

**Hypoxische Adaptation des
humanpathogenen Pilzes
*Candida albicans***

INAUGURAL-DISSERTATION

zur
Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Catrin Stichternoth
aus Willich

Oktober 2009

Aus dem Institut für Mikrobiologie der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. J.F. Ernst
Koreferent: Prof. Dr. R. Freudl

Tag der mündlichen Prüfung: 11.12.2009

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Der humanpathogene Pilz <i>Candida albicans</i> und seine verschiedenen Wachstumsformen ...	1
1.2	Die Bedeutung von Sauerstoff für die Zelle	3
1.2.1	Hyloxische Genregulation in Säugerzellen.....	4
1.2.2	Hyloxische Genregulation in Hefen	6
1.2.3	Hyloxische Genregulation in <i>C. albicans</i>	7
1.3	Regulatoren des filamentösen Wachstums unter hypoxischen Bedingungen.....	9
1.3.1	Der Transkriptionsregulator Efg1.....	10
1.3.2	Die AGC-Kinase Sch9	12
1.4	Ziel dieser Arbeit.....	14
2	Material und Methoden	15
2.1	Chemikalien, Gase und Enzyme	15
2.2	Stämme und Medien	15
2.2.1	<i>E. coli</i> -Stämme	15
2.2.2	<i>C. albicans</i> -Stämme	15
2.2.3	Medien zur Anzucht von <i>E. coli</i>	16
2.2.4	Medien zur Anzucht von <i>C. albicans</i>	17
2.3	Anzucht von <i>C. albicans</i> -Stämmen	17
2.3.1	Inkubation von <i>C. albicans</i> unter normoxischen Bedingungen	17
2.3.2	Inkubation von <i>C. albicans</i> unter hypoxischen Bedingungen.....	17
2.3.3	Hypheninduktion von <i>C. albicans</i>	18
2.3.4	Biofilmbildung von <i>C. albicans</i>	18
2.3.5	Adhäsion von <i>C. albicans</i>	18
2.4	Plasmide und Primer	19
2.4.1	Plasmide	19
2.4.2	Primer	19
2.5	Methoden zum Arbeiten mit Nukleinsäuren.....	20
2.5.1	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	20
2.5.2	Isolierung von Gesamt-RNA aus <i>C. albicans</i>	20
2.5.3	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	21
2.5.4	Auftrennung von DNA-Fragmenten durch Gelelektrophorese	21
2.5.5	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	21
2.5.6	Phosphatasereaktion	22
2.5.7	Ligation	22
2.5.8	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	22

Inhaltsverzeichnis

2.6	Transformation.....	23
2.6.1	Transformation von <i>E. coli</i>	23
2.6.2	Transformation von <i>C. albicans</i>	23
2.7	Konstruktion von Plasmiden und Stämmen.....	23
2.7.1	<i>EFG1</i> unter der Kontrolle des Tet-On-Systems.....	23
2.7.2	Rekonstitution des <i>URA3</i> -Gens an seinem nativen Locus.....	24
2.7.3	Rekonstitution der <i>sch9</i> -Mutante.....	25
2.8	qRT-PCR.....	25
2.8.1	cDNA-Synthese aus gesamt-RNA mit Oligo(dT) Primern.....	26
2.8.2	Real-time PCR Reaktion und Quantifizierung.....	26
2.9	Transkriptomanalyse.....	28
2.9.1	DNA-Microarrays.....	28
2.9.2	Anzucht der Zellen für Microarrays.....	28
2.9.3	Synthese der Komplementär – DNA.....	29
2.9.4	Hybridisieren, Waschen und Scannen der DNA Microarrays.....	30
2.9.5	Normalisierung und statistische Auswertung.....	30
2.10	Untersuchung der Virulenz mit Hilfe eines Mausmodells (durchgeführt von Prof. Anna Vecchiarelli, Universität Perugia, Italien).....	31
3	Ergebnisse.....	32
3.1	Einfluss von Hypoxie auf das Hyphenwachstum von <i>C. albicans</i>	32
3.1.2	Koloniemorphologie des <i>efg1</i> -Deletionsstammes.....	32
3.1.2.1	Morphogenese bei 25 °C.....	33
3.1.2.2	Morphogenese bei 37 °C.....	34
3.2	<i>EFG1</i> unter der Regulation des Tet-On-Systems.....	34
3.2.1	Konstruktion der Tet-On- <i>EFG1</i> Stämme.....	35
3.2.2	Ermittlung des relativen Transkriptspiegels des Gens <i>EFG1</i> unter der Regulation des Tet-On-Systems mit Hilfe einer Real-time qRT-PCR.....	36
3.2.3	Genomweite Transkriptomanalyse von <i>EFG1</i> unter der Regulation des Tet-On-Systems.....	38
3.2.3.1	Transkriptomanalyse normoxisch Efg1-regulierter Gene.....	38
3.2.3.2	Transkriptomanalyse hypoxisch Efg1-regulierter Gene.....	40
3.3	Biofilmbildung von <i>C. albicans</i>	42
3.3.1	Biofilmbildung unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen.....	43
3.3.1.1	Mutanten, die unabhängig von Sauerstoff und CO ₂ einen Defekt in der Biofilmbildung zeigen.....	46
3.3.1.2	Mutanten, die einen Defekt in der Biofilmbildung unter normoxischen, aber nicht unter hypoxischen Bedingungen zeigen.....	47
3.3.1.3	Mutanten, deren defekte Biofilmbildung bei Hypoxie mit CO ₂ wieder hergestellt wird.....	48

