemisch. Hierbei nutzte man die Tatsache aus, dass DNA-Fragmente nicht gleichmäßig denaturieren, sondern in Abhängigkeit ihres GC-Gehaltes in sogenannte Schmelzdomänen („melting domains“) unterteilt werden können, die unterschiedliche Schmelztemperaturen (T_m) aufweisen. Wird während des elektrophoretischen Vorgangs der Schmelzpunkt dieser Domäne bei einer bestimmten Denaturierungskonzentration im Gel erreicht, findet ein partielles Aufschmelzen des Doppelstranges statt, welches zu einem veränderten Laufverhalten der DNA im Polyacrylamidgel führt. Durch diese Änderung der Sekundärstruktur wird die Migrationsgeschwindigkeit des entsprechenden Fragments im Gel deutlich verlangsamt, sodass das entsprechende DNA-Fragment als einzelner Spot erkennbar wird.

Die Konzentration des Polyacrylamidgels sowohl der ersten als auch der zweiten Dimension, sowie der entsprechende Denaturierungsgradient waren für eine optimale Auftrennung der ds-cDNA-Fragmente entscheidend und mussten deshalb für jeden zu untersuchenden Organismus separat bestimmt werden. Für alle in dieser Arbeit untersuchten Organismen lag die Polyacrylamidkonzentration der 1. Dimension meistens zwischen 8 – 10%, sowie bei konstanten 8% in der 2. Dimension. Abhängig vom GC-Gehalt des entsprechenden Genoms variierten dagegen die verwendeten Denaturierungskonzentrationen für den Gradienten. Während für die Analyse des *Candida spp.*-Transkriptoms (GC-Gehalt bei ca. 36%) ein Gradient zwischen 10% (entspricht 0,7 M Harnstoff/4% (v/v) Formamid) und 40% (2,8 M Harnstoff/16% (v/v) Formamid) ausreichend war, musste die Denaturierungskonzentration für die ds-cDNA aus menschlichen Zellen auf 50% erhöht werden, für die Analyse der cDNA aus Pflanzenzellen wurde sogar ein Denaturierungsgradient zwischen 20-60% verwendet (**Daten nicht gezeigt**).

Nach der Färbung des Gels mithilfe des sehr sensitiven Nukleinsäure-spezifischen Fluoreszenzfarbstoffs SYBR Gold konnten die angereicherten Transkripte in Form von einzelnen Spots detektiert werden. Pro Gel war eine Auftrennung von etwa 2000 Fragmenten möglich. Diese hohe Auflösungskapazität kombiniert mit der Möglichkeit der Komplexitätsregulation während der Probenvorbereitung, war für die Anwendung der *MESSAGE*-Technologie für Genexpressionsanalysen von entscheidendem Vorteil. Je nach Organismus (z. B. Pflanzen-, Säuger- oder Pilzzelle) oder der entsprechenden Wachstumsbedingung unterscheidet sich die Expressionsaktivität einer Zelle und somit die Transkriptanzahl erheblich. So konnten in einer Zelle von *Oryza sativa* oder *Arabidopsis thaliana* über 30000 aktive Gene nachgewiesen werden, während in *C. albicans*-Blastosporen z. B nur etwa 5100 Gene exprimiert werden [Zhang, N *et al.*

2010] C. Grumaz, pers. Kommunikation]. Mit der Aufteilung des Transkriptoms in 192 individuelle Subpopulationen und der Vereinigung von diesen in unterschiedlicher Anzahl, bestand die Möglichkeit, die Komplexität der Probe für die anschließende zweidimensionale Auftrennung zu kontrollieren. Wie hoch die Komplexität des Probematerials noch sein darf, damit cDNA-Fragmente noch als einzelne Spots detektiert werden können, ist in **Abbildung 12** dargestellt. Diese zeigt die Auflösungskapazität der Gele anhand eines zunehmend komplexeren Probematerials von *C. albicans*. Je nachdem, welcher Teil des Transkriptoms zweidimensional aufgetrennt wurde (1/192stel, 1/16tel, 1/4tel bzw. das komplette Transkriptom), variierte die Anzahl der noch als einzelne Spots detektierten ds-cDNA-Fragmente erheblich. Eine Auftrennung aller amplifizierten ds-cDNA-Fragmente in einem einzigen Gel überstieg die Kapazitätsgrenze eines Gels erheblich, selbst bei *Candida spp* (**Abb. 12D**). Durch die Überlagerungen von verschiedenen Spots konnten einzelne Fragmente (insbesondere die mittel-abundanten oder seltenen Transkripte) nicht eindeutig detektiert und identifiziert werden, was zu einem großen Informationsverlust führte.

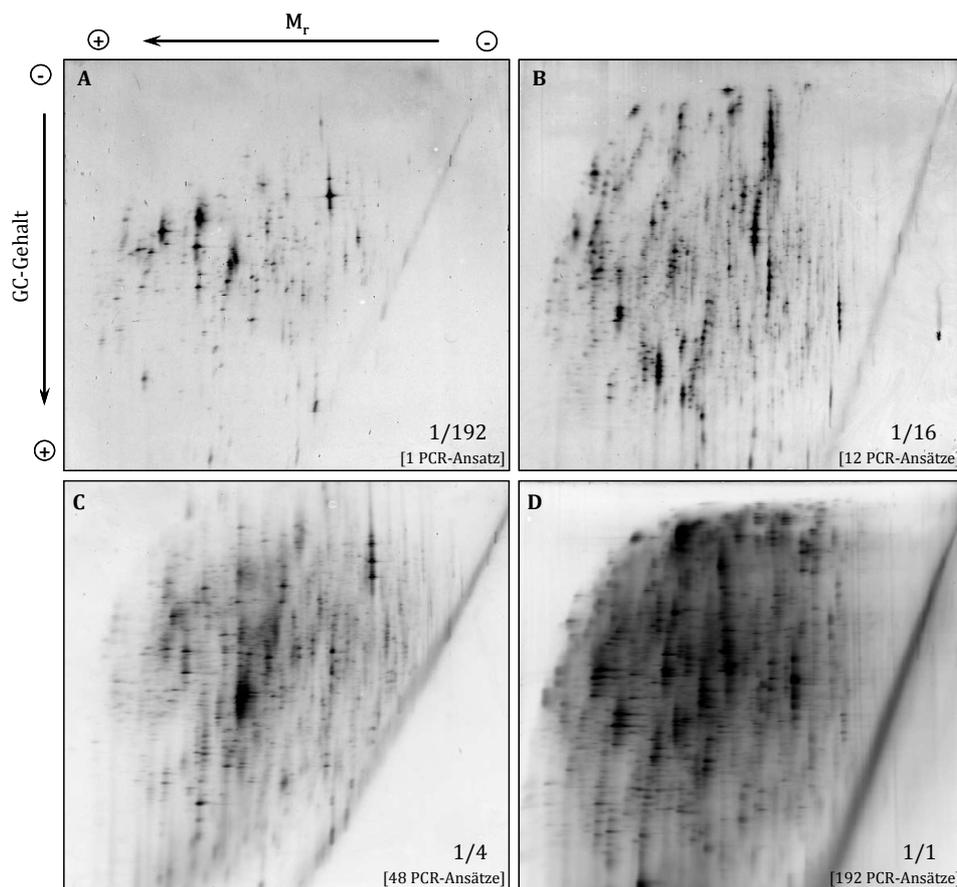


Abbildung 12: Kontrolle der Probenkomplexität und der Auftrennungskapazität.

Unterschiedliche Anzahl an detektierten DNA-Fragmenten, je nachdem welcher Bruchteil des *C. albicans* Transkriptoms analysiert wird. Während der Spezifischen PCR wird das Transkriptom in 192 einzelne Subpopulationen aufgeteilt. Die Komplexität eines PCR-Ansatzes ist in **(A)** dargestellt, in **(B)** das Spotmuster nach Vereinigung von 12 Subpopulationen (entspricht 1/16 des Transkriptoms), in **(C)** das von 48 vereinigten PCR-Ansätzen (1/4 Transkriptom) und in **(D)** das Gesamttranskriptom mit allen angereicherten ds-cDNA-Fragmenten.

Wurde jedoch nach der spezifischen PCR nur eine Subpopulation der angereicherten ds-cDNAs aufgetrennt, konnte mit ca. 100 Fragmenten eine sehr gute Separation erreicht werden (**Abb. 12A**). Gegenüber anderen Gel-basierten Auftrennungsverfahren wie DD, ODD oder RLCS („Restriction landmark cDNA scanning“) [Suzuki, H *et al.* 1996], war eine so hohe Auflösung nur durch *MESSAGE* möglich, da neben der Auftrennung nach Molekulargewicht eine zusätzliche Dimension (GC-Gehalt) ausgenutzt werden konnte, die eine mögliche Identifizierung von Falsch-Positiven erheblich reduzierte. Die niedrige Komplexität des 1/192 Transkriptoms war jedoch mit einem großen Nachteil verbunden, da für eine Analyse des Gesamt-Transkriptoms 192 verschiedene Gele notwendig wären.

Die Möglichkeit, je nach zu untersuchendem Organismus, die einzelnen Subpopulationen kombinieren zu können, bot einen wichtigen Kompromiss aus Komplexität der Probe und Auflösungsvermögen des Gels. Bei der Analyse von verschiedenen *Candida spp.* reichte eine Fraktionierung in Vierteltranskriptome (aus jeweils 48 verschiedenen Ansätzen der Spezifischen PCR) für eine optimale Separation mit durchschnittlich 1160 ds-cDNA-Fragmenten pro Gel aus (**Abb. 12C; Abb. 14A**). Durch die Verwendung der PROTEAN Plus MultiGel-Casting Kammer (Biorad) zum gleichzeitigen Gießen für bis zu 10 Gradientengelen und dem Einsatz der PROTEAN Plus Dodeca Cell Apparatur (Biorad) sowie dem Hoefer Dalt 2D Elektrophoresesystem (Amersham Pharmacia Biotech) mit einer Kapazität von je 10-12 Gelen, konnte der Durchsatz für die Analyse gesteigert werden. Insbesondere die Möglichkeiten zur parallelen Herstellung von „identischen“ Gradientengelen sowie ihre gleichzeitige Separation unter einheitlichen Elektrophoresebedingungen wie Temperatur, Pufferzusammensetzung oder Auftrennungsdauer erlaubten einen hohen Grad an Reproduzierbarkeit und gleichzeitig eine signifikante Durchsatzsteigerung.

Ein weiterer entscheidender Schritt in der Weiterentwicklung der *MESSAGE*-Technologie lag in der Etablierung eines Auswertungssystems. Zur Bestimmung der differentiellen Expression eines Transkripts unter verschiedenen Bedingungen war es notwendig, die ds-cDNA-Fragmente in den unterschiedlichen Gelen zu detektieren und ihre Intensität bestimmen zu können. Diese qualitative und quantitative Auswertung war mit der DELTA2D-Software von DECODON, die eigentlich zur statistischen Auswertung von zweidimensionalen Proteingelen entwickelt wurde, möglich. Nach der Detektion der einzelnen ds-cDNA-Fragmente, konnten differentiell regulierte Gene durch Überlagerung der unterschiedlichen Gelbilder bestimmt und quantifiziert werden.

Die beschriebenen Vorteile der Probenherstellung mit der Möglichkeit zur Komplexitätsregulation, die Steigerung des Durchsatzes durch die Parallelisierung der Auftrennung, die Erhöhung der Reproduzierbarkeit sowie die Etablierung eines Auswertungssystems waren entscheidende Weiterentwicklungen, die eine Anwendung der *MESSAGE*-Technologie für globale, differentielle Transkriptionsprofile erst ermöglichten.

I.2 Anwendung der Technologie für differentielle Genexpressionsanalysen

Die erste Anwendung der *MESSAGE*-Technologie für differentielle Transkriptionsprofile erfolgte in *Candida albicans* am Beispiel des morphologischen Wechsels von der Hefe- zur filamentösen Wachstumsform (**Abbildung 13**). Dies war nicht nur wegen der biologischen Bedeutung der Hyphenbildung für die Pathogenität von *C. albicans* interessant, sondern in erster Linie für die Validierung der *MESSAGE*-Technologie wichtig. Im Gegensatz zu *C. dubliniensis* existierten in *C. albicans* z. B. mit DNA-Mikroarrays etablierte Verfahren zur Analyse der differentiellen Genexpression, so dass die mit *MESSAGE* generierten quantitativen Daten mit unabhängigen Methoden validiert werden konnten.

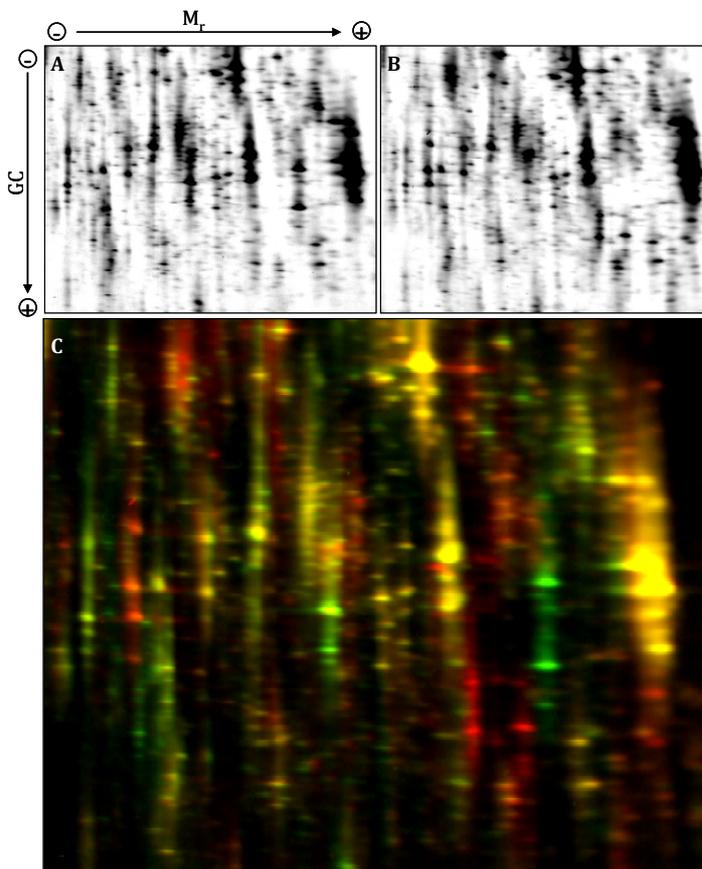


Abbildung 13: Differenzielle Genexpressionsanalyse mithilfe der *MESSAGE*-Technologie.

Korrespondierende Ausschnitte von cDNA-Gele nach der zweidimensionalen Auftrennung der ds-cDNA-Fragmente eines Viertel-Transkriptoms von *Candida albicans* während der Hefe- (**A**) oder der hyphalen Wachstumsform (**B**). Differenziell regulierte Transkripte wurden mittels DELTA2D-Software durch Überlagerung der beiden Gele in Form einer Falschfarbendarstellung ermittelt (**C**). Dabei wurden Gene, die unter den beiden Bedingungen in gleicher Häufigkeit exprimiert waren durch gelbe und differentiell regulierte Transkripte entweder durch grüne (Hefe) und rote (Hyphe) Spots repräsentiert.

I.2.1 Analyse und statistische Auswertung des *Candida albicans*-Transkriptom

Mithilfe der bereits beschriebenen Probenvorbereitung wurden jeweils 1 µg der Gesamt-RNA der als Hefe (YPD, 30°C) oder als echte Hyphen (α -MEM, 37°C) wachsenden *C. albicans*-Zellen zu 3'-terminalen ds-cDNA-Fragmenten umgeschrieben und während der Spezifischen-PCR in 192 einzelne Subpopulationen aufgeteilt. Nach der Vereinigung von jeweils 48 unterschiedlichen Ansätzen der spezifischen PCR zu einer Fraktion, die jeweils ein Vierteltranskriptom repräsentierten, wurden die ds-cDNA-Fragmente mithilfe der 2D-cDNA-Gelelektrophorese hochauflösend aufgetrennt und das komplexe Spotmuster mittels des Fluoreszenzfarbstoffs SYBR Gold visualisiert. Ausschnitte solcher Gele nach zweidimensioneller Auftrennung sind in der **Abb. 13A** und **13B** dargestellt. Durch die statistischer Auswertung des Spotmusters konnten auf diese Weise pro Fraktion und Wachstumsbedingung zwischen 980 und 1450 diskrete ds-cDNA Fragmente als spezifische Spots detektiert werden (**Abb. 14A**). Die Gesamtanzahl aller detektierten Fragmente summiert sich je nach Wachstumsbedingung auf ca. 4400 (während des hyphalen Wachstums) oder auf ca. 4920 (unter Blastosporen-induzierenden Bedingungen). Um aus dieser Menge differentiell regulierte Transkripte zu identifizieren sowie ihre Expressionsunterschiede bestimmen zu können, wurden mithilfe von Falschfarbendarstellungen die entsprechenden Gelausschnitte aus unterschiedlichen Bedingungen übereinander gelegt und auf diese Weise entweder die differentiell oder konstitutiv exprimierte Gene bestimmt (**Abb. 13C**).

Von den 7400 detektierten ds-cDNA-Fragmenten in den beiden analysierten Wachstumsbedingungen zeigten abhängig vom Regulationsfaktor zwischen 6 bis 25% der Spots unterschiedliche Signalintensitäten auf (**Abb. 14B**). Wurde z. B. bei der Analyse eine 2-fache Regulation als differentiell exprimiert angenommen, konnten unter der Hefeform 625 (entspricht 12,71%) und in der Hypheform 550 Spots (12,57%) als induziert identifiziert werden, erhöhte man diesen Regulationsfaktor auf das 4-fache, waren es 158 (3,22%) und 129 Spots (2,95%) unter der jeweiligen Bedingung. Diese Anzahl an differenziellen Spots war vergleichbar mit quantitativen Daten aus DNA-Mikroarrays, die unter Verwendung der identischen isolierten RNAs gewonnen wurden. Dabei konnten von 4871 analysierten ORFs auf dem Array 2,3% (112 Gene) in der Hefeform und 2,11% (103 Gene) in Hyphen als mindestens 2-fach differentiell bestimmt werden. Unter der Berücksichtigung, dass der detektierte dynamische Bereich von DNA-Mikroarrays einem Kompressionseffekt unterliegt und somit signifikant niedriger ist als bei *MESSAGE* (s. auch **Abb. 17**), waren die Datensätze vergleichbar, wenn der 4-fache Regulationsfaktor bei *MESSAGE* der 2-fachen Regulation in DNA-Mikroarrays gegenübergestellt wurde.

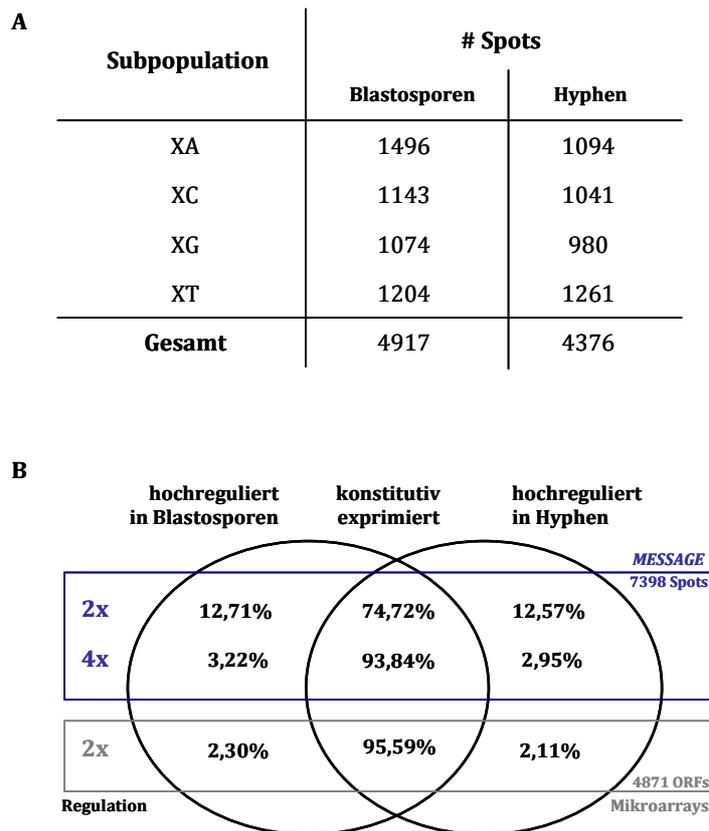


Abbildung 14: Statistische Auswertung des *Candida albicans* Transkriptoms.

Anzahl der detektierten DNA-Fragmente jeder Subpopulation und Wachstumsbedingung des *C. albicans*-Transkriptoms, die auf dem entsprechenden Fusionsbild detektiert werden konnten, das aus zwei technischen und zwei biologischen Replikaten zusammengesetzt war **(A)**. Venn-Diagramm zum Vergleich der prozentualen Anzahl differenziell regulierter Transkripte (entweder 2-fach, oder 4-fach) in der jeweiligen untersuchten Bedingungen der Hefe- oder Hypheform, identifiziert mit der *MESSAGE*-Technologie. Gegenüberstellung zu der Anzahl differenziell exprimierter Transkripte (2-fache Regulation) in DNA-Mikroarrays von *C. albicans* **(B)**.

1.2.2 Identifizierung von ds-cDNA-Fragmenten

Für die Identifizierung von ds-cDNA-Fragmenten wurden aus unterschiedlichen Fraktionen des *C. albicans* Transkriptoms 79 zufällig ausgewählte Spots isoliert und die cDNA - nach der Vervielfältigung mittels PCR durch DNA-Sequenzierung identifiziert. Die entsprechenden DNA-Sequenzen wurden eindeutig den 3'-terminalen Enden von 29 einzelnen Genen zugeordnet **(Tab. 14)**. Diese Daten zeigten, dass jeder ORF nicht nur von einem Spot, sondern durchschnittlich von mehreren Fragmenten abgedeckt wird. Diese Redundanz war z. B. auf Allelbedingte Gen-Variationen oder auf abweichende Polyadenylierungsstellen im 3'-terminalen Bereich der Transkripte und somit auf unterschiedliche 3'-nicht-translatierte Regionen (UTRs) zurückzuführen **(Daten nicht gezeigt)**. Bereits minimale Sequenzunterschiede führten durch

Austausch, Insertion oder Deletion einer oder mehrerer Base(n) zu einem veränderten Migrationsverhalten der Fragmente im zweidimensionalen Gelsystem, welches sich in multiplen Spots für eine spezifische ds-cDNA widerspiegelte. Hier war insbesondere die Separation nach GC-Gehalt in der zweiten Dimension entscheidend, während die alleinige Auftrennung nach Molekulargewicht dieses Auflösungsvermögen nicht aufbringen konnte. Eine unvollständige *RsaI*-Fragmentierung konnte als Ursache für das häufige Auftreten multipler Spots pro ORF ausgeschlossen werden, da alle analysierten DNA-Fragmente an der ersten *RsaI*-Konsensussequenz vom 3'-terminalen Ende eine entsprechende Restriktion aufwiesen.

Die Auswertung der relativen Signalstärke der verschiedenen Spots, die einem ORF zugeordnet werden konnten, ergab deutliche Unterschiede in der Intensität (**Abb. 15A**). Wie in der Abbildung anhand sechs unterschiedlicher Spots für das Gen *RBT5* dargestellt, blieb jedoch die relative Intensitätsverteilung in den beiden Wachstumsbedingungen (Blastosporen und Hyphen) konstant.

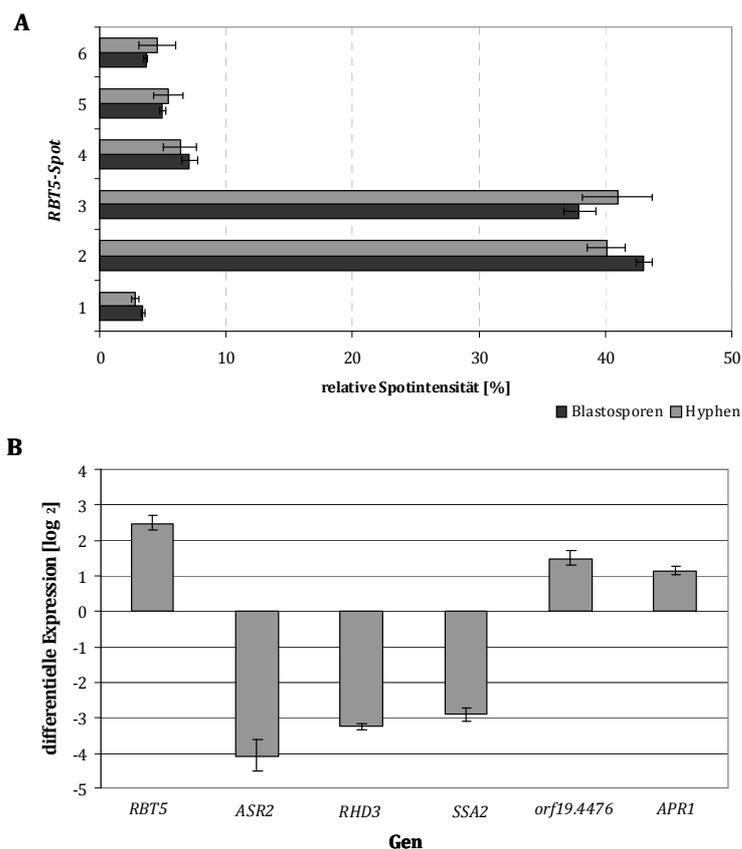


Abbildung 15: Multiple Spots und ihre Reproduzierbarkeit.

Reproduzierbare Verteilung der relativen Spotintensität (angegeben in %) von sechs identifizierten *RBT5*-Spots in zwei unabhängigen Wachstumsbedingungen (**A**). Differenzielle Genexpression (als log₂-Werte) und die entsprechenden Standardabweichung als Fehlerbalken von ausgewählten Genen mit mehreren Fragmenten (n= 2-6 Spots/Gen) angegeben als Quotient aus dem Durchschnitt der relativen Spotintensitäten (%V) aller detektierter Fragmente/Gen/Bedingung während des Hyphenwachstums gegenüber der Hefebedingung (**B**).

Die Verteilung der relative Spotintensität (angegeben in %) dieser ds-cDNA-Fragmente wurde als Quotient aus der Spotintensität (%V) jedes einzelnen Fragments gegenüber der summierten Gesamtintensität aller identifizierten *RBT5*-Spots (definiert als 100%) für jede Wachstumsbedingung einzeln angegeben. Die beschriebene Konstanz in der Verteilung der Spotintensitäten, die auf eine abweichende transkriptionelle Expression der einzelne Fragmente zurückgeführt werden kann, erlaubt die Ermittlung von robusten quantitativen Angaben zur differentiellen Genexpression, unabhängig davon, ob nur ein oder der Durchschnitt von mehreren Fragmenten eines ORFs zur Analyse verwendet wird. Quantitative Daten zur differentiellen Genexpression einiger Gene mit mehreren Spots sind in der **Abbildung 15B** dargestellt. Dabei wurde der Durchschnittswert der einzelnen Spotintensitäten (%V) jedes Fragments pro Wachstumsbedingung verglichen.

Neben den 29 identifizierten Genen im analysierten *C. albicans* Transkriptom konnte von den 79 zufällig ausgewählten Spots ein cDNA-Fragment mit hoher Homologie zum Retrotransposon der sogenannten LTRmoa-Familie identifiziert werden. Aus der Studie von Goodwin TJ *et al.* ist bekannt, dass einige Retrotransposons innerhalb ihrer LTR (long-terminal Repeat) nicht nur eine Promotorsequenz sondern auch Konsensusstellen für Polyadenylierungen des gag- und pol-ORFs aufweisen [Goodwin, TJ and Poulter, RT 2000], so dass ihre transkriptionelle Expression wahrscheinlich ist. Mit der *MESSAGE*-Technologie konnte dieser Sachverhalt nicht nur bestätigt werden, es wurde zusätzlich gezeigt, dass diese Expression während der morphologischen Transition differentiell reguliert wird (s. **Tabelle 14**). Während des hyphalen Wachstums wurde dieser Retrotransposon ca. 14- bis 20-fach stärker transkribiert als unter der Hefebedingung. Dieses Beispiel zeigt ferner, dass *MESSAGE* gegenüber anderen Verfahren wie DNA-Mikroarrays einen entscheidenden Vorteil aufweist. Es ist eine offene Technologieplattform, die keiner vorhergehenden Sequenzinformation bedarf, wodurch sie auch eine Identifizierung von neuen transkriptionellen Einheiten ermöglicht.

I.2.3 Identifizierung und *de novo*-Annotation von neuen transkriptionellen Einheiten

Obwohl im Rahmen dieser Arbeit eine nur vergleichsweise kleine Anzahl differentiell exprimierter Gene des *C. albicans*-Transkriptoms analysiert wurde, konnten überraschenderweise trotzdem mehrere Fragmente identifiziert werden, die keinem bekannten ORF des *C. albicans*-Genoms zugeordnet werden konnten. Die DNA-Sequenzen dieser Fragmente wurden mithilfe von BLAST-Algorithmen dem Chromosom 1 bzw. Chromosom R zugeordnet und ihre vollständigen transkriptionellen Einheiten durch zusätzliche 5'-RACE (Rapid Amplification of 5'-

cDNA Ends)-Experimente bestimmt. Die entsprechende Gesamtlänge von beiden transkriptionellen Einheiten (unit, TU) lag bei 189 bzw. 165 bp, also deutlich unter der festgelegten ORF-Annotationsgrenze von 300 bp für *Candida albicans*. Aus der heutigen Sicht ist jedoch nicht klar, ob die beiden Sequenzen zwei neue ORFs zugeordnet werden können oder möglicherweise zwei nicht-kodierende regulatorische RNA-Einheiten repräsentieren. Mithilfe des **BLASTP**-Algorithmus für die Identifizierung von Proteinsequenz-Homologie konnte gezeigt werden, dass zumindest die TU1 eine Homologie zu Glykosylphosphatidylinositol (GPI)-Proteinen wie Rbr1p (orf19.535) oder Ecm33p (orf19.3010.1) aufweist. Die Identifizierung und *de novo*-Annotation einer neuen transkriptionellen Einheit ist in der **Abbildung 16** dargestellt.

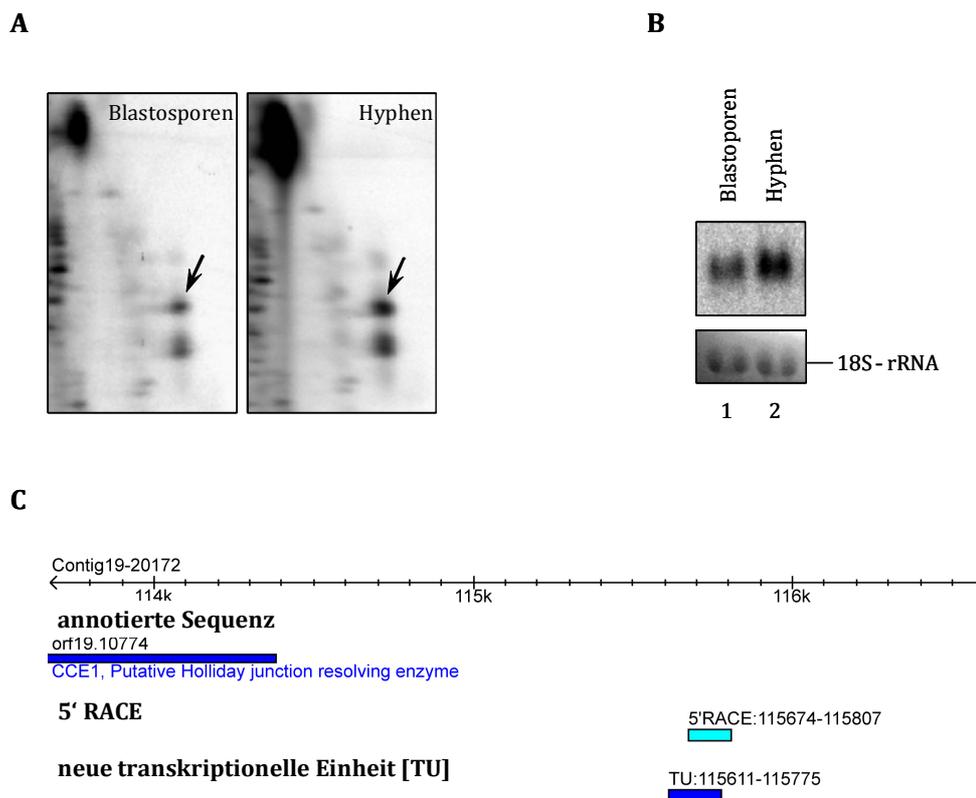


Abbildung 16: De novo-Annotation einer neuen transkriptionellen Einheit in *C. albicans*.

Identifizierung eines differentiell regulierten Fragments nach zweidimensioneller Separation mithilfe der *MESSAGE*-Technologie, die nach der Sequenzierung keinem bekannten ORF zugeordnet werden konnte (A). Die gegenüber Blastosporen stärkere Expression des Transkripts unter hyphalen Wachstumsbedingungen wurde zusätzlich mit Hilfe der Northern Blot-Analyse bestätigt (B). Ausschnitt einer 4-kb langen Region des Chromosoms R von *C. albicans*, in der die neu-identifizierte, transkriptionelle Einheit (TU) im Assembly 21 keinem annotierten ORF entsprach. Die Existenz sowie die vollständige Transkriptlänge wurde mithilfe der 5'-RACE-Experimente bestätigt (C).

I.2.4 Validierung der *MESSAGE*-Technologie mit unabhängigen Verfahren

Von entscheidender Bedeutung für die Etablierung und Eignung einer neuen Technologie ist die Qualität und Reproduzierbarkeit von quantitativen Daten. Solcher Nachweis beruht meistens auf einem Vergleich der generierten Datensätze mit unabhängigen Methoden und wird durch die Angabe statistischer Kenngrößen wie z. B. Mittelwert, Standardabweichung und/oder Korrelationskoeffizient erbracht.

Die Validierung der mit dem *MESSAGE*-System gewonnene Expressionsdaten erfolgte mit Hilfe von bereits etablierten Verfahren für differentielle Genexpressionsanalysen wie quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR) und DNA-Mikroarrays. Für eine bessere Vergleichbarkeit wurde für alle drei Methoden die identische RNA des als Blastospore und als Hyphe wachsenden klinischen Isolats SC5314 von *C. albicans* herangezogen und von diesen entweder genomweite Transkriptionsprofile (DNA-Mikroarrays) erstellt oder mit qRT-PCR für 21 ausgewählte Transkriptionseinheiten das Expressionsverhalten bestimmt. Für die Analyse wurden zwei biologische Experimente (gekennzeichnet als Exp. I und Exp. II) mit jeweils zwei technischen Replikaten herangezogen. Der entsprechende Regulationsfaktor wurde sowohl als Quotient der Expression unter hyphalen Bedingung gegenüber der Hefeform, sowie für eine bessere Vergleichbarkeit der verschiedenen Methoden als entsprechenden \log_2 -Werte angegeben. Die Ergebnisse sind in der **Tabelle 14** zusammenfassend gegenübergestellt. Die Regulationswerte für die beiden neu annotierten Transkriptionseinheiten (TU1 und 2) sowie für die LTR konnten mit den beiden Referenzmethoden (qRT-PCR und DNA-Mikroarrays) nicht bestimmt werden, da die Fragmente nur relativ kurze Sequenzlänge aufwiesen und somit für die Analyse weder passende Sonden noch Oligonukleotide gefunden werden konnten.

Die vergleichende Auswertung ergab eine auffallend hohe Korrelation der Daten zwischen den unterschiedlichen Technologieplattformen. Der Pearson-Korrelationskoeffizient der Expressionsdaten von *MESSAGE* verglichen mit DNA-Mikroarrays und qRT-PCR lag bei 0,871 bzw. 0,939 (s. **Abbildung 17**). Besonders interessant war die Tatsache, dass die Daten von beiden PCR-basierten Verfahren verglichen mit Mikroarrays mit Werten von 0,871 und 0,873 äußerst ähnliche Korrelationskoeffizienten aufwiesen (**Abb. 17C**). Dies zeigte sich auch in der vergleichbar einheitlichen linearen Steigung der Regressionsgeraden von 1,018, was auf den ähnlichen dynamischen Bereich von *MESSAGE* und qRT-PCR hindeutete (**Abb. 17B**).

Tabelle 14: Zusammenstellung der mit MESSAGE identifizierten Transkripte während des Hefe-Hyphe-Übergangs in *C. albicans**

Identifizierte Sequenz ¹⁾	MESSAGE			quantitative RT-PCR			DNA-Mikroarrays			
	Exp.I ^{2,3)}	Exp.II ^{2,3)}	log ₂ (U)	Exp.I ^{2,3)}	Exp.II ^{2,3)}	log ₂ (U)	Exp.I ^{2,3)}	Exp.II ^{2,3)}	log ₂ (U)	log ₂ (II)
Orf19.7284	0,052	0,070	-4,272	0,050	0,060	-4,322	0,114	0,074	-3,127	-3,750
Orf19.7150	0,068	0,127	-3,868	0,130	0,240	-2,943	0,162	0,252	-2,622	-1,989
Orf19.5305	0,073	0,133	-3,770	0,080	0,090	-3,644	0,149	0,134	-2,743	-2,898
Orf19.1065	0,118	0,147	-3,083	n.d ^a	n.d ^a		0,307	0,339	-1,701	-1,559
Orf19.9571	0,120	0,330	-3,058	0,100	0,140	-3,322	0,697	0,723	-0,520	-0,467
Orf19.2765	0,199	0,243	-2,326	0,830	0,830	-0,269	0,782	0,845	-0,355	-0,243
Orf19.10201	0,232	0,132	-2,107	0,290	0,230	-1,786	0,908	0,843	-0,139	-0,246
Orf19.3278	0,317	0,588	-1,657	0,430	0,490	-1,218	0,691	0,684	-0,532	-0,547
Orf19.3575	0,703	0,419	-0,508	0,790	0,790	-0,340	0,762	0,646	-0,392	-0,630
Orf19.868	0,729	1,056	-0,455	0,460	0,440	-1,120	0,902	0,894	-0,148	-0,162
Orf19.4618	0,743	0,557	-0,428	n.d ^a	n.d ^a		0,720	0,865	-0,474	-0,210
X	0,858	0,706	-0,220	n.d ^b	n.d ^b		n.d ^c	n.d ^c		
Orf19.3651	1,165	0,947	0,220	n.d ^a	n.d ^a	0,176	1,208	0,798	0,272	-0,326
Orf19.395	1,234	0,896	0,303	1,130	1,070	0,176	1,023	0,750	0,032	-0,415
Orf19.2023	1,307	1,590	0,386	0,680	1,420	-0,556	0,668	0,983	-0,583	-0,024
Orf19.6286.2	1,389	1,080	0,474	0,880	0,940	-0,184	n.d ^c	n.d ^c		
Orf19.1949	2,063	1,646	1,045	2,070	2,380	1,050	1,816	2,132	0,861	1,092
X	2,376	1,035	1,248	n.d ^b	n.d ^b		n.d ^c	n.d ^c		
Orf19.1891	2,832	1,916	1,502	2,550	1,790	1,350	1,828	1,527	0,870	0,611
Orf19.4476	3,581	1,874	1,840	n.d ^a	n.d ^a		2,716	1,877	1,441	0,908
Orf19.2241	4,778	2,884	2,256	n.d ^a	n.d ^a		1,817	1,339	0,862	0,422
Orf19.4255	5,293	5,295	2,404	n.d ^a	n.d ^a		4,372	6,508	2,128	2,702
Orf19.5636	5,567	5,518	2,477	7,630	8,310	2,932	6,738	7,005	2,752	2,808
Orf19.638	6,190	3,794	2,630	49,220	24,540	5,621	n.d ^c	n.d ^c		
Orf19.1585	7,729	7,030	2,950	13,190	17,530	3,721	2,135	2,526	1,095	1,337
Orf19.7610	7,841	6,131	2,971	5,200	5,760	2,379	1,657	1,965	0,728	0,975
Orf19.7561	10,216	4,174	3,353	5,530	7,420	2,467	1,042	1,031	0,060	0,045
Orf19.3940.1	10,344	2,545	3,371	n.d ^b	n.d ^b		n.d ^c	n.d ^c		
Orf19.4145	11,510	6,708	3,525	9,250	11,430	3,209	3,102	3,356	1,633	1,747
Orf19.7114	17,860	16,397	4,159	n.d ^a	n.d ^a		8,258	9,521	3,046	3,251
Orf19.2355	20,295	14,022	4,343	n.d ^b	n.d ^b		n.d ^c	n.d ^c		
ALS10	82,417	17,974	6,365	53,950	58,550	5,754	3,489	5,057	1,803	2,338

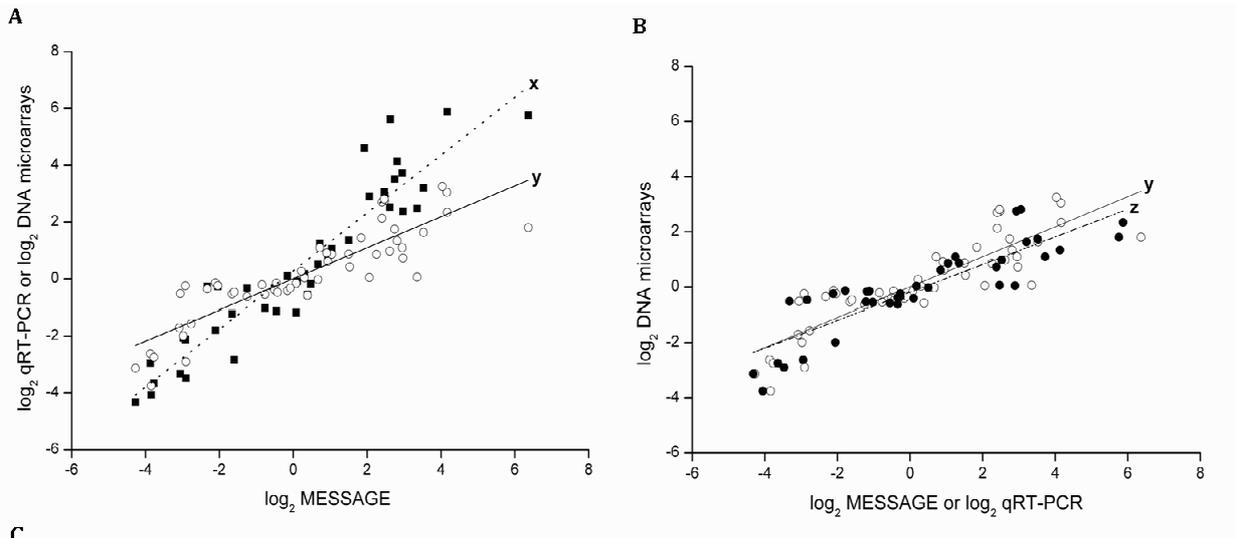
¹⁾ Systematische Bezeichnung laut *Candida* Genom Datenbank (CGD); ²⁾ Relative Änderungen der Genexpression in *C. albicans* (Vergleich: Hyphales Zellwachstum gegenüber Blastosporen)

³⁾ Exp.I und Exp.II sind biologische Replikate; X: Kennzeichnung einer neuen transkriptionellen Einheit (unit) (TU), die in der bisherigen Annotation der *C. albicans* Sequenz (Assembly 19) nicht berücksichtigt war; n.d^a: nicht analysiert; n.d^b: keine passende UPL-Sonde gefunden wurde; n.d^c: keine Aussage möglich, da keine Sonde auf dem Array vorhanden war

*sowie die Gegenüberstellung der Genexpressionsdaten zum Vergleich mit zwei Referenztechnologie-Plattformen wie DNA-Mikroarrays und qRT-PCR.

Auf der anderen Seite war ein charakteristischer Kompressionseffekt der Hybridisierungsbasierten DNA-Mikroarrays zu beobachten, wenn die differentiellen Genexpressionsdaten mit *MESSAGE* und/oder qRT-PCR verglichen wurden. Die Steigung der Regressionsgeraden lag in diesem Fall bei 0,545 bzw. bei 0,502 (vgl. **Abb. 17B** und **C**).

Zusammenfassend zeigten diese Ergebnisse eine sehr hohe Korrelation der *MESSAGE*-generierten Daten zu qRT-PCR.



Korrelation	Pearson Korr. koef.	Steigung
<i>MESSAGE</i> vs. qRT-PCR	$r_x = 0,939$	$s_x = 1,018$
<i>MESSAGE</i> vs. DNA-Mikroarrays	$r_y = 0,871$	$s_y = 0,545$
qRT-PCR vs. DNA-Mikroarrays	$r_z = 0,873$	$s_z = 0,502$

Abbildung 17: Validierung von *MESSAGE* mit unabhängigen Methoden wie DNA-Mikroarrays und qRT-PCR.

Die Korrelation der log₂-Werte der differentiellen Expression zwischen *MESSAGE* und qRT-PCR (schwarze Quadrate) und zwischen *MESSAGE* und DNA-Mikroarrays (offene Kreise), sowie die zugehörigen lineare Regressionsgeraden **x** und **y** im gleichen Streudiagramm **(A)**. Graphische Darstellung der Korrelation der log₂-Werte zwischen *MESSAGE* und DNA-Mikroarrays (offene Kreise), sowie zwischen qRT-PCR und DNA-Mikroarrays (schwarze Kreise) mit den entsprechenden Regressionsgeraden **y** und **z** **(B)**. Angaben zu entsprechenden Pearson-Korrelationskoeffizienten sind als r_{xyz} sowie die jeweilige Steigungen der jeweiligen Regressionsgeraden als s_{xyz} angegeben **(C)**.

Interessant war in diesem Zusammenhang auch die Tatsache, dass die *MESSAGE*-Technologie vergleichbare und stark reproduzierbare Ergebnisse zeigte, selbst wenn nur geringe Mengen an RNA als Ausgangsmaterial verwendet wurden. So konnte die anfängliche RNA-Konzentration für die cDNA-Synthese bis auf 10 ng reduziert werden, ohne dass die Qualität der Ergebnisse kompromittiert wurde. So lag der Pearson-Korrelationsfaktor für technische Replikate bei einer Ausgangsmenge von 10 ng bei 0,983, vergleichbar mit dem Korrelationskoeffizienten von 0,985 für 1 µg **(Daten nicht gezeigt)**.

I.2.5 Differentielle Genexpressionsanalyse während der morphologischen Transition in *Candida dubliniensis*

Wie bereits beschrieben, ist neben *Candida albicans* auch *Candida dubliniensis* in der Lage einen Morphologiewechsel einzugehen und von der sphärischen Blastospore zu filamentösen Formen wie Hyphen oder Pseudohyphen auszuwachsen. Unter *in vitro*-Bedingungen findet dieser Wechsel im Gegensatz zu *C. albicans* jedoch nur unter äußerst nährstoffarmen Umweltbedingungen statt, wie z. B. Wasser supplementiert mit 10% (v/v) fötalem Kälberserum (FCS) (vgl. **Abb. 2**). Die Umgestaltung der Morphologie unterliegt großen Veränderungen der Genexpression, die jedoch in *C. dubliniensis* – im Gegensatz zu *C. albicans* – aufgrund von fehlenden *C. dubliniensis*-spezifischen DNA-Mikroarrays zum Zeitpunkt dieser Arbeit genomweit nicht analysiert werden konnten. Somit ist dies die erste Studie, die in *C. dubliniensis* mithilfe der *MESSAGE*-Technologie spezifische Transkriptionsprofile beschreibt. Von 56 identifizierten Genen waren 36 während der morphologischen Transition von der Hefe zur hyphalen Wachstumsform in ihrer Expression differentiell reguliert. Die entsprechenden Regulationsfaktoren sind als \log_2 -Werte in der **Tabelle 15** zusammengefasst. Wie in *C. albicans* wurden die Expressionswerte einiger Transkripte mittels qRT-PCR validiert.

Vergleichend mit Genexpressionsanalysen von *C. albicans* konnten auch in *C. dubliniensis* eine Gruppe von Genen als differentiell identifiziert werden, deren Proteine an der Zelloberfläche lokalisiert sind, was darauf hindeutet, dass während der Morphogenese die Oberfläche modifiziert wird. Dazu gehören Proteine wie CdRbt5p, CdIhd1p oder CdPga38p, deren Homologe in *C. albicans* eine (mögliche) GPI-Ankersequenz aufweisen und somit kovalent an der Zellwand verknüpft sind, sowie weitere Zelloberflächen-Proteine wie die 1,3- β -Glucanosyltransferase CdPhr2p, das Oberflächenantigen CdCsa2p oder die sekretierte Lipase CdLip5p. Für manche Gen-Homologe in *C. albicans* wie z. B. das für *RBT5* ist eine Serum-induzierte Expression in hyphalen Zellen (vgl. z. B. **Tabelle 14**) oder im Allgemeinen eine stärkere Regulation in den Hyphen (vgl. *IHD1*) bereits beschrieben worden und ist somit in beiden *Candida*-Arten vergleichbar [Nantel, A *et al.* 2002; De Groot, PW *et al.* 2003].