Inhaltsverzeichnis

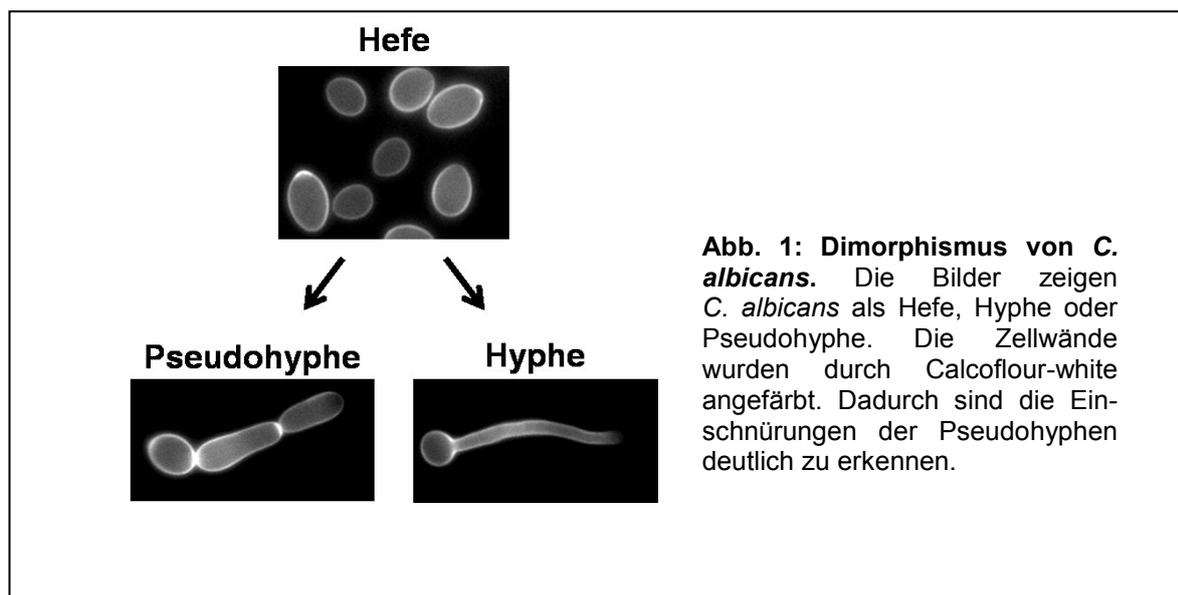
3.3.2	Adhäsion verschiedener <i>C. albicans</i> Mutantenstämme nach Wachstum unter normoxischen oder hypoxischen Bedingungen.....	49
3.4	Hypoxische Funktionen der Proteinkinase Sch9 und assoziierter Proteinkinasen	50
3.4.1	Zellmorphologie von Mutanten mit Defekten in Proteinkinasen	51
3.4.2	Abhängigkeit der Hyphenbildung von verschiedenen Sauerstoff- und Kohlendioxidkonzentrationen	54
3.4.2.1	Sensitivität gegenüber Sauerstoff.....	55
3.4.2.2	Sensitivität gegenüber Kohlendioxid.....	56
3.4.2.3	Sensitivität gegenüber Kohlendioxid unter normoxischen Bedingungen	58
3.4.3	Wachstum und Zellmorphologie in Flüssigmedium.....	59
3.4.4	Chronologische Alterung	61
3.4.5	Genomweite Transkriptomanalyse der <i>sch9</i> -Mutante.....	63
3.4.5.1	Gene, deren Transkripte in der <i>sch9</i> -Mutante erhöht wurden.....	64
3.4.5.2	Gene, deren Transkripte in der <i>sch9</i> -Mutante erniedrigt wurden.....	67
3.4.6	Einfluss der Kinase Sch9 auf die Virulenz von <i>C. albicans</i>	70
4.	Diskussion.....	72
4.1	Die Regulation der Hyphenbildung bei Hypoxie erfolgt durch einen alternativen Signalweg ..	74
4.2	Efg1 als Regulator des filamentösen Wachstums und der Biofilmbildung bei Hypoxie	75
4.3	Biofilmbildung verschiedener Mutantenstämme variiert in Abhängigkeit des O ₂ - und CO ₂ -Gehalts.....	77
4.4	Eine <i>SCH9</i> -Deletion in <i>C. albicans</i> verkürzt die Lebensspanne (CLS) im Gegensatz zu einer <i>sch9</i> -Deletion in <i>S. cerevisiae</i>	79
4.5	Die Genregulation durch Sch9 in <i>C. albicans</i> unterscheidet sich unter hypoxischen und normoxischen Wachstumsbedingungen	80
4.6	Sch9 als Teil des alternativen Signalweges der Hyphenbildung unter hypoxischen Bedingungen	81
5.	Zusammenfassung	84
6.	Literatur	86
7.	Abkürzungen	96

1 Einleitung

1.1 Der humanpathogene Pilz *Candida albicans* und seine verschiedenen Wachstumsformen

C. albicans gehört zur Abteilung der Ascomycota und ist ein fakultativ anaerober Hefepilz (Rottmann, 2002). Obwohl Paarungsprozesse stattfinden können (Dignard *et al.*, 2007), konnten bisher weder haploide Stadien noch Meiose oder Sporulation bei ihm nachgewiesen werden. Aus diesem Grund gilt *C. albicans* als ein obligat diploider Organismus (Hull und Johnson, 1999).