Wie in den Transkriptionsanalysen von *C. albicans* wurden auch in *C. dubliniensis* mit der *MESSAGE*-Technologie neue transkriptionelle Einheiten (TU) identifiziert und durch RACE-Experimente bestätigt, die im Genom von *C. dubliniensis* noch nicht annotiert waren. Sequenzanalysen ergaben, dass eine TU (pot. TU1) mit *PGA48* einen entsprechenden Homolog in *C. albicans* hatte (vgl. **Tab. 15**), dessen Protein wie weitere Mitglieder der Pga-Familie eine GPI-Ankersequenz aufwies und dadurch zu Zellwand-Proteinen dazugezählt werden konnte. Die zweite Transkriptionseinheit (pot. TU2) zeigte eine signifikante Homologie zum Tca2-transposablen Element mit einer noch unbekanntem Funktion.

Tabelle 15: Differentiell regulierte Gene des *C. dubliniensis* Wildtypstammes während des Hefe-Hyphé Übergangs*

Identifizierter ORF	Homologe in <i>Candida albicans</i>		MESSAGE	qRT-PCR	
Kohlenhydrat-Metabolismus					
Cd36_46050	Orf19.2877	<i>PDC11</i>	Pyruvatdecarboxylase	-4,907	-3,325
Cd36_41790	Orf19.4602	<i>MDH1-1</i>	mitochondrielle Malatdehydrogenase	-1,377	
Cd36_46580	Orf19.3097	<i>PDA1</i>	Pyruvatdehydrogenase	1,212	
Cd36_09130	Orf19.4833	<i>MLS1</i>	Malat-Synthase	1,455	
Cd36_32310	Orf19.1860	<i>LSC2</i>	<i>beta</i> -Untereinheit der Succinat-CoA Ligase	1,457	
Cd36_30420	Orf19.638	<i>FDH1</i>	Formiatdehydrogenase	1,522	2,961
Cd36_01550	Orf19.3358	<i>LSC1</i>	Untereinheit der Succinat-CoA Ligase	1,760	1,267
Cd36_17740	Orf19.5806	<i>ALD5</i>	NADP+-Aldehyddehydrogenase	2,721	
Strukturelle Einheit des Ribosoms					
Cd36_22240	Orf19.2179.2	<i>RPS10</i>	Einheit des Ribosoms	-3,788	
Cd36_41520	Orf19.4632	<i>RPL20B</i>	Einheit des Ribosoms	-1,726	
Cd36_00190	Orf19.6085	<i>RPL16A</i>	Einheit des Ribosoms	-1,552	
Cd36_50070	Orf19.5698		Einheit des Ribosoms	-1,071	
Zellwand /Zelloberfläche					
Cd36_00220	Orf19.6081	<i>PHR2</i>	1,3- <i>beta</i> -Glukanosyltransferase	-3,145	-3,857
Cd36_42320	Orf19.2758	<i>PGA38</i>	GPI-Anker Protein, Funktion unbekannt	-2,497	
Cd36_72520	Orf19.5179	<i>LIP5</i>	sekretierte Lipase	1,019	
Cd36_46390	Orf19.3117	<i>CSA2</i>	vorhergesagtes Zelloberflächen-Antigen	1,192	
Cd36_27050	Orf19.2613	<i>ECM4</i>	mögl. Glutathione S-Alkyl Transferase Aktivität	1,284	1,968
Pot. TU1	Orf19.6321	<i>PGA48</i>	mögl. GPI-Anker Protein mit unbekannter Funktion	1,516	1,672
Cd36_64370	Orf19.5760	<i>IHD1</i>	mögl. GPI-Anker Protein mit unbekannter Funktion	2,118	
Cd36_40190	Orf19.5636	<i>RBT5</i>	GPI-Anker Zellwandprotein	7,818	
Allgem. oder Vesikeln-vermittelter Transport					
Cd36_15930	Orf19.2021	<i>HGT8</i>	Zuckertransporter	-1,781	
Cd36_52110	Orf19.4236	<i>RET2</i>	mögl. Vesikel-vermittelter Transport vom ER zu Golgi	-1,327	-0,689
Cd36_28770	Orf19.4384	<i>HXT5</i>	Zuckertransporter	4,794	4,956
Biosynthese					
Cd36_17870	Orf19.5788	<i>EFT2</i>	Elongationsfaktor 2 (eEF2); GTPase	-1,549	-0,943
Cd36_80690	Orf19.5379	<i>ERG4</i>	Ergosterolbiosynthese	-1,442	
Cd36_55010	Orf19.4040	<i>ILV3</i>	Isoleucin und Valin-Biosynthese	-1,414	
Cd36_15230	Orf19.2107.1	<i>STF2</i>	ATP-Biosynthese	3,012	
Signaltransduktion					
Cd36_72730	Orf19.5148	<i>CYR1</i>	Adenylylacyclase	1,924	
Cd36_22420	Orf19.1354	<i>UCF1</i>	unbekannte Funktion, cAMP induziert während des filamentösen Wachstums	3,439	
Verschiedenes					
Cd36_30720	Orf19.5285	<i>PST3</i>	mögliches Flavodoxin	-2,106	
Pot. TU2			Homolog zum Tca2-transposabl. Element	-1,703	-1,550
Cd36_83880	Orf19.6925	<i>HTB1</i>	Histon H2B	1,956	1,153
vorhergesagter ORF					
Cd36_81460	Orf19.1691			-3,218	
Cd36_03300	Orf19.3053			-1,944	-2,394
Cd36_70560	Orf19.7085			2,660	
Cd36_26250	Orf19.3230			2,893	
Cd36_10510	Orf19.2296		vergleichbar mit Mucinen	3,067	

*Als differentiell wurden die Gene angesehen, die im Vergleich zum Hefe-Wachstumsform mindestens 2-fach hoch- oder runterreguliert waren (Angaben als log₂-Werte). Negative log₂-Werte entsprachen einer induzierten Expression unter der Hefebedingungen (YPD), während positive Werte eine stärkere Expression unter hypheninduzierenden Bedingungen (H₂O+Serum) darstellen. Zur systematischen Bezeichnung der identifizierten ORFs wurde die *Candida dubliniensis* GeneDB herangezogen. Für eine Auswahl von Genen wurden die Regulationswerte mittels der quantitativen RealTime-PCR (qRT-PCR) validiert.

Aufgrund von unterschiedlichen Nährstoffverhältnissen unter den beiden untersuchten Wachstumsmedien konnten zahlreiche Gene als differenziell identifiziert werden, die zum Kohlenhydrat-Metabolismus gezählt werden. Unter nährstoffarmen Bedingungen des Wassers findet insbesondere in den hyphal-wachsenden Zellen eine Induktion des Citrat- und des Glyoxylatzykluses statt, wodurch sowohl die Energieproduktion der Zelle wie auch die Kohlenhydratbiosynthese gewährleistet werden soll. Eine Übersicht der metabolischen Prozesse mit allen identifizierten Genen, die während der Hypheninduktion in Wasser supplementiert mit 10% FCS gegenüber dem Vollmedium differenziell reguliert waren, sind in der **Abbildung 18** dargestellt.

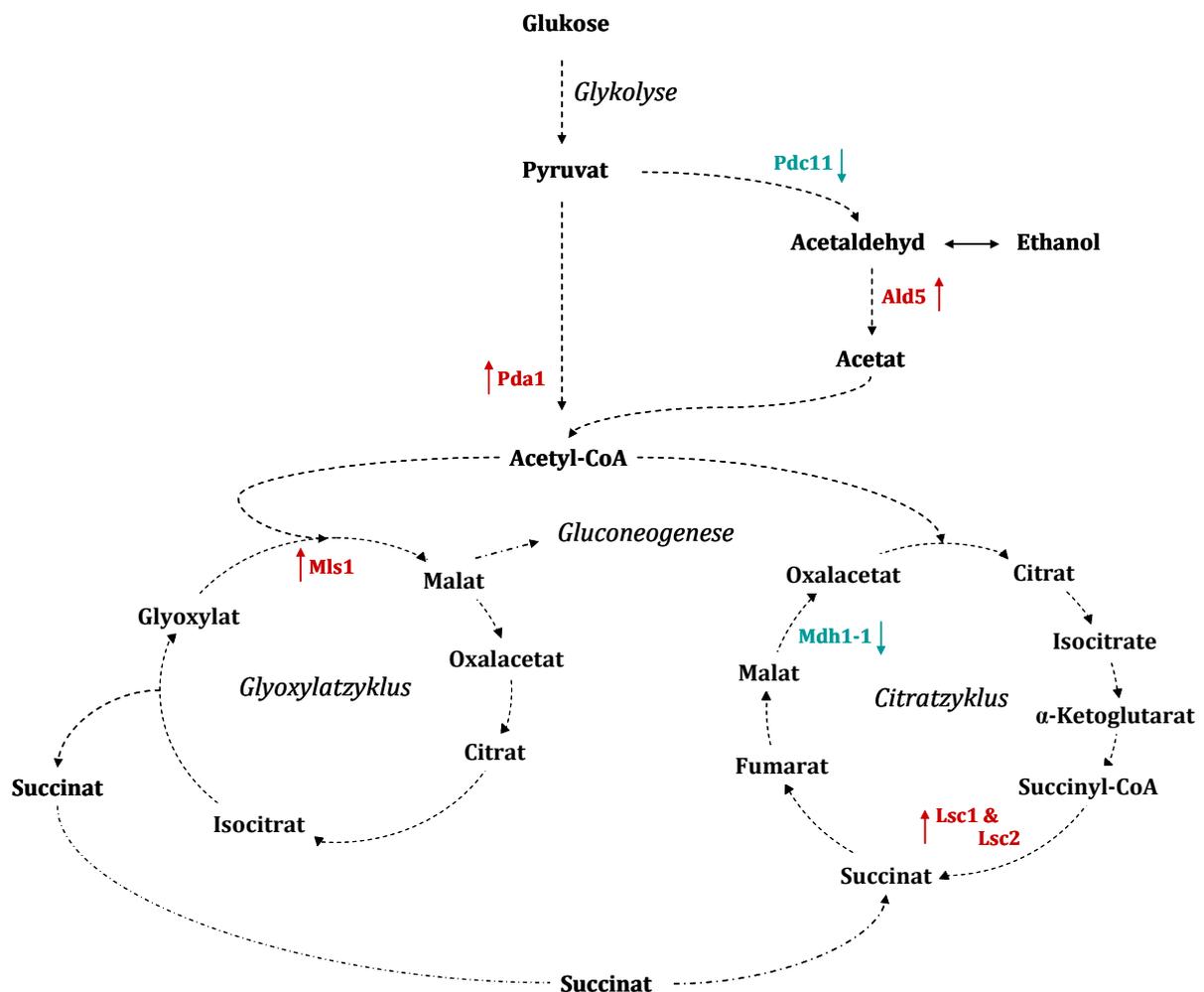


Abbildung 18: Übersicht der Stoffwechselwege des Kohlenhydratmetabolismus.

Schematische Übersicht der Stoffwechselwege sowie von denjenige Genprodukten, die in *C. dubliniensis* unter hypheninduzierenden Bedingungen des Wasser supplementiert mit 10% FCS verglichen mit Vollmedium (YPD) mit der *MESSAGE*-Technologie als differenziell-reguliert identifiziert werden konnten. Rot markierte Enzyme (mit dem Pfeil nach oben) stellen eine mind. 2-fache Induktion in Hyphen dar, während grün -markierte Proteine eine mind. 2-fach stärkere Expression der Gene unter Hefebedingung bedeuten.

Entscheidend für die metabolische Aktivität der Zelle unter diesen Minimalbedingungen ist die erhöhte Produktion von Acetyl-CoA, das als zentrales Intermediat für alle folgenden Stoffwechselaktivitäten des Energie- und Kohlenhydratmetabolismus von entscheidender Bedeutung ist. Acetyl-CoA entsteht bei verschiedenen Stoffwechselfvorgängen z. B. über die oxidative Decarboxylierung des Pyruvats, das mithilfe von mehreren Enzymen (u. a. Pda1p) des mitochondrialen Pyruvatdehydrogenase-Komplexes vollzogen wird oder während des zytosolischen Fermentationsprozesses von C2-Einheiten wie Ethanol über eine Umwandlung des Acetaldehyds durch die Aldehyddehydrogenase Ald5p zuerst zu Acetat, anschließend zu Acetyl-CoA [Strijbis, K and Distel, B 2010]. Da die Expression der zytosolischen Pyruvatdecarboxylase Pdc11p in *C. dubliniensis* unter den hypheninduzierenden Bedingungen signifikant (ca. 30-fach) runterreguliert wurde, ist davon auszugehen, dass das Acetaldehyd nicht durch die Decarboxylierung des Pyruvats gebildet wurde, sondern bei diesen Bedingungen aus C2-Komponenten synthetisiert worden ist.

Ausgehend von Acetyl-CoA findet sowohl zur Energiegewinnung wie auch zur Kohlenhydratbiosynthese sowohl in den Mitochondrien wie auch in den Peroxisomen der Zellen eine Induktion des Citrat- bzw. des Glyoxylatzykluses statt. Während des Glyoxylatzykluses werden zwei Acetyl-CoA-Einheiten zu einer C4-Einheit (entweder direkt zu Succinat oder indirekt über Glyoxylat zu Malat) umgewandelt. Succinat wird anschließend zu den Mitochondrien transportiert und steht dort dem Citrat-Zyklus für die Energieproduktion zur Verfügung. Dies erklärt auch die 8-fache *STF2*-Induktion unter hyphalen Bedingungen, dessen Genprodukt für die ATP-Biosynthese verwendet wird. Ein weiteres Produkt des Glyoxylatzykluses Malat wird dagegen zum Oxalacetat oxidiert, das entweder durch die Kondensation mit einem weiteren Molekül Acetyl-CoA eine weitere Zyklusrunde einleitet oder in das Zytosol transportiert wird, wo es in dieser Form als Vorläufer für die Gluconeogenese verwendet werden kann. Diese spezifische transkriptionelle Antwort zeigt sich dadurch, dass in den Hyphen ein Schlüsselenzym des Glyoxylatzykluses wie die Malat-Synthase Mls1p ca. 3-fach stärker exprimiert wird als in den Blastosporen. Die geringere Expression des Gens für die mitochondrielle Malatdehydrogenase *MDH1-1*, die im Citratzyklus die Oxidation von Malat zu Oxalacetat katalysiert, ist ein weiterer Hinweis, dass das Succinat aus dem Glyoxylatzyklus in den Citratcyclus eingespeist wird. Hinweise auf die verstärkte Induktion des Citratzyklus ist die Aktivierung von *LSC1* und *LSC2*, die für die beiden Untereinheiten der Succinat-CoA Ligase kodieren.

Ein weiterer Hinweis, dass die Zellen unter diesen nährstoffarmen Bedingungen auf die Energiegewinnung angewiesen waren, ist die Tatsache, dass zahlreiche anabolische Prozesse, wie die Protein-, Zellmembran- und Aminosäurebiosynthese, die Energie für die Synthese benötigen, unter den hyphalen Bedingungen stark reprimiert waren. Dazu gehörten Gene, die sowohl für die strukturellen ribosomalen Untereinheiten wie *RPS10*, *RPL20B* oder *RPL16A* kodieren oder als Elongationsfaktoren z. B. Eft2p wie auch Transportproteine (z. B. Ret2p) für den Proteinaufbau und -transport notwendig waren. Auch Gene für die Ergosterol- (*ERG4*) oder die Isoleucin- und Valinbiosynthese (*ILV3*) waren in hyphalen Zellen – verglichen mit Blastosporen – beinahe um das 3-fache reprimiert.

Die morphologischen Transition von der Hefe zur hyphalen Wachstumsform wird in *C. albicans* vor allem durch den intrazellulären cAMP-Spiegel - vermittelten Proteinkinase (PKA) - Signaltransduktionsweg reguliert [Selmecki, A *et al.* 2006; Biswas, S *et al.* 2007]. Dieser Signalweg scheint auch für die Induktion der Morphogenese in *C. dubliniensis* verantwortlich zu sein. Trotz der stichprobenartigen Identifizierung von differentiell regulierten ds-cDNA-Fragmenten, konnten zwei Transkripte bestimmt werden, die zu diesem Signalweg zugezählt werden können. Dazu gehört das *CdUCF1*, dessen Homolog in *C. albicans* cAMP-abhängig während des filamentösen Wachstums induziert ist, sowie das Transkript für die Adenylatcyclase Cyr1p. Beide Gene zeigen unter filamentösen Bedingungen eine etwa 4- bis 9-fache Induktion.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass gravierende Änderungen der Nährstoffverhältnisse in *C. dubliniensis* globale Genexpressionsänderungen hervorrufen, die den Morphologiewechsel auslösen. Die molekulare Regulation von diesen morphologischen Prozessen sollte nun im Folgenden näher untersucht werden.

II. Molekulare Regulation morphogenetischer Prozesse in *Candida dubliniensis*

Zelluläre, reversible Differenzierungsprozesse in (Hemi-)Ascomyceten werden u. a. durch eine konservierte Klasse von Transkriptionsfaktoren reguliert, die zu den sog. APSES-Proteinen gezählt werden [Ramirez-Zavala, B and Dominguez, A 2008; Shelest, E 2008]. Mitglieder der APSES-Familie (z. B. Asm1p von *Neurospora crassa*, Sok2p von *Saccharomyces cerevisiae* oder Efg1p von *Candida albicans*) besitzen eine charakteristische DNA-Bindedomäne, die eine basische Helix-Loop-Helix (bHLH)-Struktur aufweist [Dutton, JR *et al.* 1997]. Inwieweit APSES-Proteine auch in *C. dubliniensis* konserviert sind und welchen Einfluss sie auf die Induktion morphogenetischer Prozesse dieses Pilzes haben, wurde im folgendem untersucht.

II.1 Identifizierung von APSES-Proteinen in *Candida dubliniensis*

Um die APSES-Domäne bestimmen zu können, wurden die bereits charakterisierten Familienmitglieder anderer Pilze wie Efg1p und Efh1p von *C. albicans*, Sok2p und Phd1p aus *S. cerevisiae*, Asm1p von *N. crassa* sowie StuAp von *Aspergillus nidulans* mithilfe des COBALT-Algorithmus (Multiple Alignment, NCBI) nach konservierten, homologen Aminosäuren angeordnet [Papadopoulos, JS and Agarwala, R 2007]. Obwohl sich die entsprechenden Proteine sowohl in der Länge wie auch in der Gesamtsequenz erheblich unterschieden, zeigten sie jedoch einen ca. 100 AS-langen, hoch-konservierten Bereich, der der basischen Helix-Loop-Helix-Domäne zugeordnet werden konnte. **Abbildung 19** zeigt das Sequenz-Logo mit 56 identischen Aminosäuren dieser Domäne in allen analysierten Proteinen.



Abbildung 19: Sequenz-Logo der konservierten APSES-Domäne.

Alle 6 unterschiedliche APSES-Proteine wiesen in ihrer Sequenz eine 101 AS lange, basische Helix-Loop-Helix-Domäne auf. Das Sequenz-Logo (erstellt mit WebLogo, <http://weblogo.berkeley.edu/>) charakterisiert die konservierten Aminosäuren (gekennzeichnet als einzelne Buchstaben) oder weniger stark konservierte Aminosäuren (mehrere Buchstaben übereinander) für alle verglichenen Proteinsequenzen.

Für die Identifizierung homologer APSES-Proteine in *C. dubliniensis* wurde die Konsensussequenz aus 100%-konservierten Aminosäuren der bHLH-Domäne (s. oben) mithilfe des BLASTp-Algorithmus mit der Proteomdatenbank von *C. dubliniensis* abgeglichen. Es konnten zwei Proteine identifiziert werden, die mit einer statistisch signifikanten Wahrscheinlichkeit (E-value von 10^{-7}) 75% der Suchsequenz dieser APSES-Domäne abdecken konnten. Diese Proteinsequenzen konnten sowohl der systematischen Gen-Bezeichnung Cd36_20730 (Chromosom 2) wie auch Cd36_33560 (Chromosom R) zugeordnet werden, die hohe Sequenzhomologie mit dem Efh1p bzw. Efg1p von *C. albicans* aufwiesen.

Aufgrund seiner Bedeutung für die Regulation der Morphogenese in *C. dubliniensis*, die im weiteren Verlauf dieser Arbeit gezeigt werden, wird im Folgenden die Bezeichnung Mom1 (Modulator of Morphogenesis 1) für Cd36_33560 verwendet.

II.2 Funktionelle Charakterisierung des APSES-Proteins Mom1p in *C. dubliniensis*

Wie bereits durch differenzielle Genexpressionsstudien gezeigt werden konnte, findet während der morphogenetischen Transition von der sphärischen Blastospore zur hyphalen Wachstumsform in *C. dubliniensis* – vergleichbar mit der Situation in *C. albicans* - eine starke Induktion des cAMP-PKA-Signaltransduktionsweges statt. Da in *C. albicans* das APSES-Protein Efg1 den entscheidenden Transkriptionsfaktor dieses Signalweges darstellt, wurde der entsprechende Homolog in *C. dubliniensis* (Mom1p) bezüglich seiner Fähigkeit zur Regulation morphogenetischer Prozesse funktionell charakterisiert.

II.2.1 Deletion von MOM1 (Cd36_33560) in *C. dubliniensis*

i) Genomlokus von MOM1

Die **Abbildung 20** zeigt in der Übersicht einen Ausschnitt des *MOM1* (Cd36_33560)-Genlokus auf dem Chromosom R des *C. dubliniensis* Stammes CD36. Besonders auffallend sind die unterschiedlich lange intergenomische Bereiche *upstream* und *downstream* des *MOM*-Gens. So ist die *upstream*-Promotorregion bis zum nächstliegenden ORF mit 9514 bp sehr lang, wohingegen bereits nach ca. 980 bp hinter dem *MOM1*-Stoppcodon ein sog. Pseudo-Gen (Cd36_33565) lokalisiert ist. Die als flankierende Regionen FR1, FR2 und FR3 bezeichneten Bereiche wurden für die Konstruktion der Deletions- und Reintegrationsstämme verwendet (siehe **Abb. 21**). Mit einer durchschnittlichen Länge von ca. 410 bp waren sie für eine ortsspezifische Integration ausreichend.

CD36_ChrR

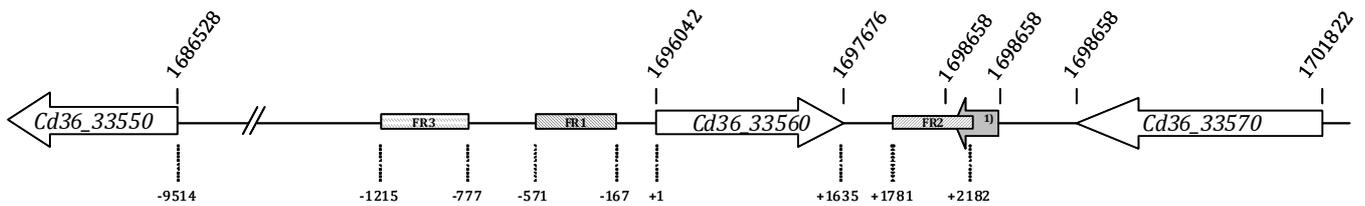


Abbildung 20: Genlokus von *MOM1* (*Cd36_33560*).

Schematische Darstellung eines Genomausschnitts aus Chromosom R des *C. dubliniensis*-Wildtypstammes CD36, auf dem das *MOM1* (*Cd36_33560*) lokalisiert ist, das durch den ORF *Cd36_33550*, dem Pseudogen *Cd36_33565*¹⁾ und einem weiteren Gen *Cd36_33570* umgeben wird. Die entsprechenden Bereiche auf dem Chromosom werden durch die Zahlen über den ORFs angegeben. FR1, FR2 und FR3 (FR = flankierende Region) kennzeichnen die Position und die jeweilige Länge der Bereiche, die für die Deletion (und Reintegration) von *MOM1* (*Cd36_33560*) verwendet worden sind. Die Positionsangaben unterhalb der Abbildung beziehen sich auf das Startcodon des *MOM1*.

ii) Prinzip der ortsspezifischen Gendeletion im diploiden Genom von *Candida dubliniensis*

Die Konstruktion der Deletionsstämme erfolgte im diploiden Genom von *C. dubliniensis* mithilfe des *SAT1*-Flipper-Systems [Reuss, O *et al.* 2004], mit dem in *C. albicans* bereits zahlreiche Gene deletiert worden sind. Im Gegensatz zu anderen Deletionssystemen wie z. B. der *URA3*-Flipperkassette nützt der *SAT1*-Flipper mit Nourseothricin einen dominanten Selektionsmarker aus, wodurch eine Geninaktivierung im Wildtyp-Hintergrund möglich wird.

Der Aufbau der pSFS2A-Deletionskassette ist in der **Abbildung 21A** dargestellt. Es besteht aus einem an *Candida* adaptierten Nourseothricin-Resistenzgen *caSAT1* als Selektionsmarker und einem Rekombinasegen *caFLP*, das unter der Kontrolle des induzierbaren *MAL2*-Promotors sowie einer terminalen Aktin-Sequenz steht. Die Kassette ist an beiden Seiten durch 34-bp lange Minimalsequenzen der *FLP*-Rekombinase (*FRT*, *FLP-Rekombinase recognition target*, *FLP*-Erkennungszielsequenz) flankiert, an welche die Rekombinase bindet. Durch diese Interaktion wird der gesamte Bereich innerhalb dieser beiden *FRT*-Abschnitte vollständig aus dem Genom entfernt.

Das Prinzip der sequentiellen Gendeletion kann wie folgt erklärt werden: zuerst werden Deletionsplasmide hergestellt, indem *upstream* und *downstream*-Sequenzen des Zielgens an beide Seiten der *SAT1*-Flipperkassette kloniert werden. Während der Transformation von *C. dubliniensis* mit dem linearisierten Insert (nach Restriktionsspaltung des Deletionsplasmids mit geeigneten Enzymen) findet aufgrund dieser flankierenden Bereiche eine ortsspezifische

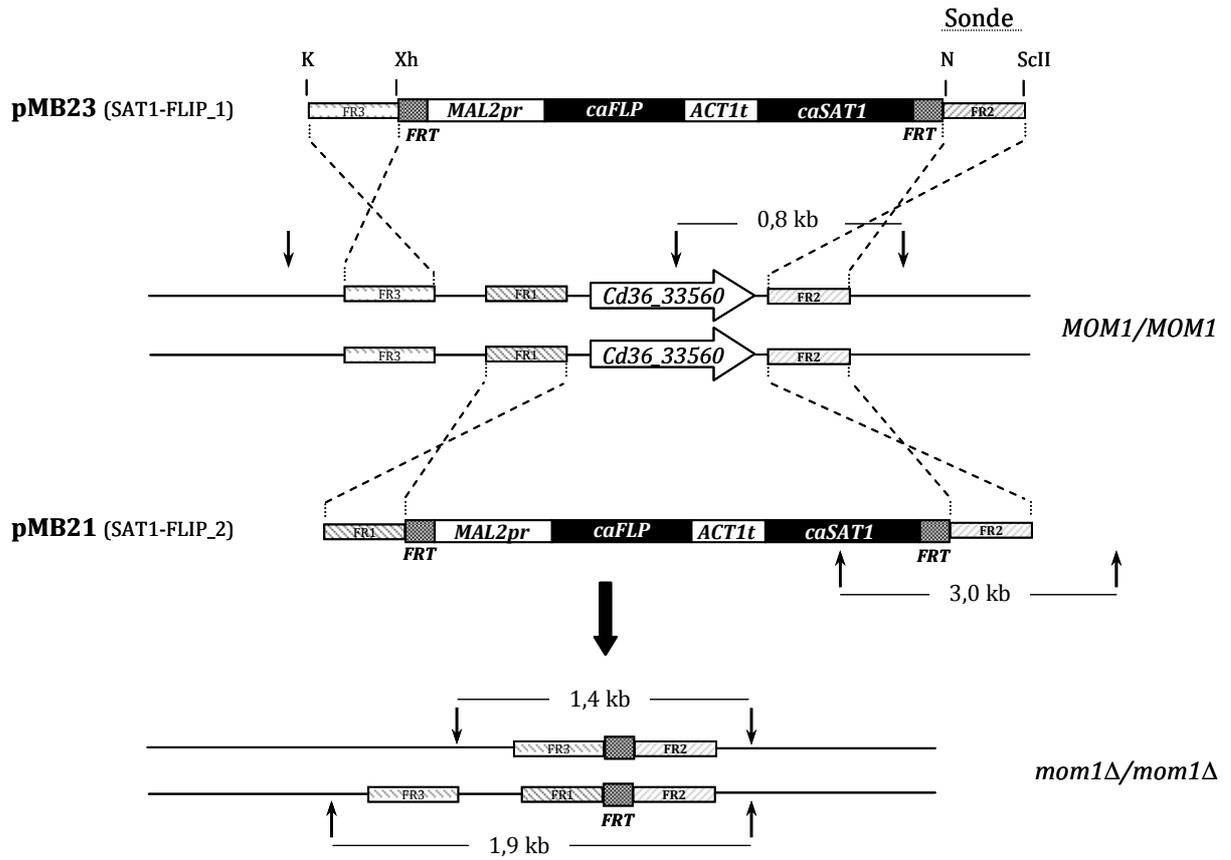
Intergration und aufgrund einer homologe Rekombination ein direkter Austausch der Kasette mit einem Allel des Zielgens statt. Die Selektion von Transformanten erfolgt anschließend in Gegenwart von Nourseothricin (sowohl für *C. dubliniensis* wie *C. albicans* bei einer Konzentration von 200 µg/ml Nou), da positive Klone das Resistenzgen *SAT1* aufweisen.

Um den Selektionsmarker in einer weiteren Transformationsrunde nützen und somit auch das zweite, noch intakte Allel des gleichen Gens deletieren zu können, werden Stämme mit einer korrekten Insertion der Flipperkasette für einige Stunden im Medium mit Maltose angezogen. Unter diesen Bedingungen wird der *MAL2*-Promotor induziert, was zur Expression der *FLP*-Rekombinase führt. Diese führt zu einer ortsspezifischen Rekombination, bei der die beiden im *SAT1*-Flipper enthaltenen *FRT*-Sequenzen miteinander verknüpft werden und die Deletionskasette auf diese Weise bis auf eine *FRT*-Sequenz vollständig aus dem Genom herausgeschnitten wird. Verglichen mit dem resistenten Ausgangsstamm können die heterozygoten, Nourseothricin-sensitiven Derivate aufgrund ihrer deutlich reduzierten Koloniegröße auf Platten mit einem geringen Selektionsdruck (bei *C. dubliniensis* max. 5 µg/ml Nou; bei *C. albicans* 20 µg/ml Nou) identifiziert werden. Eine zweite Integrationsrunde und nachfolgende Entfernung der Flipper-Kasette führt zur Herstellung homozygoter Deletionsstämme, die sich vom Wildtypstamm durch die zwei entfernte Allele des Zielgens und jeweils eine verbliebene *FRT*-Sequenz unterscheiden.

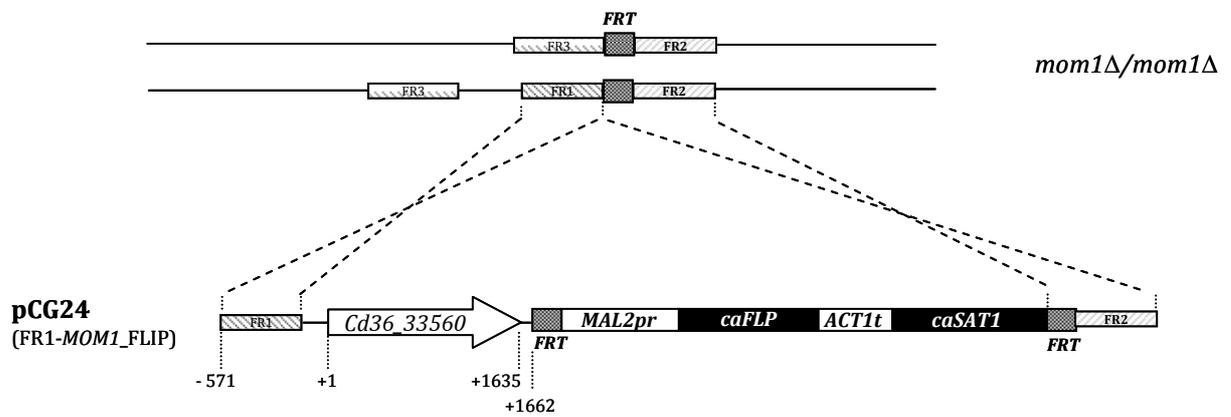
iii) Konstruktion der *MOM1*- Deletionsstämme

Die Deletion des APSES-Proteins *Mom1p* (Cd36_33560) im klinischen Isolat CD36 von *C. dubliniensis* erfolgte mithilfe von zwei Deletionskassetten, die folgendermaßen hergestellt wurden. Zuerst wurde die 3'-terminale flankierende Region FR2 von *MOM1* (Nukleotidposition von +1781 bis +2182 bezüglich des *MOM1*-Startcodons, vgl. **Abbildung 20**) anhand der genomischen DNA des *C. dubliniensis* CD36-Stammes mit den beiden Oligonukleotiden FR2_for_Not1 und FR2_rev_SacII amplifiziert. Dieser DNA-Fragment (401 bp) wurde in die *NotI/SacII*-Schnittstelle des pSFS2A-Plasmids kloniert und so das Plasmid pMB2 generiert. Anschließend wurden zwei verschiedene 5'-Bereiche des *MOM1*-Gens, FR3 (Positionen -1,215 bis -777) und FR1 (-571 bis -167) mithilfe der PCR und den Oligonukleotiden FR3_for_KpnI und FR3_rev_XhoI bzw. FR1_for_KpnI und FR1_rev_XhoI vervielfältigt und jeweils in das *KpnI/XhoI* geschnittene Plasmid pMB2 integriert, um so die Deletionsplasmide pMB23 und pMB21 herzustellen. Die so konstruierten Deletionskassetten wurden mit *KpnI* und *SacII* aus den Plasmiden ausgeschnitten und der gesamte Ansatz in die entsprechende *C. dubliniensis*-Stämme transformiert.

A



B



C

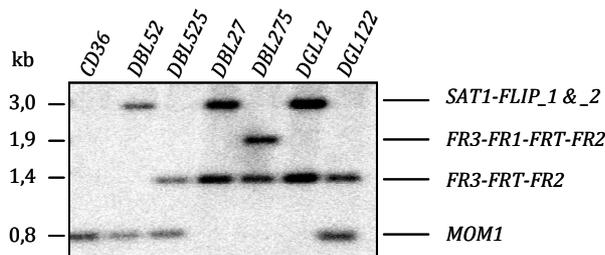


Abbildung 21: Schematischer Übersicht der *MOM1*-Deletions- und Reintegrationsstamm-Herstellung.

(A) Aufbau der beiden Flipper-Kassetten SAT1-FLIP_1 und SAT1-FLIP_2 der Plasmide pMB23 bzw. pMB21, die für die Deletion beider Allele des *MOM1* eingesetzt wurden. Angegeben sind nur die relevante Restriktionsenzym-Schnittstellen: K-*KpnI*; Xh-*XhoI*; N-*NotI*; SclI-*SacII*. Die beiden Deletionskassetten unterschieden sich durch die zwei flankierenden Regionen (FR3 und FR1), die verschiedene 5'-Bereiche des *MOM1*-Gens repräsentieren, wohingegen die 3'-terminale FR2-Region in beiden Kassetten identisch war. Diese flankierenden Regionen waren für die Konstruktion der Deletionsstämme entscheidend, da durch homologe Rekombination der gesamte Bereich zwischen FR1/3 und FR2 durch die Kasette ausgetauscht wird. Heterozygote bzw. homozygote *mom1Δ*-Deletionsstämme entstanden durch das „Ausflippern“ der integrierten Kassetten im Maltose-Medium. Kleine schwarze Pfeile markieren die Restriktionspositionen von *BglIII* in den unterschiedlichen Konstrukten. Wird FR2 als Sonde für den Southern Blot verwendet, kann aufgrund von unterschiedlich langen DNA-Fragmenten, die korrekte Insertion der Kassetten sowie die *MOM1*-Deletion kontrolliert werden.

(B) Konstruktion der Reintegrationsstämme mit der Flipper-Kasette (FR1-*MOM1*_FLIP) vom Plasmid pCG24. Die Zahlen geben die Position bezüglich des *MOM1*-Startcodons an.

(C) Überprüfung der *mom1Δ*-Deletions- und Reintegrationstämme

Der Nachweis der korrekten Insertion der Flipper-Kasette in beide Allele von *MOM1*, sowie die richtige Reintegration der Kasette erfolgte mit der Southern Blot Analyse. Die detektierten Banden entsprachen der erwarteten Längen der DNA-Fragmente (wie in der Teilabbildung **(A)** berechnet), wobei die genomische DNA mit *BglIII* geschnitten und die FR2-Sonde für die Analyse verwendet wurde.

CD36:*MOM1/MOM1*; DBL52: *mom1Δ*+SAT1-FLIP/*MOM1*; DBL525: *mom1Δ/MOM1*;

DBL27: *mom1Δ/mom1Δ*+SAT1-FLIP; DBL275: *mom1Δ/mom1Δ*; DGL12: *mom1Δ/MOM1*- SAT1-FLIP;

DGL122: *mom1Δ/MOM1*

Dabei wurde für die Deletion von beiden *MOM1*-Allelen in der ersten Transformationsrunde die Flipper-Kasette SAT1-FLIP_1 (pMB23) verwendet, die zweite Transformationsrunde erfolgte mit dem Deletionskonstrukt SAT1-FLIP_2 des Plasmids pMB21 (**Abbildung 21A**). Durch dieses Vorgehen konnte während der ersten Transformationsrunde ein längerer Abschnitt (Position -777 bis +1781 bezüglich des *MOM1*-Startcodons), der auch die FR1-Region beinhaltete, aus dem Genom von *C. dubliniensis* deletiert werden. Da die homologe Rekombination während der zweiten Transformationsrunde an dieser FR1- und der FR2-Region (Position -167 bis +1781) stattfand, konnte auf diese Weise die Möglichkeit einer Reintegration der zweiten Deletionskasette in das erste Allel deutlich reduziert und die Wahrscheinlichkeit einer spezifischen, homologen Rekombination am richtigen Genlokus des zweiten Allels erhöht werden. Positive Transformanten wurden auf dem YPD-Medium mit 200 µg/ml Nourseothricin selektiert und für die Bestätigung einer korrekten Integration in das entsprechende Genlokus sowohl mittels Kolonie-PCR wie auch Southern-Blot-Analyse überprüft.

iv) Konstruktion der MOM1- Reintegrationsstämme

Um sicherzustellen, dass die Phänotypen auf die spezifische Deletion von *MOM1* zurückzuführen waren und nicht auf den Stammherstellungsprozess - z. B. durch zusätzliche Rekombination der Kasette an anderem Genort, wurde zur Kontrolle eine funktionelle Kopie von *MOM1* in das Genom wieder reintegriert. Nur wenn sich auf diese Weise der eventuell zu beobachtende Phänotyp wieder revertiert werden konnte, waren Rückschlüsse auf die Funktion des Gens möglich.

Für die Reintegration von *MOM1* am ursprünglichen Genort des homozygoten Deletionsstammes wurden ein *KpnI-XhoI* DNA-Fragment (Nukleotidpositionen von -571 bis +1662) amplifiziert, der neben der FR1-Region auch den gesamten *MOM1*-ORF inklusive Stoppcodon und einigen Nukleotiden der Terminatorsequenz umfasste. Als Matritze für das DNA-Fragment diente der *C. dubliniensis* Wildtypstamm CD36, der mit den Oligonukleotiden FR1_for_KpnI und Rev_MOM1_XhoI mittels der Phusion High Fidelity DNA-Polymerase vervielfältigt worden ist. Dieser *KpnI-XhoI* DNA-Fragment wurde anstelle der FR1-Sequenz im pMB2-Plasmid integriert und auf diese Weise das Plasmid pCG24 mit der FR1-*MOM1*_FLIP-Reversionskasette generiert (**Abbildung 21B**).

Nach dem Entfernen der Flipper-Kasette durch die Induktion der *FLP*-Rekombinase (s.o.) war der genomische *MOM1*-Wildtyplokus funktionell wieder hergestellt. Es verblieb lediglich eine 34 bp lange Erkennungssequenz *FRT* für die *FLP*-Rekombinase nach dem *MOM1*-ORF und FR2-Sequenz.

v) Nachweis der richtigen Integration der Deletions- und Reversionskasette

Nach jeder Transformations- und Ausflipperrunde wurden positive Klone sowohl mittels der Kolonie-PCR wie auch durch Southern Blot-Analyse bestätigt. Die Überprüfung einer solchen Konstruktion des *mom1Δ*-Deletions- und Reintegrationstammes ist in der **Abbildung 21C** dargestellt. Dazu wurde von jedem Stamm genomische DNA isoliert und diese mit dem Restriktionsenzym *BglII* fragmentiert. Die Detektion der entsprechenden Fragmente erfolgte mithilfe der FR2-Region als Sonde. Die erwarteten Fragmentlängen konnten anhand der *BglII*-Schnittstellen berechnet werden (vgl. **Abbildung 21A, B**).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass mit den Stämmen DBL275 und DBL64 insgesamt zwei voneinander unabhängige *MOM1*-Deletionsstämme generiert worden sind und in beiden Stämmen eine funktionelle Kopie von *MOM1* reintegriert wurde (DGL122 und DGL31). Alle diese Stämme wurden sowohl über PCR-Reaktionen wie auch über die Southern Blot-Analysen überprüft.

II.2.2 Funktionelle Charakterisierung von *Candida dubliniensis* *MOM1*

i) Morphologie der *mom1Δ*-Deletionsstämme

Die Deletion von *MOM1* hatte bereits unter Vollmediumbedingungen (YPD, 30°C) eine starke Auswirkung auf die Zellmorphologie (**Abbildung 22**). So zeigten die Deletionsstämme verglichen mit dem Wildtypstamm eine signifikante Reduktion der Zellgröße insbesondere in der Breitachse. Dies hatte eine konstante, stäbchenförmige Zellmorphologie zur Folge, die zwar nach dem Vermessen der Zellen mit ca. 3,98 μm dieselbe Länge wie der Wildtyp (durchschnittlich 4,01 μm) aufwies, jedoch in der Breite mit 1,22 μm signifikant reduziert waren (zum Vergleich: 2,57 μm beim Wildtyp). Dies hatte außerdem zur Folge, dass die Zellanzahl einer Kultur mit einer Optischen Dichte von 1 mit 9×10^7 Zellen/ml dreimal mehr Zellen aufwies als der Wildtypstamm. Die Reintegration von bereits einer funktionellen Kopie von *MOM1* konnte den Phänotyp vollständig revertieren.



Abbildung 22: Morphologische Unterschiede unter Vollmediumbedingung

Morphologie des *mom1*-Deletionsstammes (*mom1Δ/mom1Δ*) in Vollmedium (YPD, 30°C) (**B**) verglichen mit dem Ausgangsstamm (*MOM1/MOM1*) (**A**) und dem Reversionsstamm (*mom1Δ/MOM1*) als Kontrolle (**C**).

Maßstabsbalken entspricht 10 μm

ii) Sedimentationsverhalten

Neben der divergierenden Zellmorphologie zeigten beide *mom1Δ*-Deletionsstämme (DBL275 und DBL64) verglichen mit dem *C. dubliniensis* Wildtyp- sowie *MOM1*-Reversionsstamm (DGL122) signifikante Unterschiede im Sedimentationsverhalten (**Abbildung 23**). Durch die Deletion von *MOM1* reduzierte sich die Sedimentationsgeschwindigkeit in YPD um das 5- bis 10-fache, wobei dies sowohl für stationäre Zellen (vgl. Abbildung), wie auch exponentielle Wachstumsphase zutrif (**Daten nicht gezeigt**). Die Ursachen für diese abweichende Sedimentation der *mom1Δ*-Deletionsstämme kann entweder auf die unterschiedliche Zellgröße, Dichte oder Flokkulationseigenschaft zurückgeführt werden, wobei der Einfluss dieser Parameter auf die Sedimentation näher untersucht werden muss.

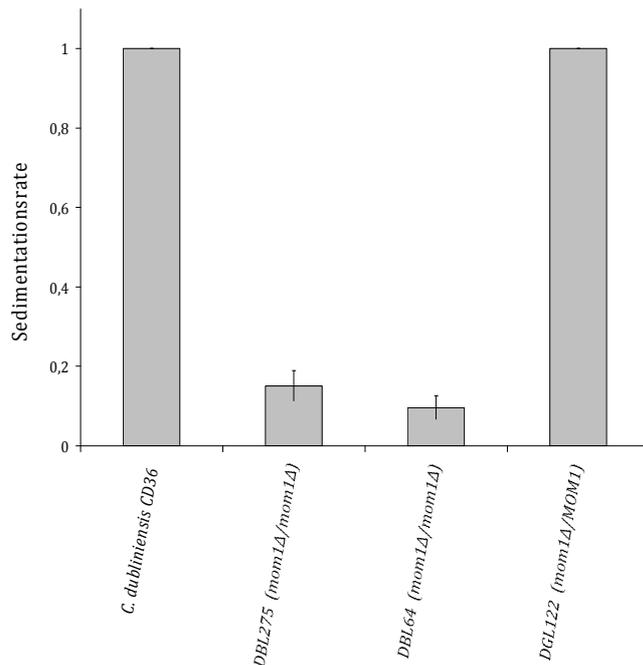


Abbildung 23: Sedimentationsverhalten der *C. dubliniensis*-Stämme.

Unterschiede in der Sedimentation der *mom1Δ*-Deletionsstämme (DBL275 und DBL64) verglichen mit dem klinischen Isolat von *C. dubliniensis* CD36 und dem *MOM1*-Reversionsstamm DGL122. Die Messung der Sedimentationsrate erfolgte mit stationär- wachsenden *C. dubliniensis*-Stämmen, die auf die identische Optische Dichte von 1,0 eingestellt worden sind. Alle Werte wurden auf die Sedimentationsrate des Wildtypstammes (festgelegt auf 1,0) bezogen.

iii) Phänotypische Charakterisierung der *mom1Δ*-Deletionsstämme unter unterschiedlichen Wachstumsbedingungen

Für die funktionelle Charakterisierung des *MOM1* wurden neben dem *C. dubliniensis* Ausgangsstamm CD36 sowohl die Deletions- wie auch die Reintegrationsstämme unter verschiedenen Wachstumsbedingungen morphologisch untersucht. Die **Abbildung 24** zeigt das charakteristische Verhalten der unterschiedlichen Stämme unter Hyphen- oder Chlamydosporen-induzierenden Bedingungen auf. Während der *C. dubliniensis*-Stamm CD36 wie auch die Reintegrationsstämme DGL122 und DGL31 unter stark Nährstoff-limitierenden Bedingungen wie Wasser, supplementiert mit Serum, bereits nach kurzen Zeitpunkten eine starke Hypheninduktion aufwiesen, wuchsen die beiden Deletionsstämme von *MOM1* (DBL275 und DBL64) in Form von Blastosporen (vgl. **Abb. 24A-C**). Auch unter Pseudohyphen-induzierenden Bedingungen des YNB- oder SC-Mediums, supplementiert mit 10% FCS, konnten die Deletionstämme – im Gegensatz zum CD36 und DGL122-Stamm – keine Filamentierung zeigen (**Daten nicht gezeigt**), was jedoch nicht bedeutete, dass die Deletion von *MOM1 per se* zum Verlust des hyphalen Wachstums führt. Unter Chlamydosporen-induzierenden Bedingungen wie Sonnenblumensamenhülsen (SSH)- oder Staib-Agar wuchsen dagegen nur die Deletionsstämme in einer Mischkultur aus sphärischen Blastosporen und echten Hyphen.