C. albicans besiedelt als Kommensale den menschlichen Körper und ist bei 30 % aller Menschen in den Schleimhäuten der Nase, des Darmtrakts und des Genitalbereichs zu finden (McCullough *et al.*, 1996; Sobel, 1997). Dabei kann er eine oberflächliche, aber auch eine lebensbedrohliche systemische Infektion auslösen (Brown und Gow, 1999). Letztere tritt vor allem bei immunsupprimierten Patienten auf, wobei es zu einem Pilzbefall der inneren Organe kommen kann, der in über 40 % der Fälle tödlich endet (Wey *et al.*, 1988; de Pauw und Meunier, 1999; Madigan *et al.*, 2006). Besonders häufig tritt eine Kandidose in Form eines Biofilms auf, bei dem sich die Zellen als mehrschichtige Ablage auf einer Oberfläche bilden und nur schwer durch Antimykotika zu beseitigen sind. *C. albicans* besitzt ein pleomorphes Wachstum. Das heißt, dass der Pilz zwischen verschiedenen Phänotypen wechseln kann, die durch unterschiedliche äußere Bedingungen wie Temperatur, Gaszusammensetzung oder pH-Wert beeinflusst werden können. Eine für die Virulenz ausschlaggebende Fähigkeit ist der als Dimorphismus bezeichnete Wechsel zwischen einer kugeligen Hefeform (Blastokonidie) und dem einer Hyphe (Odds, 1988).



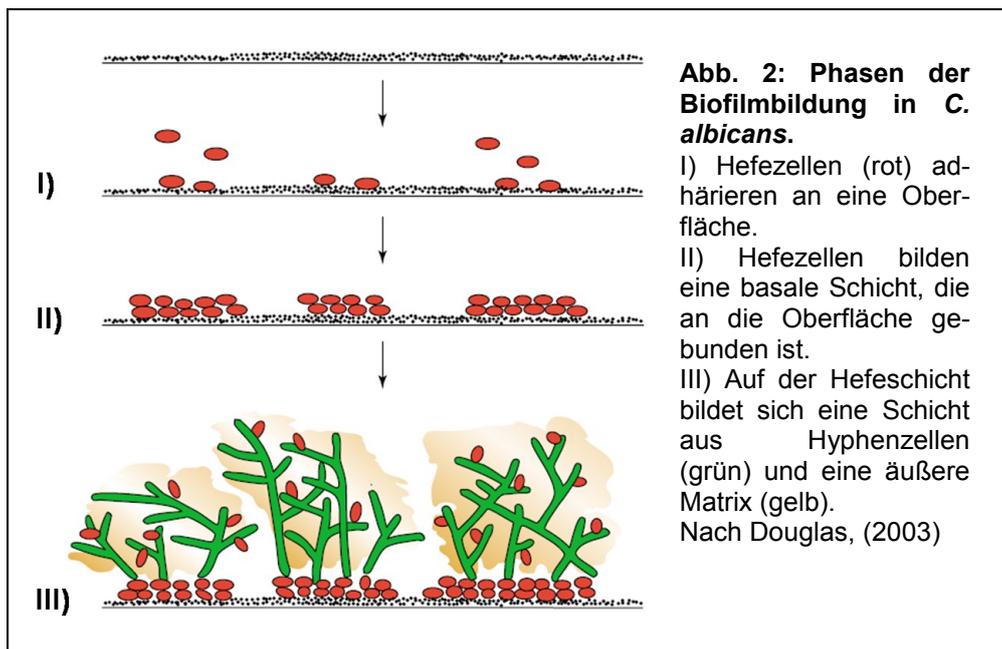
Einleitung

Die Hefeform vermehrt sich durch Abknospung einer Tochterzelle von der Mutterzelle. Bei filamentösem Wachstum unterscheidet man zwei verschiedene Wachstumsformen: echte Hyphen und Pseudohyphen. Echte Hyphen entstehen durch ein kontinuierliches Wachstum und durch anschließendes Einziehen von Septen, während Pseudohyphen durch unipolare Knospung gebildet werden, bei der die elongierte Tochterzelle in Kontakt mit der Mutterzelle bleibt (Abb. 1) (Odds *et al.*, 1988; Ernst, 2000).