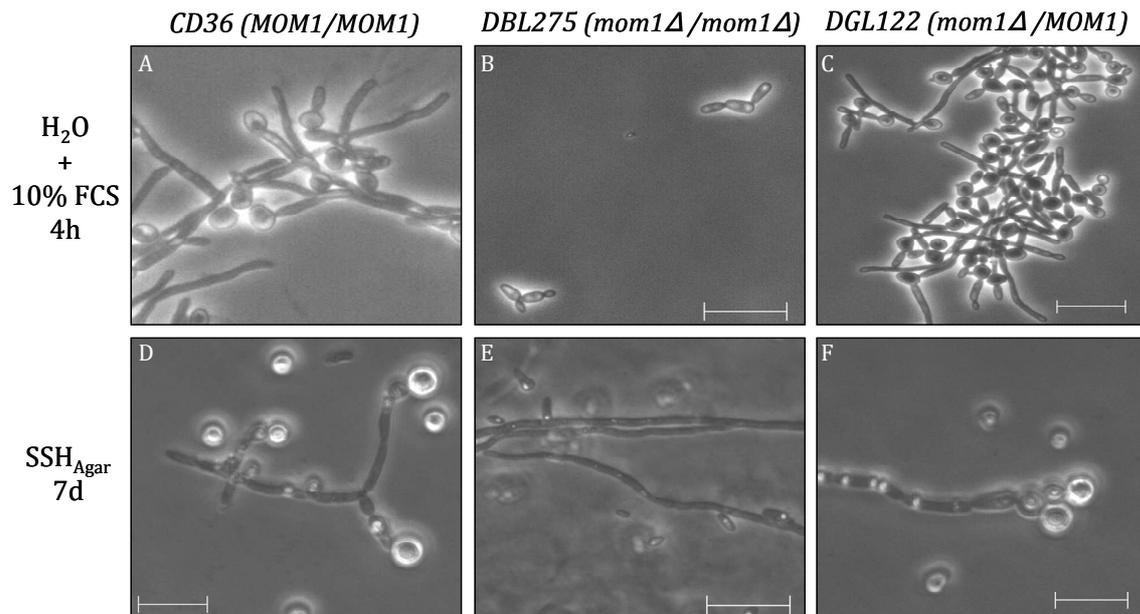


Abbildung 24: Funktionelle Charakterisierung des Mom1p unter verschiedenen Wachstumsbedingungen.

Morphologische Unterschiede des *mom1Δ*-Deletionsstammes DBL275 verglichen mit dem Ausgangsstamm CD36 (*MOM1/MOM1*) und Reintegrationsstamm DGL122 (*mom1Δ/MOM1*) bezüglich der Hypheninduktion im Wasser, supplementiert mit 10% FCS bei 37°C (**A-C**) und Chlamydosporenbildung auf Agarplatten mit Extrakten der Sonnenblumensamenhülsen (SSH) nach 7 Tagen Inkubation bei 30°C. Es wurde jeweils ein Zellausstrich der entsprechenden Kolonieränder mikroskopisch analysiert (**D-F**).

Die Zellmorphologie unterschied sich auf diesen Pflanzensamenextrakten je nach der entsprechenden Lokalisation dieser Zelle in einer Kolonie. Während die Zellen in der Koloniemitte als Blastosporen wuchsen, bildeten die äußeren Zellen entweder wegen der geringeren Zelldichte oder unterschiedlichen Nährstoffverteilung extrem lange Hyphen aus. Die Produktion von Chlamydosporen konnte jedoch weder in der Koloniemitte noch am Rand beobachtet werden. Durch die Reintegration einer funktionellen Kopie von *MOM1* in die Deletionsstämme konnten diese Stämme - verglichen mit dem Wildtypstamm CD36 - wieder verstärkt pseudohyphales Wachstum mit häufiger Chlamydosporenbildung zeigen (vgl. **Abb. 24D-F**). Ein hyphales Wachstum konnte in diesen Stämmen weder in der Koloniemitte noch am Rand beobachtet werden.

Diese Ergebnisse deuten daraufhin, dass das identifizierte APSES-Protein in *C. dubliniensis*, wie andere APSES-Proteine in anderen Pilzen, die Funktion eines zentralen Regulators der Morphogenese annimmt und - je nach Bedingung - sowohl die Ausbildung von filamentösen Wachstumsformen (echten Hyphen oder Pseudohyphen) wie auch die Chlamydosporenbildung steuert. Die Benennung des Gens war aus diesem Grund *MOM1* = „Modulator of Morphogenesis 1“.

II.3 Vergleichende funktionelle Charakterisierung der beiden APSES-Proteine

Mom1p aus *C. dubliniensis* und Efg1p aus *C. albicans*

Die funktionelle Charakterisierung des Mom1p zeigte, dass dieses APSES-Protein einen großen Einfluss auf die Induktion von morphogenetischen Differenzierungsprozessen in *C. dubliniensis* hatte. Diese Funktion war vergleichbar mit der regulatorischen Funktion des Efg1-Proteins („Enhancer of Filamentous Growth1“) in *C. albicans* [Stoldt, VR *et al.* 1997]. Inwiefern die beiden APSES-Proteine auch in ihrer Proteinsequenz konserviert sind, wurde durch einen Homologievergleich bestimmt (**Abbildung 25**).

CaEfg1	MSTYSIPYYNQMNNGNYNNGMPQQTTAANQQAFPPQQQPTTTGNASQQQQQ---AAATAAA	57
CdMom1	MSTYSIPYYNQMNNGNYNNGMPQQTTAANQQAFSQQQ-PTATGNTSQQQQQSAAVAAAAA	59
	***** .*** **:***:***** *.*:***	
CaEfg1	VQQPYNYMFYQQQGQPGQQTGQTAGQQQQQQQQQQDYNTYNYRYQYPAATSQGNYYQQT	117
CdMom1	AQQPYNYMFYQQQGQPGQQT-----TGQQQYDYSAYNRYLYPAATSQPNYYQQT	108
	.***** *****.:***** ***** *****	
CaEfg1	IPNQLSQPQPQHYNGSNRNYTSAPSGAPIPSNSTSGPSQQPPLPGQQAVPIPPHVSTMQQ	177
CdMom1	IPNQLSQPQPQHYNGSNRNYTSAPSGAPIPSNSTSGPSQQPPLPGQQAVPIPPHVSTMQQ	168

CaEfg1	PTPVQDTLNASSTSTVGQFQPPGIRP	237
CdMom1	PTPVQDTLNTSNTSTVGQFQPPGIRP	228
	*****:*.*****	
CaEfg1	GTKLLNVAQMT	297
CdMom1	GTKLLNVAQMT	288
	*****.***** *****	
CaEfg1	LFVRDIKRVIQTG	357
CdMom1	LFVRDIKRVIQTG	342
	*****:***:*.***:***** *.*:***.* *.*:..**	
CaEfg1	GNSISATSGGSNVSGASGAGSTTSPVNTKAATAAGIPQGNYYQTYNQQQ--YPOQYQGYN	415
CdMom1	RNSISATNGGSSASGASGAGSTTSPVNTKAATG-TPQGNYYQAYNQQQQYPOQYQGYN	401
	*****.***.*.*****:..*****:***** *****	
CaEfg1	APGKNQNTPASQPG--STTNDQYLQQQQQQQQMYGYQSNYYQGGAAAN-SSYYPNYQQQ	472
CdMom1	APGKNQNTPGSQGSATSTNDLYLQQAQAQQQVYGYQLNFPNAAPAGGNYSNYQQQ	461
	*****.*** * :*:*** ***** * *****:***** *:*. *..* .*.*****	
CaEfg1	QPNYASSYPYQQQQKQQQQQPNQQQSDQQQ---TSTPSGGAGTRSVHQSPQVQSLTQG	529
CdMom1	QPNYASSYPY-QQQLLQKQQPNQQQSDQQQTVASSTPSGGTGRSVHQSPQVQ----G	516
	***** ** ***:***** :*****:***** ***** *	
CaEfg1	SVHPSQQHQAN----QSASTVAKEEK-	552
CdMom1	SVHPSQQHQTNQSALQSTTTTHAKEEKQ	544
	*****:* ***:.* *****	

Abbildung 25: Sequenzvergleich der beiden homologen APSES-Proteine Efg1p (Ca) und Mom1p (Cd).

Der Vergleich des Efg1p von *C. albicans* und Mom1p von *C. dubliniensis* erfolgte mithilfe des Programms ClustalW2 (http://www.ebi.ac.uk/Tools/services/web_clustalw2/) [Larkin, MA *et al.* 2007]; „*“ = identische AS in beiden Sequenzen; „:“ = konservierte Substitutionen; „.“ = semi-konservierte Substitution; grau unterlegt = APSES-Domäne zur DNA Bindung; rot = potentielle Phosphorylierungsstelle (RVT) für Proteinkinase A (PKA); blau (RR ...RGRR) = potentielles Zellkernlokalisierungssignal.

Das Alignment der beiden Proteinesequenzen wies über eine Länge von 552 Aminosäuren beim Efg1p bzw. 544 beim Mom1p eine äußerst konservierte Proteinsequenz mit 79% identischen Aminosäuren auf. Beide Proteine wiesen eine ungewöhnliche Aminosäurezusammensetzung auf, bestehend aus 19% Glutamin (Q), 10% Alanin (A) und jeweils 9% vom Threonin (T), Serin (S), Prolin (P) und Glycin (G). Insbesondere die Glutamin-Einheiten traten verstärkt am N- und C-terminalen Bereich der Sequenzen auf. Aufgrund der beinahe 100% konservierten APSES-Domäne waren auch andere Sequenzmotive innerhalb dieser Sequenz identisch. So konnten in beiden Proteinen identische Motive für das potentielle Zellkernlokalisierungssignal oder die potentielle PKA-Phosphorylierungsstelle identifiziert werden. Interessanterweise konnten insbesondere zwischen der APSES-Domäne und dem C-terminalen Ende der beiden Proteine die größten Unterschiede in der Aminosäurezusammensetzung beobachtet werden, die möglicherweise unterschiedliche Funktionalität mit sich ziehen können.

Inwiefern die Funktion der beiden so homologen APSES-Proteine Efg1p und Mom1p konserviert ist, sollte in weiteren Arbeiten durch Kompletationsstudien näher charakterisiert werden.

II.3.1 Ektopische Expression von *MOM1* oder *EFG1* in den *C. albicans efg1Δ*-Deletionsstämmen durch einen Doxycyclin-induzierbaren Promotor

Für die vergleichende Funktionalitätsanalyse der beiden APSES-Proteine Efg1p und Mom1p bezüglich der Induktion von Differenzierungsprozessen, wurden die beiden Gene *MOM1* wie auch *EFG1* mithilfe der modifizierten Expressionskassette pNIM6 [Ramirez-Zavalla et al., 2008] in den *CaADH1*-Genlocus des *C. albicans efg1Δ*-Deletionsstammes integriert. Diese pNIM6-Expressionskassette zählt zu dem sog. TET-ON-System, bei dem die Expression der Zielgene allein durch die Zugabe von Tetracyclin (TET) oder dem Tetracyclin-Derivat Doxycyclin (DOX) induziert wird [Gossen, M et al. 1995; Park, YN and Morschhauser, J 2005]. Bei diesem System bindet der an *Candida*-angepasste reverse Tetracyclin-kontrollierter Transaktivator (cartTA) Doxycyclin-abhängig an die sog. *tet*-Operator - Sequenz (*tetO*) im Promotor (P_{TET}) und führt dadurch zur Expression von Genen, die entweder unter den Bedingungen nicht induziert werden oder im Organismus nicht vorkommen. Somit wird auch eine gezielte Genexpression unabhängig von der Wachstumsbedingung möglich. Eine Übersicht der verwendeten *caGFP*-, *EFG1*- oder *MOM1*- Konstrukte für die ektopische Expression ist in der **Abbildung 26** dargestellt.

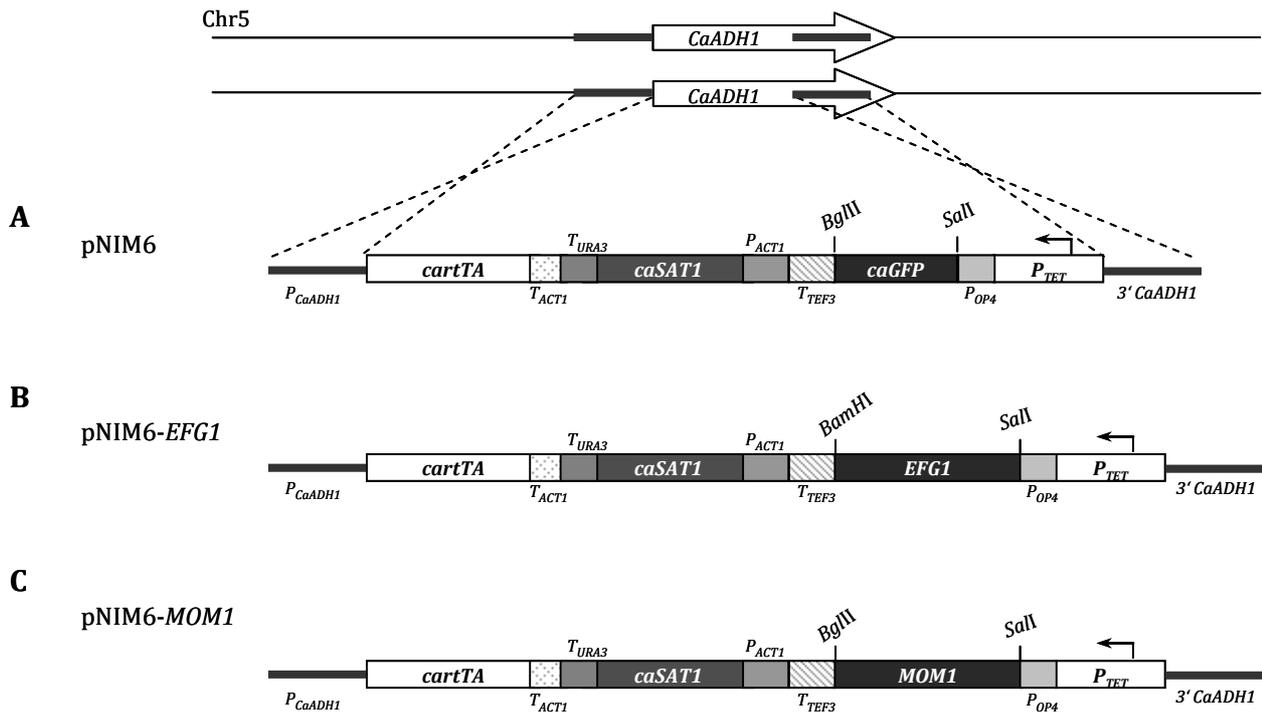


Abbildung 26: Ektopische Expression von *EFG1* und *MOM1* im *C. albicans efg1Δ*-Deletionsstamm.

Schematische Übersicht der Konstrukte für die ektopische Expression von *EFG1* (**B**) und *MOM1* (**C**) sowie zur Kontrolle von *caGFP* (**A**) durch einen Doxycyclin-induzierbaren Promotor (P_{TET}) im *C. albicans efg1Δ*-Deletionsstamm. Die Integration der Expressionskassette am *CaADH1*-Genlocus erfolgte über die Rekombination der homologen *ADH1*-Bereiche vor und nach der Kassette. Weitere Abkürzungen: *cartTA* – reverse Tetracyclin-induzierbarer Transaktivator; T_{ACT1} oder T_{TEF3} – Terminationssequenz vom *ACT1* oder vom *TEF3*-Gen; *caSAT1* – Gen für die Nourseothricin-Resistenz; P_{OP4} – Promotorsequenz des *OP4*-Gens.

Die Integration der Zielgene *EFG1* und *MOM1* anstelle von *caGFP* in der Expressionskassette pNIM6 erfolgte über die *BglII/BamHI*- und die *Sall*-Restriktionsschnittstellen. Die Kontrolle des korrekten Einbaus der Gene in die Kassette fand sowohl mithilfe von PCR-Reaktionen, der Restriktionsspaltung sowie durch die Sequenzierung der Plasmide statt. Die überprüften Konstrukte wurden im *efg1Δ*-Deletionsstamm an den flankierende Regionen des *CaADH1*-Gens (sowohl der Promotorregion, wie auch der 3'-terminalen Sequenz) über die homologe Rekombination integriert. Nach der Selektion auf die Resistenz für das Antimycotikum Nourseothricin erfolgte der Nachweis der positiven Integration der Expressionskassette sowohl über PCR-Reaktionen sowie mithilfe der Southern Blot-Analyse. Im Gegensatz zu der beschriebenen *SAT1*-Flipperkassette zur Deletion von *MOM1* störte das Nourseothricin-Resistenzgen der pNIM6-Expressionskassette weder die Funktionalität noch die korrekte Expression der Zielgene und wurde deshalb nicht mehr entfernt.

Die Expression der beiden APSES-Proteine Efg1p und Mom1p in ihrer Funktion als Modulatoren von Differenzierungsprozessen – sowohl während der Hefe-Hyphe-Transition, wie auch der Chlamyosporenbildung - erfolgte in diesem TET-ON-System durch die Zugabe von Doxycyclin. Da bei einer Konzentration von 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Doxycyclin ein hemmender Effekt für das hyphale Wachstum von *C. albicans* auf Festmedien beschrieben worden ist, wurde für die Genexpression die Konzentration dieses Tetracyclin-Derivats im Medium auf 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ reduziert. Für die ektopische Expressionsanalyse wurden die *C. albicans efg1Δ*-Deletionsstämme entweder mit induzierbarem *GFP*- (Stamm ALG1) oder dem *EFG1*-ORF (Stämme ALE41 und ALE42) sowie zur Kontrolle mit dem *MOM1*-ORF (Stämme ALM102 und ALM111) unter Wachstumsbedingungen wie YPD, supplementiert mit fötalem Kälbersserum (FCS), oder Zellkulturmedium α -MEM bei 37°C und nach der Doxycyclin-Zugabe inkubiert, unter denen die Deletionsstämme durch den Verlust von *EFG1* keine Hyphen mehr ausbilden konnten. Ob Mom1p diese Fähigkeit von Efg1p zur Induktion der morphologischen Transition funktionell komplementieren kann, sollte mithilfe der ektopischen Expression von *MOM1* nachgewiesen werden. Im Gegensatz zum *efg1Δ*-Deletionsstamm mit *GFP* zeigten die Stämme entweder mit *EFG1* oder *MOM1* ähnliche Morphologie. Durch die Expression der beiden APSES-Proteine konnte

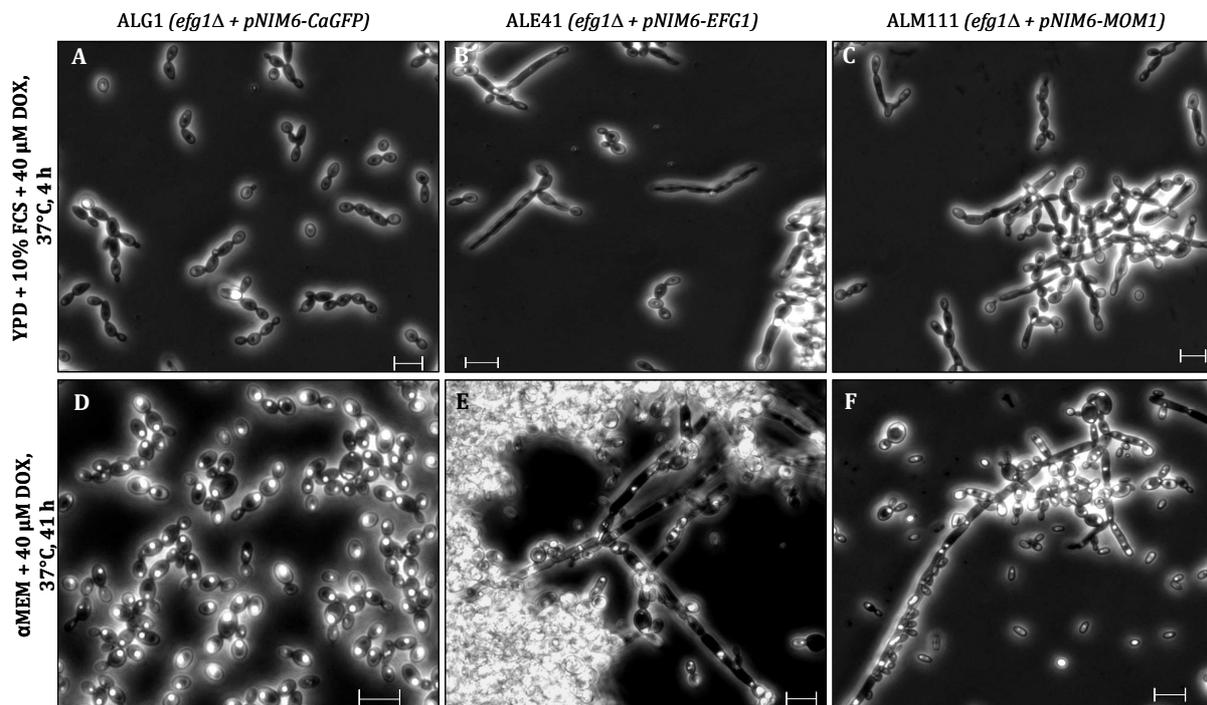


Abbildung 27: Vergleichende funktionelle Charakterisierung des *efg1Δ*-Deletionsstammes nach ektopischer Expression von *MOM1* und *EFG1*.

Morphologie der *C. albicans efg1Δ*-Deletionsstämme nach der ektopischen Expression der APSES-Proteine Efg1p (**B**, **E**) und Mom1p (**C**, **F**) sowie CaGfp (**A**, **D**) als Kontrolle unter einem Doxycyclin induzierbaren Promotor. Die untersuchten Wachstumsbedingungen waren entweder YPD+10% FCS sowie α -MEM bei 37°C nach der Zugabe von 40 μM Doxycyclin (DOX). Maßstabsbalken entspricht 10 μm .

bereits nach 4 h unter dem Vollmedium YPD supplementiert mit Serum pseudohyphale Strukturen und beginnende Flokkulation beobachtet werden, während der Stamm mit *GFP* nur vereinzelte Zellen in der Hefeform zeigte (**Abb. 27A-C**). Auch im Zellkulturmedium α -MEM war diese Filamentierung und Klumpenbildung erst zu späteren Zeitpunkten (nach 41 h) zu beobachten, wohingegen der *C. albicans efg1Δ*-Deletionsstamm mit und ohne der *GFP*-Expressionskassette nur das Wachstum als Blastosporen zeigte (**Abb. 27D-F**).

Diese Ergebnisse zeigen, dass das *MOM1* aus *C. dubliniensis* die Fähigkeit besitzt in *C. albicans* den *efg1Δ*-Deletionsphänotyp funktionell zu komplementieren, so dass davon ausgegangen werden kann, dass die beiden APSES-Proteine aufgrund ihrer hohen Homologie funktionell konserviert sind und unter hypheninduzierenden Bedingungen gleiche Zielgene regulieren. Interessant war die ektoische Expression der APSES-Proteine Efg1p und Mom1p im *efg1Δ*-Deletionsstamm unter Bedingungen in der nur die *C. dubliniensis* Wildtyp-Stämme Chlamydosporen induzieren können, wie Sonnenblumensamenhülsen (SSH-) oder Staib-Agar. Trotz der Expression von *MOM1* konnte unter diesen Wachstumsbedingungen keine Chlamydosporen induziert werden (**Daten nicht gezeigt**). Dies zeigt erstens, dass in *C. albicans* die Induktion von Chlamydosporen nicht direkt vom *MOM1*-abhängig ist und dass während der Chlamydosporenausbildung in der beiden *Candida*-Stämmen - z.B. durch *NRG1* - unterschiedliche regulatorische Signaltransduktionswege angeregt werden [Staib, P and Morschhauser, J 2005].

II.3.2 Heterologe Expression von *EFG1* im *C. dubliniensis mom1Δ*-Deletionsstamm

Um feststellen zu können, ob durch eine Integration des *EFG1*-Gens in *C. dubliniensis* eine verstärkte Induktion von Hyphen erfolgen konnte und welchen Beitrag die unterschiedlichen Promotoren der beiden APSES-Proteine in diesem Induktionsprozess haben, wurden Stämme mit *mom1Δ*-Deletionshintergrund hergestellt, die das *C. albicans EFG1* sowohl unter dem nativen *MOM1*- wie auch dem *EFG1*-Promotor heterolog exprimieren. Die entsprechenden *EFG1*-Konstrukte und ihre Integrationspositionen im homozygoten *mom1Δ*-Deletionsstamm sind in der **Abbildung 28** schematisch dargestellt.

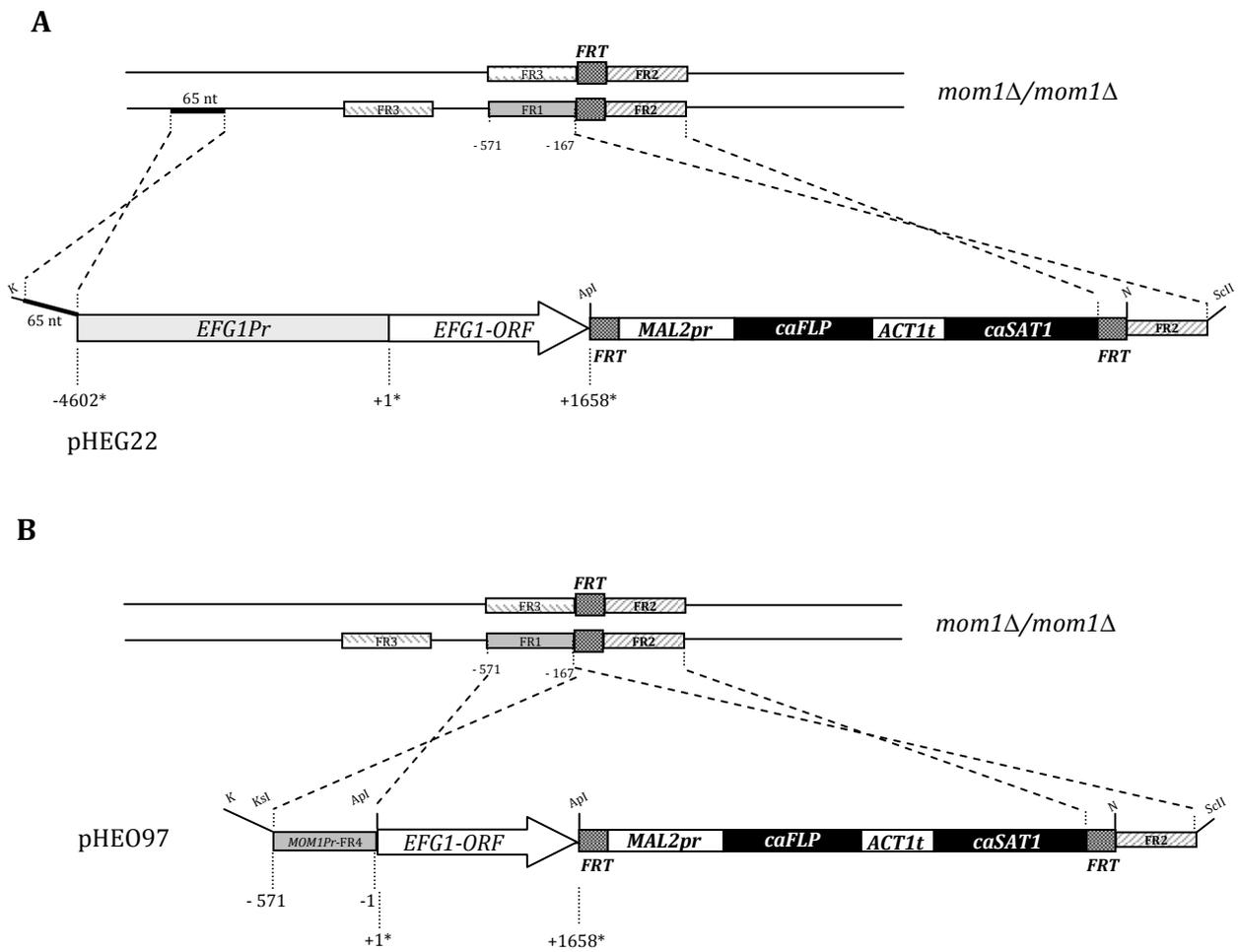


Abbildung 28: Schematische Übersicht der Konstrukte und des Integrationsorts zur heterologen *EFG1*-Expression im homozygoten *mom1Δ*-Deletionsstamm von *C. dubliniensis*.

Darstellung von beiden *EFG1*-Konstrukten (*EFG1*-ORF mit und ohne dem dazugehörigen *EFG1*-Promotor) für die heterologe Expression des APSES-Proteins Efg1p im homozygoten *mom1Δ*-Deletionsstamm von *C. dubliniensis*. Die Amplifikation des *C. albicans EFG1*-Promotor-ORF-Fragments (Nukleotidposition -4602 bis +1658 ausgehend vom *EFG1*-Startcodon, markiert mit *) und der Einbau über die *KpnI* und *ApaI*-Schnittstellen in die SAT1-Flipper-Kassette. Die Integration des Konstrukts im *mom1Δ*-Deletionsstamm erfolgte durch die homologe Rekombination über das FR2-Fragment und die 65 nt lange - *MOM1*-Sequenz, die über die Oligonukleotidverlängerung eingeführt worden ist **(A)**. Für die Integration des *EFG1*-ORFs wurde zuerst das *MOM1*-FR4-Fragment über die *KpnI*-*ApaI*-Schnittstelle in die SAT1-Flipper-Kassette integriert und anschließend ungerichtet der *EFG1*-ORF-Abschnitt **(B)**.

i) Konstruktion der mom1Δ-Deletionsstämme mit heterologer Expression von EFG1

Für die heterologe Expression des *EFG1*-ORFs im homozygoten *mom1Δ*-Deletionsstamm unter dem nativen *MOM1*-Promotor wurde der 5'-upstream Fragment FR4 (Nukleotidpositionen -571 bis -1 bezüglich des *MOM1*-Startcodons) mit den Oligonukleotiden HE_FR4_KasI_KpnI und HE_FR4_rev_ApaI aus dem *C. dubliniensis* Wildtyp-Stamm CD36 amplifiziert und nach der *KpnI*/*ApaI*-Restriktionsspaltung in die *SAT1*-Flipper-Kassette des Plasmids pMB2 kloniert. Anschließend wurde mithilfe der chromosomalen DNA des *C. albicans* SC5314-Stammes und dem Oligonukleotiden-Paar HE_EFG1_for_ApaI/HE_EFG1_rev_ApaI der *EFG1*-ORF vervielfältigt und nach dem *ApaI*-Verdau ungerichtet in den *ApaI*-linearisierten pHEO9-Vektor integriert und auf diese Weise das Plasmid pHEO97 generiert. Die Selektion der Konstrukte mit der richtigen *EFG1*-Orientierung erfolgte mittels PCR und wurde mithilfe der Sequenzierung bestätigt. Die mit den Restriktionsendonukleasen *KasI* und *SacII*-ausgeschnittene Expressionskassette (**Abb. 28B**) wurde anschließend in die beiden *mom1Δ*-Deletionsstämme DBL275 und DBL64 transformiert.

Zur Expression von *EFG1* unter dem eigentlichen *EFG1*-Promotor im *mom1Δ*-Deletionsstamm wurde mithilfe der Phusion High-Fidelity DNA Polymerase anhand der genomischen DNA des *C. albicans* Stammes SC5314 ein DNA-Fragment amplifiziert, das neben dem *EFG1*-ORF (1659 nt) eine 4602 nt - lange 5'-upstream Promotorregion von *EFG1* enthält (Nukleotidpositionen -4602 bis +1659 bezüglich des *EFG1*-Startcodons). Die Oligonukleotide, die für diese Vervielfältigung benützt worden sind, waren EFG1pr_65nt MOM1_KpnI_for (mit einem 65 nt langen *MOM1*-Promotorüberhang für die spezifische Integration in den *MOM1*-Genloкус) und EFG1_ApaI_rev. Das PCR-Produkt wurde an den durch die Oligonukleotide eingeführten *KpnI* und *ApaI*-Restriktionsschnittstellen geschnitten, in die – mit denselben Restriktionsendonukleasen - linearisierte *SAT1*-Flipper-Kassette des Plasmids pMB2 integriert und auf diese Weise das Plasmid pHEG22 generiert. Nach der Sequenzierung des integrierten DNA-Fragments wurde die gesamte Expressionskassette (ca. 10 kb) anschließend mit den Enzymen *KpnI* und *SacII* aus pHEG22 herausgeschnitten und für die Transformation verwendet (**Abb. 28A**). Die Integration der Kassette im *MOM1*-Genloкус von *C. dubliniensis* erfolgte über die 65-nt lange Upstream-Sequenz von *MOM1* und die FR2-Region durch die homologe Rekombination.

Der Nachweis der korrekten und vollständigen Integration der Konstrukte im *mom1Δ*-Deletionsstamm erfolgte über PCR-Reaktionen mit *EFG1*-oder *MOM1*-Promotor-spezifischen Oligonukleotiden (vgl. **Tab. 7**). Positive Stämme wurden über die Southern Blot-Analyse bestätigt (**Daten nicht gezeigt**).

ii) Phänotypische Charakterisierung unter verschiedenen Wachstumsbedingungen

Der elongierte Deletionsphänotyp von *MOM1* wurde nicht nur durch die Reintegration einer intakten Kopie von *MOM1*, sondern auch durch die heterologe Expression von *EFG1* erreicht (vgl. **Abb. 29**). Die Zellen zeigten wie die Wildtypstämme eine runde Zellmorphologie, wobei kein Unterschied bestand, ob nur der *EFG1*-ORF (**Abb. 28B**) integriert oder zusätzlich der *MOM1*-Promotorbereich von *C. dubliniensis* durch die 4600-lange Promotorsequenz von *C. albicans EFG1* ersetzt worden ist.

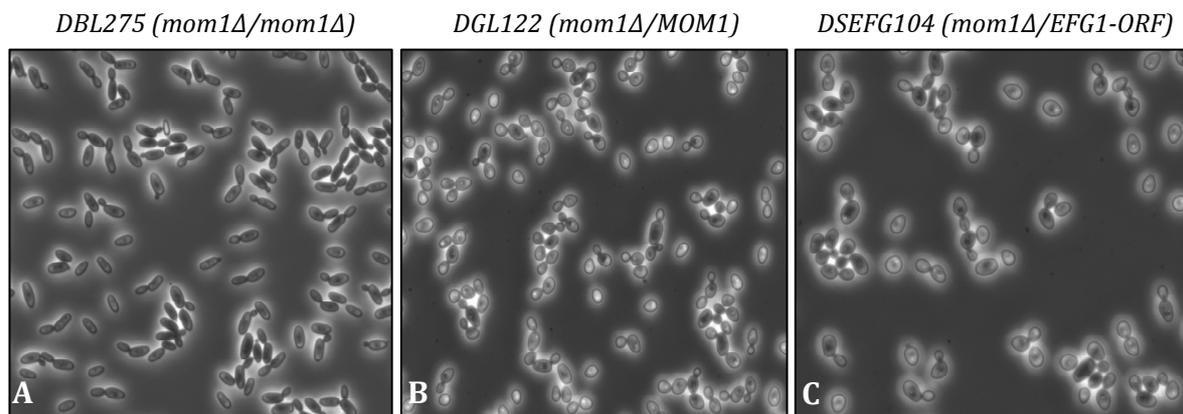


Abbildung 29: Funktionelle Komplementierung im Vollmedium.

Vergleichende Morphologie des *MOM1*-Reversions (DGL122) (**B**) - und *EFG1*-Integrationsstammes (DSEFG104) (**C**) im Vollmedium (YPD) nach Integration in die *mom1Δ*-Deletionsmutante (**A**).

Diese Fähigkeit von *EFG1* zur funktionellen Komplementierung des *mom1Δ*-Deletionsphänotyps war auch unter hypheninduzierenden Bedingungen wie Wasser supplementiert mit 10% FCS unter 37°C ersichtlich. Während die Deletionsstämme von *MOM1* im Gegensatz zum Wildtyp-Stamm keine Filamente induzieren konnten, zeigten Stämme mit heterolog exprimiertem *EFG1* unter dieser Bedingung nicht nur eine starke Flokkulation sondern auch signifikante Hyphenausbildung (vgl. **Abbildung 30**). Auch hier war bereits die Integration des *EFG1*-ORFs für die Induktion des filamentösen Wachstums ausreichend.

Diese Ergebnisse, sowohl aus der heterologen wie auch ektopischen Expressionsstudie, bestätigten die Annahme einer konservierten Funktion der beiden APSES-Proteine Mom1p und Efg1p, die aufgrund der hohen Homologie (78%) der beiden Proteine angenommen worden ist.

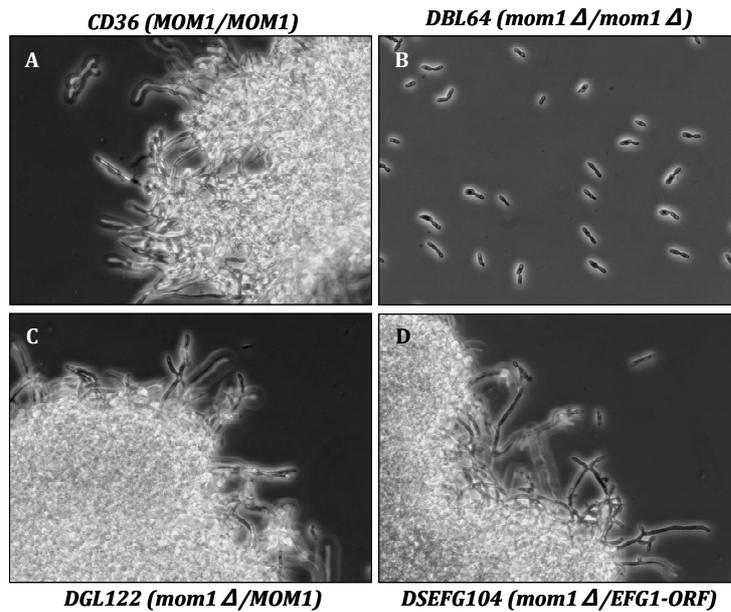


Abbildung 30:
Funktionelle Komplementierung der Hypheninduktion.

Fähigkeit zur Hypheninduktion von Stämmen, die entweder *MOM1* (A und C) oder *EFG1* (D) exprimieren. Im Gegensatz dazu zeigten die *mom1Δ*-Deletionsstämme (B) unter Wasser supplementiert mit 10% FCS bei 37°C nur hefeförmiges Wachstum.

Wie die Ergebnisse zeigten, waren die *mom1Δ*-Deletionsstämme von *C. dubliniensis* nach der Reintegration von *MOM1* oder durch die heterologe Expression von *EFG1 per se* in der Lage unter bekannten hypheninduzierenden Bedingungen filamentöse Wachstumsformen auszubilden. Von besonderem Interesse war nun die Frage, ob durch die heterologe Expression des *EFG1*-ORFs (entweder mit oder ohne dem *EFG1*-Promotor) diese Stämme auch unter den Wachstumsbedingungen filamentöse Wachstumsformen eingehen, unter denen diese morphologische Transition von den *C. dubliniensis*-WT-Stämmen normalerweise nicht eingegangen wird (vgl. **Abb.10**). Dafür wurden die *C. dubliniensis mom1Δ*-Deletionsstämme mit dem heterolog exprimiertem *EFG1*-ORF (DSEFG104 und DSEFG89) sowie zusätzlich mit dem *EFG1*-Promotor (DKEFG12 und DKEFG27) – und zur Kontrolle mit dem *EFG1*-heterozygoten *C. albicans* Stamm HLC37 (*EFG1/efg1Δ*) - unter Wachstumsbedingungen wie Vollmedium YPD, supplementiert mit 10% FCS oder dem Zellkulturmedium α -MEM angeimpft und bei 37°C inkubiert. Zu bestimmten Zeitpunkten wurden die Zellen lichtmikroskopisch untersucht. Wie in der **Abbildung 31** dargestellt, konnte unter den untersuchten Bedingungen nur der *C. albicans* Stamm HLC37 mit einer funktionellen *EFG1*-Kopie hyphales Wachstum ausbilden, während die *C. dubliniensis*-Stämme weiterhin eine hefeförmige Wachstumsform zeigten. Dabei schien der durch die homologe Rekombination ausgetauschter *EFG1*-Promotor für die Induktion der morphologischen Transition keine Rolle zu spielen, was darauf hindeutet, dass unter diesen nährstoffreichen Bedingungen in den beiden *Candida*-Arten unterschiedliche Signalwege angeschaltet werden, die nur in *C. albicans* diese starke Filamentierung induzieren. Die Expression von *CaEFG1* hatte - zumindest in *C. dubliniensis* - keinen Einfluss auf die verstärkte Ausbildung von filamentösen Wachstumsformen unter diesen Bedingungen.

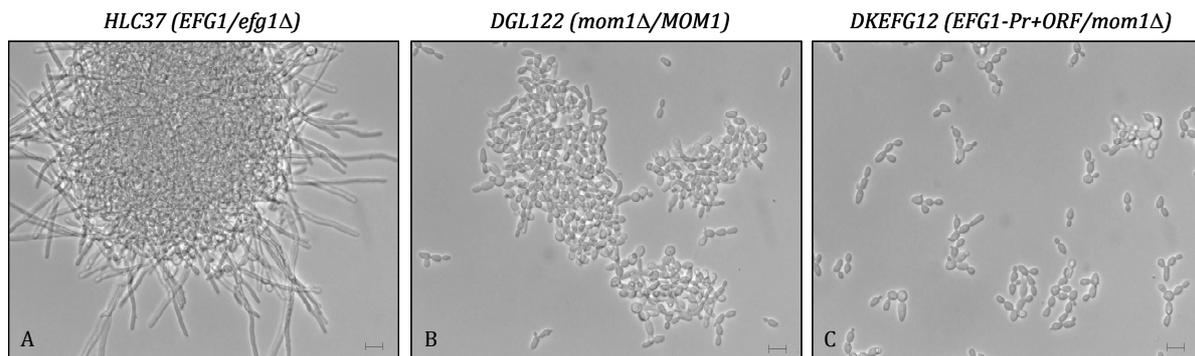


Abbildung 31: Auswirkung der *CaEFG1*-Expression in *Candida dubliniensis* auf die Morphogenese.

Zellmorphologie der Stämme mit heterologer *CaEFG1*-Expression im *mom1Δ*-Deletionshintergrund DKEFG12 (*EFG1*-Pr+ORF/*mom1Δ*) (C) im Vergleich mit dem *MOM1*-Reversionsstamm DGL122 (B) und dem *C. albicans* Stamm HLC37 mit einer funktionellen Kopie des *EFG1* (A) unter YPD, supplementiert mit 10% FCS nach 5 h Wachstum bei 37°C. Maßstabsbalken entspricht 10 µm.

II.4 Differentielle Genexpressionsanalyse mittels der *MESSAGE*-Technologie zur Identifizierung von *MOM1*-abhängigen Genen unter zwei verschiedenen Wachstumsbedingungen

Wie bereits gezeigt, hatte das Fehlen von *MOM1* signifikante Auswirkungen sowohl auf die Zellmorphologie, wie auch auf die Fähigkeit des hyphalen Wachstums unter Serum-induzierenden Bedingungen. Durch die differentielle Genexpressionsstudie mithilfe der *MESSAGE*-Technologie konnten Transkripte identifiziert werden, die im Vergleich zwischen dem Wildtypstamm CD36 und den beiden Deletionsstämmen DBL27 und DBL64 mind. 2-fach hoch- oder runter reguliert waren und somit signifikante Unterschiede zeigten. Als Kontrolle wurde zusätzlich auch das Expressionsprofil des *MOM1*-Reversionsstamm DGL122 erstellt. Die Studie erfolgte unter zwei unterschiedlichen Bedingungen wie YPD (30°C) (Tabelle 16) und Wasser supplementiert mit Serum (10% FCS, 37°C) (Tabelle 17), unter denen die beiden *mom1Δ*-Deletionsstämmen ein hefeförmiges Wachstum zeigten, während die Wildtypzellen - je nach Bedingung - entweder als Hefen wuchsen oder echte Hyphen ausbildeten.

Unter den gleichen Nährstoffverhältnissen (Vollmedium YPD) wiesen von den 56 stichprobenartig identifizierten Transkripten im *mom1Δ*-Deletionsstamm 15 Fragmente signifikante Unterschiede in ihrer Genexpression auf. Interessant war vor allem, dass insbesondere die Gene der Proteinbiosynthese durch das Fehlen von *MOM1* stark beeinflusst waren. So konnten im *mom1Δ*-Deletionsstamm Komponenten des Translations-Apparats wie beispielsweise das ribosomale Protein Rpl16a sowie der Translationselongationsfaktor Eft2p als

stark runterreguliert identifiziert werden, während weitere Proteine der Ribosomenbiogenese wie Rpl20b, Rps4a, Rpl25 induziert waren. Neben der Proteinbiosynthese war auch der Proteintransport innerhalb der Zelle zwischen dem Wildtyp- und dem Deletionsstamm differentiell reguliert. Einen wichtigen Hinweis dafür lieferte das Gen *RET2*, dessen Produkt wahrscheinlich, wie bereits für *C. albicans* beschrieben, für den Vesikel-vermittelten Transport vom ER zum Golgi-Apparat kodiert und in den beiden *mom1Δ*-Deletionsstämmen verglichen gegenüber dem *C. dubliniensis* Wildtypstamm weniger exprimiert worden ist.

Interessant war auch die Tatsache, dass durch das Mom1p die transkriptionelle Expression von Genen beeinflusst worden ist, deren Proteine entweder in der Zellwand lokalisiert sind oder die Ergosterolbiosynthese und somit die Zellmembranzusammensetzung beeinflussen. So waren nach der Deletion von *MOM1* Gene wie *CdPGA38* oder das *CdPGA48* - eine im *C. dubliniensis* Genom neu annotierte transkriptionelle Einheit – die beide möglicherweise für GPI-gekoppelte Zellwandproteine kodieren, oder das Protein für die Ergosterolbiosynthese Erg4p gegenüber den Wildtypzellen verstärkt exprimiert.

Tabelle 16: Differentielle Genexpression in YPD.

Tabellarische Auflistung von differentiell regulierten Genen aus dem Vergleich zwischen dem *mom1Δ*-Deletions- und dem *C. dubliniensis* Wildtyp-Stamm CD36 in YPD nach 6 h Wachstum, identifiziert mit der *MESSAGE*-Technologie.

	Ident. ORF	Homologie in <i>Candida albicans</i>		Regulation ¹
<i>mom1Δ</i> ↓	Cd36_00190	Orf19.6085	<i>RPL16A</i> ribosomales Protein	-3,268
	kappa E	kappa-1a	mit Transposon Tca6 assoziiertes LTR	-1,748
	Cd36_70560	Orf19.7085	mögl. ORF mit unbekannter Funktion	-1,409
	Cd36_27050	Orf19.2613	<i>ECM4</i> mögl. cytoplasmatisches Glutathione S-Transferase Aktivität	-1,231
	Cd36_34530	Orf19.7308	<i>TUB1</i> Alpha-Tubulin	-1,197
	Cd36_52110	Orf19.4236	<i>RET2</i> mögl. Vesikel-vermittelter Transport vom ER zu Golgi	-1,125
	Cd36_17870	Orf19.5788	<i>EFT2</i> Elongationsfaktor 2 (eEF2); GTPase	-1,043
<i>mom1Δ</i> ↑	Cd36_41520	Orf19.4632	<i>RPL20B</i> ribosomales Protein	1,010
	Cd36_80690	Orf19.5379	<i>ERG4</i> Ergosterolbiosynthese	1,059
	Cd36_28380	Orf19.2398	konserviertes hypothet. Protein, unbekannte Funktion	1,131
	pot. TU1	Orf19.6321	<i>PGA48</i> mögl. GPI-Anker Protein mit unbekannter Funktion	1,228
	Cd36_24720	Orf19.5341	<i>RPS4a</i> mögl. ribosomales Protein	1,634
	Cd36_42320	Orf19.2758	<i>PGA38</i> GPI-Anker Protein, Funktion unbekannt	2,018
	Cd36_62095	Orf19.687.1	<i>RPL25</i> mögl. ribosomales Protein	2,447
	Cd36_32760	Orf19.732	unbekannte Funktion, Homologie zu <i>ScSPS19</i>	4,958

¹ Die Regulationswerte (*mom1Δ*-Deletionsstamm/Wildtyp) sind als log₂-Werte angegeben

Im Vergleich zu den differentiellen Genexpressionsstudien von *efg1Δ*-Deletionsstämmen von *C. albicans* (HLC52) unter diesen Nährstoffbedingungen (YPD) [Doedt, T *et al.* 2004], konnten in *C. dubliniensis* kein großer Einfluss des Mom1p auf den Kohlenhydratmetabolismus und die ATP-Biosynthese beobachtet werden. Während die Deletion dieses APSES-Proteins in *C. albicans* eine Reduktion der glykolytischen Enzyme (z. B. *ENO1*, *PFK1*) und eine Induktion von einiger Genen

des Citratzyklus sowie der ATP-Synthese (wie *KGD1*, *FUM12*, *MDH1*, *STF2*) als Folge hatte, war dieser Effekt in *C. dubliniensis mom1Δ*-Deletionsstämmen nicht zu beobachten. Obwohl die stichprobenartige Identifizierung von 56 verschiedenen cDNA-Fragmenten aus den 2D-Gelen keine umfassende globale Genexpressionsstudie darstellt, konnten trotzdem einige Transkripte dieser Stoffwechselprozesse analysiert werden, die – verglichen mit dem Wildtypstamm- in YPD keine Regulation aufwiesen. So zeigten Transkripte für *CdPGK1* (Phosphoglyceratkinase) und *CdENO1* (Enolase) in beiden *mom1Δ*-Deletionsstämmen mit Regulationsfaktor 1,22 bzw. 1,56 keine Repression, auch einige identifizierte Enzyme des Citratzykluses wie die beiden Untereinheiten der Succinat-CoA Ligase CdLsc1p und CdLsc2p (Regulationswerte von 1,01 bzw. 1,08), der Malatdehydrogenase CdMdh1-1p (0,78) sowie des Regulationsfaktors der ATP-Synthese CdStf2p (1,0) keine Induktion. Ob dieser Unterschied in der Genexpression tatsächlich auf die beiden APSES-Proteine zurückgeführt werden kann oder es sich um einen Spezies-spezifischen Unterschied der beiden Pilze unter der nährstoffreichen YPD-Bedingungen handelt, kann aus den vorliegenden Daten nicht abschließend beantwortet werden.

Unter der nährstofflimitierenden Bedingung (Wasser + 10% FCS) konnte jedoch ein starker Einfluss des Mom1p auf den Kohlenhydratmetabolismus bestätigt werden. Im Vergleich zur der Genexpression im *C. dubliniensis* Wildtypstamm CD36 wiesen – wie bereits in *C. albicans* für *efg1Δ*-Deletionsstamm gezeigt werden konnte - Gene von glykolytischen Enzymen (z. B. *PGK1*, *ENO1*) durch die Deletion von *MOM1* einen starken Expressionsrückgang auf (vgl. **Tab. 17**). Enzymkomponenten des Citratzykluses (z. B. Lsc1p, Lsc1p, Mls1p) waren dagegen unter diesen Bedingungen in ihrer transkriptioneller Expression stark induziert. Da diese starke Induktion dieser Gene auch während der Hefe-Hyphe-Transition des Wildtypstammes CD36 unter diesen nährstofflimitierenden Bedingungen beobachtet wurde (vgl. **Tab. 17**; **Abb. 18**), konnte keine Aussage getroffen werden, ob das APSES-Protein Mom1p oder der Morphologiewechsel die transkriptionelle Repression von Citratzykluses-Genen bewirkt. Ähnliche Problematik galt auch z.B. für die Gene *CdPGA38*, *CdMDH1-1*, *CdERG4* oder *CdRPL20B*, die eine starke Expression in den beiden *MOM1*-Deletionsstämmen zeigten, also unter Bedingungen unter denen die Stämme – im Gegensatz zum Wildtyp – als Hefen wuchsen. Nichtsdestotrotz konnten durch diese Studie potentielle Downstream-Faktoren von *MOM1* identifiziert werden. Wie bereits für die YPD-Bedingung gezeigt werden konnten, zeigten *C. dubliniensis* Gene wie *CdECM4*, *CdEFT2*, *Cd36_70563*, *CdPGA48*, *CdRPL16A* oder *CdRPL25* ein ähnliches Expressionsmuster auch unter Wasser, supplementiert mit Serum oder konnten nur unter diesen Bedingungen in dem *mom1Δ*-Deletionsstamm als differentiell reguliert (entweder reprimiert oder induziert) identifiziert werden (vgl. Gene wie *CdTUP1*, *CdATG15* oder *CdTDH3*).

Tabelle 17: Differentielle Genexpression in H₂O + 10% FCS.

Tabellarische Auflistung von Genen, die aus dem Vergleich zwischen dem *mom1Δ*-Deletionsstamm und dem *C. dubliniensis* Wildtyp-Stamm CD36 unter H₂O, supplementiert mit 10% FCS nach 6 h Wachstum bei 37°C, mit der MESSAGE-Technologie als differentiell identifiziert worden sind.

	Ident. ORF	Homologie in <i>Candida albicans</i>		Regulation¹
<i>mom1Δ</i> ↓	Cd36_28770	Orf19.4384	<i>HXT5</i> Zuckertransporter	-5,690
	Cd36_15230	Orf19.2107.1	<i>STF2</i> ATP-Biosynthese	-2,905
	Cd36_27050	Orf19.2613	<i>ECM4</i> pot. Glutathione S-Alkyl Transferase Aktivität	-2,879
	Cd36_15930	Orf19.2021	<i>HGT8</i> Zuckertransporter	-2,597
	Cd36_08010	Orf19.395	<i>ENO1</i> Enolase	-2,565
	Cd36_22420	Orf19.1354	<i>UCF1</i> Funktion unbekannt, cAMP-induziert (Filamentierung)	-2,492
	Cd36_03300	Orf19.3053	unbekannte Funktion	-2,459
	Cd36_10510	Orf19.2296	unbekannte Funktion	-2,207
	Cd36_00190	Orf19.6085	<i>RPL16A</i> ribosomales Protein	-2,080
	Cd36_60670	Orf19.3651	<i>PGK1</i> Phosphoglycerat Kinase (Glykolyse)	-1,943
	pot.TU2		pot. neue Transkriptionseinheit 2	-1,806
	Cd36_72170	Orf19.6472	<i>CYP1</i> Peptidyl-propyl cis-trans isomerase (PPIase)	-1,735
	Cd36_17870	Orf19.5788	<i>EFT2</i> Elongationsfaktor 2 (eEF2); GTPase	-1,660
	Cd36_00070	Orf19.6109	<i>TUP1</i> Transkriptioneller Corepressor	-1,486
	Cd36_72520	Orf19.5179	<i>LIP5</i> sekretierte Lipase	-1,402
	Cd36_70560	Orf19.7085	unbekannte Funktion	-1,236
	<i>mom1Δ</i> ↑	Cd36_43910	Orf19.1426	nicht charakterisiert
Cd36_32310		Orf19.1860	<i>LSC2</i> beta-Untereinheit der Succinat-CoA Ligase	1,109
Cd36_80690		Orf19.5379	<i>ERG4</i> Ergosterolbiosynthese	1,183
Cd36_61830		Orf19.3412	<i>ATG15</i> mögl. Lipase	1,202
Cd36_52110		Orf19.4236	<i>RET2</i> mögl. Vesikel-vermittelter Transport vom ER zu Golgi	1,209
Cd36_50070		Orf19.5698	mögl. ribosomales Protein	1,296
Cd36_09130		Orf19.4833	<i>MLS1</i> Malat-Synthase	1,310
Cd36_86830		Orf19.6814	<i>TDH3</i> Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	1,391
Cd36_22240		Orf19.2179.2	<i>RPS10</i> Einheit des Ribosoms	1,547
Cd36_82300		Orf19.1613	<i>ILV2</i> pot. Acetolaktat Synthase	1,562
pot. TU1		Orf19.6321	<i>PGA48</i> pot. GPI-Anker Protein mit unbekannter Funktion	1,578
Cd36_30720		Orf19.5285	<i>PST3</i> mögliches Flavodoxin	2,269
Cd36_24720		Orf19.5341	<i>RPS4a</i> pot. ribosomales Protein	2,389
Cd36_01550		Orf19.3358	<i>LSC1</i> Untereinheit der Succinat-CoA Ligase	2,393
Cd36_62095		Orf19.687.1	<i>RPL25</i> pot. Einheit des Ribosoms	2,425
Cd36_46390		Orf19.3117	<i>CSA2</i> vorhergesagtes Zelloberflächen-Antigen	2,462
Cd36_25160		Orf19.7521	<i>REP1</i> konserviertes hypothetisches Protein	2,495
Cd36_83880		Orf19.6925	<i>HTB1</i> Histon H2B	2,594
Cd36_41520		Orf19.4632	<i>RPL20B</i> Einheit des Ribosoms	3,010
Cd36_30420		Orf19.638	<i>FDH1</i> Formiatdehydrogenase	3,256
Cd36_41790		Orf19.4602	<i>MDH1_1</i> mitochondrielle Malatdehydrogenase	3,263
Cd36_42320		Orf19.2758	<i>PGA38</i> GPI-Anker Protein, Funktion unbekannt	3,922
Cd36_28380		Orf19.2398	konserviertes hypothet. Protein, unbekannte Funktion	4,715

¹ Die Regulationswerte (*mom1Δ*-Deletionsstamm/Wildtyp) sind als log₂-Werte angegeben

III. Weiterführende, vergleichende funktionelle Charakterisierung der Wildtyp- und Deletionsstämme

III.1 Adhäsionsverhalten von verschiedenen *C. albicans* und *C. dubliniensis* - Stämme auf unterschiedlichen Oberflächen

Die Adhäsion stellt eine der ersten Phase der Wirt-Pathogen-Interaktion dar und ist somit eine kritische Voraussetzung für die spätere Invasion in das Wirtsgewebe und infolgedessen entscheidend für die Virulenz. Im Allgemeinen haben zahlreiche humanpathogene Pilze wie z. B. *Histoplasma capsulatum* oder einige *Aspergillus*-Arten die Fähigkeit an spezifische Epithelien zu adhären [Mendes-Giannini, MJ *et al.* 2005], jedoch nur *Candida albicans* ist in der Lage ein breites Spektrum von verschiedenen Zell- und Oberflächen-Arten zu besiedeln [Dieterich, C *et al.* 2002; Wiesner, SM *et al.* 2002; Sohn, K *et al.* 2006]. Dies kann eine Erklärung sein, weshalb dieser Hefepilz diverse Nischen wie den menschlichen Darm, den Vaginaltrakt oder die Mundschleimhaut kolonialisiert und diesen Organismus zum erfolgreichsten pilzlichen Pathogen des Menschen macht [Sohn, K and Rupp, S 2009]. Inwiefern die Adhäsions-Fähigkeit auch in klinischen Isolaten von *Candida dubliniensis* sowie im *mom1Δ*-Deletionsstamm ausgeprägt ist, wurde mit Hilfe der quantitativen Adhäsionstests analysiert. Dazu wurden am IGVT/IGB-entwickelten *in vitro* – Polystyrol-, Darm- und Vaginalmodelle verwendet (Dieterich *et al.*, 2002; Sohn *et al.* 2006; Sohn and Rupp, 2009]. Da die Mundhöhle als biologische Nische von *C. dubliniensis* angesehen wird, wurden die Untersuchungen auch auf das Mundschleimhautmodell mit Wangenepithel-Zelllinie (TR146) erweitert. Die Adhäsionsexperimente wurden mit den klinischen Isolaten von *C. albicans* SC5314 und von *C. dubliniensis* CD36 und Wü296 sowie mit dem *C. dubliniensis mom1Δ*-Deletions- und dem Reintegrationsstamm (*mom1Δ/MOM1*) durchgeführt. Dazu wurden konfluent wachsende, humane Epithelzellen einer kolorektalen Karzinomzelllinie (Caco-2), einer epidermoiden vulvo-vaginalen Zelllinie (A-431) sowie einer Wangen-Plattenepithel-Zelllinie (TR146) bzw. eine reine Polystyroloberfläche in 24-Well-Platten mit ca. 3×10^2 Zellen einer exponentiell wachsenden Kultur infiziert und bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Das Infektionsverhältnis betrug dabei etwa eine *Candida*-Zelle auf 100 humane Zellen (*multiplicity of infection (MOI) = 0,01*). Zur quantitativen Bestimmung der Adhäsion wurden zu verschiedenen Zeitpunkten (0, 30, 60, 120 und 240 min] nicht-adhären *Candida*-Zellen im Überstand der Kultur auf YPD-Platten ausplattiert. Anschließend wurden die adhären wachsenden Hefezellen vom Plattenboden abgelöst und ebenfalls auf YPD-Platten ausplattiert. Nach der 24 h Inkubation bei 30°C konnten die Kolonien auf allen Platten ausgezählt und das Verhältnis von adhären zu nicht-adhären wachsenden *Candida* Zellen prozentual bestimmt werden. Die Daten setzten sich aus den Werten von zwei unabhängigen Experimenten mit jeweils 2 biologischen Replikaten je Zeitpunkt zusammen (**Abbildung 32**). Je nach untersuchter

Oberfläche wiesen klinische Isolate von *C. albicans* und *C. dubliniensis* nicht nur große Unterschiede in der Fähigkeit sondern auch in Adhäsionskinetik über den Zeitverlauf auf. Insbesondere auf der Polystyrol-Oberfläche zeigten über 80% - 90 % der Wildtypstämme bereits nach 30 min ein adhärentes Wachstum, wobei zu diesen kurzen Zeitpunkten zwischen den einzelnen *Candida*-Arten kein großer Unterschied bestand (**Abb. 32A**). Spätestens nach 120 min konnte jedoch für *C. dubliniensis*-Wildtypstämme (beim Wü296-Stamm bereits früher) eine stetige Abnahme der Adhäsion beobachtet werden, so dass nach 4 Stunden nur zwischen 55-70% der Zellen auf der Kunststoff-Oberfläche ein adhärentes Wachstum aufwiesen. Diese Abnahme der Adhäsion konnte auf der Polystyrol-Oberfläche für den *C. albicans* Stamm SC5314 über den Zeitverlauf nicht beobachtet werden, es blieb bei den selben hohen Adhäsionswerten von über 90%. Interessant war das Adhäsionsverhalten der klinischen Isolate auf verschiedenen humanen Zellschichten /-monolayer. Zu früheren Zeitpunkten war der Anteil adhärenter Zellen vergleichbar zwischen den beiden *Candida*-Arten, jedoch mit maximal 70% auf vulvovaginalen Epithelzellen (A431) signifikant geringer als auf der Polystyrol-Oberfläche. Auf anderen Epithelien wie Caco-2 oder TR146 zeigten beide Hefepilze eine reduzierte Adhäsion, so dass kein Vorteil von *C. dubliniensis*-Zellen auf Mundschleimhautzellen erkennbar war. Nach 1 bis 2 h Adhäsionsdauer wurde jedoch der Unterschied zwischen *C. albicans* und *C. dubliniensis* offensichtlich. Vergleichbar mit dem Adhäsionsverhalten auf Polystyrol nahm die Anzahl adhärenter Zellen von *C. dubliniensis* nach dieser Zeit auf allen untersuchten Zelloberflächen signifikant ab, während der *C. albicans* Stamm SC5314 entweder den Adhäsionswert beibehielt (so auf TR146, **Abb. 32D**) oder wie auf Caco-2 oder A-431 sogar auf 90% vergrößerte (**Abb. 32B,C**). Dieses Ergebnis zeigt, dass *C. dubliniensis* zwar grundsätzlich in der Lage ist adhäsiv zu wachsen, jedoch dieser Prozess – im Gegensatz zu *C. albicans* – über einen längeren Zeitrahmen nicht mehr aufrecht erhalten werden kann. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung ist z. B. die Tatsache, dass *C. albicans* in den ersten 2 h dieser Bedingung einen morphologischen Wechsel von der Hefe- zur hyphalen Form vollzieht (Daten nicht gezeigt) und auf diese Weise neben der Oberflächenvergrößerung auch hyphenspezifische Oberflächen-Proteine (u. a. Hwp1p, Als-Proteinfamilie oder Hyr1p usw.) ausbildet, die die Adhäsionseigenschaft beeinflussen oder sogar noch verstärken. Im Gegensatz zum Wildtyp CD36 oder zum weiteren *C. dubliniensis* Isolat Wü296 war der *mom1Δ*-Deletionsstamm zu keinem untersuchten Zeitpunkt und auf keiner Oberfläche in der Lage adhärent zu wachsen. Dieser Verlust der Adhäsionsfähigkeit konnte durch die Re-Integration von einem intakten *MOM1*-Allel wieder aufgehoben werden. Unter allen analysierten Bedingungen zeigte der Reversionsstamm DGL122 (*mom1Δ/MOM1*) ein vergleichbares Verhalten sowie ähnliche Adhäsionskinetik wie der *C. dubliniensis* Ausgangsstamm CD36. Dieses Ergebnis zeigt, dass *MOM1* einen großen Einfluss auf die Zellwand/Zelloberfläche des Pilzes aufweist und die Expression von Adhäsionsproteinen stark beeinflusst.

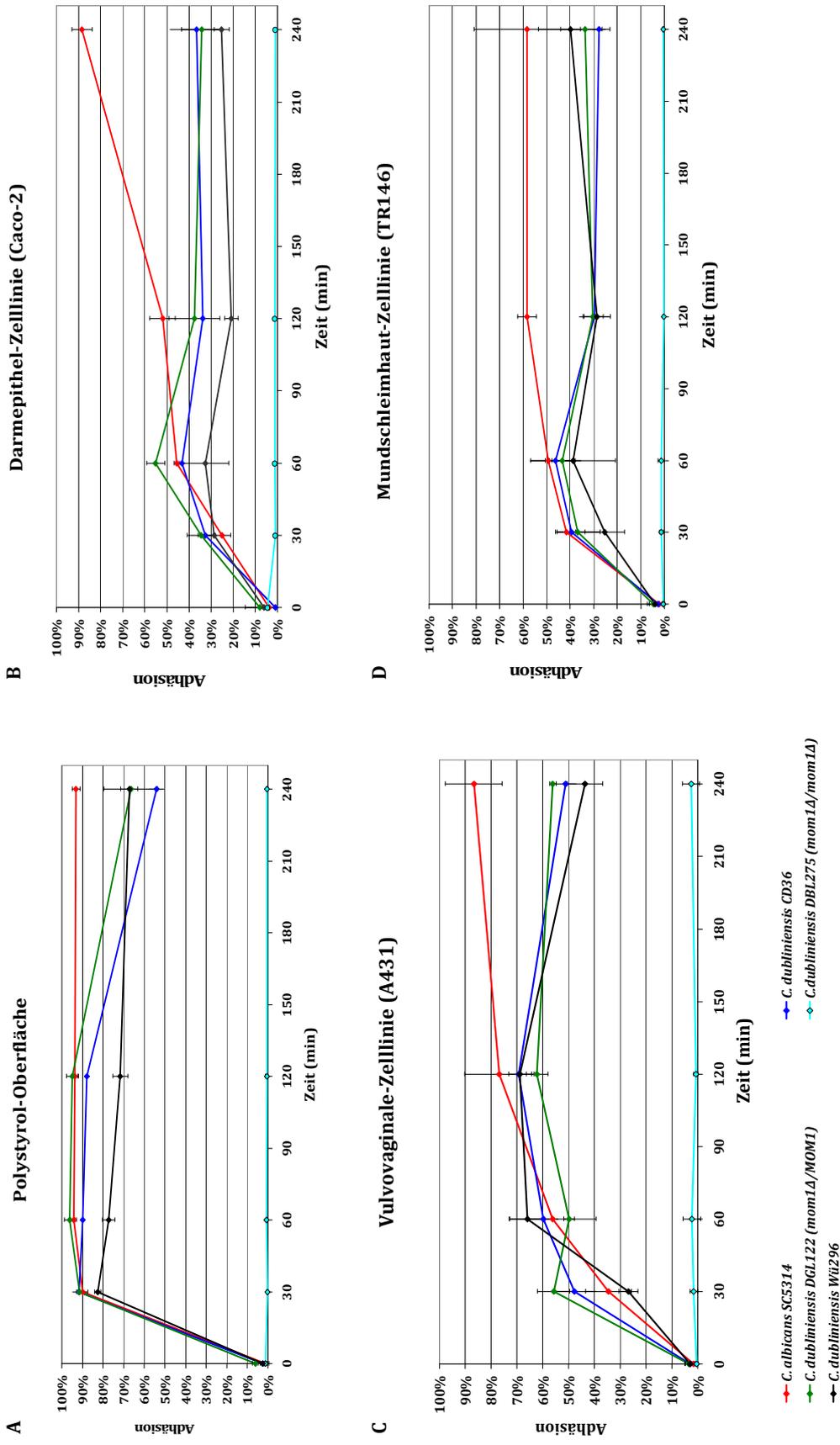


Abbildung 32: Adhäsionskinetik von verschiedenen *Candida*-Stämme auf unterschiedlichen Oberflächen

Adhäsionsverhalten zweier verschiedener *C. dubliniensis*-Stämmen (CD36 und Wü296) verglichen mit dem klinischen Isolat von *C. albicans* SC5314 sowie dem *mom1Δ*-Deletions- und Reintegrationsstamm (*mom1Δ/MOM1*) auf unterschiedlichen Oberflächen wie Polystyrol (A), Caco-2 (Darmepithel-Zelllinie) (B), A431 (Vulvo-vaginale Epidermoid-Zelllinie) (C) sowie auf TR146 (Mundschleimhaut-Zelllinie) (D).

III.2 Analyse des Invasionsverhaltens von unterschiedlichen *C. albicans* sowie *C. dubliniensis*-Stämmen mittels xCelligence Real Time Cell Analyzer (RTCA).

Während eines Infektionsprozesses findet nicht nur eine Interaktion des Pathogens mit der Wirtszelle statt – wie z. B. bereits bei der Adhäsion beschrieben - sondern auch eine Reaktion des Wirts auf den Pathogen. So kann je nach Virulenzeigenschaft der *Candida*-Stämme und der entsprechenden Multiplicity of Infection (MOI) im verwendeten *in vitro*-System diese Reaktion der Wirtszelle durch kontinuierliche Messung der elektrischen Impedanz mithilfe des xCELLigence Real Time Cell Analyzers (RTCA) analysiert werden. Im Gegensatz zu anderen Bestimmungsmethoden des Infektionsprozesses wie z. B. der Messung des von Humanzellen sezernierenden Enzyms Laktat-Dehydrogenase (LDH) oder der Beurteilung des Pilzbefalls humaner Zellen durch histologische Präparate zu einem definierten Zeitpunkt (Endpunktmessung) erlaubt das xCelligence RTCA-System eine kontinuierliche Messung der Zellreaktion. So können nicht nur die verschiedenen *Candida*-Stämme untereinander, sondern auch die Reaktion der Epithelzellen auf die Infektion in Echtzeit gemessen und untereinander verglichen werden.

Für die Analyse mit dem RTCA wurden sowohl die vulvo-vaginale (A-431) wie auch die oropharyngeale Epithelzelllinie (TR146) im 96-*well* Format ausgesät und nach dem Erreichen des konfluenten Wachstums (zum 24 h-Zeitpunkt) mit verschiedenen *Candida*-Stämmen (MOI 1) infiziert. Der Infektionsverlauf auf den beiden Epithelzellen wurde systematisch über 20 h gemessen und in der **Abbildung 33** dargestellt.

Die beiden Epithelzelllinien TR146 und A-431 zeigten während der Infektion mit dem *C. albicans* Wildtypstamm SC5314 ein unterschiedliches Reaktionsverhalten. Die oropharyngealen TR146-Epithelzellen schienen bei gleichem MOI sensitiver auf die Infektion zu reagieren, da bereits ab 3-5h nach Infektion die Impedanz kontinuierlich abnahm, was auf eine zunehmende Zellzerstörung hindeutete. Die Infektion auf A-431-Zellen wies dagegen eine andere Kinetik auf. Hier fand die Abnahme des Zellindex erst zu deutlich späteren Zeitpunkten (nach 8 – 10 h) statt, verlief jedoch dann sehr rapide. Zu beobachten war zusätzlich die Impedanz-Zunahme zu früheren Zeitpunkten der Infektion auf dem A431-Epithel, die möglicherweise auf die Zellmorphologieänderung durch Actin- oder Tubulinmodifikationen hindeuten, durch die sich humane Zellen vor der *Candida*-Infektion (z. B. der Adhäsion oder dem invasivem Wachstum) zu schützen versuchten. Diese Ergebnisse zeigten, dass es bei der *Candida*-Infektion Zelltyp-spezifische Reaktionsantworten auftraten, die mit dem xCelligence RTCA reproduzierbar und sehr genau detektiert werden konnten. Nebenbei konnten auch *Candida*-Spezies-spezifische Unterschiede gemessen werden. So zeigten die beiden Epithelien nach der Infektion mit dem *C.*

dublinsiensis Wildtypstamm (CD36) eine andere Reaktionskinetik als beim klinischen Isolat von *C. albicans*. Der Beginn der Zellindex-Abnahme und somit die Reduktion der elektrischen Impedanz war bei *C. dublinsiensis* - auf beiden Epithelzelllinien - erst nach 12h Infektion detektierbar, verlief dann aber für beide Zelltypen ähnlich. Während auf TR146-Zellen bereits nach weiteren 8 h der Zellindex auf beinahe 10% und somit den *C. albicans* -Wert reduziert wurde, stabilisierte sich der Zellindexwert innerhalb dieses Zeitabschnitts bei A-431-Zellen auf ca. 60%. Auch die beiden *efg1Δ*- und *mom1Δ*-Deletionsstämme hatten -jedoch erst zu späteren Zeitpunkten - einen ähnlichen Infektionsverlauf. Auf beiden Epithelien fand eine Abnahme des Zell-Index beim *C. albicans* HLC52-Stamm (*efg1Δ/efg1Δ*) etwa nach 13 h, beim *C. dublinsiensis* *mom1Δ*-Deletionstamm DBL64 nach 15 h der Infektion statt, verlief dann aber je nach Zelltyp

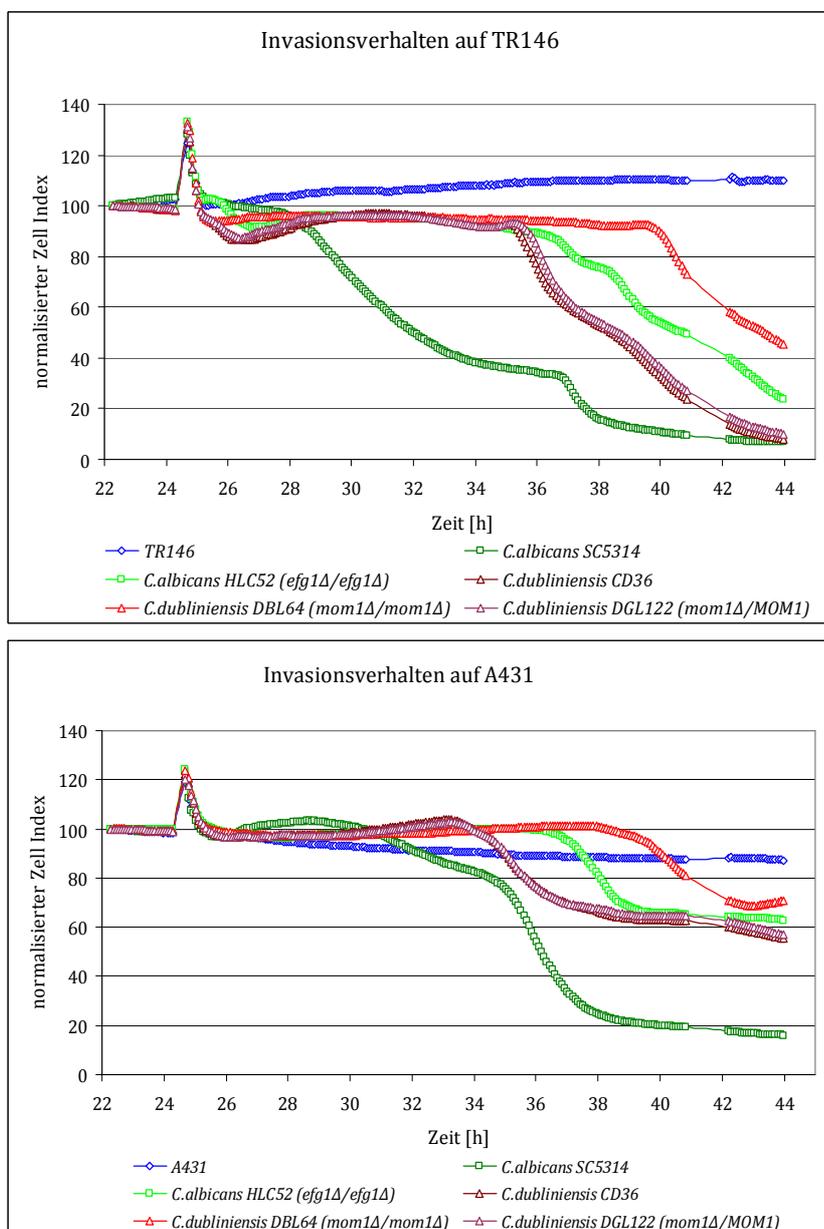


Abbildung 33: Messung des Invasionsverhaltens mittels RTCA.

Echtzeit-Analyse der Reaktion von oral-epithelialen (TR146) und vulvo-vaginalen (A431)-Zelllinien auf Infektion mit verschiedenen *Candida* Stämmen gemessen mit dem xCelligence Real Time Cell Analyzer (RTCA), Roche. Für die Analyse wurden im 96-well-Format jeweils 20000 humane Zellen ausgesät und bei einem konfluenten Wachstum nach 24 h mit einer MOI von 1:1 sowohl mit den Wildtyp-Stämmen von *C. albicans* und *C. dublinsiensis* wie auch mit den *mom1Δ* und *efg1Δ*-Deletionsstämmen infiziert. Die Auswirkung der Infektion wurde über einen Verlauf von 20 h durch die kontinuierliche Messung der elektrischen Impedanz (Angabe als Zell Index-Wert) beobachtet.

ähnlich. Eine Reintegration einer funktionellen Kopie von *MOM1* in den *mom1Δ*-Deletionsstamm (Reversionsstamm DGL122) konnte die Verlaufskinetik zu 100% revertieren. Verglichen mit dem Wildtypstamm zeigten beide Stämme einen sehr reproduzierbaren Infektionsverlauf, was für die hohe Zuverlässigkeit des RTCA bei der Detektion der Zellreaktion spricht.

Die scheinbar geringere Resistenz der oralen Plattenepithelzelllinie TR146 gegenüber der vulvo-vaginalen Zelllinie A431 konnte jedoch nicht ausschließlich auf die Pathogenität der Hefestämme, sondern zu einem bestimmten Anteil auch auf die Limitierung der Sauerstoffaufnahme der oralen Zellen durch das Bewachsen der humanen Zellschicht mit dem Pilz oder durch die zusätzliche Reduktion der Nährstoffe zurückgeführt werden. Ohne *Candida* zeigten beide Zelllinien diese zunehmende Zellzerstörung nicht.

Die RTCA-Daten bestätigten die Ergebnisse aus der Analyse des Adhäsionsverhaltens (vgl. **Ergebnisse, Abschnitt III.1**) und der Literatur, die zeigen, dass *C. dubliniensis* Wildtyp-Stämme verglichen mit *C. albicans* WT-Stamm SC5314 in *in vitro*- und *in vivo*-Studien eine signifikant geringe Virulenz aufweist. Obwohl auch *C. dubliniensis* in der Lage ist humane Zellen zu zerstören, findet dies – verglichen mit dem *C. albicans* Wildtypstamm – eher zu späteren Zeitpunkten statt. Die Deletion der beiden APSES-Proteine Efg1p und Mom1p führte zu einem weiteren signifikanten Verlust der Pathogenität.

III.3 Untersuchung der Zellwandstabilität

Die Zellwand der Pilze ist ein essentielles Organell der Zelle und diejenige Komponente, die als erstes mit den Wirtszellen in Kontakt tritt und die sowohl in der Adhäsionseigenschaft des Pilzes sowie in der Wirt-Pathogen-Wechselwirkung eine entscheidende Rolle spielt. In ihrem Aufbau ist die Zellwand eine Struktur aus kovalent und nicht-kovalent verknüpfter Bestandteilen, die nicht nur eine Schutzbarriere gegen physikalische, chemische und biologische Eingriffe darstellt, sondern die der Zelle auch ihre spezifische Form verleiht. Abhängig von der Umweltbedingung kann sowohl ihre makromolekulare Zusammensetzung wie auch die molekulare Organisation beachtlich variieren. Ihre Biogenese bedarf außerdem einer beachtlichen metabolischen Investition und ist deshalb sowohl räumlich wie auch zeitlich streng kontrolliert [Ram, AF and Klis, FM 2006].

Die Hauptbestandteile der Zellwand sind Polysaccharide wie verzweigte β -1,3- und β -1,6-verknüpfte Glukosepolymere (β -Glukane) sowie aus N-Acetylglucosamin-Einheiten (GlcNAc) zusammengesetztes Chitin. Zu weiteren Komponenten zählen glykosylierte Zellwandproteine, zu denen GPI-Ankerproteine oder andere kovalent-gebundene Mannoproteine zählen. Einen geringen Anteil bilden die Lipide [Chaffin, 2008; Chaffin *et al.*, 1998].

III.3.1 Einfluss zellwandspezifischer Substanzen auf das Wachstumsverhalten der *Candida* WT-Stämme

Die Biogenese der Zellwand kann mithilfe von zwei miteinander verwandten anionischen Farbstoffen Calcofluor White (CFW) und Congo Red (CR) analysiert werden, die sich jedoch in ihrem Wirkungsort unterscheiden. Während das Fluorochrom Congo Red durch seine Interaktion mit dem β -Glucan die Zusammenlagerung der Glukan-Mikrofibrillen behindert [Kopecka, M and Gabriel, M 1992], stört Calcofluor White den Aufbau des Chitins [Elorza, MV et al. 1983]. Je nach Zellwandbeschaffenheit verschiedener Stämme, können unterschiedliche Mengen des Farbstoffs in der Zellwand interkalieren bis ihre Funktionalität deutlich eingeschränkt wird und sich in einer (Hyper)sensitivität der Stämme gegenüber diesen chemischen Substanzen bemerkbar macht.

Serielle Verdünnungsreihen von unterschiedlichen klinischen Isolaten von *C. albicans* (SC5314 und WO-1) und *C. dubliniensis* (CD36, Wü284 und Wü296) wurden auf YPD-Agarplatten supplementiert mit unterschiedlichen Konzentrationen Calcofluor White und Congo Red ausplattiert und für mehrere Tage bei 30°C kultiviert. Das Ergebnis dieses Wachstums ist in der **Abbildung 34** zusammengestellt.

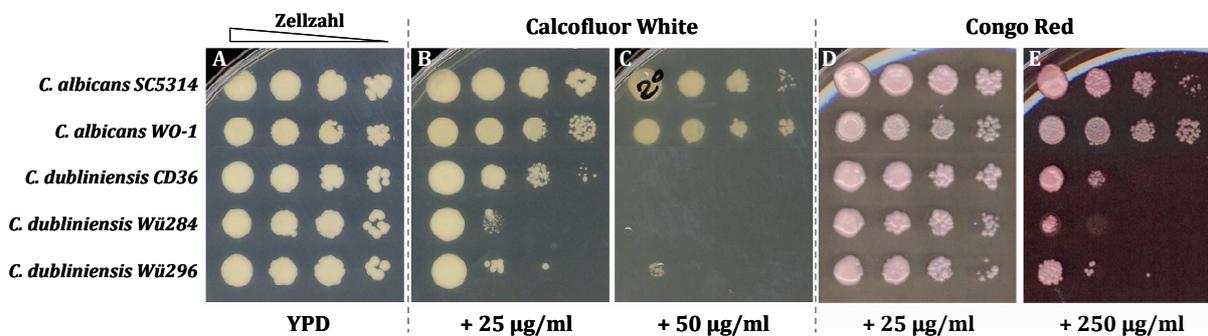


Abbildung 34: Einfluss von Calcofluor White und Congo Red auf das Wachstumsverhalten von verschiedenen *C. albicans* und *C. dubliniensis*-Stämmen.

Serielle Verdünnungen (10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 Zellen) unterschiedlicher klinischer Isolate von *C. albicans* und *C. dubliniensis* auf YPD-Platten ohne **(A)** und nach der Supplementierung mit verschiedenen Konzentrationen an Calcofluor White oder Congo Red **(B-E)**. Die entsprechenden Farbstoff-Konzentrationen sind unterhalb der Platten angegeben. Die Inkubation der Stämme erfolgte für 2 Tage bei 30°C.

Die verschiedenen *Candida*-Arten zeigten unterschiedliche Sensitivität gegenüber den beiden Zellwand-interkalierenden Substanzen Calcofluor White und Congo Red. So zeigten die untersuchten klinische Isolate von *C. dubliniensis* bereits bei niedrigen Konzentrationen von Congo Red (ab 250 $\mu\text{g/ml}$) ein deutlich reduziertes Wachstum. Eine Konzentration von 500 $\mu\text{g/ml}$ CR im Agar war für *C. dubliniensis* letal, während die klinischen Isolate von *C. albicans*

noch ein gutes Wachstum zeigen konnten (**Daten nicht gezeigt**). Insbesondere hat scheinbar der *C. albicans* WO-1-Stamm Mechanismen entwickelt, diesen Farbstoff entweder zu zersetzen oder es nicht in die Zellwand einzubauen. Dies wird durch die signifikant geringere Pigmentierung der Zellen und durch eine verstärkte Hofbildung um die Kolonien sichtbar. Verglichen mit Congo Red zeigten die *C. dubliniensis* Wildtyp-Stämme auf Agar-Platten mit Calcofluor White einen noch signifikanteren Wachstumsunterschied gegenüber *C. albicans*. Bereits sehr niedrige Konzentrationen dieses Agents (25 µg/ml) hatten auf das Wachstumsverhalten von den meisten *C. dubliniensis* Stämmen subletale Auswirkungen. Bei 50 µg/ml CFW konnten im Gegensatz zu *C. albicans* kein *C. dubliniensis* Wildtyp-Stamm mehr wachsen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die beiden *Candida*-Arten unterschiedliche Sensitivität gegenüber den Zellwand-interkalierenden Substanzen aufweisen. Die Tatsache, dass *C. dubliniensis*-Stämme bereits bei niedrigen Konzentrationen an Congo Red und Calcofluor White einen letalen Wachstumseffekt zeigten, lässt darauf schließen, dass signifikante Unterschiede in der Zellwandzusammensetzung der beiden *Candida*-Arten bezüglich β -Glukan und Chitin bestehen. Vorläufige Daten aus der Analyse der Kohlenhydratzusammensetzung bestätigen diese Ergebnisse. So weisen die Zellwände von zwei unabhängigen *C. dubliniensis* Isolaten CD36 und Wü296 mit 4,71% im Vergleich zu den beiden *C. albicans* Stämmen SC5314 und WO-1 (3,08%) etwa 50% mehr Chitin auf (**Daten nicht gezeigt, Analyse durch Dr. P. de Groot, University of Castilla-La Mancha, Spanien**).

III.3.2 Einfluss zellwandspezifischer Substanzen auf das Wachstumsverhalten der *mom1Δ*- und *efg1Δ*-Deletions- und ihren Reintegrationsstämmen

In der Literatur wurde bereits gezeigt, dass die Deletion des APSES-Proteins Efg1p einen großen Einfluss auf die Zellwandzusammensetzung von *C. albicans* hat [Sohn *et al.*, 2003]. Als Transkriptionsfaktor hat Efg1p eine entscheidende Rolle auf die Induktion und Repression von Zellwandgenen sowohl während des hyphalen wie auch hefeförmigen Wachstums. So konnte z. B. gezeigt werden, dass GPI-verankerte Zellwandproteine wie Hwp1p, Hwp2p, Ywp1 oder das Adhesin Eap1p in Abhängigkeit von Efg1p reguliert waren [Sharkey, LL *et al.* 1999; Li, F and Palecek, SP 2003; Sohn, K *et al.* 2003]. Die Transkriptom-Analyse mittels der MESSAGE-Technologie zeigte, dass *MOM1* in *C. dubliniensis* ebenfalls die Expression von zahlreichen Zellwandproteinen regulierte, so dass davon ausgegangen werden kann, dass die beiden homologe APSES-Proteine ähnliche Funktion in der Zellwandbiogenese aufweisen.

Inwieweit die beiden APSES-Proteine auch die Sensitivität gegen CFW und CR beeinflussen, wurde im folgenden Abschnitt anhand des Wachstumsverhaltens verschiedener Stämme analysiert. Dazu wurden neben den entsprechenden Wildtyp-Stämmen, sowohl die jeweiligen Deletions- und die *MOM1* oder *EFG1*-Reintegrationsstämme in einer seriellen Verdünnungsreihe auf YPD-Agarplatten supplementiert mit 25 µg/ml CFW oder 175 µg/ml CR aufgetropft und über mehrere Tage bei 30°C inkubiert (vgl. **Abbildung 35**).

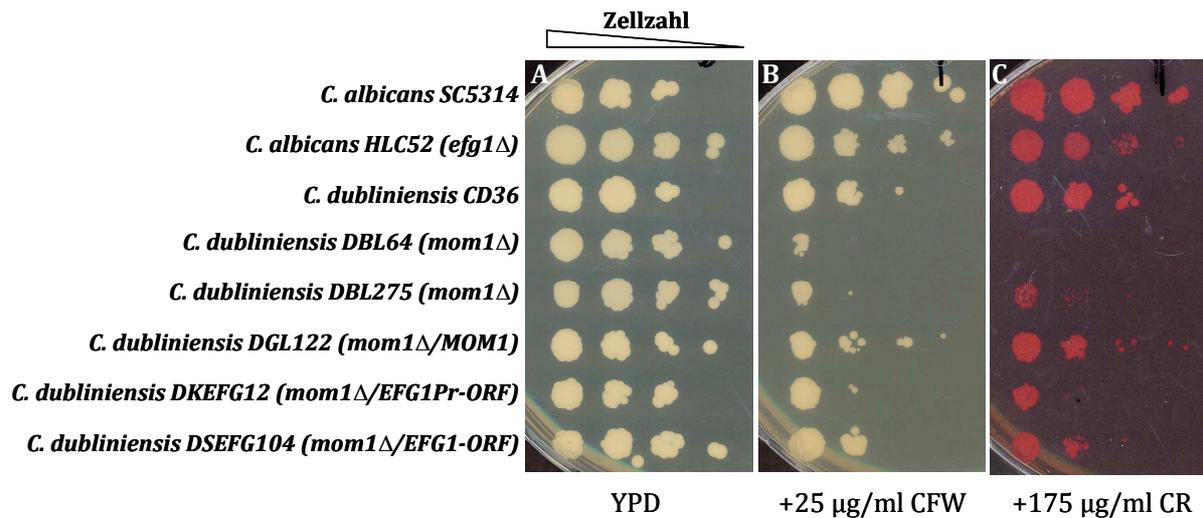


Abbildung 35: APSES-Proteine und ihr Einfluss auf die Zellwand.

Einfluss der APSES-Proteine Efg1p und Mom1p auf das Wachstumsverhalten der Stämme auf Vollmedium (YPD) (A) supplementiert entweder mit 25 µg/ml Calcofluor White (CFW, B) oder 175 µg/ml Congo Red (CR, C). Die Inkubation der Platten erfolgte für 2 Tage bei 30°C. Verdünnungsreihe entspricht 10^5 -, 10^4 -, 10^3 -, 10^2 -Zellen.

Verglichen mit dem klinischen Isolat CD36 von *C. dubliniensis* zeigten die beiden *mom1Δ*-Deletionsstämme DBL64 und DBL275 sowohl bei der Supplementierung mit Congo Red wie Calcofluor White signifikante Wachstumsdefekte. Die Reintegration einer funktionellen *MOM1*-Kopie konnte diesen Wachstumseffekte vollständig aufheben, was darauf hindeutet, dass der Transkriptionsfaktor Mom1p sowohl die β -Glukan- wie auch die Chitinaufbiogenese reguliert. Diese Funktion ist vergleichbar mit der von Efg1. Auf den gleichen Agar-Platten zeigte auch der *efg1Δ*-Deletionsstamm im Gegensatz zum *C. albicans* Wildtyp-Stamm SC5314 eine höhere Sensitivität gegenüber diesen beiden Zellwand-interkalierenden Farbstoffen, wobei die scheinbar höhere Resistenz des *efg1Δ*-Stammes HLC52 verglichen zur *mom1Δ*-Deletion eher auf den oben beschriebenen Spezies-Unterschied zurückzuführen ist.

Interessant war das Wachstumsverhalten von *mom1Δ*-Deletionsstämmen nach heterologer Expression des *C. albicans EFG1*-Gens, anstelle von *MOM1*. Wie bereits bei der Reintegration von *MOM1* konnte auch die Expression des *EFG1*-ORFs den signifikanten Wachstumsdefekt auf Platten mit CFW und CR zum großen Teil aufheben und die Resistenz im großen Umfang revertieren. Auch in dieser Funktion scheinen die beiden APSES-Proteine ähnliche Downstream-Faktoren zu regulieren, obwohl minimale Unterschiede zwischen Mom1p und Efg1p unter diesen Bedingungen bestehen. Noch deutlicher war diese Differenz bei der zusätzlichen Integration des *EFG1*-Promotors anstelle vom *MOM1*-Promotor ersichtlich. Sowohl auf CFW- wie auch CR-Platten, zeigten die Stämme eine erhöhte Sensitivität gegenüber diesen Farbstoffen verglichen mit dem *mom1Δ*-Deletionstamm bei dem lediglich der *EFG1*-ORF reintegriert wurde. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass sich die beiden Promotoren in *cis*-regulatorischen Elementen unterscheiden.

Beide APSES-Proteine Mom1p und Efg1p haben jedoch eine konservierte Funktion in der Zellwandbiosynthese, sowohl in der Expression von Zellwandproteinen wie auch in der Aufrechterhaltung der Stabilität des Kohlenhydratgerüsts.

III.4 Unterschiede in der transkriptionellen Regulation von *EFG1* und *MOM1*

Frühere Untersuchungen der *EFG1*-Expressionskinetik in *C. albicans* konnten zeigen, dass die Expression dieses Gens durch das Überimpfen aus einer logarithmisch-wachsenden Kultur in ein frisches, hypheninduzierendes Medium der morphologischen Transition im voraus signifikant runterreguliert wurde. Bereits nach 10 min Inkubation konnte aufgrund der negativen Autoregulation vom *EFG1* kein mRNA-Transkript nachgewiesen werden, und das vor der beginnenden Hyphenausbildung. Somit existierte eine klare Korrelation zwischen der Abnahme des *EFG1*-Transkriptniveaus und nachfolgender hyphalen Entwicklung in *C. albicans* [Stoldt, VR *et al.* 1997; Tebarth, B *et al.* 2003]. Inwiefern eine Wechselbeziehung zwischen der *MOM1*-Expression und der morphologischen Differenzierung in *C. dubliniensis* bestand, wurde im Folgenden mithilfe der quantitativen RT-PCR untersucht und mit *C. albicans* verglichen.

Dafür wurden die im Vollmedium (YPD) stationär-wachsenden üN-Vorkulturen der beiden klinischen Isolate von *C. albicans* und *C. dubliniensis* auf eine optische Dichte (OD_{600nm}) von 0,1 sowohl in einer YPD-Flüssigkultur supplementiert mit 10 % fötalem Kälberserum (FCS) oder unter den nährstofflimitierenden Bedingungen des Wassers supplementiert mit 10 % FCS angeimpft und über einen Zeitverlauf von 6 h bei 37°C inkubiert. Da der *C. dubliniensis* Wildtyp-Stamm unter diesen beiden Bedingungen unterschiedliche morphologische Formen annimmt, konnte so der Zusammenhang zwischen *MOM1*-Expression und Hyphenausbildung analysiert

werden. Die Bestimmung des *EFG1*- und *MOM1*-Transkriptniveaus erfolgte zu den entsprechenden Zeitpunkten (5, 15, 30, 50, 90, 180 und 360 min) der Inkubation über den relativen Vergleich der *EFG1*- bzw. *MOM1*- Expression zur μ N-Kultur als 0h- Wert (**Abb. 36**).