Dieser Wechsel zwischen der Hefe- und der Hyphenform verschafft *C. albicans* große Vorteile bei der Ausbreitung und dem Organbefall im Wirt. Die Blastokonidie ist vor allem in der Lage, sich durch Knospung schnell zu vermehren und kann so mit Hilfe des Blutstroms im gesamten Körper verteilt werden (Cutler, 1991). Die Hyphenform dagegen ist aufgrund ihrer hydrophoben Oberfläche besonders geeignet an Epithelzellen zu adhären (Odds, 1994; Hostetter, 1994) und diese zu penetrieren. *C. albicans* kann durch die Filamentbildung auch nach einer Phagozytose aus Makrophagen wieder herauswachsen (Vasque-Torres und Balish, 1997). Neben diesen beiden Wachstumsformen sind die Zellen von *C. albicans* auch in der Lage, sogenannte Chlamydosporen und die *white*- oder *opaque*-Zellformen zu bilden. Chlamydosporen sind dickwandige Zellen, die meist am terminalen Ende von Hyphen- oder Pseudohyphenzellen entstehen. Die genaue Funktion dieser Zellen ist noch unbekannt, man vermutet jedoch, dass sie eine Überdauerungsform darstellen (Joshi *et al.*, 1993). *White*-Zellen sind die typischen kugeligen *Candida*-Hefezellen, während die Zellen der *opaque*-Form stäbchenförmig sind und punktförmige Auswüchse tragen. Ihre Koloniefarbe und -form ist nicht mehr rund und weiß (wie die der *white*-Zellen), sondern flach und gräulich (Slutsky *et al.*, 1987). Sie spielen möglicherweise eine Rolle in der Kolonialisierung von Zelloberflächen (Kvaal *et al.*, 1997; Kvaal *et al.*, 1999; Lachke *et al.*, 2003) und stellen im Vergleich zu den *white*-Zellen die paarungskompetentere Wachstumsform dar (Miller und Johnson, 2002).

Neben den beschriebenen Wachstumsformen ist *C. albicans* auch in der Lage, einen komplexen Biofilm zu bilden. Ein Biofilm ist ein dreidimensionaler Zusammenschluss von Mikroorganismen, die von einer äußeren Matrix umgeben und an eine Oberfläche gebunden sind. Das Wachstum auf biologischen Oberflächen, wie z. B. den Zelloberflächen eines Gewebes, aber auch auf Oberflächen implantierter Herzkatheter und Prothesen, sind wichtige Aspekte der Virulenz von *C. albicans* (Chandra *et al.*, 2001; Kumamoto und Vines, 2005). Die Biofilmbildung gewinnt eine immer bedeutendere Rolle in der Forschung, da darin enthaltene Zellen durch das Immunsystem des Wirtes und Antimykotika nur schwer angreifbar sind (Douglas, 2003; Kojic und Darouiche, 2004). Schätzungen gehen davon aus, dass die Mehrheit der im Krankenhaus zugezogenen Infektionen mit einer Biofilmbildung in Verbindung gebracht werden können (Licking, 1999; Potera, 1999; Donlan, 2001). Die Bildung eines Biofilms erfolgt nach Douglas (2003) in drei Schritten. 1.) Hefen adhären an eine Oberfläche,

2.) die Hefezellen bilden eine basale Schicht aus, 3.) auf der Hefeschicht bildet sich eine Schicht mit hyphenförmigen Zellen und der gesamte Zellkomplex wird von einer polymeren Matrix umgeben. Charakteristisch bei diesem Aufbau ist die Mischung der morphologisch unterschiedlichen Zellen. Mutantenstämme, die nicht in der Lage sind Filamente zu bilden (z. B. homozygote *efg1*- und *cph1*-Mutanten), zeigen eine defekte Biofilmbildung. Das lässt erkennen, dass die Hyphenbildung nicht nur alleine für die Adhärenz und die Penetration von Zellmembranen, sondern auch für den Aufbau und die Funktion des Biofilms eine wichtige Rolle spielt (Lewis *et al.*, 2002; Ramage *et al.*, 2002).



1.2 Die Bedeutung von Sauerstoff für die Zelle

Vor ca. 1,5 Billionen Jahren stieg der Sauerstoffgehalt durch die Photosynthese der ersten Cyanobakterien in der Erdatmosphäre an. Für die bis dahin anaerob lebenden Einzeller war Sauerstoff ein toxisches Molekül. Mittlerweile ist es jedoch für viele Lebewesen auf der Erde unerlässlich und dient als leistungsfähiger Elektronenakzeptor (Lindahl, 2008). Während der Energiegewinnung durch die oxidative Phosphorylierung führt eine unvollständige Reduktion des Sauerstoffs allerdings auch zur Bildung von hoch reaktiven Zwischenprodukten, sog. ROS (reactive oxygen species). Diese Radikale können Moleküle in ihrer Umgebung

wie Proteine, Lipide und Nukleinsäuren oxidieren, wodurch oxidativer Stress entsteht. Davor schützt sich die Zelle entweder auf enzymatischem Weg durch z.B. Katalasen und Superoxiddismutasen oder auf nicht-enzymatischem Weg durch Antioxidantien. Auf der anderen Seite schädigen ROS die Zellen nicht nur, sondern sie scheinen bei verschiedenen Regulationsabläufen sogar unerlässlich zu sein. Studien ergaben, dass freie Radikale als Signalmoleküle und Regulatoren der Transkription fungieren. Aguirre *et al.* (2005) und Hervouet *et al.* (2008) stellen sogar die These auf, dass ROS eine wichtige Rolle während der Anpassung der Zelle an hypoxische Bedingungen spielen.