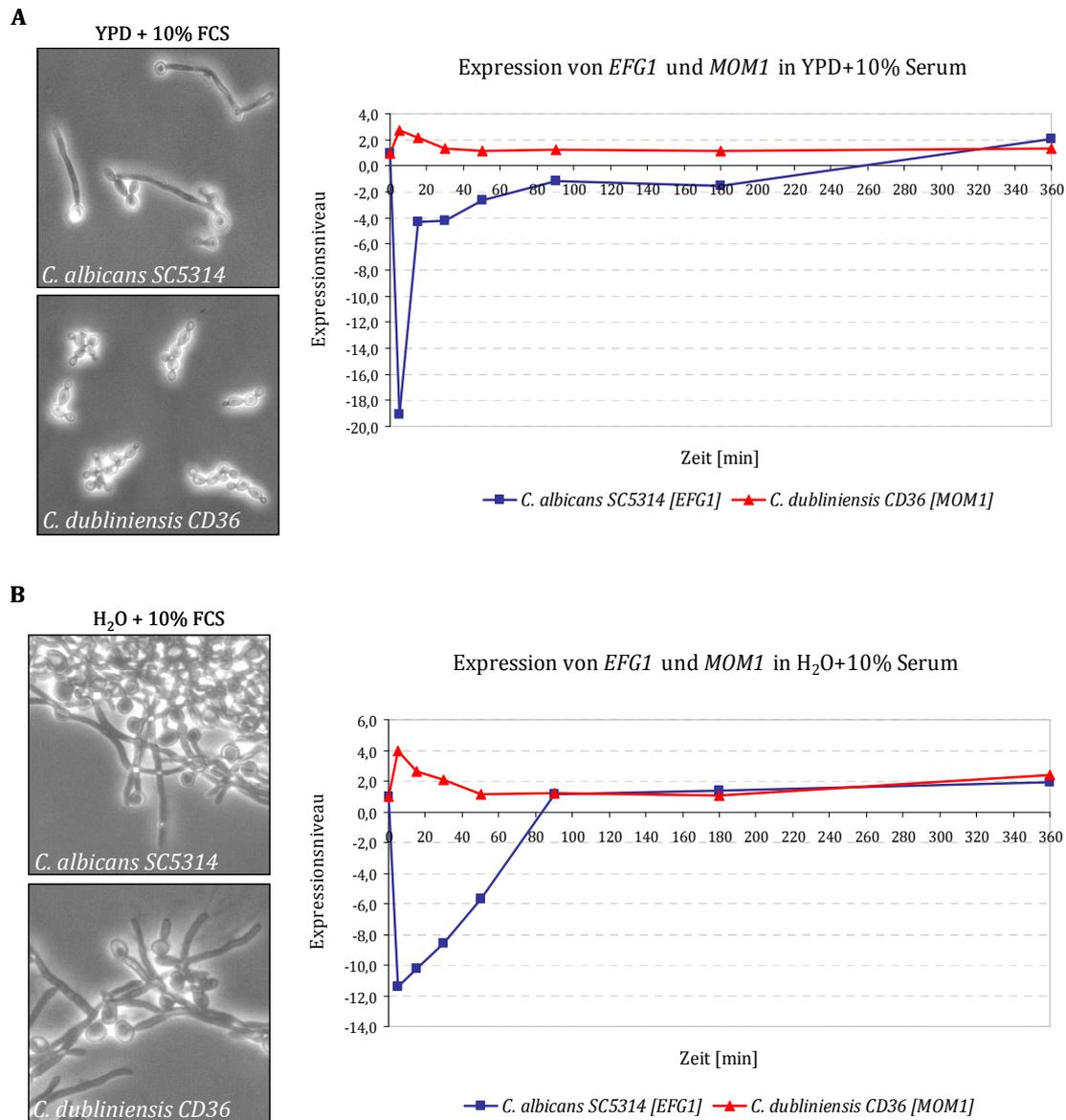


Abbildung 36: Kinetik der relativen Expression von *EFG1* und *MOM1* in den entsprechenden Wildtypstämmen.

Mit qRT-PCR bestimmter zeitlicher Verlauf der *EFG1* bzw. *MOM1*-Expressionskinetik nach dem Überimpfen des *C. albicans* SC5314 bzw. *C. dubliniensis* CD36-Wildtyps von der Übernachtskultur YPD (0 h-Wert) ins frische YPD-Medium (**A**) oder H₂O (**B**), beides supplementiert mit 10% FCS bei 37°C. Unter beiden Bedingungen zeigten die *C. albicans* Stämme Hyphenausbildung, während der *C. dubliniensis* Wildtypstamm unterschiedliche Morphologien aufwies und entweder echte Hyphen ausbildete (H₂O + Serum) oder in der Hefeform wuchs (YPD + Serum). Referenzgen für die Normalisierung war das *Ca/CdRDN18*.

Zunächst bestätigten die transkriptionellen Analysen die beschriebene rasche Repression von *EFG1* während der zunehmenden Hypheninduktion des *C. albicans* Wildtypstamms SC5314 in den beiden untersuchten Bedingungen. Die *EFG1*-Transkriptmenge war – verglichen mit dem *EFG1*-Transkriptniveau der stationären Blastosporen-Kultur – bereits nach 5 min Inkubation signifikant (um das 11 – 19-fache) reduziert, nahm jedoch anschließend stetig zu, so dass zu dem Zeitpunkt 90 min beinahe der gleiche Ausgangswert erreicht werden konnte. Von besonderem Interesse war der Verlauf der *MOM1*-Expression im *C. dubliniensis* Stamm CD36. Im Gegensatz zur *EFG1*-Expressionsabnahme konnte zu ganz frühen Zeitpunkten der Inkubation (bereits 5 min nach dem Überimpfen) unter den beiden so morphologisch unterschiedlichen Bedingungen in *C. dubliniensis* eine Steigerung des *MOM1*-Transkriptniveaus auf das 2- bis 4-fache beobachtet werden, wobei sich nach 50 min wieder das Ausgangsniveau einstellte.

Diese Daten stehen im Widerspruch zu den Ergebnissen aus *C. albicans*, so dass zumindest für *C. dubliniensis* dieser positive Zusammenhang zwischen transkriptioneller Repression des APSES-Proteins Mom1p und der morphologischen Transition von der Blastospore zur hyphalen Wachstumsform nicht bestätigt werden kann. Im Vergleich zu der stark konservierten Funktion der beiden homologen APSES-Proteine Efg1 und Mom1p von *C. albicans* und *C. dubliniensis*, zeigt sich in der transkriptionellen Expression der beiden Gene ein entscheidender Spezies-spezifische Unterschied.

Um den transkriptionellen Unterschied in der Expression der beiden APSES-Proteine verstehen zu können, wurde mithilfe der qRT-PCR die Regulationskinetik des heterolog exprimierten *EFG1*-ORFs mit *EFG1*-Promotor im *mom1Δ*-Deletionsstamm unter YPD-Medium supplementiert mit 10% FCS bei 37°C analysiert. Wie bereits beschrieben, konnte der Stamm unter diesen Bedingungen kein filamentöses Wachstum ausbilden (**vgl. Abb. 10C**). Interessant war jedoch die Tatsache, dass alleine über diesen Austausch der gesamten *MOM1*-Promotorregion durch den *EFG1*-Promotor die Kinetik der *C. albicans* *EFG1*-Induktion in *C. dubliniensis* beobachtet werden konnte. Zwar konnte das Transkriptionsniveau des heterozygoten *C. albicans* Stammes HLC37 mit einer beinahe 22-fachen Repression des *EFG1*-Transkripts nicht ganz erreicht werden, hatte jedoch verglichen mit dem *MOM1*-Reversionsstamm DGL122 eine entgegengesetzte Tendenz (**vgl. Abb. 37**). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die antagonistische transkriptionelle Expression der beiden APSES-Proteine hauptsächlich auf unterschiedliche *cis*-regulatorische Elemente im Promotorbereich der Gene zurückgeführt werden kann, die für die differenzielle Induktion von *EFG1* bzw. *MOM1* verantwortlich sind.

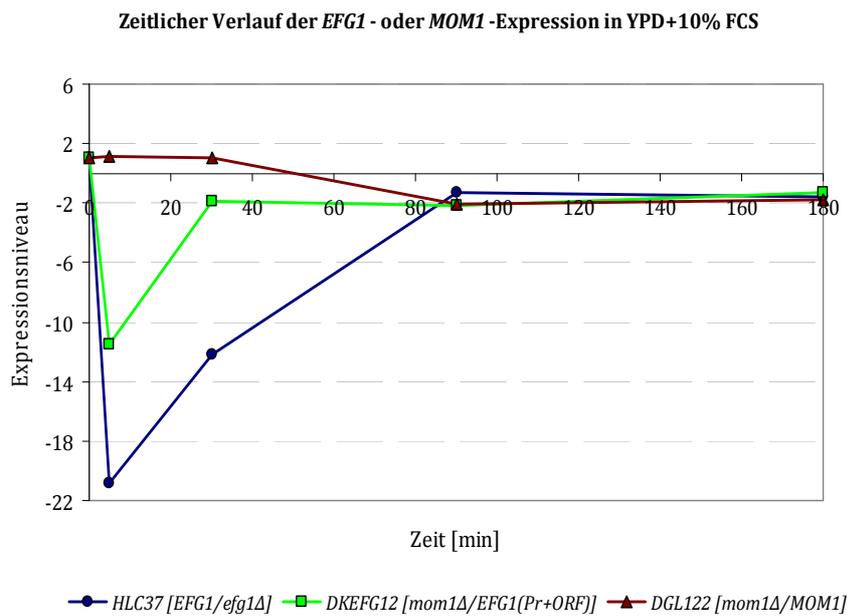


Abbildung 37: Kinetik der *EFG1*-Regulation nach heterologer Expression des *EFG1* (mit Promotor und ORF) im *mom1Δ*-Deletionsstamm.

Mit qRT-PCR bestimmter *EFG1*- und *MOM1*-Expressionsverlauf in den 3 unterschiedlichen Stämmen HLC37 (*C. albicans*) und den beiden *C. dubliniensis* Stämmen DGL122 und DKEFG12 zu den Zeitpunkten 5, 30, 90 und 180 min nach dem Überimpfen ins YPD supplementiert mit 10% FCS bei 37°C.

III.4.2 Unterschiedliche Morphologie der *efg1Δ*- und *mom1Δ*-Deletionsstäme auf Festmedien mit Protein als Stickstoffquelle

Auf Agarplatten aus Hefe-Kohlenstoff (YCB) supplementiert mit Protein (z. B. Rinderserumalbumin, BSA) als einzige Stickstoffquelle und saurem pH (pH 4,0) zeichnete sich ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Deletionsstämmen ab (vgl. **Abbildung 38**). Unter diesen Bedingungen bildeten nur die *C. dubliniensis mom1Δ*-Deletionsstäme radiärsymmetrische Koloniefortsätze aus besonders langen Hyphen, während sowohl die *C. albicans efg1Δ*-Deletionsstäme, aber auch die beiden Wildtypstäme als Blastoporen wuchsen und dadurch glatte Kolonieränder ausbildeten. Dieser Phänotyp war auch durch andere Proteinquellen wie z.B. Hämoglobin oder Casein induzierbar. Durch Zugabe von Hefeextrakt wurde dieser Effekt zusätzlich verstärkt. Die *mom1Δ*-Deletionsstäme bildeten dreidimensionale hyphale Strukturen („Lufthyphen“) aus, die nicht-invasiv wuchsen. Eine pH-Zunahme zum neutralen Bereich führte zur Reduktion dieser hyphaler Strukturen. Auch das Wachstum in Flüssigkultur und Schütteln (160 rpm) hemmte die Ausbildung dieser Strukturen. Durch das Abstellen des Schüttlers konnten zunehmend hyphale Strukturen nachgewiesen werden (**Daten nicht gezeigt**).

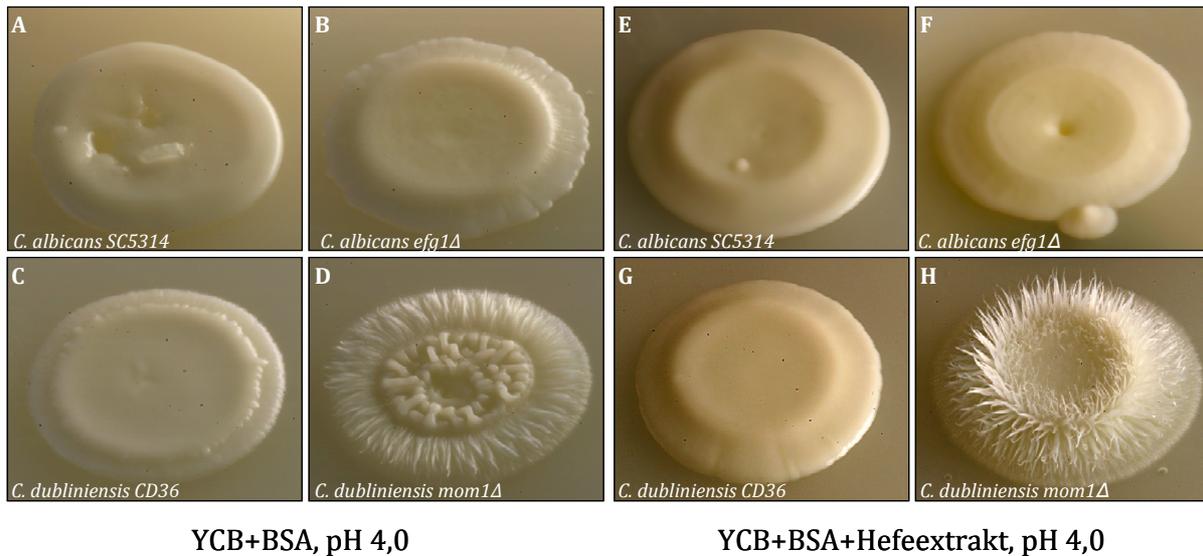


Abbildung 38: Unterschiedliche Morphologie der Deletionsstämmen auf Agarplatten mit Hefe-Kohlenstoff (YCB) supplementiert nur mit Rinderserumalbumin (BSA) oder zusätzlich mit Hefeextrakt bei saurem pH.

Koloniemorphologie des *C. albicans* und *C. dubliniensis* WT- verglichen mit den entsprechenden *efg1Δ*- und *mom1Δ*- Deletionsstämmen auf YCB, supplementiert entweder nur mit Rinderserumalbumin (BSA) (A-D) oder nach Zugabe von BSA und Hefeextrakt (E-H), nach 1 Woche Wachstum bei 30°C. Die Platten hatten einen pH-Wert von 4,0.

Dieser Phänotyp deutete darauf hin, dass das Mom1p unter diesen hochmolekularen Stickstoff - Bedingungen eine reprimierende Funktion aufweist oder nicht benötigt wird. Interessanterweise konnte durch die funktionelle Komplementierung des *C. albicans EFG1* in den *mom1Δ*-Deletionsstämmen eine Reduktion dieser hyphalen Morphologie beobachtet werden, die in ihrer Auswirkung mit dem *MOM1*-Reintegrationsstamm vergleichbar war, so dass davon ausgegangen werden kann, dass diese reprimierende Fähigkeit auch im Efg1p erhalten ist.

Für *C. albicans* ist bekannt, dass bei der Verwertung von Proteinen (z.B. BSA) unter diversen Nährstoff- und pH-Bedingungen unterschiedliche sekretorische Aspartatproteinasen (sog. SAPs) exprimiert werden, die extrazellulär das Protein abbauen können. Die Expression von homologen *C. dubliniensis* SAP-Genen (*CdSAP1*; 2; 3; 4-6; 7) unter diesen Bedingungen wurde mittels quantitativen RT-PCR überprüft. Dazu wurde die Gesamt-RNA aus den Lufthyphen der beiden *mom1Δ*-Deletionsstämmen, sowie zum Vergleich vom Wildtyp und dem *MOM1*-Reversionsstamm isoliert und die Expression der einzelnen SAP-Gene bestimmt. Zur Normalisierung wurden die beiden Referzgene *CdRPPO* und *CdTUB1* verwendet. Das Ergebnis zeigte eine signifikante Reduktion nur von *CdSAP2* in den Deletionsstämmen (0,47-fache Deregulation), alle anderen SAPs waren in den Lufthyphen nicht differentiell reguliert (**Daten nicht gezeigt**).

IV. Identifizierung einer Schlüsselfunktion der APSES-Proteine in der Verwertung von Stickstoffverbindungen

IV.1 Einfluss unterschiedlicher Stickstoffverbindungen auf das Wachstumsverhalten von *C. albicans* und *C. dubliniensis* Wildtypstämmen

Wie bereits gezeigt, hatte die *MOM1*-Deletion in *C. dubliniensis* einen großen Einfluss auf die Ausbildung von Hyphen auf Agarplatten bestehend aus Hefe-Kohlenstoff (YCB), einem synthetischen Medium mit einer definierten Kohlenstoffquelle, supplementiert entweder nur mit Protein wie Rinderserumalbumin (BSA) oder mit Hefeextrakt als zusätzliche Stickstoffquelle (vgl. **Abb. 38**). Diese Morphologie zeigten die beiden Wildtyp-Stämme sowie der *efg1Δ*-Deletionstamm von *C. albicans* nicht. Welchen Einfluss unterschiedliche Stickstoffverbindungen auf das Wachstumsverhalten und Morphologie der Stämme hatte, wurde im Folgenden untersucht. Dazu wurde eine Wachstumskinetik der beiden klinischen Isolate von *C. albicans* SC5314 und *C. dubliniensis* CD36 in YCB-Flüssigkulturen supplementiert entweder mit einer hochmolekularen (z. B. BSA) oder einer niedermolekularen Stickstoffquelle (z. B. Ammoniumchlorid) sowie einer Kombination aus den beiden Stickstoffverbindungen ermittelt (vgl. **Abbildung 39**). Die abgebildeten Graphen stellten das Wachstumsverhalten der Wildtypstämme bei 30°C aus jeweils 3 unabhängigen Experimenten dar.

Beide *Candida*-Arten zeigten auf diesen Medien eine ähnliche Proliferationskinetik, die sich je nach Stickstoffquelle unterschieden. Im Gegensatz zu Proteinen stellen Ammonium-Verbindungen eine bevorzugte, sog. primäre Stickstoffquelle dar, da Ammonium-Ionen (NH_4^+) von der Zelle sofort aufgenommen und verwertet werden können, so dass bereits nach einer sehr kurzen lag-Phase (5 h) unter Amminumchlorid bei beiden Wildtypstämmen ein exponentielles Wachstum zu beobachten war. Im Gegensatz dazu muss die Zelle beim Protein als einzige Stickstoffquelle im Medium sowohl ihr Transkriptom wie auch ihre katabolische Aktivität umstellen und zuerst die notwendigen sekretorischen Proteinasen (sog. Saps) und Oligopeptidtransporter (Opt-Transporter) exprimieren, die das vorliegende Protein extrazellulär zu Peptiden abbauen und über die Transporter in die Zellen aufnehmen können [Banerjee et al., 1991; Martinez & Ljungdahl, 2005]. Diese Verzögerung war auch an der sehr langen Adaptationsphase der Stämme ersichtlich. Der Beginn des exponentiellen Wachstums fand bei dieser sog. „sekundären“ Stickstoffquelle erst nach 50 – 60 h statt, wobei - verglichen mit *C. dubliniensis* - der *C. albicans* Stamm etwas früher die Proliferation induzierte. Ein weiteres charakteristisches Wachstumsmerkmal im YCB-Medium mit Protein (z. B. BSA) als einzige Stickstoffquelle war, dass trotz des sehr späten Beginns die stationäre Phase doppelt so hohe

OD-Werte und somit eine größere Zelldichte erreicht wurde, als unter Ammoniumchlorid. Diese Wachstumskinetik deutet darauf hin, dass für die Verwertung von komplexen Stickstoffverbindungen der Metabolismus der Zelle zuerst umgestellt werden muss, jedoch anschließend für die Zelle längerfristig und effektiver zur Verfügung steht.

Bei einer Kombination sowohl der nieder- wie auch hochmolekularen Stickstoffquelle (bei gleichen Konzentrationen wie oben beschrieben: 234 mM Ammoniumchlorid bzw. 58 μ M BSA sowie pH 4,0) zeigten beide *Candida*-Stämme einen interessanten Mittelweg in ihrer Proliferationskinetik. Trotz des Vorhandenseins einer „primären“ Stickstoffquelle im Medium verzögerte sich die lag-Phase etwa um das 4-fache, so dass der Beginn der exponentiellen Phase bei beiden *Candida*-Arten erst nach 20 – 30 h nach dem Animpfen detektiert werden konnte. Außerdem wurde mit einem OD-Maximum von 9 eine deutlich höhere Biomasse als beim Ammoniumchlorid alleine erreicht. Verglichen mit Protein im Medium als einzige Stickstoffquelle war die Zelldichte jedoch signifikant geringer.

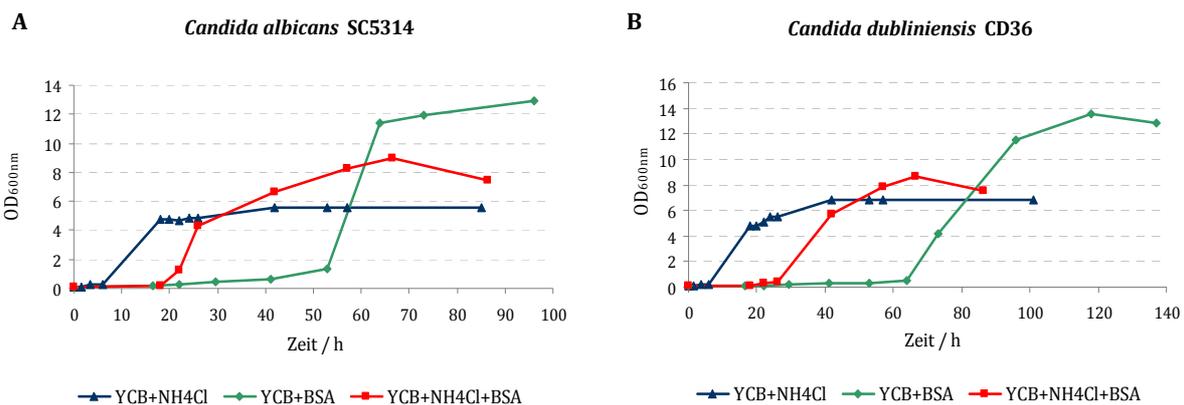


Abbildung 39: Wachstumsverhalten der Wildtypstämme aus unterschiedlichen Stickstoffquellen.

Proliferationskinetik der Wildtypstämmen von *C. albicans* (A) und *C. dubliniensis* (B) in Flüssigkulturen (pH 4,0) aus Hefe-Kohlenstoff-Basis (YCB) supplementiert entweder mit 234 mM Ammoniumchlorid (NH₄Cl), 58 μ M Rinderserumalbumin (BSA) oder einer Kombination aus den beiden Stickstoffverbindungen (gleiche Konzentrationen). Alle Stämme wurden im Schüttelkolben nach dem zweimaligen Waschen der ÜN-Vorkultur zu einer OD_{600nm} von 0,1 angeimpft. Ihr Wachstumsverhalten wurde zu den entsprechenden Zeitpunkten über die Extinktionsmessung ermittelt.

Diese Wachstumsstudie zeigt, dass die beiden klinischen Isolate von *C. albicans* und *C. dubliniensis* die verschiedenen Stickstoffquellen unterschiedlich verwerten können. Der Stickstoffmetabolismus scheint spezieübergreifend konserviert zu sein und unterliegt einer komplexen transkriptionellen Regulation. Inwiefern APSES-Proteine in dieser Regulation eine wichtige Rolle spielen, wurde im Folgenden analysiert.

IV.2 Essentielle Funktion der APSES-Proteine bei der parallelen Verwertung von zwei Stickstoffverbindungen

Wie bereits in dieser Arbeit und in der Literatur gezeigt werden konnte, haben APSES-Proteine Efg1p und Mom1p – je nach vorliegender Wachstums- und Morphologiebedingung - einen starken Einfluss auf den Kohlenhydratmetabolismus der Zelle. In dieser Arbeit konnte zum ersten Mal auch eine essentielle Funktion der beiden Proteine im Stickstoffmetabolismus gezeigt werden, die in dieser Form weder für das Efg1-Protein von *C. albicans* noch für ein weiteres Mitglied der APSES-Proteinfamilie beschrieben worden ist (**Abbildung 40**).

Ein Vergleich des Proliferationsverhaltens der *efg1Δ*- und *mom1Δ*- Deletionsstämmen mit den entsprechenden *Candida*-Wildtypstämmen zeigt, dass je nach vorliegender Stickstoffquelle sich das Wachstum signifikant unterscheidet. Während bei niedermolekularen Stickstoffverbindungen wie Ammoniumchlorid oder Ammoniumsulfat zwischen den Stämmen kein Wachstumsunterschied zu beobachten war (**vgl. Abb. 40A**), änderte sich das Verhalten im Medium mit hochmolekularer Stickstoffquelle. Durch die Deletion der beiden APSES-Proteine verlängerte sich die Adaptationsphase der Deletionsstämmen nach dem Überimpfen ins Hefe-Kohlenstoff - Medium mit dem Protein BSA als einzige Stickstoffverbindung gegenüber den Wildtyp-Stämmen mit 100-120h auf das Doppelte (**Abb. 39 und Abb. 40B**). Nach der exponentiellen Phase wurde dann beinahe dieselbe Zelldichte erreicht. Wurden jedoch im Medium die beiden nieder- und hochmolekularen Stickstoffquellen zur gleichen Zeit und in gleicher Konzentration wie unter Einzelbedingungen kombiniert, zeigte sich eine essentielle Funktion der beiden APSES-Proteine, die für diese Proteinfamilie bisher noch nicht publiziert worden ist. Im Gegensatz zu den beiden klinischen Isolaten von *C. albicans* und *C. dubliniensis* konnten die Deletionsstämmen aufgrund des fehlenden Efg1p- oder Mom1p-Proteins nicht wachsen, auch nicht, wenn die Stämme über 3 Wochen bei 30°C inkubiert wurden und eigentlich ein Überschuss an Stickstoffverbindungen vorliegt (**Abb. 40C**). Dieser Effekt wurde nicht nur in Flüssigkulturen, sondern auch auf YCB-Agarplatten unter sauren Bedingungen (pH 4,0) beobachtet, die neben dem Rinderserumalbumin entweder mit Ammoniumchlorid oder -sulfat als niedermolekulare Stickstoffquelle supplementiert worden sind. Eine Letalität der Zellen konnte dabei ausgeschlossen werden, da durch die Zugabe einer konzentrierteren BSA- oder Ammoniumchloridlösung zu den eine Woche stagnierenden Flüssigkulturen wieder ein Wachstum induziert werden konnte (**Daten nicht gezeigt**).

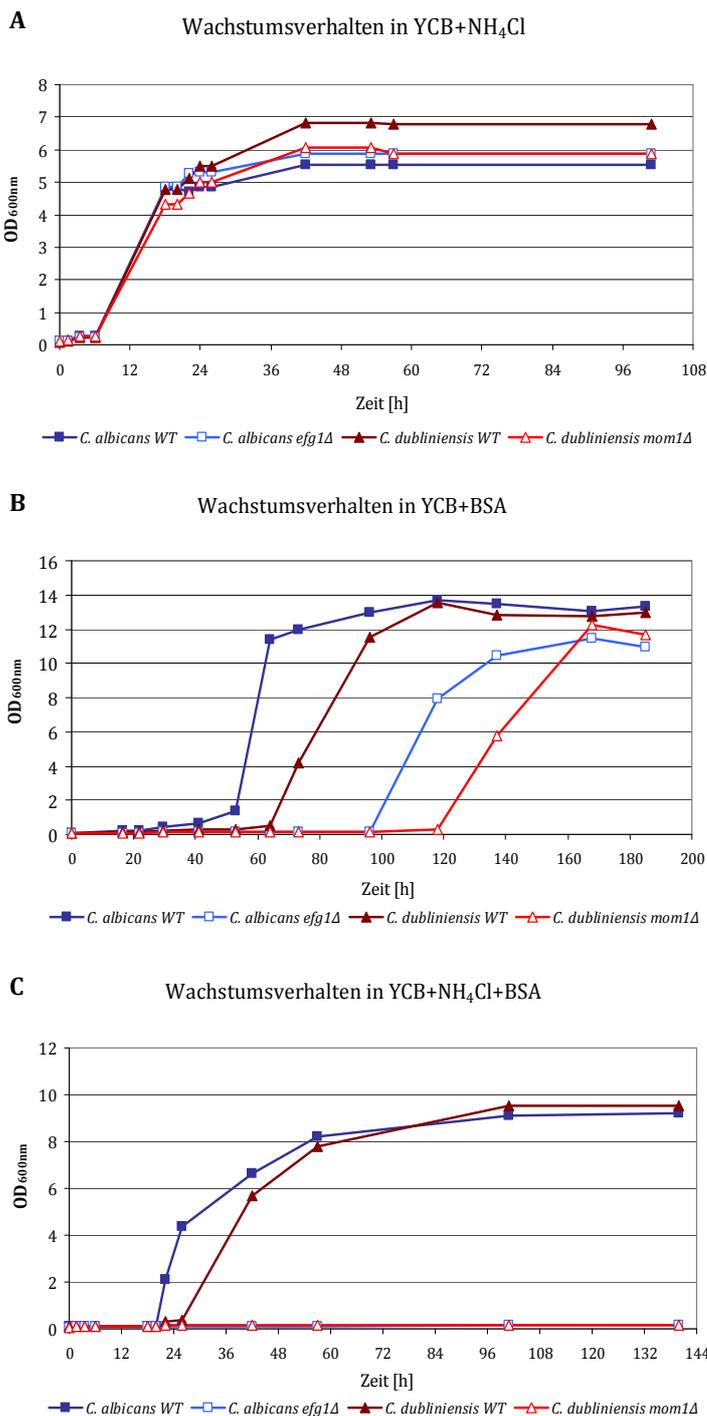


Abbildung 40: Unterschiedliche Wachstumskinetik der verschiedenen *Candida*- Stämme in YCB-Medien supplementiert mit einer oder zwei Stickstoffquellen.

Die drei Abbildungen zeigen den Wachstumsverlauf von *efg1Δ*- bzw. *mom1Δ*-Deletionsstämmen HLC52 und DBL275 im Vergleich zu den Wildtyp-Stämmen von *C. albicans* und *C. dubliniensis* SC5314 und CD36 im YCB-Flüssigmedium entweder mit 234 mM Ammoniumchlorid (A), 58 μM Rinderserumalbumin (BSA) (B) oder einer Kombination aus den beiden Stickstoffverbindungen (C).

Dieses Wachstumsverhalten führt zu der Annahme, dass in beiden *Candida*-Spezies zwei konservierte Stoffwechselprozesse existieren, um entweder niedermolekulare, leicht zugängliche Stickstoffquelle oder komplexe Stickstoffverbindungen (z. B. in Form von Proteinen) aufnehmen und metabolisch verwerten zu können. Die gegenseitige Regulation dieser beiden Stoffwechselwege scheint streng kontrolliert zu sein, wobei das Efg1p in *C. albicans*, wie auch das Mom1p in *C. dubliniensis*, einen zentralen Schalter in dieser Regulation darstellt.

IV.3 Spezielle Morphologie der *mom1Δ*-Deletionsstämme in YCB-NH₄Cl-BSA

Neben der Wachstumsstagnation auf Hefe-Kohlenstoff-Flüssigmedien mit Ammoniumchlorid und Rinderserumalbumin zeigten insbesondere die *mom1Δ*-Deletionsstämme DBL27 und DBL4 eine interessante Morphologie, die sowohl im *C. dubliniensis* und *C. albicans*-Wildtyp- sowie beim *efg1Δ*-Deletionsstamm nicht zu beobachten war. Unter diesen sauren Bedingungen (pH 4,0) bildeten die Stämme bereits nach 30 h-Inkubation eine Mischpopulation aus normalen elongierten und kreisrunden, stark lichtbrechenden Zellen, die Ähnlichkeiten mit den Chlamydosporen aufwiesen (vgl. **Abb. 41**). Im Gegensatz zur Chlamydosporenproduktion auf den speziellen Nährbedingungen wie Staib- oder SSH-Flüssigkultur/Agar konnte jedoch weder pseudohyphale Strukturen noch die Ausbildung von Progenitorzellen beobachtet werden, so dass noch zu klären ist, ob es sich bei diesen Strukturen wirklich um Chlamydosporen handelt.

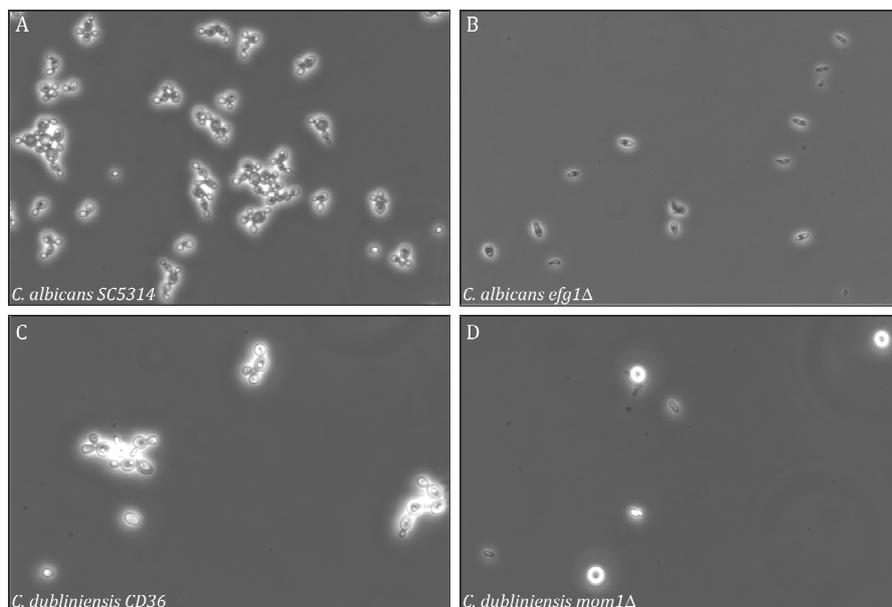


Abbildung 41: Spezielle Morphologie des *mom1Δ*-Deletionsstammes in YCB-NH₄Cl-BSA.

Morphologie der verschiedenen *Candida*-Stämme nach 30h Inkubation im Hefe-Kohlenstoff- (Yeast Carbon Base, YCB) Flüssigmedium supplementiert sowohl mit Rinderserumalbumin (BSA, als hochmolekulare N-Quelle) und Ammoniumchlorid (NH₄Cl, als niedermolekulare N-Quelle) bei pH 4,0.

Da dieser Phänotyp nur in *C. dubliniensis*-Stämmen mit *MOM1*-Deletion und nicht im *C. albicans efg1Δ*-Deletionsstamm zu beobachten ist, ist davon auszugehen, dass diese Morphologie – ähnlich wie die Lufthyphenausbildung auf definiertem Hefe-Kohlenstoff (YCB)-Medium, supplementiert mit Protein als einzige Stickstoffquelle – einen Spezies-spezifischen Unterschied zwischen den beiden *Candida*-Arten darstellt.

IV.4 Relative Expressionsanalyse einiger ausgewählter Gene unter verschiedenen Stickstoffbedingungen

Um aufklären zu können, weshalb die *efg1Δ*- und *mom1Δ*-Deletionsstämme trotz des Stickstoffüberschuss unter diesen komplexen Stickstoffbedingungen nicht wachsen können und wie diese Gene unter Wachstumsbedingungen reguliert sind, die jeweils nur eine Stickstoffquelle aufweisen, wurde die Genexpression einzelner, ausgewählter Transkripte mithilfe der quantitativen Real Time PCR (qRT-PCR) bestimmt. Für die Analysen wurden YCB-Flüssigkulturen des *C. albicans* Wildtyp- und *efg1Δ* -Deletionsstammes verwendet, die entweder mit 234 mM Ammoniumchlorid, mit 58 μM Rinderserumalbumin sowie mit beiden Stickstoffverbindungen supplementiert und 24 h bei 30°C inkubiert worden sind. Für diese Transkriptionsanalysen wurden Gene ausgewählt, deren molekulare Funktion im Stickstoffmetabolismus bekannt war. Dazu gehörten Gene, die für die beiden Ammoniumpermeasen (*MEP1*, *MEP2*) sowie die spezifischen Transkriptionsfaktoren (*STP1*, *STP2*) kodieren, die für die Degradation und Aufnahme von extrazellulären Proteinen verantwortlich sind. Zusätzlich wurde auch die Genexpression von *EFG1* unter diesen drei Bedingungen im *C. albicans* Wildtypstamm SC5314 untersucht. **Abbildung 42** zeigte die relative Expressionswerte der einzelnen Gene in den beiden Stämmen unter den untersuchten Bedingungen, stets bezogen auf das Transkriptionsniveau des *C. albicans* SC5314-Stammes unter der YCB-NH₄Cl-BSA-Bedingung. Verglichen mit diesen komplexen Stickstoffbedingungen zeigten insbesondere die Wildtypstämme von *C. albicans* unter YCB-Flüssigkulturen mit BSA als einzige Stickstoffquelle eine besonders starke Induktion von Genen für die beiden Ammoniumpermeasen *MEP1* und *MEP2*, sowie eine hohe *STP1*-Expression. Eine verstärkte *Stp2p*-Induktion, die für die transkriptionelle Regulation von Oligopeptid- und Aminosäuretransporter kodiert, war jedoch zu diesem Zeitpunkt noch nicht aktiviert. YCB-BSA war auch die einzige Bedingung, unter der das *EFG1*-Gen die 2-fache Expression zeigte. Im Vergleich zum SC5314 zeigte der *efg1Δ*-Deletionsstamm eine signifikant reduzierte Expression dieser Gene, was wahrscheinlich darauf zurückgeführt werden kann, dass die Deletionsstämme viel später zu proliferieren beginnen. Eine weitere Besonderheit dieser Studie konnte unter Ammoniumchlorid als einzige Stickstoffquelle gezeigt werden. Verglichen mit dem Wildtypstamm waren unter der *EFG1*-Deletion sowohl *MEP1*, *MEP2*, *STP1* wie auch *STP2* verstärkt exprimiert und dies trotz des analogen Wachstumsverhaltens der untersuchten Stämme unter dieser Bedingung. Für komplexe Wachstumsbedingungen mit zwei unterschiedlichen Stickstoffverbindungen konnte jedoch durch diese Transkriptionsstudie die signifikanten Unterschiede in der Genregulation zwischen dem *C. albicans* Wildtyp- und dem *efg1Δ*-Deletionsstamm leider nicht geklärt werden, die diesen Phänotyp erklären würden. Kein

Gen dieser Studie zeigte ein besonderes Expressionsverhalten. Dies kann dadurch erklärt werden, dass die Regulation der Stoffwechselprozesse eventuell auf posttranskriptioneller Ebene stattfindet oder andere – hier nicht analysierte Gene – eine entscheidende Rolle spielen.

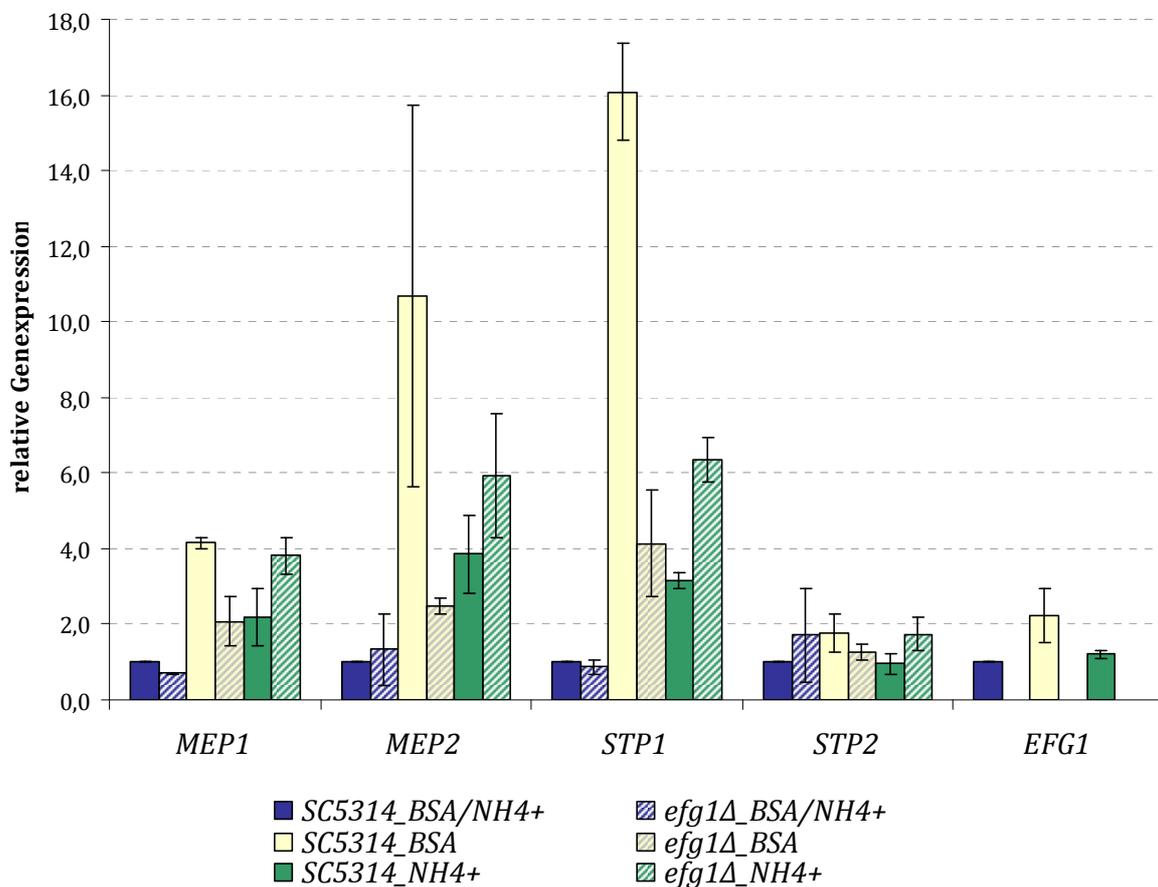


Abbildung 42: Relative Genexpression einiger ausgewählter Gene unter unterschiedlichen stickstoffhaltigen Wachstumsbedingungen.

Untersuchung der relativen Expression von ausgewählten Genen (*MEP1*, *MEP2*, *STP1*, *STP2* und *EFG1*) in *C. albicans* Wildtyp- und *efg1Δ*-Deletionsstamm (HLC52) nach 24 h Wachstum in Flüssigmedium auf Hefe Kohlenstoff (YCB) supplementiert entweder mit Rinderserumalbumin (BSA), Ammoniumchlorid (NH_4^+) oder einer Kombination von beiden Stickstoffverbindungen (BSA/ NH_4^+). Die Analyse erfolgte in jeweils zwei unabhängigen biologischen Replikaten. Normalisiert wurde mit den beiden Referenzgenen *RDN18* und *SOD2*, die unter allen Bedingungen konstitutiv exprimiert waren. Wildtypstamm unter BSA/ NH_4^+ diente als die Bedingung, auf die alle Werte bezogen worden sind.

Problematisch war bei dieser Analyse, dass die Deletionsstämme unter der YCB-Flüssigkultur supplementiert sowohl mit einer hoch- wie auch niedermolekularen Stickstoffverbindung von Beginn an nicht wachsen konnten und dadurch insgesamt eine Repression ihrer Genaktivität zeigten. Um dies umgehen zu können, wurden Wachstums – und Genexpressionsanalysen unter denen das Wachstum nach der Induktion wieder reprimiert werden konnte, durchgeführt.

IV.5 Analyse des Wachstumsverhalten der Stämme nach späterer Zugabe einer zweiten Stickstoffquelle

Um zu identifizieren, worauf die Wachstumshemmung der beiden Deletionsstämme in YCB-BSA-NH₄Cl zurückgeführt werden kann, wurde der *C. albicans* Wildtyp- und der *efg1Δ*-Deletionsstamm zunächst in YCB-Medium und mit einer Stickstoffquelle (entweder NH₄Cl oder BSA) angeimpft. Erst nach dem Anwachsen der Zellen erfolgte die Konfrontation der Kultur mit der zweiten Stickstoffquelle. Der Zeitpunkt für die Zugabe der zweiten Stickstoffquelle erfolgte anhand der in der **Abbildung 43** gezeigten Wachstumskinetik: für YCB-BSA nach 24 h und für YCB-NH₄Cl nach 5 h Inkubation.

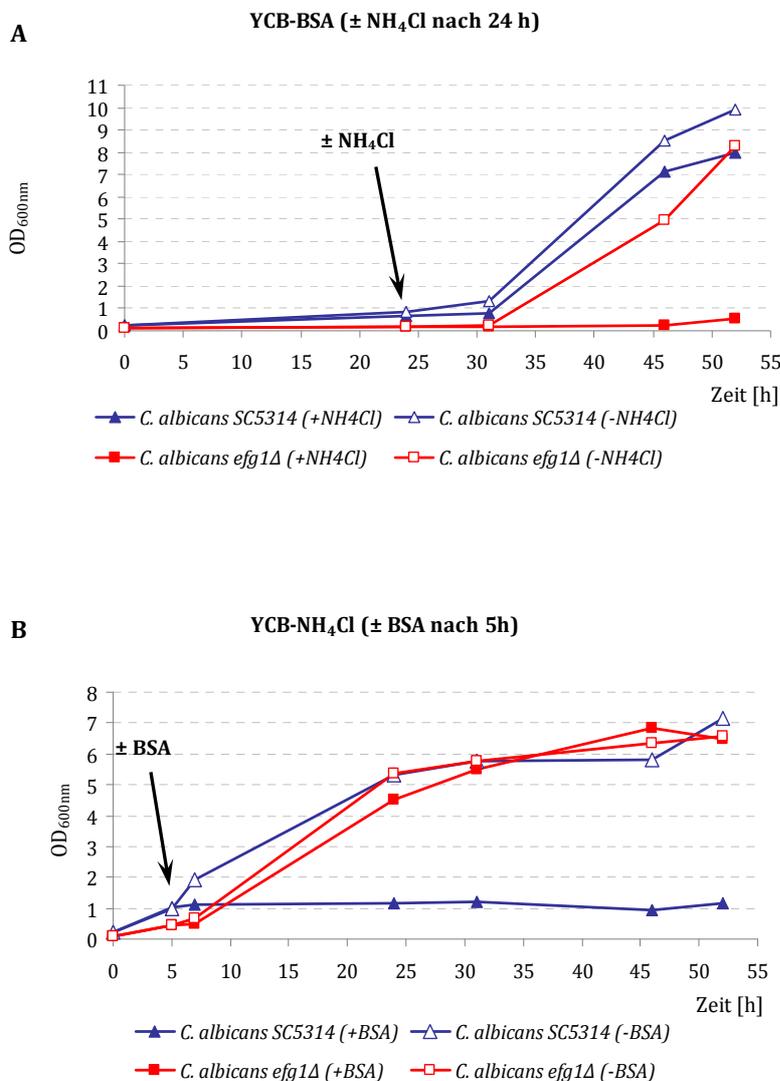


Abbildung 43: Wachstumskinetik der Stämme, nach und ohne Zugabe einer zweiten Stickstoffquelle.

Der *C. albicans* Wildtyp Stamm SC5314 und der Deletionsstamm HLC52 wurden bei 30 °C kultiviert. **(A)**: YCB-BSA-Medium mit und ohne Zugabe der 10-fach konzentrierten Ammoniumchlorid-Lösung zu einer Endkonzentration von 2,34 M nach 24 h nach der Inkubation. **(B)**: Proliferationskinetik im YCB-NH₄Cl-Medium nach und ohne Zugabe von BSA nach 5 h nach der Inkubation. Alle Stämme wurden mit einer OD_{600nm} von 0,1 angeimpft und die Wachstumskinetik über einen Zeitverlauf analysiert.

Die **Abbildung 43A** stellt das Proliferationsverhalten der Stämme unter YCB-BSA dar, nachdem die 10-fache Konzentration der Ammoniumchloridlösung zu der Kultur zugegeben wurde (Endkonzentration 2,34 M). Wie bereits unter der komplexen YCB-BSA-NH₄Cl-Kultur gezeigt, konnte nur durch die NH₄Cl-Zugabe in den *efg1Δ*-Deletionsstämmen ein Wachstumsarrest induziert werden. Im Gegensatz dazu wächst der Wildtypstamm mit und ohne Supplementation von Ammoniumchlorid, ebenso wie der Deletionsstamm, bei dem kein NH₄Cl zugegeben wurde.

Eine besondere Anomalie zeigte der *C. albicans* Wildtypstamm SC5314 nach Zugabe einer BSA-Lösung zur Wachstumskultur, die im YCB-NH₄Cl-Medium 5 h vorinkubiert worden ist (Endkonzentration an BSA: 58 μM) (**Abb. 43B**). Im Gegensatz zu allen Erwartungen, konnte unter diesen Bedingungen ein Wachstumsstopp für den Wildtypstamm beobachtet werden, der ohne BSA-Zugabe nicht induziert werden kann. Wachstumsdefekte von *efg1Δ*-Deletionsstämmen konnten unter diesen Wachstumskonditionen (mit und ohne BSA-Zugabe) nicht beobachtet werden. Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zur bereits beschriebenen Wachstumskinetik der Wildtyp- und Deletionsstämmen unter Bedingungen, in der von Anfang an die nieder- und hochmolekulare Stickstoffverbindung im Medium vorlagen. Um dies weiter aufklären zu können, wurden zwei Kriterien analysiert, die in diesem Zusammenhang für das Wachstum des *C. albicans* Wildtypstammes SC5314 eine wichtige Rolle spielen.

IV.5.1 Zeitpunktabhängigkeit der BSA-Zugabe zu YCB-NH₄Cl-Flüssigkulturen

Inwiefern der Zeitpunkt der BSA-Zugabe einen Einfluss auf die Induktion des Wachstumsarrests im *C. albicans* Wildtypstamm SC5314 hatte, wurde im Folgenden analysiert. Hier wurde der Wildtypstamm unter YCB- Ammoniumchlorid-Medium zu einer optischen Dichte von 0,1 angeimpft und zu bestimmten Zeitpunkten des Wachstums mit Rinderserumalbumin (BSA) versetzt (Endkonzentration: 70 μM). Ob ein nachfolgendes Wachstum möglich war oder nicht, wurde durch die OD-Messung bestimmt (**Abb. 44**). Es zeigte sich, dass der Zeitpunkt der BSA-Zugabe ein entscheidendes Kriterium ist. Fand die Supplementation zu früherem Zeitpunkt - bis 3,4 h nach dem Animpfen - der Adaptationsphase an Ammoniumchlorid statt, konnte kein Wachstumsarrest induziert werden. Die Stämme zeigten nach weiteren 22 h der Inkubation mit dem Protein im Medium eine hohe Wachstumsrate. Wurde die BSA-Stammlösung erst zu späteren Zeitpunkten - nach über 5 h der Adaptation (und somit zu höheren OD-Werten) - zugegeben, zeigten die Wildtypstämme einen sofortigen Wachstumsstopp. Dieser Wachstumsstopp war sehr effizient und erfolgte sofort nach der BSA-Zugabe, die möglicherweise sofort einen Zellzyklusarrest induzierte, da in der Kultur nicht einmal eine Zellteilung beobachtet werden konnte.

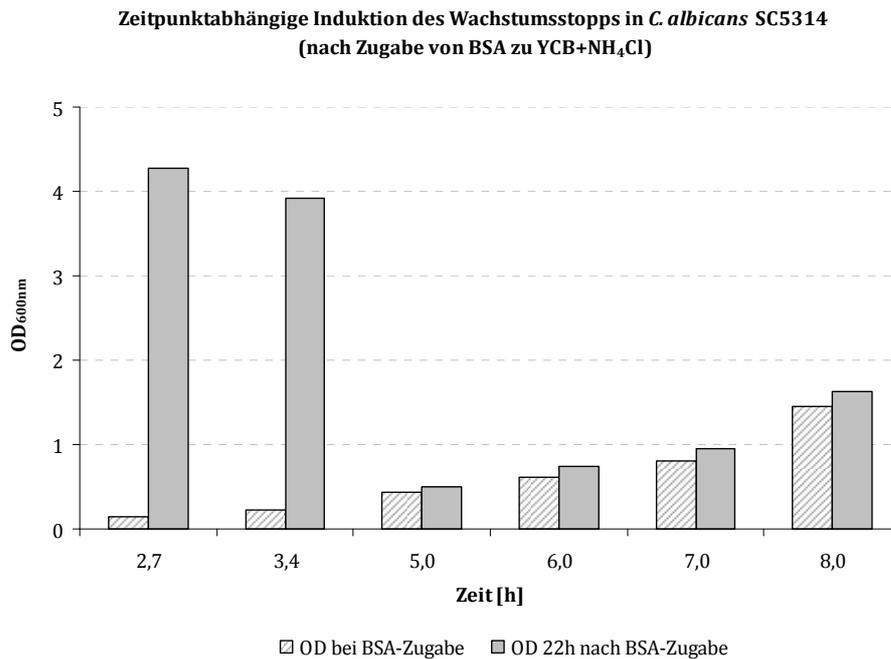


Abbildung 44: Einfluss des Zeitpunkts der BSA-Zugabe auf das Wachstumsverhalten in *C. albicans*.

Die Supplementation von YCB+NH₄Cl mit BSA erfolgte zu den indizierten Zeitpunkten.

Es existiert also eine Korrelation zwischen der beginnenden Wachstumsphase im YCB-Ammoniumchlorid-Medium und anschließendem Wachstumsarrest bei BSA-Zugabe. Es ist davon auszugehen, dass im Wildtypstamm – möglicherweise *EFG1*-abhängig – während der NH₄Cl-Inkubation Faktoren induziert werden, die eine reprimierende Wirkung auf die Induktion des Proteinstoffwechsels hatten.

IV.5.2 Abhängigkeit des Wachstums von unterschiedlichen BSA-Konzentrationen

Ein weiteres Kriterium für die Analyse des Proliferationsdefekts im *C. albicans* Wildtypstamm SC5314 war für den Wachstumsarrest notwendige Endkonzentration von BSA im Medium. Dazu wurde der *C. albicans*-Stamm SC5314 unter YCB-NH₄Cl angeimpft und nach 5 h Inkubation mit unterschiedlichen Konzentrationen an BSA versetzt (**Abbildung 45**). Unter diesen bestimmten Bedingungen existiert offensichtlich ein enges Fenster an BSA-Endkonzentrationen im Medium (zwischen 58 – 100 µM), in dem direkt nach der Zugabe ein Wachstumsarrest der Zellen stattfindet, der über 136 h aufrecht erhalten werden kann. Unter einer Konzentration von 58 µM BSA bzw. über 120 µM BSA im YCB-NH₄Cl-Medium findet dagegen ein Wachstum der Zellen statt, wobei der jeweilige Proliferationsverlauf der entweder der charakteristischen Wachstumskinetik unter niedermolekularen (z. B. Ammoniumchlorid) bzw. der hochmolekularen Stickstoffverbindungen (wie z. B. BSA) entspricht (vgl. **Abb. 40**).

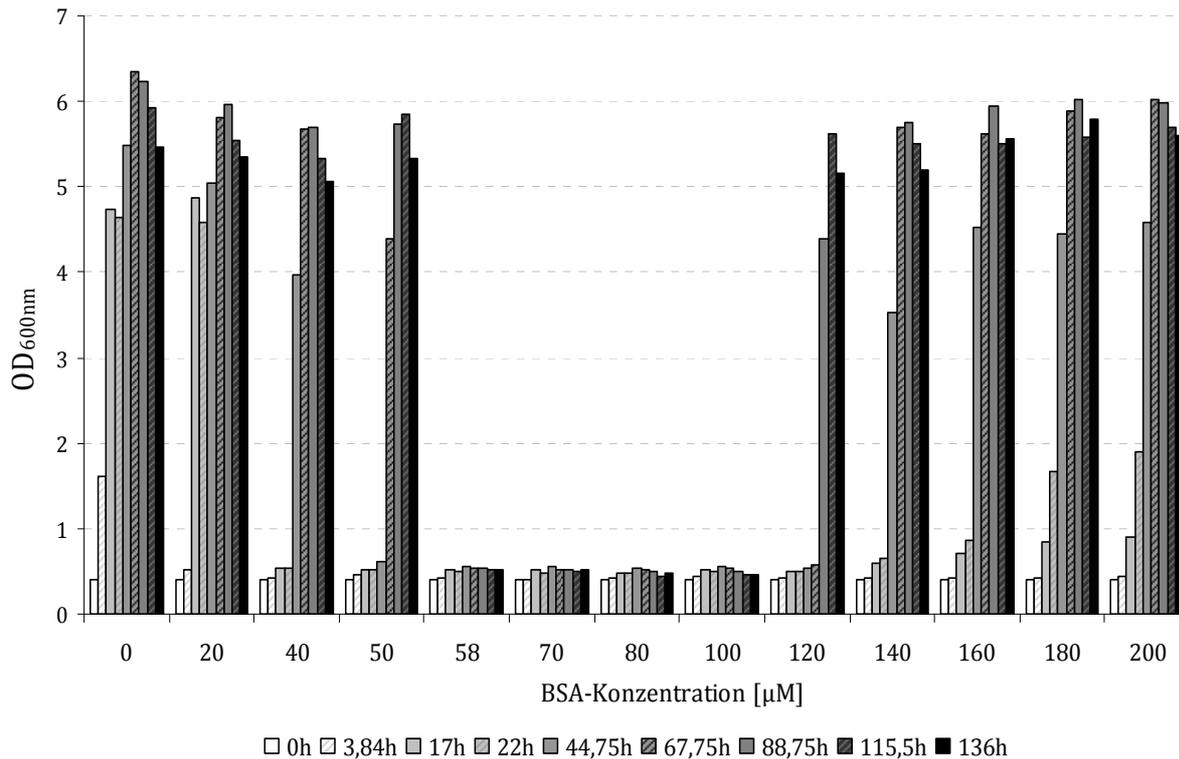


Abbildung 45: Wachstumskinetik des *C. albicans* Wildtypstammes SC5314 in YCB-NH₄Cl nach Zugabe von unterschiedlichen BSA-Konzentrationen.

Die Zugabe von BSA erfolgte nach 5 h Inkubation unter YCB-Ammoniumchlorid. Über einen Zeitverlauf von 136 h wurde die Proliferation über die OD-Messung bei 600 nm bestimmt.

Diese Ergebnisse deuten auf die Existenz von zwei unabhängigen Stoffwechselwegen hin, die in Abhängigkeit von *EFG1*, die Verwertung von nieder- und hochmolekularen Stickstoffverbindungen regulieren. Eine geringere Endkonzentration von BSA (unter 58 μM) reichte für die Repression des Ammonium-Stoffwechselwegs nicht aus, so dass in reziproker Proportionalität zur BSA-Konzentration eine Inhibierung dieses Signalweges ersichtlich war. Dagegen reichte wahrscheinlich eine überwiegend hohe NH₄⁺-Konzentration im Medium nicht aus, um den Proteinstoffwechsel induzieren zu können. Mit steigender BSA-Konzentration im Medium nahm auch das Wachstum des Wildtypstammes zu. Halten sich die beiden Stickstoffkonzentrationen die Waage, kann der BSA-Stoffwechselweg nicht induziert werden, während der NH₄⁺-Stoffwechselweg gleichzeitig reprimiert worden war. Dies hatte trotz eines Stickstoffüberflusses einen Wachstumsdefekt zufolge.

IV.6 Expressionskinetik ausgewählter Gene im *C. albicans* Wildtyp- und $\Delta efg1$ -Deletionsstamm unter YCB-NH₄Cl-Medium nach Zugabe von BSA

Um molekularbiologisch aufklären zu können, weshalb die Zugabe von BSA zu einer YCB-NH₄Cl-Kultur des *C. albicans* Wildtypstammes SC5314 sofort einen Wachstumsstopp nach sich zieht, während die Deletion von *EFG1* keinen Einfluss auf das Wachstumsverhalten des Stammes hatte, erfolgte mit qRT-PCR die Expressionsanalyse einzelner Gene. Hierfür wurden sowohl der *C. albicans* Wildtyp Stamm SC5314 wie auch der *efg1Δ*-Deletionsstamm HLC52 mit einer OD_{600nm} von 0,1 im YPD-NH₄Cl-Medium (234 mM NH₄Cl-Konzentration) angeimpft und bis zur Wachstumsinduktion für 5 h inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von BSA zu den Kulturen (Endkonzentration: 58μM). Jeweils 15 min und 24 h nach der BSA-Zugabe, erfolgte die Kulturentnahme für die RNA-Präparation. Zum Vergleich und als Referenzbedingung wurden die Genexpression der beiden Stämme vor der BSA-Zugabe (also nach 5 h-Wachstum) und zusätzlich der 24 h-Wert ohne BSA im Medium analysiert. Für die Auswertung der qRT-PCR wurde alle Expressionswerte auf das Expressionsniveau des Wildtypstammes SC5314 nach 5 h-Wachstum im YCB-NH₄Cl-Medium (vor der BSA Zugabe) bezogen. Die Ergebnisse sind in der **Abbildung 46** dargestellt.

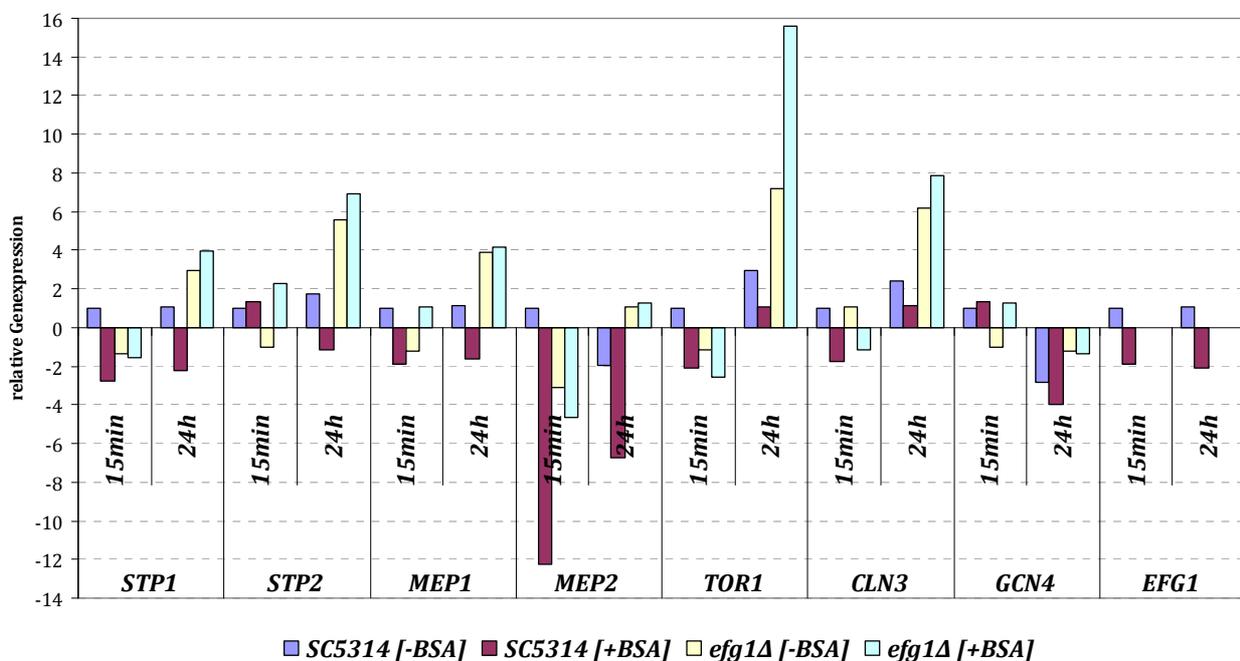


Abbildung 46: Untersuchung der Expressionskinetik von ausgewählten Genen im YCB-NH₄Cl-Medium vor und nach der BSA-Zugabe (15 min und 24 h).

Untersucht wurde der zeitliche Verlauf der Expression einiger Gene des *C. albicans* Wildtypstammes SC5314 und des *efg1Δ*-Deletionsstamm (HLC52) nach Zugabe von BSA ins Medium, sowie zum Vergleich die Kulturen nach 24 h im YCB-NH₄Cl ohne BSA-Zugabe. Als Referenzbedingung wurde das Expressionsniveau des Wildtypstammes nach 5 h Wachstum im YCB-NH₄Cl-Medium verwendet. Die Normalisierung erfolgte mit *CaRDN18*.

Verglichen mit der Genexpression im YCB-NH₄Cl-Medium zeigte der *C. albicans*-Wildtypstamm SC5314 bereits 15 min nach der BSA-Zugabe eine mind. 2-fache-Repression der Phosphatidylinositolkinase Tor1p (-2,12) und des Transkriptionsfaktors Stp1p (-2,77), das interessanterweise sowohl die Expression der Proteinase Sap2p und einiger Peptidtransporter wie Opt1p und Opt3p reguliert. Dieses inhibierende Expressionsverhalten konnte in dem *efg1Δ*-Deletionsstamm nur für *TOR1* (2,2-fach Repression) beobachtet werden, jedoch nicht für *STP1*. Dies änderte sich jedoch nach 24 h. Während die Deletionsstämme die Expression von *STP1* nach 24 h Wachstum im YCB-NH₄Cl - unabhängig von BSA - stark induzieren konnten (bis ca. 4-fach), blieb in den Wildtypstämmen die Expression dieses für die Verwertung von BSA wichtigen Gens weiterhin stark reprimiert. Ein ähnliches Expressionsmuster zeichnete sich auch für einen weiteren Transkriptionsfaktor des Proteinmetabolismus Stp2p nach 24 h ab, welches die Expression von Aminosäurenpermeasen reguliert. Dies führt zu der Annahme, dass die transkriptionelle Expression sowohl von *STP1* wie auch von *STP2* in Gegenwart von Efg1p unterdrückt wird. Dieser Repressionseffekt konnte jedoch nicht 100% auf das *EFG1* zurückgeführt werden, da die Expression von *EFG1* selbst unter diesen Bedingungen etwa um das 2-fache runterreguliert wurde. Bei dieser Repression von *STP1* und *STP2* spielen möglicherweise die beiden GATA- Transkriptionsfaktoren Gat1p und Gln3p in der Interaktion mit Efg1p eine entscheidende Rolle. Verglichen mit dem Expressionsniveau vor der BSA-Zugabe konnte nach 24 h Wachstum unter BSA im YCB-NH₄Cl-Medium im *efg1Δ*-Deletionsstamm - im Gegensatz zum Wildtypstamm - eine starke Induktion von *TOR1* (ca. +16-fach) und von Zellzyklus-regulierenden G₁-Zyklus Cln3p beobachtet werden. Die fehlende Expression dieses Gens bestätigt die Annahme, dass in den Wildtypzellen ein Zellzyklusarrest und somit ein Proliferationsstopp induziert werden konnte.

Ein weiteres interessantes Expressionsmuster konnte für die Ammoniumpermease Mep2p beobachtet werden. Bereits nach 15 min BSA-Präsenz im Ammoniumchlorid-Medium erfolgte im Wildtypstamm eine extrem starke Abschaltung des Gens auf transkriptionellen Ebene (über 12-fach). Dies änderte sich nicht nach 24 h-Wachstum im YCB-NH₄Cl, supplementiert mit BSA, da die Expression weiterhin - verglichen mit dem Niveau vor der BSA-Zugabe - mit -6,7-fach stark runterreguliert worden ist. Dagegen wurde die Expression von *MEP2* im *efg1Δ*-Deletionsstamm nach 24 h-Wachstum um das 4-fache induziert. Diese Repression der Mep2-Ammoniumpermease könnte erklären, weshalb die Zellen das vorliegende Ammoniumchlorid nicht mehr verwerten können. Dies wurde im Folgenden näher untersucht.

IV.7 Einfluss des Mep2p auf den Wachstumsarrest

Welchen Einfluss Mep2p auf den Wachstumsstopp des *C. albicans* Wildtypstammes SC5314 in YCB-NH₄Cl-Medium nach Zugabe von BSA hatte und ob eine Wachstumsinduktion durch eine gezielte *MEP2*-Expression unter diesen Bedingungen erreicht werden konnte, wurde im Folgenden analysiert. Die *MEP2*-Expression erfolgte entkoppelt von den Wachstumsbedingungen entweder mittels der konstitutiven Expression dieses Gens vom *ACT1*-Promotor nach Integration der Konstrukts in den *ACT1*-Genlocus oder durch die induzierbare Expression vom Tetrazyklin-abhängigen Promotor nach der Integration der modifizierten Expressionskassette pNIM6 in den *CaADH1*-Genort (vergleiche **Abb. 26**) durch die Zugabe von 50 µg/ml Doxycyclin.

Das Wachstumsverhalten der Stämme ist in der **Abbildung 47** dargestellt. Obwohl mittels der qRT-PCR-Analyse nachgewiesen werden konnten, dass die untersuchten Stämme in beiden Fällen eine 2-3-fach stärkere Expression von *MEP2* unter den verwendeten Bedingungen -

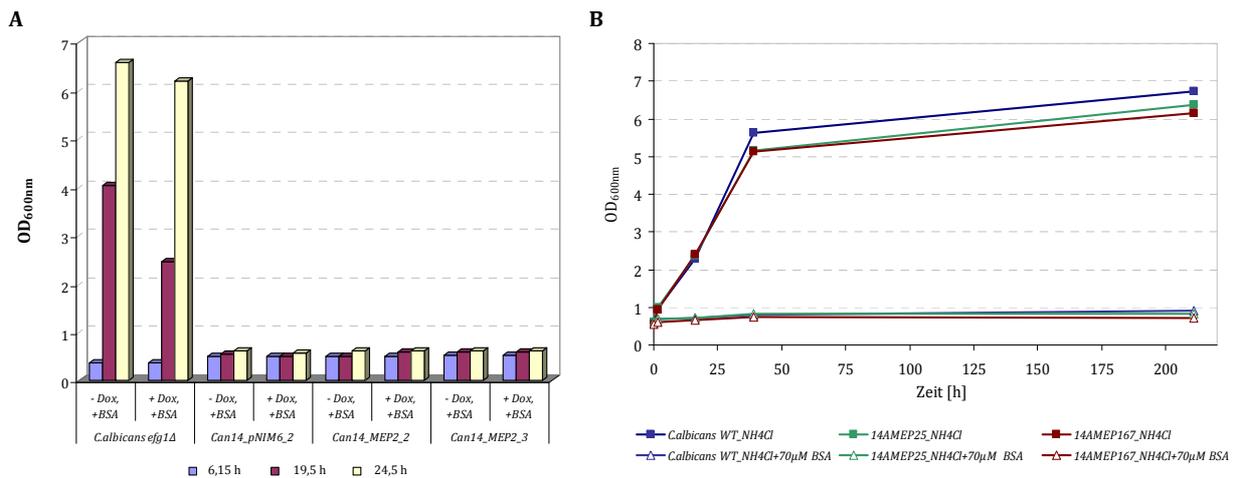


Abbildung 47: Wachstumsverhalten der *C. albicans* Wildtypstämme mit ektopischer *MEP2*-Expression unter YCB-NH₄Cl ohne oder nach Zugabe von BSA.

(A) Analyse des Proliferationsverhaltens des *C. albicans*-Wildtypstammes EMEP22 (mit *MEP2*-Expression unter einem Doxycyclin-abhängigen Promotor P_{TET}) zu bestimmten Zeitpunkten (6,15; 19,5 und 24,5 h) nachdem BSA in einer 70 µM Endkonzentration ins YCB-NH₄Cl-Medium zugeführt worden ist. Die Induktion von *MEP2* erfolgte durch Zugabe von 50 µg/ml Doxycyclin. Zur Kontrolle wurden sowohl die Stämme HLC52 (*C. albicans efg1Δ*) und EL142 (*C. albicans* Wildtypstamm mit *GFP*-Expression) verwendet. Der Einfluss von Doxycyclin auf das Wachstumsverhalten der Stämme wurde jeweils durch die Zugabe oder das Weglassen des Antimycotikums bestimmt.

(B) Wachstumskinetik der *C. albicans* Stämme 14AMEP25 und 14AMEP167 mit konstitutiver *MEP2*-Expression unter dem *ACT1*-Promotor im Genlocus von Aktin nach Zugabe von 70 µM BSA oder zum Vergleich ohne Zugabe von BSA in YCB-NH₄Cl-Medium. Als Kontrolle wurde der Wildtypstamm SC5314 verwendet.

verglichen mit dem Wildtypstamm - zeigten **(Daten nicht gezeigt)**, konnte trotzdem der Wachstumsstopp des *C. albicans* Wildtypstammes SC5314 in YCB-NH₄Cl-Medium nach Supplementation mit BSA nicht aufgehoben werden. Unter beiden Fällen zeigten die Stämme einen Wachstumsarrest, kurz nachdem das Protein dem Medium zugefügt worden ist. Inwiefern die Funktionalität der Ammoniumpermease Mep2p von posttranslationalen Modifikation des Proteins und nicht mittels der transkriptionellen Regulation bestimmt wird, soll in weiteren Experimenten näher untersucht werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in dieser Arbeit zum ersten Mal eine Schlüsselfunktion der beiden APSES-Proteine im Stickstoffmetabolismus beschrieben worden ist, die in beiden *Candida*-Arten konserviert ist. Die molekulare Aufklärung ihrer Funktion muss jedoch in weiteren Studien (sowohl auf globaler Genexpressions- wie auch der Proteinebene) weiter untersucht werden.

DISKUSSION

Was bestimmt die Pathogenität einiger Hefepilze der Gattung *Candida* und weshalb sind phylogenetisch sehr nah verwandte Arten unterschiedlich virulent?

Für die Beantwortung dieser Fragen existieren mehrere Lösungsansätze. So besteht ein möglicher Ansatz in der Deletion einzelner Gene und der nachfolgenden Charakterisierung der Stämme auf den Verlust oder die Beibehaltung der Virulenzeigenschaft. Dieser Ansatz kann jedoch auch – wenn das entsprechende Gen keinen Einfluss auf die Virulenz hat – zu keinem Ergebnis führen. Werden jedoch unterschiedlich pathogene Arten durch einen systematischen Vergleich miteinander untersucht (z.B. anhand ihrer phänotypischen Eigenschaften, ihres Genoms oder des Transkriptoms), können so potentielle Virulenzfaktoren effizienter identifiziert werden.

So konnten durch einen umfassenden Vergleich des human-pathogenen Pilzes *Candida albicans* und dem avirulenten Hefepilz *Saccharomyces cerevisiae* bereits zahlreiche Faktoren identifiziert und charakterisiert werden, die heute mit der Pathogenese von *C. albicans* in Verbindung gebracht werden. Obwohl zwischen beiden Arten viele Stoffwechselprozesse konserviert zu sein scheinen, sind beide Organismen phylogenetisch sehr weit voneinander entfernt. Beide Pilze teilten vor 300 – 900 Millionen Jahren denselben Vorfahren [Pesole, G *et al.* 1995; Hedges, SB 2002], so dass insbesondere ihre Genome so verschieden sind wie die von Fisch und Mensch [Dujon, B *et al.* 2004]. Viele evolutionsbedingte Adaptationen veränderten auch die funktionelle Aktivität zahlreicher Gene.

Mit der Identifizierung von *C. dubliniensis* im Jahr 1995 konnte dagegen ein sehr naher Verwandter von *C. albicans* beschrieben werden, der sich jedoch erheblich in seiner Pathogenität unterscheidet. Was macht den Unterschied zwischen den *Candida*-Arten aus? Um diese Frage beantworten zu können, erfolgte im Rahmen dieser Arbeit ein systematischer Vergleich der beiden Organismen insbesondere im Bezug auf die Regulation von morphogenetischen Differenzierungsprozessen, u.a. auch durch die Analyse der differentiellen Genexpression unter verschiedenen morphologischen Bedingungen. Da zu Beginn dieser Studie solche Genexpressionsanalysen von *C. dubliniensis* nur begrenzt möglich waren, erfolgte mit der Entwicklung von *MESSAGE* eine Etablierung einer neuen Technologie, die globale Transkriptomanalysen an beliebigen Eukaryonten ermöglicht.

I. *MESSAGE* – eine neue Technologie für Genexpressionsanalysen

Als (differenzielle) Genaktivität wird die spezifische und komplexe Regulierung des Transkriptions- sowie des Translationsprozesses bezeichnet, die sowohl räumlich (zelltyp-, gewebe- und organspezifisch) wie auch zeitlich begrenzt ist, jedoch signifikant u. a. die metabolische Aktivität, Funktion, Struktur oder den Differenzierungsprozess einer Zelle, einer Zellpopulation, eines Gewebes oder Organs beeinflusst. Die Genaktivität ist ein dynamischer Prozess, bei dem sich das Expressionsmuster eines Genoms je nach Umwelteinfluss spezifisch ändert. So lösen z. B. bestimmte Umweltsignale (Nährstofflimitation, Komponenten des Serums usw.) große Änderungen in der Expression spezifischer Gene aus, durch die ein Morphologiewechsel einer Hefezelle induziert wird. Mithilfe von Genexpressionsanalysen ist es möglich, diese qualitativen und quantitativen Änderungen der Aktivität entweder eines einzelnen Gens oder des gesamten Genoms einer einzelnen Zelle oder eines Organismus zu definierten Zeitpunkten zu bestimmen und sie analysieren zu können.

Zu Beginn dieser Arbeit war das Genom von *C. dubliniensis* weder vollständig sequenziert noch annotiert. Mithilfe der so genannte *Comparative Genomic Hybridization (CGH)*-Methode war es anhand von *C. albicans* spezifischen DNA-Mikroarrays möglich, die beiden Genome von *C. albicans* und *C. dubliniensis* zu vergleichen [Murray, AE *et al.* 2001; Moran, G *et al.* 2004]. Dagegen war die Erstellung (globaler) Transkriptionsprofile speziell für *C. dubliniensis* nur eingeschränkt, bis gar nicht möglich.

Obwohl im Laufe der letzten Jahre mit Methoden wie Differential Display (DD, 1992), *Serial Analysis of Gene Expression* (SAGE, 1995) oder DNA-Mikroarrays (1995) zahlreiche Verfahren etabliert und weiterentwickelt worden sind, hatte jede dieser Technologien bestimmte Nachteile und Limitationen [Liang, P and Pardee, AB 1992; Schena, M *et al.* 1995; Velculescu, VE *et al.* 1995]. So bestand ein großer Bedarf an neuen, universellen Technologie-Plattformen, mit dem die Nachteile der bereits etablierten Verfahren umgangen werden konnten. Eines dieser alternativer Verfahren ist *MESSAGE* (*Multidimensional Electrophoretic System of Separation for the Analysis of Gene Expression*). In seinen Grundprinzipien während der Diplomarbeit am Fraunhofer Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik entwickelt [Lindemann, E 2006], war die Weiterentwicklung der Technologie insbesondere hinsichtlich der verbesserten Reproduzierbarkeit und Durchsatzsteigerung ein wichtiges Ziel dieser Arbeit. Die *MESSAGE*-Technologie basiert auf einer hochauflösenden, zweidimensionalen, elektrophoretischen Auftrennung von definierten 3'-terminalen ds-cDNA-Fragmenten (**Abbildungen 7, 11**). Es stellt eine offene Technologieplattform dar, die weder ein vollständig sequenziertes Genom noch aufwendige Annotation des Genoms voraussetzt. Dadurch unterscheidet sich *MESSAGE*

erheblich von der DNA-Mikroarray-Technologie, die bis heute eine Kerntechnologie für Hochdurchsatz-Transkriptionsanalysen ist. Aufgrund von charakteristischen Merkmalen wie Miniaturisierung, Automatisierung und Parallelität können innerhalb eines Experiments gleichzeitig Tausende von Transkripten analysiert werden [Kuhn, E and Schaller, A 2004]. Aussagen über die Genexpression erfolgen über die Messung der relativen Intensität der während der reversen Transkription der RNA in cDNA kovalent eingebauten Farbstoff-Moleküle, die mit der Menge des Probenmaterials korrelieren. Die Zuverlässigkeit der Technologie war aufgrund von unterschiedlichen Probenvorbereitungsprotokollen und zahlreichen Array-Plattformen lange Zeit umstritten. Obwohl Publikationen - wie die von Tan *et al.* - zeigen, dass unterschiedliche Mikroarray-Plattformen widersprüchliche Ergebnisse liefern [Tan, PK *et al.* 2003], konnten Untersuchungen des MicroArray Quality Control (MAQC)-Konsortiums eine hohe Reproduzierbarkeit der Daten sowohl innerhalb eines und zwischen unterschiedlichen Array-Technologien zeigen, insbesondere dann, wenn während der Probenvorbereitung und Daten-Auswertung Qualitätskontrollen durchgeführt werden [Canales, RD *et al.* 2006; Shi, L *et al.* 2006].

Im übergreifenden Vergleich mit unabhängigen Methoden wie quantitative RealTime-PCR (qRT-PCR) und Northern Blot Techniken zeigen DNA-Mikroarrays für manche Expressionsdaten eine relativ schlechte Korrelation. Dies kann z. B. für Gene mit niedriger Expressionsstärke oder für Transkripte innerhalb von stark konservierten Genfamilien zutreffen, bei denen mögliche Kreuzhybridisierungen zu einer Verfälschung der Daten beitragen [Kothapalli, R *et al.* 2002; Yuen, T *et al.* 2002]. Eine Technologien-übergreifende Validierung wurde im Rahmen dieser Arbeit auch für das *MESSAGE*-Verfahren durchgeführt, bei dem Expressionsdaten von ausgewählten Transkripten sowohl unterschiedlicher Abundanzklasse als auch von differenziell-regulierten Genen den Ergebnisse von DNA-Mikroarrays und der qRT-PCR gegenübergestellt worden sind. Der Korrelationskoeffizient dieser Datensätze zeigt mit 0,87 bzw. 0,94 eine hohe Übereinstimmung zwischen den verschiedenen Technologie-Plattformen, so dass eine hohe Qualität der quantitativen Daten und somit eine hohe Zuverlässigkeit der *MESSAGE*-Technologie gewährleistet werden konnte.

Diese hohe Qualität der *MESSAGE*-Daten kann u. a. auf die definierte Probenvorbereitung zurückgeführt werden, die eine hohe Spezifität, Selektivität und eine Regulierung der Probenkomplexität erlaubt. In ihrer Probenvorbereitung beruht *MESSAGE* auf der Technologie von *Ordered Differential Display* (ODD), die im Jahr 1997 als eine Weiterentwicklung von *Differential Display* zum systematischen Vergleich von Genexpressionsprofilen beschrieben worden ist [Matz, M *et al.* 1997]. Beginnend mit polyadenylierten mRNA-Molekülen werden mit Hilfe der SMART-Technologie zuerst doppelsträngige cDNA-Moleküle (ds-cDNA) generiert, die

eine vollständige Länge der mRNA-Matrize aufweisen und im Anschluss für eine definierten Anreicherung von 3'-terminalen Fragmenten verwendet werden. Die Synthese dieser definierten Fragmente wird durch zwei selektive Amplifikationsschritte (Suppressions- und Spezifische PCR) erreicht. Diese Probenvorbereitung ermöglicht nicht nur eine definierte Amplifikation des Probenmaterials, sondern bietet auch die Möglichkeit zur kontrollierten Variation der Probenkomplexität. Bei diesem Probenvorbereitungsprozess ist es entscheidend, dass die relativen Häufigkeiten der mRNA-Transkripte untereinander nicht verschoben werden. In diesem Punkt wird der Schritt der exponentiellen Amplifikation häufig als kritisch angesehen, da DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge und Sequenzzusammensetzung während einer PCR-Reaktion mit unterschiedlichen Effizienzzraten vervielfältigt werden können, was dann zur Verschiebung der Häufigkeiten und somit zu einer erhöhten Fehlerrate führt. Untersuchungen von N. Iscove *et al.* zeigen dagegen, dass während einer exponentiellen Phase der PCR-Reaktion diese Verschiebung der relativen Abundanzen vernachlässigbar ist, selbst wenn bis zu 3×10^{11} -fach amplifiziert wird [Iscove, NN *et al.* 2002]. Dies können wir mit unseren Probenvorbereitung und quantitativen Daten bestätigen, da technische Replikate bei identischer Ausgangsmenge an RNA Korrelationskoeffizienten zwischen 0,980 und 0,995 lagen (**Daten nicht gezeigt**). Um eine exponentielle Phase der Reaktion zu gewährleisten und keine Überamplifikation zu generieren, war sowohl während der Suppressions- wie auch der spezifischen PCR über eine Zyklenoptimierung eine Kontrolle der exponentiellen Reaktion entscheidend. Im Allgemeinen ermöglichen die beiden Amplifikationsschritte während der Probenvorbereitung einen weiteren Vorteil der *MESSAGE*-Technologie gegenüber anderen Genexpressionsverfahren wie z. B. DNA-Mikroarrays, da dadurch die Sensitivität des Systems deutlich erhöht werden kann. Während für die Probenvorbereitung bei DNA-Mikroarrays für eine Analyse 10 – 25 µg Gesamt-RNA gebraucht werden, kann die notwendige Gesamt-RNA-Konzentration bei *MESSAGE* auf 10 ng reduziert werden, ohne dass die Qualität der Ergebnisse darunter leidet. Diese geringen Ausgangsmengen, die für eine zuverlässige Probenvorbereitung gebraucht werden, erlauben die Anwendung der *MESSAGE*-Technologie z. B. für Biopsie-Materialien oder für Analysen der Embryonalentwicklung oder von Entwicklungsprozessen.

Obwohl die zweidimensionale, elektrophoretische Auftrennung von Proteinen eine Kerntechnologie für Proteomanalysen ist, wurde die mehrdimensionale Separation von Nukleinsäuren nur für den Vergleich von bakteriellen Genomen oder für die Detektion von Polymorphismen und des lateralen Gentransfers verwendet [Malloff, CA *et al.* 2001; Malloff, CA *et al.* 2002; Malloff, C *et al.* 2003]. Analog zu der 2D-Polyacrylamidgelelektrophorese von Proteinen erfolgt die Separation von Nukleinsäuren in diesen Verfahren wie auch bei der *MESSAGE*-Technologie nach zwei unabhängigen physikalisch-chemischen Kriterien von Nukleinsäuren, die miteinander kombiniert werden können: in der 1. Dimension nach dem

Molekulargewicht unterschiedlicher Fragmente, in der 2. bezüglich ihrer jeweiligen Basenzusammensetzung (GC-Gehalt). Andere Gel-basierte Verfahren zur Genexpressionsanalysen - wie Differential Display (DD), Ordered Differential Display (ODD) oder die RLCS (Restriction Landmark cDNA Scanning)-Methode - nutzen für ihre Auftrennung von cDNA-Fragmenten die Kombination dieser Kriterien nicht [Liang, P and Pardee, AB 1992; Suzuki, H *et al.* 1996; Matz, M *et al.* 1997]. Im Gegensatz zur *MESSAGE*-Technologie erfolgt z.B. bei RLCS die Identifizierung von differentiell regulierten Transkripten nur über zwei nacheinanderfolgenden Größenseparationen der radioaktiv markierten cDNA-Fragmente, die mit mehreren Restriktionsendonukleasen gespalten werden. Es findet keine Separation nach GC-Gehalt im denaturierenden Polyacrylamidgel statt. Dies führt dazu, dass die Auflösung der 2D-cDNA-Gele der RLCS-Technologie eine deutlich niedrige Auflösungskapazität haben, so dass nur etwa 500 – 1000 verschiedene Spots in einem einzigen Gel separiert werden können [Suzuki, H *et al.* 1996]. Dies ist für eine Abdeckung des Transkriptom nicht ausreichend. Weitere Nachteile der RLCS sind die hohe Ausgangsmenge an poly(A)+-RNA (einige Mikrogramm!) sowie die Notwendigkeit von mind. zwei Konsensussequenzen im Transkript für die Spaltung mit Restriktionsenzymen. Auch die Probenvorbereitung von *MESSAGE* ist abhängig von Restriktionsendonukleasen. Es kann nur dann ein Transkript detektiert werden, wenn es in der Sequenz mindestens eine Konsensussequenz für das verwendete Restriktionsenzym hat. Mittels einer *in silico* Analyse konnten wir zeigen, dass 84,79% der annotierten ORFs (6107) im *C. albicans*-Genom mindestens eine *RsaI*-Restriktionsschnittstelle aufweisen. Mit der Annahme, dass jedes Transkript noch eine untranslatierte, jedoch transkribierte *Upstream*- und *Downstream*-Region von 50 – 300 bp besitzt, konnte mit dieser zusätzlichen Sequenzlänge die Abdeckung auf 94,91% erhöht werden (Daten nicht gezeigt). Um das gesamte Transkriptom möglichst vollständig abdecken zu können, sollte daher – falls notwendig – die Probenvorbereitung mit verschiedenen Restriktionsenzymen stattfinden.

Wie bereits erwähnt, sind auch Differential Display und Ordered Differential Display Gel-basierte Genexpressionsverfahren, bei denen - im Gegensatz zu RLCS und *MESSAGE* - die Auftrennung der cDNA-Fragmente nur in einer Dimension nach der Fragmentgröße erfolgt. Die Komplexität des Probematerials und die eingeschränkte Auflösungsfähigkeit von eindimensionalen Gelen führt beim DD zu der Identifizierung einer großen Anzahl von sogenannten „falsch-positiven“ Transkripten, die insbesondere beim DD etwa 50 -75% aller als differentiell-regulierten Fragmenten ausmacht. Die Probenvorbereitung von ODD erlaubt zwar eine Regulation der Probenkomplexität während des selektiven Anreicherungsprozess, kann jedoch die Limitationen einer eindimensionalen Gelauf trennung nicht beheben. In diesem Punkt kombiniert *MESSAGE* die Vorteile dieser Probenvorbereitung mit den hohen Auflösungskapazitäten des mehrdimensionalen Gelsystems.

Wie bereits beschrieben, ist die Abhängigkeit von einer annotierten Genomsequenz ein zentraler Nachteil von DNA-Microarrays. Etablierte sequenzunabhängige Technologieplattformen wie SAGE, sind auf der anderen Seite – insbesondere im Bezug zu den generierten quantitativen Daten – nicht so leistungsfähig wie die *MESSAGE*-Technologie. So basiert z.B. die SAGE-Methode (und ihre Weiterentwicklungen zu Long- oder SuperSAGE) auf der Herstellung von bis zu 26 bp-kurzen cDNA-Abschnitten („tags“), die in Konkatemeren sequenziert werden [Velculescu, VE *et al.* 1995; Matsumura, H *et al.* 2008]. Die Häufigkeit ist ein „digitales“ Maß für das Expressionsniveau des Transkripts. Jedoch ist die zuverlässige Zuordnung dieser sehr kurzen Fragmente auf ein komplexes Transkriptom sehr schwierig und fehleranfällig. Die Verlässlichkeit der Daten ist somit auch abhängig von der Sequenzqualität, obwohl die Probenvorbereitung bei SAGE *per se* „offen“, also Sequenz-unabhängig ist. Im Vergleich dazu werden mit der *MESSAGE*-Technologie Fragmente mit einer durchschnittlichen Länge von 50 bis 1000 bp generiert, die – falls notwendig – eine eindeutige Zuordnung zum Genom oder Transkriptom ermöglichen, oder zur Identifikation von Homologen verwendet werden können, wenn für die Organismen keine Sequenzinformation vorliegt.

Zeitgleich zu dieser Dissertationsarbeit wurde mit RNA-Seq eine äußerst leistungsfähige Technologie etabliert, die – ähnlich wie SAGE – auf der Sequenzierung einzelner Transkripte basiert. Dabei werden alle umgeschriebenen cDNA-Moleküle gleichzeitig über eine Hochdurchsatz-Parallelsequenzierung detektiert und nach bioinformatischen Auswertung einzeln gezählt [Nagalakshmi, U *et al.* 2008; Sultan, M *et al.* 2008; Wilhelm, BT *et al.* 2008]. Die Anwendungsfelder von sog. *Next Generation Sequenzier* -Technologieplattformen, die seit ihrer Einführung im Jahr 2004 die Molekularbiologie revolutionierten, sind enorm und reichen z. B. von der (Re)Sequenzierung von Genomen und Metagenomen zu globalen Genexpressionanalysen oder sogar Metatranskriptomanalysen [Huber, JA *et al.* 2007; Stark, A *et al.* 2007]. Noch ist die Technologie keine Routineanwendung, da sie äußerst kostspielig ist und neben der apparativen Ausstattung (Sequenziergerät) auch einer hohen bioinformatischen Infrastruktur bedarf. Trotz der konstant fallenden Sequenzierkosten bleibt die Anwendung dieser Technologie heute noch wenigen spezialisierten Laboren und Einrichtungen vorbehalten. Obwohl dieser hohe Grad an Automatisierung und Durchsatz bei *MESSAGE* nie erreicht werden kann, bedarf die *MESSAGE*-Technologie dagegen nur einen geringen apparativen Aufwand und kann mit Laborgeräten durchgeführt werden, die auch für die zweidimensionale Auftrennung von Proteinen verwendet werden (2D-Elektrophoreseapparatur sowie CCD-Kamerasystem mit UV-Anregung).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die *MESSAGE*-Technologie einen neuartigen elektrophoretischen Ansatz für Genexpressionsanalysen darstellt, der eine universelle Anwendung dieser Technologie für jeden eukaryontischen Organismus ermöglicht und bei dem zuverlässige quantitative Daten generiert werden. Diese Technologie kann – und wurde bereits – für Transkriptionsprofile von weniger gut charakterisierten Organismen wie beispielsweise *C. dubliniensis* verwendet.

II. Systematischer Vergleich der Morphogenese-Regulation in *C. albicans* und *C. dubliniensis* durch die APSES-Proteine Efg1p und Mom1p

Einer der wichtigsten Virulenzfaktoren von *C. albicans* ist die Fähigkeit unter bestimmten äußeren Umwelteinflüssen (u. a. einer Temperaturerhöhung auf 37°C oder pH-Änderung) einen reversiblen morphologischen Wechsel von der sphärischen Hefe- (Blastospore) zur filamentösen Zellform (echte Hyphen) einzugehen [Cutler, JE 1991]. Diese Befähigung zur morphologischen Transition wurde bis zur Identifizierung von *C. dubliniensis* im Jahr 1995 als das Alleinstellungsmerkmal von *C. albicans* angesehen, da echte Hyphen in anderen, sowohl mit der Pathogenität assoziierten als auch avirulenten Pilzen (*C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* bzw. *S. cerevisiae*), nicht ausgebildet werden. Das gleiche gilt auch für eine weitere morphologische Zellform, die Chlamydospore. Vergleichende, phänotypische Charakterisierung der Zellmorphologien unter verschiedenen morphologischen Bedingungen konnten sowohl in dieser Arbeit, wie auch in weiteren Studien von O'Connor *et al* oder Stokes *et al.* zeigen, dass die Induktion dieser morphologischen Transitionsprozesse in beiden *Candida*-Arten unterschiedlich reguliert ist [Stokes, C *et al.* 2007; O'Connor, L *et al.* 2010]. So wird eine fast 100%ige Hyphenausbildung in *C. dubliniensis* nur unter äußerst nährstofflimitierten Bedingungen (z.B. Wasser supplementiert mit Serum) induziert. Genexpressionsanalysen mittels der *MESSAGE*-Technologie von *C. dubliniensis* Hefe- und Hyphe-Zellen konnten zeigen, dass der Hauptanteil der differentiell regulierten Gene dem Energie- und Kohlenhydratmetabolismus zugeordnet werden konnte, so dass davon ausgegangen werden kann, dass in *C. dubliniensis* in erster Linie die Nährstofflimitation – und nicht Serum (ein wichtiger Induktor des filamentösen Wachstums von *C. albicans*)– die Morphogenese induziert. Dass die Serum-Induktion in *C. dubliniensis* der Nährstoff-vermittelten Regulation untergeordnet ist, zeigt sich unter anderem auch dadurch, dass unter nährstoffreichen Bedingungen (z.B. YPD- oder RPMI-Medium) supplementiert mit Serum kein oder nur ein geringer Anteil der Zellen eine Filamentierung (hauptsächlich zu Pseudohyphen) eingehen kann.

Während der morphogenetischen Transition von der Blastospore zur Hyphe findet offensichtlich in den Zellen eine Umstellung des Metabolismus statt. Nährstoffmangel führt in *C. dubliniensis* zur Induktion der Acetyl-CoA-Biosynthese, entweder durch oxidative Decarboxylierung des Pyruvats (über den mitochondriellen Pyruvatdehydrogenase-Komplex) oder über den zytosolischen Fermentationsprozess, das dann dem Citrat- und Glyoxylatzyklus, zur Verfügung steht. Die Induktion dieser Stoffwechselwege dient der Zelle zur Kohlenhydratbiosynthese wie auch zur Energieproduktion. Dagegen sind anabolische Prozesse wie Protein-, Zellmembran-, oder Aminosäurebiosynthese aufgrund des hohen Energiebedarfs runterreguliert.

Dass während der Hyphenausbildung zwischen den *C. albicans* und *C. dubliniensis* -Stämmen auch signifikante, metabolische Unterschiede existieren, zeigt die entgegengesetzte Regulation der zytosolischen Pyruvatdecarboxylase Pdc11. Während die Expression dieses Enzyms in hyphalen Zellen von *C. dubliniensis* signifikant runterreguliert wird, belegen zahlreiche Literaturquellen eine induzierte Expression von Pdc11p in *C. albicans* [Crespo-Diaz, R *et al.* 2010; Synnott, JM *et al.* 2010; Taylor, JP *et al.* 2010].