1.2.1 Hypoxische Genregulation in Säugerzellen

Menschen und andere Säugetiere sind auf Sauerstoff angewiesen und würden ohne diesen nicht überleben können. In Säugern wird Sauerstoff mehr als alle anderen anorganischen oder organischen Substanzen verbraucht und der Verlust keiner anderen Substanz führt so schnell zum Tod. Schon vor der Geburt entwickeln Menschen komplexe respiratorische Systeme, um die Versorgung der etwa 10^{14} Zellen des erwachsenen Organismus mit Sauerstoff versorgen zu können (Semenza, 1998). Deshalb ist es für Säugerzellen wichtig, sich durch verschiedene Mechanismen an mögliche hypoxische Bedingungen anpassen zu können. Diese können entstehen, wenn sich der Organismus z. B. in einer Region mit einem niedrigen O_2 -Partialdruck befindet, wie er bei einem Aufenthalt in großer Höhe besteht. Im Bereich von soliden Tumoren entstehen im Körper ebenfalls Regionen, in denen Zellen hypoxischen Bedingungen ausgesetzt sind. Ein Ziel der Tumorforschung ist daher die Entwicklung von Medikamenten, die die hypoxische Antwort der Zellen regulieren und dadurch in der Krebstherapie eingesetzt werden können (Semenza, 2007).

Ein wichtiger Regulator der hypoxischen Antwort in Säugetierzellen ist der Transkriptionsfaktor Hif-1 (hypoxia inducible factor) (Semenza und Wang, 1992; Semenza, 2007). 1992 konnten Semenza und Mitarbeiter nachweisen, dass Hif1 an die HRE-Region (hypoxia response element) im Enhancer des menschlichen Erythropoetin-Gens (*EPO*) bindet und für dessen Transkription verantwortlich ist. *EPO* kodiert einen Wachstumsfaktor, der die Erythropoese und somit den Sauerstofftransport des Blutes reguliert (Wang *et al.*, 1995). Weitere Gene, die durch Hif1 reguliert werden, sind Gene des Eisentransports und der Eisenaufnahme (Rolfs *et al.*, 1997; Tacchini *et al.*, 1999), sowie der Glukoseaufnahme und Glykolyse (Semenza *et al.*, 1994; Ebert *et al.*, 1996; Semenza *et al.*, 1996). Hif1 ist ein heterodimeres Protein, das aus einer α - und

Einleitung

einer β -Untereinheit besteht, die eine bHLH (basic helix-loop-helix) und eine PAS-Domäne (benannt nach den ersten Proteinen, in denen das Motiv beschrieben wurde, PER, ARNT und SIM) gemeinsam haben (Jiang *et al.*, 1996). Beide Untereinheiten werden unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen konstitutiv synthetisiert (Schumacker, 2002). Liegt in der Zelle genügend Sauerstoff vor, wird die α -Untereinheit jedoch schnell abgebaut. Der erste Schritt der Degradation ist die Hydroxylierung zweier konservierter Prolinreste in der ODD-Region (oxygen dependent degradation) der α -Untereinheit durch das Enzym Prolyl-4-hydroxylase. Die katalytische Funktion der Prolyl-4-hydroxylase ist Abhängigkeit von Eisen, 2-Oxoglutarat, Ascorbat und Sauerstoff. Das Ascorbat wirkt vermutlich als Reduktionsmittel für das Eisen, das im zweiwertigen Zustand an das Enzym bindet. Werden den Zellen z. B. Eisenchelatoren zugegeben, führt das zu einer Stabilisierung der α -Untereinheit, da Eisenionen, die der Prolylhydroxylase als Kofaktor dienen, abgefangen werden. Weiterhin wurde auch beobachtet, dass die Stabilität von Hif1 α auch durch Zugabe von Übergangsmetallen, wie z. B. Kupfer, erhöht wird. Da die Prolylhydroxylase nur bei Sauerstoffanwesenheit aktiv ist, kann sie als direkter Sauerstoffsensor angesehen werden (Lando *et al.*, 2002; Michiels, 2004). Die hydroxylierte Region wird von einer E3-Ubiquitin-Ligase, dem von-Hippel-Lindau (VHL)-Protein, erkannt und in Proteasomen abgebaut (Ivan *et al.*, 2001; Jaakkola *et al.*, 2001). Durch eine Inaktivierung des VHL-Gens wird die α -Untereinheit bei Anwesenheit von Sauerstoff nicht mehr degradiert, wodurch bei Normoxie auch hypoxisch relevante Gene, wie z. B. für den Wachstumsfaktor VEGF (vascular growth factor) exprimiert werden. Menschen mit diesem Gendefekt leiden an dem sogenannten von-Hippel-Lindau Krebsyndrom und entwickeln eine hohe Anzahl von Tumoren im Körper (Clifford *et al.*, 2001). Lando *et al.* (2002) fanden eine dritte Hydroxylierungsstelle an einem konservierten Asparaginrest in der carboxyterminalen Transaktivierungsdomäne der Hif1 α -Untereinheit. Eine Hydroxylierung dieser Stelle führt zu einer sterischen Inhibition der Interaktion zwischen der Hif1 α -Untereinheit und dem für die Transkription nötige Koaktivator-Komplex CBP7p300, einer Histon-Acetyltransferase. Weitere Studien zeigten, dass die Konzentration freier Radikaler (ROS) bei Hypoxie steigt und dass diese die Prolylhydroxylase inhibieren (Guzy *et al.*, 2005; Schroedl *et al.*, 2002). Somit wird durch ROS die α -Untereinheit des Hif-Proteins vor Hydroxylierung geschützt und stabilisiert. Ergebnisse, dass von außen zugegebene Oxidantien die Stabilität von HIF1 α bei Normoxie unterstützen, bestätigen diese Theorie (Guzy *et al.*, 2005).