Insgesamt zeigt sich, dass die Zellantwort von *C. dubliniensis* auf die morphologische Transition mit der von *C. albicans* insgesamt relativ vergleichbar ist [O'Connor, L *et al.* 2010]. Obwohl mit *MESSAGE* nur eine äußerst geringe Anzahl von Transkripten identifiziert worden ist, konnten aus den Genexpressionstudien der Hefe-Hyphe-Transition von *C. albicans* sowie von *C. dubliniensis* mit Genen wie *FDH1*, *RBT5* und *HGT8* die entsprechend homologe Transkripte identifiziert werden, die ähnlich reguliert werden und damit auf phylogenetisch konservierte Regulationen hindeuten.

Zelluläre Differenzierungsprozesse unterliegen in Pilzen - je nach Induktionssignal - einer komplexen Regulation durch unterschiedliche Transkriptionsfaktoren, die über Signaltransduktionskaskaden aktiviert werden können. Zu den wichtigsten Regulationsfaktoren, die mit der Morphogenese in Verbindung gebracht werden, sind Cph1 (MAP-Kinase-), Efg1 (RAS-cAMP-PKA-) und der Nrg1-Tup1-Signalweg [Biswas, S *et al.* 2007]. Serum ist in *C. albicans* beispielsweise als ein starker Induktor der Efg1-vermittelten cAMP-PKA-Signaltransduktionskaskade beschrieben. Mittels differentieller Transkriptionsprofile für die Hefe-Hyphe-Transition in *C. dubliniensis* konnten mit *CYR1* (kodierend für die Adenylatcyclase) und *UCF1* zwei Transkripte identifiziert werden, die dem cAMP-PKA-Signaltransduktionsweg zugeordnet wurden. In *C. albicans* führt eine Aktivierung der Adenylatcyclase zu einer verstärkten cAMP-Synthese. Die Erhöhung des intrazellulären cAMP - Spiegels bewirkt eine Induktion der Proteinkinase A-Aktivität, die über eine Phosphorylierung die Aktivität von Efg1 reguliert [Rocha, CR *et al.* 2001]. Der Transkriptionsfaktor Efg1, der aufgrund seiner charakteristischen basischen Helix-Loop-Helix DNA-Bindedomäne zu einer konservierten Klasse

der sog. APSES-Proteinfamilie zugeordnet wird, ist in *C. albicans* als der zentrale Regulator der Morphogenese beschrieben worden [Stoldt, VR *et al.* 1997]. Inwiefern die unterschiedliche Induktion von morphogenetischen Differenzierungsprozessen (insbesondere bezüglich der Seruminduktion) zwischen den beiden *Candida*-Spezies auf die Unterschiede der entsprechenden APSES-Proteine in *C. albicans* (Efg1p) und *C. dubliniensis* (Mom1p) zurückgeführt werden kann, wurde mittels einer vergleichenden, funktionellen Charakterisierung untersucht.

Die beiden APSES-Proteine Efg1p und Mom1p weisen mit 79%-Identität (insbesondere in der APSES-Domäne) eine stark konservierte Proteinsequenz auf, was wahrscheinlich darauf zurückgeführt werden kann, dass sie auch funktionell stark konserviert sind. In Analogie zu der Efg1p-Funktion in *C. albicans* hat auch das Mom1p von *C. dubliniensis* einen signifikanten Einfluss auf die Zellmorphologie. So führten Deletionen des Mom1p zu einer elongierten Zellmorphologie, die auch für *EFG1*-Deletion beobachtet werden konnte. Generell kann gesagt werden, dass durch den Verlust des APSES-Proteins Efg1p oder Mom1p die charakteristische, physiologische, ovale Form nicht mehr aufrechterhalten werden kann [Sonneborn, A *et al.* 1999]. Es ist jedoch unklar, worauf dieser Phänotyp zurückgeführt werden kann. Als zentrale Regulatoren der Morphogenese haben beide Gene einen großen Einfluss (sowohl direkt als auch indirekt) auf den Metabolismus der Zelle, die Zellwandzusammensetzung, einige Cyclin-abhängige Gene während des Zellzykluses, so dass eine genaue Aussage, weshalb diese Zellformen ausgebildet werden, noch spekulativ bleiben muss.

Ähnlich dem *EFG1*-Deletionsphänotyp hat auch eine Deletion des Mom1p in *C. dubliniensis* einen großen Einfluss auf die Morphogenese des Pilzes. Wie für das Efg1p-Protein angenommen, scheint auch Mom1p ein Aktivator Hyphen-spezifischer Gene zu sein, wenn Zellen bestimmten Umweltsignalen - entweder Serum oder einer Nährstofflimitation - ausgesetzt werden [Lo, HJ *et al.* 1997; Stoldt, VR *et al.* 1997]. Unter anderen Bedingungen (SSH- oder Staib-Medium; YCB-BSA (mit und ohne Hefeextrakt) konnten dagegen extrem lange Hyphen ausgebildet werden, so dass ein vollständiger Verlust hyphaler Strukturen durch *MOM1*-Deletion nicht angenommen werden kann. Wie bei *C. albicans* triggern auch in *C. dubliniensis* andere Transkriptionsfaktoren (z.B. das Nrg1p oder das Czf1p) unter bestimmten Umweltsignalen Efg1- bzw. Mom1p-unabhängig die Hyphenausbildung [Staib, P and Morschhauser, J 2005; Moran, GP *et al.* 2007].

Viele Virulenzeigenschaften von *C. albicans* (z.B. Adhäsion, Invasion) sind mit der Hyphenausbildung assoziiert, da diese Faktoren (beispielsweise Hwp1 oder Mitglieder der ALS-Familie) nur während dieser morphologischen Transition exprimiert werden [Filler SG, Plos Pathogen, 2006; Chaffin WL, 2008]. So ist die reduzierte Pathogenität einiger avirulenter *C. albicans* Stämme (z.B. von *efg1Δ*- und/oder *efg1Δ/cph1Δ*-Stämme) neben dem Verlust der Hyphenbildung, auf die Nichtexpression dieser Faktoren zurückzuführen [Staib, P *et al.* 2002]. Wahrscheinlich ist die reduzierte Hyphenausbildung einer der Gründe, weshalb *C. dubliniensis* in den meisten klinischen Studien eine so geringe Virulenz aufweist. Dies konnten wir entsprechend für den *mom1Δ*-Deletionsstamm bestätigen, der in *in vitro* Infektionsassays eine verminderte Adhäsion und Invasion zeigte. Die im Vergleich zum *C. albicans* Wildtypstamm geringere Adhäsionseigenschaft von *C. dubliniensis* (zumindest auf Epithelzellen) kann in diesem Zusammenhang sowohl auf die reduzierte Filamentierung, sowie auch auf die Unterschiede mancher virulenzassoziierter Proteine (z.B. CaHwp1 und CdHwp1) zurückgeführt werden, ähnliches gilt auch für die Invasionstudien. Ähnlich wie bei *C. albicans*, wird auch in *C. dubliniensis* Mom1p als ein positiver Regulationsfaktor für die Ausbildung der Chlamydosporen benötigt [Sonneborn, A *et al.* 1999]. Ebenfalls analog zu der Efg1-Funktion [Sohn *et al.*, 2003; Li and Palacek, 2003] hat auch das Mom1p einen großen Einfluss auf die Zellwandbiogenese (sowohl auf die β -Glukan und Chitin-Zusammensetzung, wie auch auf die Expression von Zellwand-assoziierten Proteinen).

Mittels differentieller Genexpressionstudien von *mom1Δ*-Deletionsstämmen und *C. dubliniensis* Wildtyp-Stämmen unter nährstofflimitierenden Wachstumsbedingungen in Wasser, supplementiert mit Serum, konnte ein starker Einfluss des Mom1p auf den Kohlenhydratmetabolismus gezeigt werden. Wie bereits für den *C. albicans efg1Δ*-Deletionsstamm gezeigt werden konnte [Doedt, T *et al.* 2004], waren Gene von glykolytischen Enzymen durch die *MOM1*-Deletion stark reprimiert, während Enzyme des Citratzykluses in ihrer transkriptionellen Aktivität induziert waren.

Überraschenderweise konnte unter nährstoffreichen Wachstumsbedingungen dieser Einfluss von Mom1p auf den Kohlehydratmetabolismus nicht beobachtet werden, während es für Efg1p in *C. albicans* bereits - sogar unter denselben Wachstumsbedingungen (YPD) - beschrieben wurde [Doedt, T *et al.* 2004].

Die konservierte Funktion von Efg1p und Mom1p wurde auch durch Komplementationsexperimente (sowohl durch eine ektopische Expression von *MOM1* in dem *efg1Δ*-Deletionsstamm, sowie die heterologe Expression von *EFG1* in dem *mom1Δ*-Deletionsstamm) bestätigt. Was jedoch nicht beobachtet werden konnte, war eine induzierte Filamentierung von *C. dubliniensis*-*mom1Δ*-Deletionsstämmen durch Integration des *EFG1*-ORFs, selbst wenn der endogene *MOM1*-Promotor zusätzlich durch einen heterologen *EFG1*-Promotor ausgetauscht wurde. Dieses Ergebnis erlaubt die Schlussfolgerung, dass in den beiden *Candida*-Spezies unterschiedliche Signalwege (oder vielleicht nur ein spezifischer Signalweg in *C. albicans*, der in *C. dubliniensis* fehlt) angeschaltet werden, und so in *C. albicans* spezifisch die Filamentierung induzieren können. In nachfolgenden Studien könnten so durch die heterologe Expression von potentiellen Regulationsfaktoren aus *C. albicans* in *C. dubliniensis* diese unterschiedlichen Regulationswege u.U. bestimmt werden.

Signifikante Unterschiede zwischen den Stämmen zeigten sich auch in der Regulation der beiden APSES-Proteine. Wie in der Literatur bereits beschrieben wurde, nimmt die transkriptionelle Expression des *EFG1*-Gens nach dem Überimpfen ins hypheninduzierende Medium aufgrund von negativer Autoregulation (in Verbindung mit dem Sin3p-abhängigen Histon-Deacetylase-Komplex) rapide ab [Tebarth, B *et al.* 2003], während unter identischen Bedingungen die Expression von *MOM1* induziert wird. Da eine transkriptionelle Repression des Mom1p weder unter der nicht-hypheninduzierten Bedingung noch zu hypheninduzierenden Bedingungen beobachtet werden konnte, kann der in der Literatur beschriebene positive Zusammenhang zwischen transkriptioneller Repression und morphologischer Transition zumindest für das APSES-Protein Mom1p nicht bestätigt werden.

Eine ähnliche antagonistische Regulation homologer Proteine in beiden *Candida*-Spezies, konnte bereits für einen weiteren wichtigen Regulationsfaktor der Morphogenese, dem Nrg1p, beschrieben werden [Staib, P and Morschhauser, J 2005; Moran, GP *et al.* 2007]. Der Transkriptionsfaktor Nrg1p reprimiert die Chlamydosporen-Entwicklung, sowohl in *C. albicans*, wie auch in *C. dubliniensis*. Dabei sind jedoch Spezies-spezifische Unterschiede der Chlamydosporen-Entwicklung im Staib-Agar nur auf die unterschiedliche Regulation der Nrg1-Expression zurückzuführen [Staib, P and Morschhauser, J 2005].

III. Regulation des Stickstoffmetabolismus und die Rolle der APSES-Proteine

Dass APSES-Proteine als zentrale Regulatoren der Morphogenese auch im Kohlenhydratmetabolismus eine wichtige regulatorische Funktion einnehmen, war bereits für Efg1p in *C. albicans* bekannt [Doedt, T *et al.* 2004] und konnte auch im Rahmen dieser Arbeit für Mom1p in *C. dubliniensis* gezeigt werden. Die Tatsache, dass Metabolismus und Morphologie innerhalb einer Zelle von den gleichen Regulationsfaktoren eng miteinander verknüpft sind, zeigt wie wichtig es für die Zelle ist, sich schnell auf Veränderungen der äußeren Umgebung anpassen zu können. Diese Arbeit zeigt zum ersten Mal auch einen essentiellen Zusammenhang zwischen APSES-Proteinen und Stickstoffmetabolismus, der sowohl in *C. albicans* wie auch *C. dubliniensis* konserviert ist. Die Verwertung des Stickstoffs spielt in allen Lebewesen eine entscheidende Rolle, da Stickstoff als Hauptkomponent zahlreicher Verbindungen (u. a. Proteinen, Purinen, Pyrimidinen) zum Überleben der Zelle benötigt wird. Um die Versorgung der Zelle mit Stickstoff unter einer möglichst breiten Vielfalt von Umweltbedingungen gewährleisten zu können, haben Hefepilze komplexe Regulationsmechanismen entwickelt, die eine kontrollierte Aufnahme von primären (bevorzugten) oder sekundären Stickstoffverbindungen gewährleisten. In diesem Regulationsprozess spielen APSES-Proteine offensichtlich auch eine entscheidende Rolle.

III.1 Proliferationsverhalten auf unterschiedlichen Stickstoffverbindungen als einzige N-Quelle

Ammonium stellt - neben Aminosäuren wie Glutamat oder Glutamin - für die Hefezelle eine „bevorzugte“ Stickstoffquelle dar. Im Gegensatz zu Proteinen bedarf die Ammoniumaufnahme bei hohen extrazellulären Konzentrationen keiner Aktivierung von katabolischen Enzymen, die Proteine als Stickstoffquelle erst abbauen müssen, sondern kann über unspezifische Transporter oder durch die Diffusion in die Zelle gelangen [Morschhäuser, J 2011]. Dieses bevorzugte Verhalten ist u. a. in der **Abb. 39** dargestellt. Während beide *Candida*-Wildtypstämme unter Ammoniumchlorid als einzige Stickstoffquelle bereits zu sehr früheren Zeitpunkten eine Proliferation eingehen, verschiebt sich der Beginn der exponentiellen Phase unter YCB-BSA deutlich zu späteren Zeitpunkten, da die Expression von proteinabbauenden Enzymen (Sap-Proteine) sowie Oligopeptidtransportern erst induziert werden muss. Der im Vergleich zu *C. albicans* verzögerte Beginn der Proliferationsphase in *C. dubliniensis* kann dadurch erklärt werden, dass dieser Pilz nur ein geringeres Repertoire an sauren Aspartylproteinasen (SAPs) für den Abbau von Proteinen (BSA) aufweist. Sap-Proteine sind proteinabbauende Enzyme, die von

der Zelle für eine extrazelluläre Degradation des Proteins zu Oligopeptiden sezerniert werden. Die entsprechenden Peptide werden anschließend über die Oligopeptidtransporter (wie Opt1p oder Opt3p) in die Zelle aufgenommen [Martinez, P and Ljungdahl, PO 2005]. Während *C. albicans* 10 Mitglieder der Sap-Proteinfamilie aufweist, sind homologe Proteine von CaSap4p, CaSap5, und CaSap6p in *C. dubliniensis* auf ein ursprüngliches Sap4-6-Protein reduziert [Moran, G *et al.* 2004]. Die Deletionen der beiden APSES-Proteine Efg1p in *C. albicans* sowie von Mom1p in *C. dubliniensis* führen unter Flüssigbedingungen, in denen BSA als einzige Stickstoffquelle vorliegt, zu einer doppelt so langen *lag*-Phase, als es für die Wildtypstämmen beobachtet werden konnte (**Abb. 40**). Obwohl nicht unter diesen Bedingungen analysiert, konnten eine Studie zeigen, dass die transkriptionelle Expression von *SAP5* Efg1p-abhängig reguliert wird [Staib, P *et al.* 2002]. Es ist anzunehmen, dass durch das Fehlen des APSES-Proteins Efg1p in *C. albicans* die Expression dieser Proteinase nicht gewährleistet wird, was zur verzögerten Bereitstellung von Nährstoffen führt. Da ein direktes Homolog des Sap5-Proteins dieser Unterfamilie in *C. dubliniensis* fehlt, zeigen sowohl die Wildtypstämmen, wie auch die *mom1Δ*-Deletionsstämmen einen verlängerten Wachstumsarrest, der auf einen verstärkten Hungerzustand der Zelle hindeutet. Welche Rolle das Sap5p von *C. albicans* beim BSA-Abbau unter diesen *in vitro* Bedingungen einnimmt, muss jedoch noch umfassend analysiert werden. In dieser Arbeit wurde jedoch mit Sap2p die Regulation einer weiteren Aspartylproteinase untersucht. Unter *in vitro* Bedingungen mit Proteinen als einzige Stickstoffquelle wird für das Wachstum von *C. albicans* insbesondere die proteolytische Aktivität des Sap2-Proteins gebraucht, da *sap2Δ*-Deletionsstämmen unter diesen Bedingungen nicht wachsen können [Hube, B *et al.* 1997; Staib, P *et al.* 2002; Staib, P *et al.* 2008]. Die Induktion des *SAP2*-Promotors ist abhängig von dem Transkriptionsfaktor Stp1p, der in Anwesenheit von mikromolaren Konzentrationen von extrazellulären Aminosäuren – die aufgrund basaler Sap-Aktivität freigesetzt werden – über den SPS-Sensor nach einer proteolytischen Spaltung im Zellkern transkriptionell aktiv wird [Martinez, P and Ljungdahl, PO 2005]. Genexpressionsanalysen des *C. albicans* Wildtypstammes SC5314 zeigen bereits nach 24 h Wachstum in Flüssigkulturen mit BSA als einzige Stickstoffquelle eine hohe Expression des *STP1*-Gens (**Abb. 42**), was unter diesen Bedingungen eine starke Induktion des Sap2p-Proteins nach sich zieht (**Daten nicht gezeigt**). Verglichen mit dem Wildtypstamm war die *STP1*-Expression im *efg1Δ*-Deletionsstamm HLC52 auf ein Viertel reduziert. Wenn man jedoch in diesem Zusammenhang die Expressionsdaten der Sap-Proteinfamilie beim Lufthyphen-Phänotyp der *mom1Δ*-Deletionsstämmen auf Agarplatten mit BSA als einzige Stickstoffquelle aufgreift (**Abb. 38**), zeigen die *mom1Δ*-Deletionsstämmen von *C. dubliniensis* gegenüber dem Wildtypstamm dementsprechend eine signifikant reduzierte *SAP2*-Expression.

Neben *STP1* und *SAP2* scheint die Deletion des APSES-Proteins Efg1p in *C. albicans* auch auf die Expression der beiden Ammoniumpermease-Gene *MEP1* und *MEP2* einen großen Einfluss zu haben. Im Vergleich zum Wildtypstamm SC5314 sind diese Gene in den Deletionsstämmen mit BSA als einzige Stickstoffquelle signifikant runterreguliert, wohingegen unter Ammoniumchlorid sowohl die Expression der beiden Ammoniumpermeasen wie auch die der beiden Transkriptionsfaktoren *STP1* und *STP2* – gegenüber dem Wildtypstamm SC5314 – deutlich induziert ist. Diese Ergebnisse zeigen zum ersten Mal eine Efg1p-abhängige Regulation der für den Stickstoffmetabolismus zentralen Gene in *C. albicans*. Unter sauren Bedingungen, in der BSA in mikromolaren Konzentrationen als einzige Stickstoffquelle vorliegt, scheint das Efg1p – entweder über eine direkte oder indirekte Beteiligung einen positiven Einfluss auf die Expression von stickstoffabhängigen Genen zu haben. Wird jedoch das Protein als Stickstoffquelle durch hohe Konzentrationen des Ammoniumchlorids /oder -sulfats ersetzt, unterliegen diese Gene einer negativen Regulation in Abhängigkeit durch das APSES-Protein Efg1p.

Zahlreiche Regulationssysteme werden in Pilzen wie *S. cerevisiae* oder *C. albicans* mit der Stickstoffverwertung in Verbindung gebracht werden. Wie bereits durch zahlreiche Studien gezeigt werden konnte, unterliegt die transkriptionelle Regulation dieser Stickstoff-abhängigen Gene (*STP1*, *STP2*, *MEP1* und *MEP2*) in *C. albicans* einer zentralen Kontrolle durch die beiden GATA-Transkriptionsfaktoren Gat1p und Gln3p. Es sind Mitglieder einer konservierten Proteinfamilie in Pilzen, die über die DNA-bindende Zinkfingerdomäne die 5'-GATA-3' Nukleotidsequenz in der Promotorregion ihrer Zielgene erkennen [Marzluf, GA 1997; Wilson, RA and Arst, HN, Jr. 1998]. Wenn primäre Stickstoffquelle limitierend oder nicht vorhanden ist, wird die Expression von Stickstoff-abhängigen Genen induziert, was im Allgemeinen als *Nitrogen Catabolite Repression* (NCR) bezeichnet wird [Marzluf, GA 1997]. In *S. cerevisiae* erfolgt diese Regulation mithilfe von verschiedenen GATA Transkriptionsfaktoren, von denen zwei (Gat1p und Gln3p) die Transkription aktivieren und zwei andere (Dal80p und Gzf3p/Nil2p) - aufgrund einer antagonistischen Funktionsweise - sich dagegen negativ auf die Expression auswirken [Coffman, JA and Cooper, TG 1997]. Andere Pilze wie *Aspergillus nidulans* und *Neurospora crassa* besitzen einen einzigen GATA-Transkriptionsfaktor AreAp bzw. Nit2, der die Expression NCR-sensitiver Gene aktiviert. Ihre Homologe NmrAp bzw. Nmr1p wirken der AreA und Nit2-Funktion entgegen, in dem sie mit der Zinkfinger-Domäne interagieren und dadurch keine Genexpression ermöglichen [Marzluf, GA 1997]. Für *C. albicans* konnten dagegen bislang noch keine funktionellen Proteinhomologe für diese negative Regulation beschrieben werden. Da die beiden APSES-Proteine Efg1p und Mom1p auch die Expression ihrer Zielgene sowohl positiv wie auch negativ beeinflussen können [Sohn, K *et al.* 2003] und der Tatsache, dass durch ihr Fehlen die Expression der NCR-sensitiver Gene in Abhängigkeit von der vorliegenden Stickstoffquelle

entgegengesetzt reguliert wird (s.o.), ist es vorstellbar, dass die Genexpression der GATA-Transkriptionsfaktoren entweder *EFG1*-abhängig induziert (bei BSA/Proteinen als sekundäre N-Quelle) oder reprimiert werden kann (bei Ammonium als primäre N-Quelle). Inwieweit diese Hypothese wirklich zutrifft, muss mittels der quantitativen RealTime-PCR gezeigt werden. Ein anderer Erklärungsansatz ist der, dass APSES-Proteine in der Regulation des Stickstoffmetabolismus mit den GATA-Transkriptionsfaktoren interagieren. Auch dieser Ansatz muss in weiterführenden Analysen z. B. durch Protein-Protein-Interaktionsstudien näher untersucht werden.

III.2. Proliferationsverhalten der Stämme unter Bedingungen in denen unterschiedliche Stickstoffverbindungen vorliegen.

Wie wichtig die APSES-Proteine Efg1p und Mom1p für die Regulation des Stickstoffmetabolismus in den jeweiligen *Candida*-Arten sind, zeigt sich dadurch, dass eine Deletion dieses Genprodukts einen Wachstumsstopp nach sich zieht, wenn Zellen von Beginn an unter Bedingungen gebracht werden, in der beide Stickstoffquellen (sowohl BSA, wie Ammoniumchlorid) gleichzeitig vorliegen. Dieser Wachstumsdefekt der Deletionsstämmen ist faszinierend und zeigt zum ersten Mal eine essentielle Funktion der APSES-Proteine, die bisher weder für das Efg1p von *C. albicans*, noch für ein anderes Mitglied der APSES-Proteinfamilie beschrieben worden ist. Obwohl beide Stickstoffquellen (Ammoniumchlorid und BSA, in denselben Konzentrationen wie unter den Einzelbedingungen) den Deletionsstämmen zur Verfügung stehen, zeigen diese von Beginn an keine Proliferation (**Abb. 40**). Dieser Wachstumsdefekt ist nicht letal, da ein Zellwachstum durch eine weitere Zugabe einer der beiden Stickstoffquellen wieder induziert werden konnte. Dieses Wachstumsverhalten führt zu der Annahme, dass neben den GATA-Transkriptionsfaktoren auch APSES-Proteine eine zentrale Schalterfunktion im Stickstoffmetabolismus einnehmen und für den Entscheidungsprozess der Zelle notwendig sind, ob entweder niedermolekulare, leicht zugängliche Stickstoffquellen (Ammonium) oder komplexe Stickstoffverbindungen (z. B. in Form von Proteinen) von der Zelle aufgenommen und metabolisch verwertet werden sollen. Dieser Regulationsmechanismus ist in beiden *Candida*-Arten konserviert und scheint nicht nur dann eine wichtige Rolle zu spielen, wenn sich die Hefezelle in ihrer Umwelt einer Vielfalt von unterschiedlichen Stickstoffverbindungen ausgesetzt ist, sondern auch, wenn sich die Umweltbedingungen sehr schnell ändern. Nur eine schnelle Reaktion und Adaptation der Zelle auf sich ändernde äußere Lebensbedingungen ermöglicht der Zelle eine Bereitstellung von Nährstoffen und dadurch ein Aufrechterhalten des Zellwachstums. Wie wichtig z.B. APSES-Proteine im Stick-

stoffmetabolismus für die Regulierung von solchen Adaptionsprozessen sind, zeigen Versuche, in der die Zellen zuerst einer Stickstoffquelle ausgesetzt worden sind und anschließend eine weitere Stickstoffverbindung zugegeben wurde. So konnten wir überraschenderweise in dem unter Ammoniumchlorid wachsenden Zellen des Wildtypstamms von *C. albicans* – nicht des *efg1Δ*-Deletionsstamms – direkt nach der BSA-Zugabe einen Proliferationsstopp induzieren. Dieser Phänotyp war abhängig von dem Zeitpunkt, wann und in welcher Konzentration die sekundäre Stickstoffquelle zugegeben worden ist. Durch die Deletion von *EFG1* konnte unter keinen diesen Bedingungen ein Wachstumsstopp ausgelöst werden. Diese Ergebnisse bestätigen wieder die bedeutende Regulationsfunktion der APSES-Proteine in der Verwertung von unterschiedlichen Stickstoffverbindungen. Genexpressionsstudien zeigten, dass insbesondere 24 h nach der BSA-Zugabe die NCR-sensitiven Gene wie *STP1*, *STP2*, *MEP1* und *MEP2* im Gegensatz zum *efg1Δ*-Deletionsstamm – in den Wildtypstämmen nicht induziert waren. Da durch die BSA-Zugabe auch das Expressionsniveau von *EFG1* in den Wildtypzellen runterreguliert war, kann dieser Phänotyp nicht direkt auf das APSES-Protein zurückgeführt werden, sondern wahrscheinlich auf zusätzliche Regulationsfaktoren wie beispielsweise die GATA-Transkriptionsfaktoren Gat1p und Gln3p, die ebenfalls für diesen Prozess wichtig sind. Wie dies jedoch genau reguliert wird, muss noch durch weiterführende Studien untersucht werden.

Die Tatsache, dass zahlreiche zelluläre Prozesse innerhalb einer Zelle eng miteinander verknüpft sind, erschwert ganz erheblich die Beantwortung der Frage, was den Unterschied, zwischen zwei nah verwandten, sich jedoch in der Pathogenität unterschiedlichen Pilzen ausmacht. Aus allem, was man heute aus der Literatur und dieser Arbeit weiß, sind es zahlreiche Faktoren, die in einem komplexen Wechselspiel miteinander interagieren. So können es neben einzelnen Proteinen auch ganze Proteinfamilien sein, die sich im Laufe der unterschiedlichen adaptiven Entwicklung in beiden Pilzarten sich unterschiedlich entwickelt haben. Andere Mechanismen zeigen dagegen trotz einer konservierten Funktion einen erheblichen Unterschied in der transkriptionellen Regulation von bestimmten Regulationsfaktoren. Wir haben außerdem Hinweise, dass auch unterschiedliche Induktionen von regulatorischen Signaltransduktionswegen zu diesem Spezies-spezifischen Unterschied beitragen können.

In diesem Zusammenhang konnte mit der Identifizierung und funktionellen Charakterisierung der APSES-Proteine Efg1p und Mom1p hoffentlich ein signifikanter Beitrag zum molekularen Verständnis der Regulation der Morphogenese und des Metabolismus in *C. albicans* und *C. dubliniensis* geleistet werden.

LITERATURVERZEICHNIS

- Albrecht, A, A Felk, I Pichova, JR Naglik, M Schaller, P de Groot, D Maccallum, FC Odds, W Schafer, F Klis, M Monod and B Hube (2006). "Glycosylphosphatidylinositol-anchored proteases of *Candida albicans* target proteins necessary for both cellular processes and host-pathogen interactions." *J Biol Chem* **281**(2): 688-694.
- Almeida, RS, S Brunke, A Albrecht, S Thewes, M Laue, JE Edwards, SG Filler and B Hube (2008). "the hyphal-associated adhesin and invasin Als3 of *Candida albicans* mediates iron acquisition from host ferritin." *PLoS Pathog* **4**(11): e1000217.
- Andrade, SL and O Einsle (2007). "The Amt/Mep/Rh family of ammonium transport proteins." *Mol Membr Biol* **24**(5-6): 357-365.
- Aramayo, R, Y Peleg, R Addison and R Metznerberg (1996). "Asm-1+, a *Neurospora crassa* gene related to transcriptional regulators of fungal development." *Genetics* **144**(3): 991-1003.
- Asmundsdottir, LR, H Erlendsdottir, BA Agnarsson and M Gottfredsson (2009). "The importance of strain variation in virulence of *Candida dubliniensis* and *Candida albicans*: results of a blinded histopathological study of invasive candidiasis." *Clin Microbiol Infect* **15**(6): 576-585.
- Ausubel, FM, R Brent, RE Kingston, DD Moore, JG Seidman, JA Smith and K Struhl (1989). *Current Protocols in Molecular Biology*. New York, John Wiley & Sons.
- Barrett-Bee, K, Y Hayes, RG Wilson and JF Ryley (1985). "A comparison of phospholipase activity, cellular adherence and pathogenicity of yeasts." *J Gen Microbiol* **131**(5): 1217-1221.
- Biswas, K and J Morschhauser (2005). "The Mep2p ammonium permease controls nitrogen starvation-induced filamentous growth in *Candida albicans*." *Mol Microbiol* **56**(3): 649-669.
- Biswas, S, P Van Dijck and A Datta (2007). "Environmental sensing and signal transduction pathways regulating morphopathogenic determinants of *Candida albicans*." *Microbiol Mol Biol Rev* **71**(2): 348-376.
- Bockmuhl, DP, S Krishnamurthy, M Gerads, A Sonneborn and JF Ernst (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**(5): 1243-1257.
- Brassart, D, A Woltz, M Golliard and JR Neeser (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**(5): 1605-1613.
- Braun, BR and AD Johnson (1997). "Control of filament formation in *Candida albicans* by the transcriptional repressor TUP1." *Science* **277**(5322): 105-109.
- Brown, AJ and NA Gow (1999). "Regulatory networks controlling *Candida albicans* morphogenesis." *Trends Microbiol* **7**(8): 333-338.
- Brown, DH, Jr., AD Giusani, X Chen and CA Kumamoto (1999). "Filamentous growth of *Candida albicans* in response to physical environmental cues and its regulation by the unique CZF1 gene." *Mol Microbiol* **34**(4): 651-662.

- Brown, GD (2006). "Dectin-1: a signalling non-TLR pattern-recognition receptor." *Nat Rev Immunol* **6**(1): 33-43.
- Buffo, J, MA Herman and DR Soll (1984). "A characterization of pH-regulated dimorphism in *Candida albicans*." *Mycopathologia* **85**(1-2): 21-30.
- Butler, G (2010). "Fungal sex and pathogenesis." *Clin Microbiol Rev* **23**(1): 140-159.
- Calderone, RA (2002). *Candida and Candidiasis*, ASM Press, Washington, D. C.
- Cameron, BJ and LJ Douglas (1996). "Blood group glycolipids as epithelial cell receptors for *Candida albicans*." *Infect Immun* **64**(3): 891-896.
- Canales, RD, Y Luo, JC Willey, B Austermler, CC Barbacioru, C Boysen, K Hunkapiller, RV Jensen, CR Knight, KY Lee, Y Ma, B Maqsoodi, A Papallo, EH Peters, K Poulter, PL Ruppel, RR Samaha, L Shi, W Yang, L Zhang and FM Goodsaid (2006). "Evaluation of DNA microarray results with quantitative gene expression platforms." *Nat Biotechnol* **24**(9): 1115-1122.
- Cassola, A, M Parrot, S Silberstein, BB Magee, S Passeron, L Giasson and ML Cantore (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**(1): 190-199.
- Castrillo, JI, LA Zeef, DC Hoyle, N Zhang, A Hayes, DC Gardner, MJ Cornell, J Petty, L Hakes, L Wardleworth, B Rash, M Brown, WB Dunn, D Broadhurst, K O'Donoghue, SS Hester, TP Dunkley, SR Hart, N Swainston, P Li, SJ Gaskell, NW Paton, KS Lilley, DB Kell and SG Oliver (2007). "Growth control of the eukaryote cell: a systems biology study in yeast." *J Biol* **6**(2): 4.
- Chaffin, WL (2008). "*Candida albicans* Cell Wall Proteins." *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **72**(3): 495-544.
- Chaffin, WL, JL Lopez-Ribot, M Casanova, D Gozalbo and JP Martinez (1998). "Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: identification, function, and expression." *Microbiol Mol Biol Rev* **62**(1): 130-180.
- Chen, CG, YL Yang, HH Cheng, CL Su, SF Huang, CT Chen, YT Liu, IJ Su and HJ Lo (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**(3): 561-565.
- Chen, YL, A Brand, EL Morrison, FG Silao, UG Bigol, FF Malbas, Jr., JE Nett, DR Andes, NV Solis, SG Filler, A Averette and J Heitman (2011). "Calcineurin Controls Drug Tolerance, Hyphal Growth, and Virulence in *Candida dubliniensis*." *Eukaryot Cell* **10**(6): 803-819.
- Chenchik, A, L Diachenko, F Moqadam, V Tarabykin, S Lukyanov and PD Siebert (1996). "Full-length cDNA cloning and determination of mRNA 5' and 3' ends by amplification of adaptor-ligated cDNA." *Biotechniques* **21**(3): 526-534.
- Coffman, JA and TG Cooper (1997). "Nitrogen GATA factors participate in transcriptional regulation of vacuolar protease genes in *Saccharomyces cerevisiae*." *J Bacteriol* **179**(17): 5609-5613.
- Cohen, SN, AC Chang and L Hsu (1972). "Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA." *Proc Natl Acad Sci U S A* **69**(8): 2110-2114.
- Coleman, DC, MG Rinaldi, KA Haynes, JH Rex, RC Summerbell, EJ Anaissie, A Li and DJ Sullivan (1998). "Importance of *Candida* species other than *Candida albicans* as opportunistic pathogens." *Med Mycol* **36** Suppl 1: 156-165.

- Coleman, DC, DJ Sullivan, DE Bennett, GP Moran, HJ Barry and DB Shanley (1997). "Candidiasis: the emergence of a novel species, *Candida dubliniensis*." *AIDS* **11**(5): 557-567.
- Cottier, F and FA Muhlschlegel (2009). "Sensing the environment: response of *Candida albicans* to the X factor." *FEMS Microbiol Lett* **295**(1): 1-9.
- Crespo-Diaz, R, A Behfar, GW Butler, DJ Padley, MG Sarr, J Bartunek, AB Dietz and A Terzic (2010). "Platelet lysate consisting of a natural repair proteome supports human mesenchymal stem cell proliferation and chromosomal stability." *Cell Transplant*.
- Cutler, JE (1991). "Putative virulence factors of *Candida albicans*." *Annu Rev Microbiol* **45**: 187-218.
- Davis, D (2003). "Adaptation to environmental pH in *Candida albicans* and its relation to pathogenesis." *Curr Genet* **44**(1): 1-7.
- Davis, D, JE Edwards, Jr., AP Mitchell and AS Ibrahim (2000). "*Candida albicans* RIM101 pH response pathway is required for host-pathogen interactions." *Infect Immun* **68**(10): 5953-5959.
- Davis, D, RB Wilson and AP Mitchell (2000). "RIM101-dependent and-independent pathways govern pH responses in *Candida albicans*." *Mol Cell Biol* **20**(3): 971-978.
- De Groot, PW, KJ Hellingwerf and FM Klis (2003). "Genome-wide identification of fungal GPI proteins." *Yeast* **20**(9): 781-796.
- Dieterich, C, M Schandar, M Noll, FJ Johannes, H Brunner, T Graeve and S Rupp (2002). "In vitro reconstructed human epithelia reveal contributions of *Candida albicans* EFG1 and CPH1 to adhesion and invasion." *Microbiology* **148**(Pt 2): 497-506.
- Doedt, T, S Krishnamurthy, DP Bockmuhl, B Tebarth, C Stempel, CL Russell, AJ Brown and JF Ernst (2004). "APSES proteins regulate morphogenesis and metabolism in *Candida albicans*." *Mol Biol Cell* **15**(7): 3167-3180.
- Dujon, B, D Sherman, G Fischer, P Durrens, S Casaregola, I Lafontaine, J De Montigny, C Marck, C Neugeglise, E Talla, N Goffard, L Frangeul, M Aigle, V Anthouard, A Babour, V Barbe, S Barnay, S Blanchin, JM Beckerich, E Beyne, C Bleykasten, A Boisrame, J Boyer, L Cattolico, F Confanioleri, A De Daruvar, L Despons, E Fabre, C Fairhead, H Ferry-Dumazet, A Groppi, F Hantraye, C Hennequin, N Jauniaux, P Joyet, R Kachouri, A Kerrest, R Koszul, M Lemaire, I Lesur, L Ma, H Muller, JM Nicaud, M Nikolski, S Oztas, O Ozier-Kalogeropoulos, S Pellenz, S Potier, GF Richard, ML Straub, A Suleau, D Swennen, F Tekaia, M Wesolowski-Louvel, E Westhof, B Wirth, M Zeniou-Meyer, I Zivanovic, M Bolotin-Fukuhara, A Thierry, C Bouchier, B Caudron, C Scarpelli, C Gaillardin, J Weissenbach, P Wincker and JL Souciet (2004). "Genome evolution in yeasts." *Nature* **430**(6995): 35-44.
- Dutton, JR, S Johns and BL Miller (1997). "StuAp is a sequence-specific transcription factor that regulates developmental complexity in *Aspergillus nidulans*." *EMBO J* **16**(18): 5710-5721.
- Edmond, MB, SE Wallace, DK McClish, MA Pfaller, RN Jones and RP Wenzel (1999). "Nosocomial bloodstream infections in United States hospitals: a three-year analysis." *Clin Infect Dis* **29**(2): 239-244.
- Eggimann, P, J Garbino and D Pittet (2003). "Management of *Candida* species infections in critically ill patients." *Lancet Infect Dis* **3**(12): 772-785.
- Elorza, MV, H Rico and R Sentandreu (1983). "Calcofluor white alters the assembly of chitin fibrils in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans* cells." *J Gen Microbiol* **129**(5): 1577-1582.

- Ernst, JF (2000). "Regulation of dimorphism in *Candida albicans*." *Contrib Microbiol* **5**: 98-111.
- Fabry, W, EN Schmid, M Schrapf and R Ansorg (2003). "Isolation and purification of chlamydozoospores of *Candida albicans*." *Med Mycol* **41**(1): 53-58.
- Filler, SG, JN Swerdloff, C Hobbs and PM Luckett (1995). "Penetration and damage of endothelial cells by *Candida albicans*." *Infect Immun* **63**(3): 976-983.
- Fogh, J, JM Fogh and T Orfeo (1977). "One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice." *J Natl Cancer Inst* **59**(1): 221-226.
- Forsberg, H, CF Gilström, A Zargari, P Martinez and PO Ljungdahl (2001). "The role of the yeast plasma membrane SPS nutrient sensor in the metabolic response to extracellular amino acids." *Mol Microbiol* **42**(1): 215-228.
- Fotadar, R and SS Al-Hedaithy (2005). "Comparison of phospholipase and proteinase activity in *Candida albicans* and *C. dubliniensis*." *Mycoses* **48**(1): 62-67.
- Galagan, JE, MR Henn, LJ Ma, CA Cuomo and B Birren (2005). "Genomics of the fungal kingdom: insights into eukaryotic biology." *Genome Res* **15**(12): 1620-1631.
- Ghannoum, MA (2000). "Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis." *Clin Microbiol Rev* **13**(1): 122-143, table of contents.
- Ghinsberg, RC, L Bar Dov, M Rogol, Y Sheinberg and Y Nitzan (1994). "Monitoring of selected bacteria and fungi in sand and sea water along the Tel Aviv coast." *Microbios* **77**(310): 29-40.
- Giard, DJ, SA Aaronson, GJ Todaro, P Arnstein, JH Kersey, H Dosik and WP Parks (1973). "In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors." *J Natl Cancer Inst* **51**(5): 1417-1423.
- Gilfillan, GD, DJ Sullivan, K Haynes, T Parkinson, DC Coleman and NA Gow (1998). "*Candida dubliniensis*: phylogeny and putative virulence factors." *Microbiology* **144** (Pt 4): 829-838.
- Gillum, AM, EY Tsay and DR Kirsch (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**(1): 179-182.
- Gimeno, CJ and GR Fink (1994). "Induction of pseudohyphal growth by overexpression of PHD1, a *Saccharomyces cerevisiae* gene related to transcriptional regulators of fungal development." *Mol Cell Biol* **14**(3): 2100-2112.
- Goodwin, TJ and RT Poulter (2000). "Multiple LTR-retrotransposon families in the asexual yeast *Candida albicans*." *Genome Res* **10**(2): 174-191.
- Gossen, M, S Freundlieb, G Bender, G Müller, W Hillen and H Bujard (1995). "Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells." *Science* **268**(5218): 1766-1769.
- Gudlaugsson, O, S Gillespie, K Lee, J Vande Berg, J Hu, S Messer, L Herwaldt, M Pfaller and D Diekema (2003). "Attributable mortality of nosocomial candidemia, revisited." *Clin Infect Dis* **37**(9): 1172-1177.
- Hanahan, D (1983). "Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids." *J Mol Biol* **166**(4): 557-580.

- Hauser, NC, M Dukalska, K Fellenberg and S Rupp (2009). "From experimental setup to data analysis in transcriptomics: copper metabolism in the human pathogen *Candida albicans*." *J Biophotonics* **2**(4): 262-268.
- Hawksworth, DL (2001). "The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited." *Mycol. Res.* **105**: 1422-1432.
- Hazen, KC (1995). "New and emerging yeast pathogens." *Clin Microbiol Rev* **8**(4): 462-478.
- Hedges, SB (2002). "The origin and evolution of model organisms." *Nat Rev Genet* **3**(11): 838-849.
- Hensel, M, HN Arst, Jr., A Aufauvre-Brown and DW Holden (1998). "The role of the *Aspergillus fumigatus* *areA* gene in invasive pulmonary aspergillosis." *Mol Gen Genet* **258**(5): 553-557.
- Higa, A and M Mandel (1970). "Actinomycin sensitive mutants of *Escherichia coli* K-12." *Mol Gen Genet* **108**(1): 41-46.
- Hirate, Y, M Mieda, T Harada, K Yamasu and H Okamoto (2001). "Identification of ephrin-A3 and novel genes specific to the midbrain-MHB in embryonic zebrafish by ordered differential display." *Mech Dev* **107**(1-2): 83-96.
- Hoffman, CS and F Winston (1987). "A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*." *Gene* **57**(2-3): 267-272.
- Hostetter, MK (1994). "Adhesins and ligands involved in the interaction of *Candida* spp. with epithelial and endothelial surfaces." *Clin Microbiol Rev* **7**(1): 29-42.
- Hoyer, LL (2001). "The ALS gene family of *Candida albicans*." *Trends Microbiol* **9**(4): 176-180.
- Hube, B (2004). "From commensal to pathogen: stage- and tissue-specific gene expression of *Candida albicans*." *Curr Opin Microbiol* **7**(4): 336-341.
- Hube, B, M Monod, DA Schofield, AJ Brown and NA Gow (1994). "Expression of seven members of the gene family encoding secretory aspartyl proteinases in *Candida albicans*." *Mol Microbiol* **14**(1): 87-99.
- Hube, B and J Naglik (2001). "*Candida albicans* proteinases: resolving the mystery of a gene family." *Microbiology* **147**(Pt 8): 1997-2005.
- Hube, B, D Sanglard, FC Odds, D Hess, M Monod, W Schafer, AJ Brown and NA Gow (1997). "Disruption of each of the secreted aspartyl proteinase genes *SAP1*, *SAP2*, and *SAP3* of *Candida albicans* attenuates virulence." *Infect Immun* **65**(9): 3529-3538.
- Huber, JA, DB Mark Welch, HG Morrison, SM Huse, PR Neal, DA Butterfield and ML Sogin (2007). "Microbial population structures in the deep marine biosphere." *Science* **318**(5847): 97-100.
- Iscove, NN, M Barbara, M Gu, M Gibson, C Modi and N Winegarden (2002). "Representation is faithfully preserved in global cDNA amplified exponentially from sub-picogram quantities of mRNA." *Nat Biotechnol* **20**(9): 940-943.
- Iyer, LM, EV Koonin and L Aravind (2002). "Extensive domain shuffling in transcription regulators of DNA viruses and implications for the origin of fungal APSES transcription factors." *Genome Biol* **3**(3): RESEARCH0012.
- Jabra-Rizk, MA, SM Ferreira, M Sabet, WA Falkler, WG Merz and TF Meiller (2001). "Recovery of *Candida dubliniensis* and other yeasts from human immunodeficiency virus-associated periodontal lesions." *J Clin Microbiol* **39**(12): 4520-4522.

- Jackson, AP, JA Gamble, T Yeomans, GP Moran, D Saunders, D Harris, M Aslett, JF Barrell, G Butler, F Citiulo, DC Coleman, PW de Groot, TJ Goodwin, MA Quail, J McQuillan, CA Munro, A Pain, RT Poulter, MA Rajandream, H Renauld, MJ Spiering, A Tivey, NA Gow, B Barrell, DJ Sullivan and M Berriman (2009). "Comparative genomics of the fungal pathogens *Candida dubliniensis* and *Candida albicans*." *Genome Res* **19**(12): 2231-2244.
- Jewtuchowicz, VM, MT Mujica, MI Brusca, N Sordelli, MC Malzone, SJ Pola, CA Iovannitti and AC Rosa (2008). "Phenotypic and genotypic identification of *Candida dubliniensis* from subgingival sites in immunocompetent subjects in Argentina." *Oral Microbiol Immunol* **23**(6): 505-509.
- Khan, ZU, S Ahmad, E Mokaddas, N Al-Sweih and R Chandy (2005). "Sunflower seed husk agar: a new medium for the differentiation of *Candida dubliniensis* from *Candida albicans*." *Indian J Med Microbiol* **23**(3): 182-185.
- Kibbler, CC, S Seaton, RA Barnes, WR Gransden, RE Holliman, EM Johnson, JD Perry, DJ Sullivan and JA Wilson (2003). "Management and outcome of bloodstream infections due to *Candida* species in England and Wales." *J Hosp Infect* **54**(1): 18-24.
- Kim, DS, SJ Lee, SY Park, HJ Yoo, SH Kim, KJ Kim and HJ Cho (2001). "Differentially expressed genes in rat dorsal root ganglia following peripheral nerve injury." *Neuroreport* **12**(15): 3401-3405.
- Kinsman, OS, K Pitblado and CJ Coulson (1988). "Effect of mammalian steroid hormones and luteinizing hormone on the germination of *Candida albicans* and implications for vaginal candidosis." *Mycoses* **31**(12): 617-626.
- Kohler, JR and GR Fink (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**(23): 13223-13228.
- Kopecka, M and M Gabriel (1992). "The influence of congo red on the cell wall and (1----3)-beta-D-glucan microfibril biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*." *Arch Microbiol* **158**(2): 115-126.
- Kothapalli, R, SJ Yoder, S Mane and TP Loughran, Jr. (2002). "Microarray results: how accurate are they?" *BMC Bioinformatics* **3**: 22.
- Kuhn, E and A Schaller (2004). "DNA microarrays: methodology, data evaluation and application in the analysis of plant defense signaling." *Genet Eng (N Y)* **26**: 49-84.
- Kuja-Panula, J, M Kiiltomaki, T Yamashiro, A Rouhiainen and H Rauvala (2003). "AMIGO, a transmembrane protein implicated in axon tract development, defines a novel protein family with leucine-rich repeats." *J Cell Biol* **160**(6): 963-973.
- Kumamoto, CA and MD Vines (2005). "Contributions of hyphae and hypha-co-regulated genes to *Candida albicans* virulence." *Cell Microbiol* **7**(11): 1546-1554.
- Kvaal, C, SA Lachke, T Srikantha, K Daniels, J McCoy and DR Soll (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**(12): 6652-6662.
- Kvaal, CA, T Srikantha and DR Soll (1997). "Misexpression of the white-phase-specific gene WH11 in the opaque phase of *Candida albicans* affects switching and virulence." *Infect Immun* **65**(11): 4468-4475.