1.2.2 Hypoxische Genregulation in Hefen

Wie bei Säugetieren wird auch bei Hefen der Metabolismus durch Sauerstoff reguliert. Die Auswirkung von Sauerstoff auf die Genregulation wurde bereits bei *Schizosaccharomyces pombe* und *Saccharomyces cerevisiae* detailliert untersucht. Transkriptomanalysen zeigten, dass bei *S. pombe* unter hypoxischen Bedingungen die Gene der Ergosterol-, Fettsäure- und Hämbiosynthese, aber auch des fermentativen Metabolismus positiv reguliert werden, während Gene der Atmungskette reprimiert werden (Todd *et al.*, 2006). In *S. cerevisiae* wurden unter hypoxischen Bedingungen ebenfalls zahlreiche Gene reguliert, jedoch fielen diese zum Teil in andere funktionelle Kategorien (Ter Linde *et al.*, 1999; Becerra *et al.*, 2002). Auffällig war, dass bei Hypoxie eine Regulation der Glykolyse nicht stattfand (Ter Linde *et al.*, 1999). Als Sensor für molekularen Sauerstoff fungieren in der Hefe mehrere Mechanismen: 1.) Die Biosynthese von Häm, 2.) die Biosynthese von Ergosterol und 3.) die Biosynthese ungesättigter Fettsäuren.

Durch die O₂-abhängige Biosynthese von Häm wird der Transkriptionsfaktor Hap1 (heme activation protein) aktiviert, durch den wiederum die Transkription von Genen, die bei Wachstum unter normoxischen Bedingungen nötig sind, induziert wird. Dazu gehören z. B. Gene der Zellatmung oder der Antwort auf oxidativen Stress (Zhang und Guarente, 1995; Zhang und Hach, 1999). Außerdem aktiviert Hap1 die Transkription der Gene der Repressorproteine Rox1 und Mot3, die zusammen mit den Transkriptionsfaktoren Ssn6 und Tup1 die Expression der hypoxischen Gene hemmen. Hierbei bindet Rox1 an das betroffene cis-Element im Promotor hypoxischer Gene und durch Mot3 wird diese reprimierende Wirkung noch verstärkt (Zitomer und Lowry; 1992; Zitomer *et al.*, 1997; Kastaniotis und Zitomer, 2000; Kastaniotis *et al.*, 2000). Fehlt in der Zelle Sauerstoff, kann Häm nicht mehr gebildet werden und Rox1 und Mot3 können die Transkription der hypoxischen Gene nicht mehr inhibieren.

Der zweite Weg, über den die hypoxische Generegulation in Hefen erfolgt, ist der Ergosterolbiosyntheseweg. Dieser Weg ist ebenfalls in Säugetierzellen bekannt und wird dort unter anderem durch die Proteine SREBP (sterol regulatory element binding protein) und SCAP (SREBP cleavage-activation protein) reguliert. Der basic helix-loop-helix Transkriptionsfaktor SREBP ist als inaktives Protein in der Membran des ER verankert und wird bei einem niedrigem Sterolgehalt der Zelle durch SCAP zum Golgi-Apparat transportiert (DeBose-Boyd *et al.*, 1999). Dort wird der als Transkriptionsfaktor aktive Teil von SREBP abgespalten und wandert in den Zellkern, wo er Gene der Cholesterolsynthese und -aufnahme induziert (Horton *et al.*, 2003). Die homologen Proteine zu SREBP und SCAP in der Spaltheefe *S. pombe* sind Sre1 und Scp1. Sinkt unter hypoxischen Bedingungen die Sterolsynthese in der Zelle, wird Sre1 aktiviert und induziert etwa 68 % der Gene, deren Expression im Wildtyp bei Hypoxie mindestens zweifach

hochreguliert wird (Todd *et al.*, 2006). Obwohl Sre1 somit etwa zwei Drittel aller hypoxisch regulierten Gene reguliert, werden nur 22 % der Gene ausschließlich durch Sre1 kontrolliert, was auf noch weitere Regulationsmechanismen hinweist (Todd *et al.*, 2006). In der knospenden Hefe *S. cerevisiae* existiert die hypoxische Regulation durch Sre1 oder ein anderes SREBP-Homologes nicht. Dort steuert der Transkriptionsfaktor Upc2 die Ergosterolbiosynthese und Sterolaufnahme (Vik und Rine, 2001; Wilcox *et al.*, 2002). Außerdem werden in *S. cerevisiae* die in *S. pombe* durch Sre1 regulierten Gene (z.B. *ERG3*, *ERG25*, *HEM13* und *SUR2*) durch Rox1 gesteuert, was ebenfalls auf die Existenz unterschiedlicher Regulationsmechanismen hinweist (Hughes *et al.*, 2005).