- Larkin, MA, G Blackshields, NP Brown, R Chenna, PA McGettigan, H McWilliam, F Valentin, IM Wallace, A Wilm, R Lopez, JD Thompson, TJ Gibson and DG Higgins (2007). "Clustal W and Clustal X version 2.0." *Bioinformatics* **23**(21): 2947-2948.
- Leidich, SD, AS Ibrahim, Y Fu, A Koul, C Jessup, J Vitullo, W Fonzi, F Mirbod, S Nakashima, Y Nozawa and MA Ghannoum (1998). "Cloning and disruption of caPLB1, a phospholipase B gene involved in the pathogenicity of *Candida albicans*." *J Biol Chem* **273**(40): 26078-26086.
- Lengeler, KB, RC Davidson, C D'Souza, T Harashima, WC Shen, P Wang, X Pan, M Waugh and J Heitman (2000). "Signal transduction cascades regulating fungal development and virulence." *Microbiol Mol Biol Rev* **64**(4): 746-785.
- Li, F and SP Palecek (2003). "EAP1, a *Candida albicans* gene involved in binding human epithelial cells." *Eukaryot Cell* **2**(6): 1266-1273.
- Liang, P and AB Pardee (1992). "Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction." *Science* **257**(5072): 967-971.
- Limjindaporn, T, RA Khalaf and WA Fonzi (2003). "Nitrogen metabolism and virulence of *Candida albicans* require the GATA-type transcriptional activator encoded by GAT1." *Mol Microbiol* **50**(3): 993-1004.
- Lindemann, E (2006). Entwicklung alternativer Verfahren zur Genexpressionsanalyse, Universität Hohenheim.
- Lo, HJ, JR Kohler, B DiDomenico, D Loebenberg, A Cacciapuoti and GR Fink (1997). "Nonfilamentous *C. albicans* mutants are avirulent." *Cell* **90**(5): 939-949.
- Lockhart, SR, C Pujol, KJ Daniels, MG Miller, AD Johnson, MA Pfaller and DR Soll (2002). "In *Candida albicans*, white-opaque switchers are homozygous for mating type." *Genetics* **162**(2): 737-745.
- Luhn, S, M Berth, M Hecker and J Bernhardt (2003). "Using standard positions and image fusion to create proteome maps from collections of two-dimensional gel electrophoresis images." *Proteomics* **3**(7): 1117-1127.
- Magasanik, B and CA Kaiser (2002). "Nitrogen regulation in *Saccharomyces cerevisiae*." *Gene* **290**(1-2): 1-18.
- Malloff, C, E Dullaghan, A Li, R Stokes, R Fernandez and W Lam (2003). "Two-dimensional DNA displays for comparisons of bacterial genomes." *Biol Proced Online* **5**: 143-152.
- Malloff, CA, RC Fernandez, EM Dullaghan, RW Stokes and WL Lam (2002). "Two-dimensional display and whole genome comparison of bacterial pathogen genomes of high G+C DNA content." *Gene* **293**(1-2): 205-211.
- Malloff, CA, RC Fernandez and WL Lam (2001). "Bacterial comparative genomic hybridization: a method for directly identifying lateral gene transfer." *J Mol Biol* **312**(1): 1-5.
- Martin, GS, DM Mannino, S Eaton and M Moss (2003). "The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000." *N Engl J Med* **348**(16): 1546-1554.
- Martinez, P and PO Ljungdahl (2005). "Divergence of Stp1 and Stp2 transcription factors in *Candida albicans* places virulence factors required for proper nutrient acquisition under amino acid control." *Mol Cell Biol* **25**(21): 9435-9446.
- Marzluf, GA (1997). "Genetic regulation of nitrogen metabolism in the fungi." *Microbiol Mol Biol Rev* **61**(1): 17-32.

- Matsumura, H, M Reuter, DH Kruger, P Winter, G Kahl and R Terauchi (2008). "SuperSAGE." *Methods Mol Biol* **387**: 55-70.
- Matz, M, D Shagin, E Bogdanova, O Britanova, S Lukyanov, L Diatchenko and A Chenchik (1999). "Amplification of cDNA ends based on template-switching effect and step-out PCR." *Nucleic Acids Res* **27**(6): 1558-1560.
- Matz, M, N Usman, D Shagin, E Bogdanova and S Lukyanov (1997). "Ordered differential display: a simple method for systematic comparison of gene expression profiles." *Nucleic Acids Res* **25**(12): 2541-2542.
- McLaughlin, DJ, DS Hibbett, F Lutzoni, JW Spatafora and R Vilgalys (2009). "The search for the fungal tree of life." *Trends Microbiol* **17**(11): 488-497.
- McManus, BA, DJ Sullivan, GP Moran, C d'Enfert, ME Bougnoux, MA Nunn and DC Coleman (2009). "Genetic differences between avian and human isolates of *Candida dubliniensis*." *Emerg Infect Dis* **15**(9): 1467-1470.
- Mendes-Giannini, MJ, CP Soares, JL da Silva and PF Andreotti (2005). "Interaction of pathogenic fungi with host cells: Molecular and cellular approaches." *FEMS Immunol Med Microbiol* **45**(3): 383-394.
- Miller, KY, J Wu and BL Miller (1992). "StuA is required for cell pattern formation in *Aspergillus*." *Genes Dev* **6**(9): 1770-1782.
- Mishra, PK, M Baum and J Carbon (2007). "Centromere size and position in *Candida albicans* are evolutionarily conserved independent of DNA sequence heterogeneity." *Mol Genet Genomics* **278**(4): 455-465.
- Moran, G, C Stokes, S Thewes, B Hube, DC Coleman and D Sullivan (2004). "Comparative genomics using *Candida albicans* DNA microarrays reveals absence and divergence of virulence-associated genes in *Candida dubliniensis*." *Microbiology* **150**(Pt 10): 3363-3382.
- Moran, GP, DC Coleman and DJ Sullivan (2011). "Comparative genomics and the evolution of pathogenicity in human pathogenic fungi." *Eukaryot Cell* **10**(1): 34-42.
- Moran, GP, DM MacCallum, MJ Spiering, DC Coleman and DJ Sullivan (2007). "Differential regulation of the transcriptional repressor NRG1 accounts for altered host-cell interactions in *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*." *Mol Microbiol* **66**(4): 915-929.
- Morschhäuser, J (2011). "Nitrogen regulation of morphogenesis and protease secretion in *Candida albicans*." *International Journal of Medical Microbiology* **301**(5): 390-394.
- Murray, AE, D Lies, G Li, K Neelson, J Zhou and JM Tiedje (2001). "DNA/DNA hybridization to microarrays reveals gene-specific differences between closely related microbial genomes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(17): 9853-9858.
- Nagalakshmi, U, Z Wang, K Waern, C Shou, D Raha, M Gerstein and M Snyder (2008). "The transcriptional landscape of the yeast genome defined by RNA sequencing." *Science* **320**(5881): 1344-1349.
- Naglik, J, A Albrecht, O Bader and B Hube (2004). "*Candida albicans* proteinases and host/pathogen interactions." *Cell Microbiol* **6**(10): 915-926.
- Naglik, JR, SJ Challacombe and B Hube (2003). "*Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis." *Microbiol Mol Biol Rev* **67**(3): 400-428, table of contents.

- Nantel, A, D Dignard, C Bachewich, D Harcus, A Marcil, AP Bouin, CW Sensen, H Hogues, M van het Hoog, P Gordon, T Rigby, F Benoit, DC Tessier, DY Thomas and M Whiteway (2002). "Transcription profiling of *Candida albicans* cells undergoing the yeast-to-hyphal transition." *Mol Biol Cell* **13**(10): 3452-3465.
- Nunn, MA, SM Schaefer, MA Petrou and JR Brown (2007). "Environmental source of *Candida dubliniensis*." *Emerg Infect Dis* **13**(5): 747-750.
- O'Connor, L, N Caplice, DC Coleman, DJ Sullivan and GP Moran (2010). "Differential Filamentation of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* Is Governed by Nutrient Regulation of UME6 Expression." *Eukaryotic Cell* **9**(9): 1383-1397.
- Odds, FC, MF Hanson, AD Davidson, MD Jacobsen, P Wright, JA Whyte, NA Gow and BL Jones (2007). "One year prospective survey of *Candida* bloodstream infections in Scotland." *J Med Microbiol* **56**(Pt 8): 1066-1075.
- Papadopoulos, JS and R Agarwala (2007). "COBALT: constraint-based alignment tool for multiple protein sequences." *Bioinformatics* **23**(9): 1073-1079.
- Pappas, PG (2006). "Invasive candidiasis." *Infect Dis Clin North Am* **20**(3): 485-506.
- Park, H, CL Myers, DC Sheppard, QT Phan, AA Sanchez, EE J and SG Filler (2005). "Role of the fungal Ras-protein kinase A pathway in governing epithelial cell interactions during oropharyngeal candidiasis." *Cell Microbiol* **7**(4): 499-510.
- Park, YN and J Morschhauser (2005). "Tetracycline-inducible gene expression and gene deletion in *Candida albicans*." *Eukaryot Cell* **4**(8): 1328-1342.
- Pesole, G, M Lotti, L Alberghina and C Saccone (1995). "Evolutionary origin of nonuniversal CUGSer codon in some *Candida* species as inferred from a molecular phylogeny." *Genetics* **141**(3): 903-907.
- Petersen, M and J Wengel (2003). "LNA: a versatile tool for therapeutics and genomics." *Trends Biotechnol* **21**(2): 74-81.
- Petersen, RF, G Marinoni, ML Nielsen and J Piskur (2000). "Molecular approaches for analyzing diversity and phylogeny among yeast species." *Contrib Microbiol* **5**: 15-35.
- Pfaller, MA and DJ Diekema (2004). "Rare and emerging opportunistic fungal pathogens: concern for resistance beyond *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*." *J Clin Microbiol* **42**(10): 4419-4431.
- Pfaller, MA and DJ Diekema (2007). "Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem." *Clin Microbiol Rev* **20**(1): 133-163.
- Phan, QT, CL Myers, Y Fu, DC Sheppard, MR Yeaman, WH Welch, AS Ibrahim, JE Edwards, Jr. and SG Filler (2007). "Als3 is a *Candida albicans* invasin that binds to cadherins and induces endocytosis by host cells." *PLoS Biol* **5**(3): e64.
- Pluthero, FG (1993). "Rapid purification of high-activity Taq DNA polymerase." *Nucleic Acids Res* **21**(20): 4850-4851.
- Price, MF and RA Cawson (1977). "Phospholipase activity in *Candida albicans*." *Sabouraudia* **15**(2): 179-185.
- Pujol, C, KJ Daniels, SR Lockhart, T Srikantha, JB Radke, J Geiger and DR Soll (2004). "The closely related species *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* can mate." *Eukaryot Cell* **3**(4): 1015-1027.

- Ram, AF and FM Klis (2006). "Identification of fungal cell wall mutants using susceptibility assays based on Calcofluor white and Congo red." *Nat Protoc* **1**(5): 2253-2256.
- Ramirez-Zavala, B and A Dominguez (2008). "Evolution and phylogenetic relationships of APSES proteins from Hemiascomycetes." *FEMS Yeast Res* **8**(4): 511-519.
- Ramirez-Zavala, B, O Reuss, YN Park, K Ohlsen and J Morschhauser (2008). "Environmental induction of white-opaque switching in *Candida albicans*." *PLoS Pathog* **4**(6): e1000089.
- Reef, SE, BA Lasker, DS Butcher, MM McNeil, R Pruitt, H Keyserling and WR Jarvis (1998). "Nonperinatal nosocomial transmission of *Candida albicans* in a neonatal intensive care unit: prospective study." *J Clin Microbiol* **36**(5): 1255-1259.
- Reuss, O, A Vik, R Kolter and J Morschhauser (2004). "The SAT1 flipper, an optimized tool for gene disruption in *Candida albicans*." *Gene* **341**: 119-127.
- Riggle, PJ, KA Andrutis, X Chen, SR Tzipori and CA Kumamoto (1999). "Invasive lesions containing filamentous forms produced by a *Candida albicans* mutant that is defective in filamentous growth in culture." *Infect Immun* **67**(7): 3649-3652.
- Rocha, CR, K Schroppel, D Harcus, A Marcil, D Dignard, BN Taylor, DY Thomas, M Whiteway and E Leberer (2001). "Signaling through adenylyl cyclase is essential for hyphal growth and virulence in the pathogenic fungus *Candida albicans*." *Mol Biol Cell* **12**(11): 3631-3643.
- Röhm, M (2010). Charakterisierung einer Familie von Pry-Proteinen in *Candida albicans*.
- Roman, E, DM Arana, C Nombela, R Alonso-Monge and J Pla (2007). "MAP kinase pathways as regulators of fungal virulence." *Trends Microbiol* **15**(4): 181-190.
- Romeo, O and G Criseo (2008). "Molecular Epidemiology of *Candida albicans* and Its Closely Related Yeasts *Candida dubliniensis* and *Candida africana*." *Journal of Clinical Microbiology* **47**(1): 212-214.
- Ruiz-Herrera, J, MV Elorza, E Valentin and R Sentandreu (2006). "Molecular organization of the cell wall of *Candida albicans* and its relation to pathogenicity." *FEMS Yeast Res* **6**(1): 14-29.
- Sabie, FT and GM Gadd (1992). "Effect of nucleosides and nucleotides and the relationship between cellular adenosine 3':5'-cyclic monophosphate (cyclic AMP) and germ tube formation in *Candida albicans*." *Mycopathologia* **119**(3): 147-156.
- Sambrook, J, EF Fritsch and T Maniatis (1989). *Molecular cloning a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory.
- Sanglard, D, B Hube, M Monod, FC Odds and NA Gow (1997). "A triple deletion of the secreted aspartyl proteinase genes SAP4, SAP5, and SAP6 of *Candida albicans* causes attenuated virulence." *Infect Immun* **65**(9): 3539-3546.
- Schaller, M, HC Korting, C Borelli, G Hamm and B Hube (2005). "Candida albicans-secreted aspartic proteinases modify the epithelial cytokine response in an in vitro model of vaginal candidiasis." *Infect Immun* **73**(5): 2758-2765.
- Schena, M, D Shalon, RW Davis and PO Brown (1995). "Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray." *Science* **270**(5235): 467-470.
- Schmit, JP, Mueller, G.M. (2007). "An estimate of the lower limit of global fungal diversity." *Biodivers. Conserv.* **16**: 99-111

- Segal, BH, J Kwon-Chung, TJ Walsh, BS Klein, M Battiwalla, NG Almyroudis, SM Holland and L Romani (2006). "Immunotherapy for fungal infections." *Clin Infect Dis* **42**(4): 507-515.
- Selmecki, A, A Forche and J Berman (2006). "Aneuploidy and isochromosome formation in drug-resistant *Candida albicans*." *Science* **313**(5785): 367-370.
- Setiadi, ER, T Doedt, F Cottier, C Noffz and JF Ernst (2006). "Transcriptional response of *Candida albicans* to hypoxia: linkage of oxygen sensing and Efg1p-regulatory networks." *J Mol Biol* **361**(3): 399-411.
- Sharkey, LL, MD McNemar, SM Saporito-Irwin, PS Sypherd and WA Fonzi (1999). "HWP1 functions in the morphological development of *Candida albicans* downstream of EFG1, TUP1, and RBF1." *J Bacteriol* **181**(17): 5273-5279.
- Shelest, E (2008). "Transcription factors in fungi." *FEMS Microbiology Letters* **286**(2): 145-151.
- Shepherd, MG, CY Yin, SP Ram and PA Sullivan (1980). "Germ tube induction in *Candida albicans*." *Can J Microbiol* **26**(1): 21-26.
- Shi, L, LH Reid, WD Jones, R Shippy, JA Warrington, SC Baker, PJ Collins, F de Longueville, ES Kawasaki, KY Lee, Y Luo, YA Sun, JC Willey, RA Setterquist, GM Fischer, W Tong, YP Dragan, DJ Dix, FW Frueh, FM Goodsaid, D Herman, RV Jensen, CD Johnson, EK Lobenhofer, RK Puri, U Schrf, J Thierry-Mieg, C Wang, M Wilson, PK Wolber, L Zhang, S Amur, W Bao, CC Barbacioru, AB Lucas, V Bertholet, C Boysen, B Bromley, D Brown, A Brunner, R Canales, XM Cao, TA Cebula, JJ Chen, J Cheng, TM Chu, E Chudin, J Corson, JC Corton, LJ Croner, C Davies, TS Davison, G Delenstarr, X Deng, D Dorris, AC Eklund, XH Fan, H Fang, S Fulmer-Smentek, JC Fuscoe, K Gallagher, W Ge, L Guo, X Guo, J Hager, PK Haje, J Han, T Han, HC Harbottle, SC Harris, E Hatchwell, CA Hauser, S Hester, H Hong, P Hurban, SA Jackson, H Ji, CR Knight, WP Kuo, JE LeClerc, S Levy, QZ Li, C Liu, Y Liu, MJ Lombardi, Y Ma, SR Magnuson, B Maqsodi, T McDaniel, N Mei, O Myklebost, B Ning, N Novoradovskaya, MS Orr, TW Osborn, A Papallo, TA Patterson, RG Perkins, EH Peters, R Peterson, KL Philips, PS Pine, L Pusztai, F Qian, H Ren, M Rosen, BA Rosenzweig, RR Samaha, M Schena, GP Schroth, S Shchegrova, DD Smith, F Staedtler, Z Su, H Sun, Z Szallasi, Z Tezak, D Thierry-Mieg, KL Thompson, I Tikhonova, Y Turpaz, B Vallanat, C Van, SJ Walker, SJ Wang, Y Wang, R Wolfinger, A Wong, J Wu, C Xiao, Q Xie, J Xu, W Yang, S Zhong, Y Zong and W Slikker, Jr. (2006). "The MicroArray Quality Control (MAQC) project shows inter- and intraplatform reproducibility of gene expression measurements." *Nat Biotechnol* **24**(9): 1151-1161.
- Siebert, PD, A Chenchik, DE Kellogg, KA Lukyanov and SA Lukyanov (1995). "An improved PCR method for walking in uncloned genomic DNA." *Nucleic Acids Res* **23**(6): 1087-1088.
- Silva, TM, PM Glee and KC Hazen (1995). "Influence of cell surface hydrophobicity on attachment of *Candida albicans* to extracellular matrix proteins." *J Med Vet Mycol* **33**(2): 117-122.
- Slutsky, B, M Staebell, J Anderson, L Risen, M Pfaller and DR Soll (1987). "'White-opaque transition': a second high-frequency switching system in *Candida albicans*." *J Bacteriol* **169**(1): 189-197.
- Sohn, K and S Rupp (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, I Senyurek, J Fertey, A Konigsdorfer, C Joffroy, N Hauser, G Zelt, H Brunner and S Rupp (2006). "An in vitro assay to study the transcriptional response during adherence of *Candida albicans* to different human epithelia." *FEMS Yeast Res* **6**(7): 1085-1093.

- Sohn, K, C Urban, H Brunner and S Rupp (2003). "EFG1 is a major regulator of cell wall dynamics in *Candida albicans* as revealed by DNA microarrays." *Mol Microbiol* **47**(1): 89-102.
- Sonneborn, A, DP Bockmuhl and JF Ernst (1999). "Chlamyospore formation in *Candida albicans* requires the Efg1p morphogenetic regulator." *Infect Immun* **67**(10): 5514-5517.
- Sonneborn, A, DP Bockmuhl, M Gerads, K Kurpanek, D Sanglard and JF Ernst (2000). "Protein kinase A encoded by TPK2 regulates dimorphism of *Candida albicans*." *Mol Microbiol* **35**(2): 386-396.
- Spiering, MJ, GP Moran, M Chauvel, DM Maccallum, J Higgins, K Hokamp, T Yeomans, C d'Enfert, DC Coleman and DJ Sullivan (2010). "Comparative transcript profiling of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* identifies SFL2, a *C. albicans* gene required for virulence in a reconstituted epithelial infection model." *Eukaryot Cell* **9**(2): 251-265.
- Staab, JF, SD Bradway, PL Fidel and P Sundstrom (1999). "Adhesive and mammalian transglutaminase substrate properties of *Candida albicans* Hwp1." *Science* **283**(5407): 1535-1538.
- Staib, P, M Kretschmar, T Nichterlein, H Hof and J Morschhauser (2002). "Transcriptional regulators Cph1p and Efg1p mediate activation of the *Candida albicans* virulence gene SAP5 during infection." *Infect Immun* **70**(2): 921-927.
- Staib, P, U Lermann, J Blass-Warmuth, B Degel, R Wurzner, M Monod, T Schirmeister and J Morschhauser (2008). "Tetracycline-inducible expression of individual secreted aspartic proteases in *Candida albicans* allows isoenzyme-specific inhibitor screening." *Antimicrob Agents Chemother* **52**(1): 146-156.
- Staib, P and J Morschhauser (1999). "Chlamyospore formation on Staib agar as a species-specific characteristic of *Candida dubliniensis*." *Mycoses* **42**(9-10): 521-524.
- Staib, P and J Morschhauser (2005). "Liquid growth conditions for abundant chlamyospore formation in *Candida dubliniensis*." *Mycoses* **48**(1): 50-54.
- Stark, A, MF Lin, P Kheradpour, JS Pedersen, L Parts, JW Carlson, MA Crosby, MD Rasmussen, S Roy, AN Deoras, JG Ruby, J Brennecke, E Hodges, AS Hinrichs, A Caspi, B Paten, SW Park, MV Han, ML Maeder, BJ Polansky, BE Robson, S Aerts, J van Helden, B Hassan, DG Gilbert, DA Eastman, M Rice, M Weir, MW Hahn, Y Park, CN Dewey, L Pachter, WJ Kent, D Haussler, EC Lai, DP Bartel, GJ Hannon, TC Kaufman, MB Eisen, AG Clark, D Smith, SE Celniker, WM Gelbart and M Kellis (2007). "Discovery of functional elements in 12 *Drosophila* genomes using evolutionary signatures." *Nature* **450**(7167): 219-232.
- Stokes, C, GP Moran, MJ Spiering, GT Cole, DC Coleman and DJ Sullivan (2007). "Lower filamentation rates of *Candida dubliniensis* contribute to its lower virulence in comparison with *Candida albicans*." *Fungal Genet Biol* **44**(9): 920-931.
- Stoldt, VR, A Sonneborn, CE Leuker and JF Ernst (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**(8): 1982-1991.
- Strijbis, K and B Distel (2010). "Intracellular acetyl unit transport in fungal carbon metabolism." *Eukaryot Cell* **9**(12): 1809-1815.
- Sudbery, P (2007). "Morphogenesis of a human fungal pathogen requires septin phosphorylation." *Dev Cell* **13**(3): 315-316.

- Sudbery, P, N Gow and J Berman (2004). "The distinct morphogenic states of *Candida albicans*." *Trends Microbiol* **12**(7): 317-324.
- Sullivan, DJ, GP Moran and DC Coleman (2005). "Candida dubliniensis: ten years on." *FEMS Microbiol Lett* **253**(1): 9-17.
- Sullivan, DJ, TJ Westerneng, KA Haynes, DE Bennett and DC Coleman (1995). "Candida dubliniensis sp. nov.: phenotypic and molecular characterization of a novel species associated with oral candidosis in HIV-infected individuals." *Microbiology* **141** (Pt 7): 1507-1521.
- Sultan, M, MH Schulz, H Richard, A Magen, A Klingenhoff, M Scherf, M Seifert, T Borodina, A Soldatov, D Parkhomchuk, D Schmidt, S O'Keefe, S Haas, M Vingron, H Lehrach and ML Yaspo (2008). "A global view of gene activity and alternative splicing by deep sequencing of the human transcriptome." *Science* **321**(5891): 956-960.
- Sundstrom, P, E Balish and CM Allen (2002). "Essential role of the *Candida albicans* transglutaminase substrate, hyphal wall protein 1, in lethal oroesophageal candidiasis in immunodeficient mice." *J Infect Dis* **185**(4): 521-530.
- Suzuki, H, T Yaoi, J Kawai, A Hara, G Kuwajima and S Wantanabe (1996). "Restriction landmark cDNA scanning (RLCS): a novel cDNA display system using two-dimensional gel electrophoresis." *Nucleic Acids Res* **24**(2): 289-294.
- Synnott, JM, A Guida, S Mulhern-Haughey, DG Higgins and G Butler (2010). "Regulation of the hypoxic response in *Candida albicans*." *Eukaryot Cell* **9**(11): 1734-1746.
- Tan, PK, TJ Downey, EL Spitznagel, Jr., P Xu, D Fu, DS Dimitrov, RA Lempicki, BM Raaka and MC Cam (2003). "Evaluation of gene expression measurements from commercial microarray platforms." *Nucleic Acids Res* **31**(19): 5676-5684.
- Taylor, JP, ML McKenna and GP Butler (2010). "Monitoring and evaluating school nutrition and physical activity policies." *Can J Public Health* **101 Suppl 2**: S24-27.
- Tebarth, B, T Doedt, S Krishnamurthy, M Weide, F Monterola, A Dominguez and JF Ernst (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**(5): 949-962.
- Timpel, C, S Zink, S Strahl-Bolsinger, K Schroppel and J Ernst (2000). "Morphogenesis, adhesive properties, and antifungal resistance depend on the Pmt6 protein mannosyltransferase in the fungal pathogen *Candida albicans*." *J Bacteriol* **182**(11): 3063-3071.
- Urban, C, K Sohn, F Lottspeich, H Brunner and S Rupp (2003). "Identification of cell surface determinants in *Candida albicans* reveals Tsa1p, a protein differentially localized in the cell." *FEBS Lett* **544**(1-3): 228-235.
- Velculescu, VE, L Zhang, B Vogelstein and KW Kinzler (1995). "Serial analysis of gene expression." *Science* **270**(5235): 484-487.
- Vilela, MM, K Kamei, A Sano, R Tanaka, J Uno, I Takahashi, J Ito, K Yarita and M Miyaji (2002). "Pathogenicity and virulence of *Candida dubliniensis*: comparison with *C. albicans*." *Med Mycol* **40**(3): 249-257.
- Ward, MP, CJ Gimeno, GR Fink and S Garrett (1995). "SOK2 may regulate cyclic AMP-dependent protein kinase-stimulated growth and pseudohyphal development by repressing transcription." *Mol Cell Biol* **15**(12): 6854-6863.

- Wey, SB, M Mori, MA Pfaller, RF Woolson and RP Wenzel (1988). "Hospital-acquired candidemia. The attributable mortality and excess length of stay." *Arch Intern Med* **148**(12): 2642-2645.
- White, TC and N Agabian (1995). "Candida albicans secreted aspartyl proteinases: isoenzyme pattern is determined by cell type, and levels are determined by environmental factors." *J Bacteriol* **177**(18): 5215-5221.
- Whiteway, M and C Bachewich (2007). "Morphogenesis in Candida albicans." *Annu Rev Microbiol* **61**: 529-553.
- Whiteway, M and U Oberholzer (2004). "Candida morphogenesis and host-pathogen interactions." *Curr Opin Microbiol* **7**(4): 350-357.
- Wiesner, SM, CM Bendel, DJ Hess, SL Erlandsen and CL Wells (2002). "Adherence of yeast and filamentous forms of Candida albicans to cultured enterocytes." *Crit Care Med* **30**(3): 677-683.
- Wilhelm, BT, S Marguerat, S Watt, F Schubert, V Wood, I Goodhead, CJ Penkett, J Rogers and J Bahler (2008). "Dynamic repertoire of a eukaryotic transcriptome surveyed at single-nucleotide resolution." *Nature* **453**(7199): 1239-1243.
- Wilson, LS, CM Reyes, M Stolpman, J Speckman, K Allen and J Beney (2002). "The direct cost and incidence of systemic fungal infections." *Value Health* **5**(1): 26-34.
- Wilson, RA and HN Arst, Jr. (1998). "Mutational analysis of AREA, a transcriptional activator mediating nitrogen metabolite repression in Aspergillus nidulans and a member of the "streetwise" GATA family of transcription factors." *Microbiol Mol Biol Rev* **62**(3): 586-596.
- Woodcock, DM, PJ Crowther, J Doherty, S Jefferson, E DeCruz, M Noyer-Weidner, SS Smith, MZ Michael and MW Graham (1989). "Quantitative evaluation of Escherichia coli host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants." *Nucleic Acids Res* **17**(9): 3469-3478.
- Wu, T, LP Samaranyake, WK Leung and PA Sullivan (1999). "Inhibition of growth and secreted aspartyl proteinase production in Candida albicans by lysozyme." *J Med Microbiol* **48**(8): 721-730.
- Yuen, T, E Wurmbach, RL Pfeffer, BJ Ebersole and SC Sealfon (2002). "Accuracy and calibration of commercial oligonucleotide and custom cDNA microarrays." *Nucleic Acids Res* **30**(10): e48.
- Zavalza-Stiker, A (2006). "Rapid production of Candida albicans chlamydospores in liquid Media under various incubation conditions." *Jpn.J.Med.Mycol* **47**: 231-234.
- Zhang, N, RD Cannon, BR Holland, ML Patchett and J Schmid (2010). "Impact of genetic background on allele selection in a highly mutable Candida albicans gene, PNG2." *PLoS One* **5**(3): e9614.
- Zhu, YY, EM Machleder, A Chenchik, R Li and PD Siebert (2001). "Reverse transcriptase template switching: a SMART approach for full-length cDNA library construction." *Biotechniques* **30**(4): 892-897.
- Zhumabayeva, B, L Diatchenko, A Chenchik and PD Siebert (2001). "Use of SMART-generated cDNA for gene expression studies in multiple human tumors." *Biotechniques* **30**(1): 158-163.
- Zou, KH, K Tuncali and SG Silverman (2003). "Correlation and simple linear regression." *Radiology* **227**(3): 617-622.

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: „Introduction to Fungi“ - Dr. M. Fayyaz & Kandis Elliot, University of Wisconsin,.....	12
Abbildung 2: Phylogenie der Pilze.....	13
Abbildung 3: Zellwand-Aufbau in <i>Candida albicans</i>	19
Abbildung 4: Verwertung von primärer oder sekundärer Stickstoffquelle in <i>Candida albicans</i>	24
Abbildung 5: Vorkommende morphologische Formen von <i>Candida albicans</i>	25
Abbildung 6: Induktion und Regulation morphogenetischer Prozesse in <i>Candida albicans</i> durch unterschiedliche Umweltsignale und Signaltransduktionswege.....	28
Abbildung 7: Schematische Übersicht der MESSAGE-Technologie.....	69
Abbildung 8: Übersicht verschiedener Subpopulationen.....	74
Abbildung 9: Morphologie der klinischen Isolate von <i>C. albicans</i> und <i>C. dubliniensis</i> in YPD.....	82
Abbildung 10: Morphologie von <i>C. albicans</i> und <i>C. dubliniensis</i> Wildtypstämmen unter verschiedenen Wachstumsbedingungen.....	83
Abbildung 11: Prinzip der MESSAGE-Technologie.....	86
Abbildung 12: Kontrolle der Probenkomplexität und der Auftrennungskapazität.....	89
Abbildung 13: Differentielle Gen-expressionsanalyse mithilfe der MESSAGE-Technologie.....	91
Abbildung 14: Statistische Auswertung des <i>Candida albicans</i> Transkriptoms.....	93
Abbildung 15: Multiple Spots und ihre Reproduzierbarkeit.....	94
Abbildung 16: <i>De novo</i> -Annotation einer neuen transkriptionellen Einheit in <i>C. albicans</i>	96
Abbildung 17: Validierung von MESSAGE mit unabhängigen Methoden wie DNA-Mikroarrays und qRT-PCR.....	99
Abbildung 18: Übersicht der Stoffwechselwege des Kohlenhydratmetabolismus.....	102
Abbildung 19: Sequenz-Logo der konservierten APSES-Domäne.....	105
Abbildung 20: Genlokus von <i>MOM1</i> (<i>Cd36_33560</i>).....	107
Abbildung 21: Schematischer Übersicht der <i>MOM1</i> -Deletions- und Reintegrationsstamm-Herstellung.....	110
Abbildung 22: Morphologische Unterschiede unter Standardbedingung.....	112
Abbildung 23: Sedimentationsverhalten der <i>C. dubliniensis</i> -Stämme.....	113
Abbildung 24: Funktionelle Charakterisierung des Mom1p unter verschiedenen Wachstumsbedingungen.....	114
Abbildung 25: Sequenzvergleich der beiden homologen APSES-Proteine Efg1p (Ca) und Mom1p (Cd).....	115
Abbildung 26: Ektopische Expression von <i>EFG1</i> und <i>MOM1</i> im <i>C. albicans</i> <i>efg1Δ</i> -Deletionsstamm.....	117
Abbildung 27: Vergleichende funktionelle Charakterisierung des <i>efg1Δ</i> -Deletionsstammes nach ektopischer Expression von <i>MOM1</i> und <i>EFG1</i>	118
Abbildung 28: Schematische Übersicht von Konstrukten und dem Integrationsort zur heterologen <i>EFG1</i> -Expression im homozygoten <i>mom1Δ</i> -Deletionsstamm von <i>C. dubliniensis</i>	120
Abbildung 29: Funktionelle Komplementierung im Vollmedium.....	122
Abbildung 30: Funktionelle Komplementierung der Hypheninduktion.....	123
Abbildung 31: Auswirkung der <i>CaEFG1</i> -Expression in <i>Candida dubliniensis</i> auf die Morphogenese.....	124

Abbildung 32: Adhäsionskinetik von verschiedenen <i>Candida</i> -Stämme auf unterschiedlichen Oberflächen.....	130
Abbildung 33: Messung des Invasionsverhaltens mittels RTCA.....	132
Abbildung 34: Einfluss von Calcofluor White und Congo Red auf das Wachstumsverhalten von verschiedenen <i>C. albicans</i> und <i>C. dubliniensis</i> -Stämme.....	134
Abbildung 35: APSES-Proteine und ihr Einfluss auf die Zellwand.	136
Abbildung 36: Kinetik der relativen Expression von <i>EFG1</i> und <i>MOM1</i> in den entsprechenden Wildtypstämmen.....	138
Abbildung 37: Kinetik der <i>EFG1</i> -Regulation nach heterologer Expression des <i>EFG1</i> (mit Promotor und ORF) im <i>mom1Δ</i> -Deletionsstamm.	140
Abbildung 38: Unterschiedliche Morphologie der Deletionsstämmen auf Agarplatten mit Hefe-Kohlenstoff (YCB) supplementiert nur mit Rinderserumalbumin (BSA) oder zusätzlich mit Hefeextrakt bei saurem pH.	141
Abbildung 39: Wachstumsverhalten der Wildtypstämmen aus unterschiedlichen N-Quellen.....	143
Abbildung 40: Unterschiedliche Wachstumskinetik der verschiedenen <i>Candida</i> - Stämme in YCB-Medien supplementiert mit einer oder zwei Stickstoffquellen.....	145
Abbildung 41: Spezielle Morphologie des <i>mom1Δ</i> -Deletionsstammes in YCB-NH ₄ Cl-BSA.	146
Abbildung 42: Relative Genexpression einiger ausgewählter Gene unter unterschiedlichen stickstoffhaltigen Wachstumsbedingungen.....	148
Abbildung 43: Wachstumskinetik der Stämme, nach und ohne Zugabe einer zweiten Stickstoffquelle.....	149
Abbildung 44: Einfluss des Zeitpunkts der BSA-Zugabe auf das Wachstumsverhalten in <i>C. albicans</i>	151
Abbildung 45: Wachstumskinetik des <i>C. albicans</i> Wildtypstammes SC5314 in YCB-NH ₄ Cl nach Zugabe von unterschiedlichen BSA-Konzentrationen.	152
Abbildung 46: Untersuchung der Expressionskinetik von ausgewählten Genen im YCB-NH ₄ Cl-Medium vor und nach der BSA-Zugabe (15 min und 24 h).....	153
Abbildung 47: Wachstumsverhalten der <i>C. albicans</i> Wildtypstämmen mit ektopischer <i>MEP2</i> -Expression unter YCB-NH ₄ Cl ohne oder nach Zugabe von BSA.	155

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Verwendete Enzyme.....	32
Tabelle 2: Verwendete Antibiotika oder Antimycotica.....	33
Tabelle 3: Verwendete Kit-Systeme.....	33
Tabelle 4: Verwendete Pufferlösungen.....	34
Tabelle 5: Verwendete Kulturmedien für Bakterien und Hefen.....	34
Tabelle 6: Oligonukleotide für die Herstellung der Stämme.....	36
Tabelle 7: Oligonukleotide für Nachweis und Sequenzierung.....	37
Tabelle 8: Oligonukleotide & Sonden für qRT-PCR (für <i>C. albicans</i>).....	38
Tabelle 9: Oligonukleotide & Sonden für qRT-PCR (für <i>C. dubliniensis</i>).....	39
Tabelle 10: Zusammenstellung der Oligonukleotide für die Probenvorbereitung der <i>MESSAGE</i> -Technologie.....	40
Tabelle 11: In dieser Arbeit verwendete und hergestellte Plasmide.....	41
Tabelle 12: In dieser Arbeit verwendete Zelllinien.....	41
Tabelle 13: Verwendete und hergestellte <i>Candida albicans</i> oder <i>Candida dubliniensis</i> –Stämme.....	42
Tabelle 14: Zusammenstellung der mit <i>MESSAGE</i> identifizierten Transkripte während des Hefe-Hyphe-Übergangs in <i>C. albicans</i> *.....	98
Tabelle 15: Differentiell regulierte Gene des <i>C. dubliniensis</i> Wildtypstammes während des Hefe-Hyphe Übergangs*.....	101
Tabelle 16: Differentielle Genexpression in YPD.....	125
Tabelle 17: Differentielle Genexpression in H ₂ O + 10% FCS.....	127

DANKSAGUNG

Was wäre diese Arbeit ohne die Hilfe und tatkräftige Unterstützung von vielen Personen, bei denen ich mich an dieser Stelle ganz herzlich bedanken möchte:

- bei **Prof. Dr. Herwig Brunner** und **Prof. Dr. Thomas Hirth** für die Möglichkeit der Durchführung dieser Dissertation unter hervorragenden Arbeitsbedingungen am Institut für Grenzflächenverfahrenstechnik (IGVT) der Universität Stuttgart.
- **PD Dr. Steffen Rupp** danke ich sehr herzlich für sein Interesse an der vorliegenden Arbeit, die anregende Diskussionsbereitschaft sowie die Bereitschaft, diese Arbeit als Hauptberichter zu prüfen.
- Mein Dank gilt auch **Prof. Dr. Dieter Wolf** für die freundliche Übernahme des Koreferats.
- Ebenfalls sehr großer Dank gebührt der „**Landesgraduierföderung Baden-Württemberg**“ für die Gewährung eines Promotionsstipendiums.
- Mein größter Dank gilt insbesondere meinem Betreuer **Dr. Kai Sohn** einfach für alles! Lieber Kai, Deine Begeisterung für die Wissenschaft, Deine niemals endende Motivation und Inspiration, Deine herausragende Betreuung waren und sind für mich von unschätzbarem Wert. Ich danke Dir für Dein Vertrauen und bin sehr glücklich, Dich als Lehrer (gehabt) zu haben. Vielen Dank!
- Einen sehr großen Dank möchte ich **Julia Küsel, Edith Schneider, Özlem Sogukpinar** sowie „meinen“ Praktikanten **Michael Berg, Christian Grumaz** und **Silke Palzer** aussprechen. Ihr wart einfach großartig! Ich danke Euch für Eure tatkräftige Unterstützung, eure Motivation und die Bereitschaft (auch unsinnige) Experimente mitzumachen. Ich hoffe, Ihr behält Euren Spaß an der Wissenschaft bei. Ich wünsche Euch auf jeden Fall viel Erfolg!
- Meinen „ehemaligen“ Büro-Mädels **Martina Brachhold** und **Sonja Weishaupt** gebührt ebenfalls ein großer Dank für die schönen und lustigen Stunden im Büro. Ihr habt unsere gemeinsame Zeit zu etwas ganz Besonderem gemacht, an die ich immer (mit einem Grinsen) zurückdenken werde ☺!

-
- Bei der ganzen Arbeitsgruppe „**Functional Genomics**“ möchte ich mich für eine wunderschöne, gemeinsame Zeit, eine sehr gute Zusammenarbeit sowie die vielen, wertvollen fachlichen Diskussionen bedanken.
 - Allen ehemaligen und jetzigen Mitarbeiter der Abteilung „Molekulare Biotechnologie“ insbesondere **Marija Dukalska, Mascha Kallnischkies, Dr. Xin Xiong, Gabi Zelt, Dr. Ekkehard Hiller, Frauke Purschke, Petra Keller** möchte ich für die ausgesprochen gute, hilfsbereite Arbeitsatmosphäre danken. Liebe **Marija**, lieber **Xin**, ich danke Euch für Eure Freundschaft!
 - Ein herzlicher Dank gilt auch **Dr. Marc Röhm**, nicht nur für eine hervorragende Einführung in die Laborarbeit, sondern auch für eine schöne gemeinsame Zeit außerhalb des Labors.
 - Zuletzt gilt mein ganz besonderer Dank **meiner Familie** (meinen Eltern, meiner Schwester), die mich in jeder Hinsicht unterstützt und aufgemuntert hat und für mich ein wichtiger Rückhalt ist. Euch zu haben, tut einfach gut! Ich danke Euch für alles!

LEBENS LAUF

	<p>von Elena Lindemann geboren am 12.12.1980 in Karaganda/Kasachstan</p>
Schulbildung	
1987 - 1990	Grundschule in Karaganda/Kasachstan
1990 - 1991	Hauptschule Lebach/Saarland
1991 - 1993	Realschule Lebach/Saarland
1993 - 1994	Johannes-Kepler-Gymnasium Lebach/Saarland
1994 - 2000	Albert-Schweitzer-Gymnasium (math.-naturwiss. Richtung) in Neckarsulm/Baden-Württemberg Abschluss: Allgemeine Hochschulreife
Studium/Promotion	
10/2000 – 01/2006	Studiengang Biologie (Diplom) an der Universität Hohenheim Schwerpunkte: Mikrobiologie, Biochemie und Zelluläre Mikrobiologie
Diplom	
03/2005 - 01/2006	Anfertigung der Diplomarbeit am Fraunhofer Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik (IGB), Stuttgart Titel: „Entwicklung alternativer Verfahren zur Genexpressionsanalyse“ Abschluss als Dipl.-Biol.
seit 06/2006	Promotion am Institut für Grenzflächenverfahrenstechnik (IGVT), Universität Stuttgart unter Betreuung von Dr. Kai Sohn, Fraunhofer Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik (IGB), Stuttgart
seit 02/2011	Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Fraunhofer Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik (IGB), Stuttgart

Elena Lindemann

Stuttgart, den 01. Juli 2011

PUBLIKATIONEN

Zeitschriftenbeiträge

Lindemann E., Grumaz C., Berg M., Lorenz S., Kuesel J., Rupp S., Sohn K.

Functional Comparison of a Morphogenetic Regulator in *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*

Manuskript in Vorbereitung

Roehm M., **Lindemann E.**, Trkulja D., Sogukpinar O., Hiller E., Brunner H., Rupp S., Urban C.F., Sohn K.

A family of secreted pathogenesis-related proteins in *Candida albicans*

Manuskript in Revision

Lindemann E., Rohde B., Rupp S., Regenbogen J., Sohn K.

A Multidimensional Electrophoretic System of Separation for the Analysis of Gene Expression (*MESSAGE*)

Electrophoresis, 2010, 31, 1330-1343

Sohn K., **Lindemann E.**

Genexpressionsanalysen mittels 2D-cDNA-Gelelektrophorese.

Eine neue, universelle Methode zur Transkriptionsanalyse

GIT Spezial Separation, 2006, 1, 16-17.

Lindemann E., Rupp S., Sohn K.

Universelles Verfahren für die Genexpressionsanalyse

BIOspektrum, 2006, 6, 636-637.

Konferenzvorträge

Lindemann E.

An Universal Approach for the Transcriptional Profiling in Fungal Pathogens

Statusworkshop of the DGHM Fachgruppe „Eukaryotic Pathogens“

23./24.02.2007 in Stuttgart

Lindemann E.

“Characterization of *MOM1*, a Modulator of Morphogenesis in *Candida dubliniensis*”

Statusworkshop of the DGHM Fachgruppe „Eukaryotic Pathogens“

15./16. 02. 2008 in Würzburg

Posterpräsentationen

Lindemann E., Grumaz C., Küsel J., Rupp S., Sohn K.

APSES Proteins Play a Crucial Role for Nitrogen Utilization in Pathogenic *Candida* Species

3th FEBS Advanced Lecture Course „Human Fungal Pathogens“, 2. – 8. Mai, 2009

La Colle sur Loup, Frankreich

Lindemann E., Grumaz C., Rohde B., Rupp S., Regenbogen J., Sohn K.

Open Platform Technologies for Unbiased Analyses of Gene Expression in Fungal Pathogens

3th FEBS Advanced Lecture Course „Human Fungal Pathogens“, 2. – 8. Mai, 2009

La Colle sur Loup, Frankreich

Lindemann E., Grumaz C., Sogukpinar Ö., Berg M., Rupp S., Sohn K.

Characterization of *MOM1*, a Modulator of Morphogenesis in *Candida dubliniensis*

9th Candida and Candidiasis, ASM Conference, 24. -28. März, 2008

New York, USA

Lindemann E., Berg M., Grumaz C., Rupp S., Sohn K.

Phenotypic Characterization and Regulation of Morphogenesis in *Candida dubliniensis*

2th FEBS Advanced Lecture Course „Human Fungal Pathogens“, 11.-17. Mai, 2007

La Colle sur Loup, Frankreich

Lindemann E., Rohde B., Regenbogen J., Rupp S., Sohn K.

An Universal Approach for the Analysis of Differential Gene Expression in Fungal Pathogens

2th FEBS Advanced Lecture Course „Human Fungal Pathogens“, 11.-17. Mai, 2007

La Colle sur Loup, Frankreich

Lindemann E., Rohde B., Rupp S., Regenbogen J., Sohn K.

A universal system for the global transcriptional analysis of any eukaryotic organism based on high resolution two-dimensional DNA-gelelectrophoresis

5th NGFN-Meeting, 25.11.2006, Heidelberg, Deutschland

Lindemann E., Rohde B., Rupp S., Regenbogen J., Sohn K.

A universal system for the global transcriptional analysis of any eukaryotic organism based on high resolution two-dimensional DNA-gelelectrophoresis

ISPPP 2006 – Konferenz 26th International Symposium on the Separation of Proteins, Peptides and Polynucleotides, October 17-20, 2006

Innsbruck, Österreich

ERKLÄRUNG

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Zuhilfenahme der angegebenen Quellen und Hilfsmittel verfasst habe. Sie wurde weder in dieser, noch in ähnlicher Form, bei einer anderen Institution vorgelegt.

Stuttgart, den 01. Juli 2011

Trotz einer sehr nahen phylogenetischen Verwandtschaft und ihrer Fähigkeit zur Ausbildung von ähnlichen morphologischen Strukturen, unterscheiden sich die beiden humanpathogene Hefepilze *Candida albicans* und *Candida dubliniensis* deutlich in ihrer Pathogenität. Ein Vergleich der beiden *Candida*-Arten im Hinblick auf die Induktion und Regulation von morphologischen Differenzierungsprozessen sollte zur Aufklärung beitragen, weshalb *C. albicans* gegenüber *C. dubliniensis* besser an den Wirt Mensch adaptiert ist und welche Mechanismen und Virulenzfaktoren zu dieser unterschiedlichen Pathogenität beitragen.

In der vorliegenden Arbeit wurde in *C. dubliniensis* ein zentraler Morphogeneseregulator funktionell charakterisiert und mit dem orthogonalen Protein in *C. albicans* verglichen. Neben der Morphologie haben beide Proteine einen großen Einfluss auf den Zellwandaufbau, den Kohlenhydrat- und Stickstoffmetabolismus, sowie das Adhäsions- und Invasionsverhalten des Pilzes. Der signifikante Unterschied zwischen den beiden so nah verwandten Arten scheint jedoch in der unterschiedlichen Expression dieser Gene und der Aktivierung von unterschiedlichen Signaltransduktionswegen zu liegen.

ISBN 978-3-8396-0473-1



9 783839 604731