Ein weiterer Mechanismus der Sauerstofferkennung beruht ebenfalls auf die Prozessierung von Vorläuferproteinen in der ER-Membran. Hierbei steigt bei sinkendem Sauerstoffspiegel die Zahl der gesättigten Fettsäuren in der Membran an, da diese durch das Enzym Desaturase nicht mehr oxidiert werden können. Eine durch die hohe Konzentration an gesättigten Fettsäuren nachlassende Fluidität der Zellmembran spielt wahrscheinlich eine Rolle bei der Aktivierung der in der ER-Membran als inaktive Vorläuferprotein ruhende Transkriptionsfaktoren Mga2 und Spt23 (Hoppe *et al.*, 2000; Rape *et al.* 2001). Diese Transkriptionsfaktoren aktivieren das Gen für die $\Delta 9$ -Fettsäuredesaturase Ole1, durch die das Einfügen neuer Doppelbindungen katalysiert wird (Zhang *et al.*, 1999; Vasconelles *et al.*, 2001). Ein Homolog zu dem Transkriptionsfaktor Hif1, der unter hypoxischen Bedingungen in Säugerzellen die Transkription hypoxischer Gene induziert, scheint es in Hefen nicht zu geben (Semenza, 2007). Ferreira und Mitarbeiter (2006) diskutieren dagegen, dass es in *S. cerevisiae* ein Analogon zu Hif1 geben könnte, da sie in Hefezellen eine regulatorische Bindesequenz gefunden haben, die der Hif1-Bindesequenz HRE (hypoxia response element) in Säugerzellen ähnelt. Um mehr über den Mechanismus der Hif1- und VHL-Regulation in Säugetierzellen zu erfahren, stellt *S. cerevisiae* einen geeigneten Modellorganismus dar, da Teile der hypoxischen Genregulation von Säugern bereits in Hefen rekonstituiert worden sind (Braliou *et al.*, 2006; Bex *et al.*, 2007; Alcaide-German *et al.*, 2008).

1.2.3 Hypoxische Genregulation in *C. albicans*

In vitro zeigt *C. albicans* verschiedene Phänotypen bei Wachstum unter hypoxischen Bedingungen. Zum einen bilden die Zellen Chlamydosporen, wenn sie auf einem festen Medium wachsen und gleichzeitig von einem Deckglas bedeckt sind. Sonneborn *et al.* (1999) schlossen daraus, dass die Kombination

Einleitung

von Oberflächenkontakt und einer sauerstoffarmen Umgebung das Chlamydosporenwachstum hervorruft. Ein weiterer Hypoxieeinfluss auf den Phänotyp von *C. albicans*, besteht im Wechsel von der *white*- in die *opaque*-Form, der während der Zellpaarung eine Rolle spielt (Miller und Johnson, 2002). Allerdings ist die *opaque*-Form bei einer Temperatur von 37 °C nur einige Stunden stabil, was eine Paarung im menschlichen Körper unwahrscheinlich macht. Dumitru und Mitarbeiter (2007) stellten jedoch fest, dass unter hypoxischen Bedingungen die *opaque*-Form bei 37 °C eine Woche stabil und die Paarung in hypoxischen Bereichen des menschlichen Körpers möglich ist. Weiterhin ruft das Wachstum in Agar (embedded) oder bei Hypoxie auf der Agaroberfläche eine verstärkte Filamentbildung hervor, die bei Normoxie nicht beobachtet werden konnte (Sonneborn *et al.*, 1999; Setiadi *et al.*, 2006). Sogar Mutanten, denen Gene des „klassischen“ PKA-Signalweges der Filamentbildung fehlen (z. B. *EFG1*), zeigten unter hypoxischen Bedingungen ein hyperfilamentöses Wachstum. Diese Phänotypen treten vorwiegend bei Temperatur < 37 °C und bei Kontakt zu einer Matrix (z.B. Deckglas, Agaroberfläche) auf. Somit ist noch unklar, ob diese hypoxische Filamentbildung ebenfalls bei einer Körpertemperatur von 37 °C unterstützt wird (Ernst und Tielker, 2009). Hautschichten, die in Kontakt mit der Außenwelt stehen, besitzen allerdings eine Temperatur von ca. 30 °C, so dass diese Vorgänge dort ablaufen könnten.

Untersucht man die Genregulation unter hypoxischen Bedingungen mit Hilfe einer Transkriptomanalyse, so fallen mehrere regulierte Gengruppen auf. Bei Hypoxie werden fast alle Gene der Glykolyse positiv und Gene des oxidativen Metabolismus negativ reguliert (Doedt *et al.*, 2004). Darunter fallen z. B. Komponenten der Atmungskette in den Mitochondrien, der ATP-Biosynthese und des Zitronensäurezyklus (Setiadi *et al.*, 2006). Eine ähnliche Regulation erfolgt auch in Säugetierzellen (Semenza *et al.*, 1996; Hochachka *et al.*, 1996) und in der Hefe *Pichia pastoris* (Passoth *et al.*, 2003). Weiterhin führt in *C. albicans* eine durch Hypoxie gestörte Funktion der Mitochondrien zu einer positiven Regulation der Katalase Cta1, vermutlich um entstehende freie ROS neutralisieren zu können. Ebenfalls werden mehrere Chaperone reguliert, eventuell, um die ATP-abhängige Faltung von ROS-geschädigten Proteinen zu unterstützen.

Die Gene *ERG* und *OLE1*, die für eine sauerstoffabhängige Synthese von Ergosterol und ungesättigten Fettsäuren kodieren, werden bei Hypoxie ebenfalls induziert. Wahrscheinlich wird dadurch der geringe Restgehalt an Sauerstoff optimal ausgenutzt (Setiadi *et al.*, 2006). Einige Gene für Zellwandproteine, wie Hwp1 und Als12, werden in *C. albicans* unter hypoxischen Bedingungen ebenfalls stark positiv reguliert (Setiadi *et al.*, 2006). Aktuelle Studien von Sosinska und Mitarbeitern (2008) zeigen, dass Proteine, die an Struktur und Funktion der Zellwand beteiligt sind (Pir1, Hwp1, Pga10 und Rbt5), ebenfalls in einem vaginal-simulativen Medium bei Hypoxie aktiviert werden. Die positive Regulation des Zellwandproteins Rbt5, welches für die Eisenaufnahme verantwortlich ist, stellt

eventuelle Zusammenhänge der zellulären Antwort bei einem geringen Gehalt von Eisen und Sauerstoff her. In weiteren Transkriptionsstudien wurden bei Hypoxie ebenfalls Gene der Eisenaufnahme positiv reguliert, genau wie bei Eisenmangel-Wachstum (Lan *et al.*, 2004). Aus diesen Ergebnissen kann man schließen, dass der Verbrauch von Sauerstoff durch die Atmungskette oder Monooxygenasen Eisen und gleichzeitig Sauerstoff, z. B. für die Eisenaufnahme in die Zelle, benötigt. Andererseits werden Gene für Häm-abhängige Enzyme wie *CTA1*, *OLE1* und *ERG11* unter eisenarmen Bedingungen negativ reguliert (Lan *et al.*, 2004), während sie unter hypoxischen Bedingungen positiv reguliert werden. Dieses Ergebnis zeigt, dass bei weitem noch nicht alle hypoxischen Regulationsmechanismen entdeckt und verstanden sind. Die molekularen Mechanismen, die die Genregulation bei Hypoxie bewirken, sind bei *C. albicans* noch weitestgehend unbekannt. Der Transkriptionsfaktor Efg1 (siehe unten) ist offenbar an der Regulation von ca. 50 % aller hypoxisch regulierten Genen beteiligt (Setiadi *et al.*, 2006; Ernst und Tielker, 2009). Dagegen ist ein homologes Protein zu Rox1, einem Repressor hypoxischer Gene in *S. cerevisiae* (siehe oben) nicht an hypoxischer Genregulation, sondern an der Filamentbildung von *C. albicans* beteiligt (Kadosh und Johnson, 2001; Khalaf und Zitomer, 2001).

1.3 Regulatoren des filamentösen Wachstums unter hypoxischen Bedingungen

Für die Hyphenbildung bei *C. albicans* sind zwei verschiedene Signalwege bekannt. Einerseits ist eine „mitogen-activated protein kinase“-Kaskade (MAP-Kaskade) aktiv (Sonneborn *et al.*, 2000) und andererseits wird ein Proteinkinase A (PKA)-Weg benötigt, in dem der nachgeschaltete Transkriptionsfaktor Efg1 den Wechsel zwischen der Hefe- und der Hypheform steuert (Bockmühl *et al.*, 2001). Während Efg1 bei Sauerstoffanwesenheit die Hyphenbildung stimuliert, ist Efg1 bei Hypoxie auch ein Repressor der Hyphenbildung (Doedt *et al.*, 2004; Setiadi *et al.*, 2006). In dieser Arbeit konnte außerdem gezeigt werden, dass das Sch9-Protein ebenfalls einen Einfluss auf die Hyphenbildung unter hypoxischen Bedingungen hat.

1.3.1 Der Transkriptionsregulator Efg1

Efg1 (enhanced filamentous growth factor) ist Mitglied der Gruppe der APSES-Proteine, die spezifisch in Ascomyceten auftreten. Die Abkürzung APSES leitet sich von den Anfangsbuchstaben der ersten identifizierten Proteine dieser Gruppe ab. Das sind Asm1 aus *N. crassa*, Phd1 und Sok2 aus *S. cerevisiae*, Efg1 aus *C. albicans* und StuA aus *Aspergillus nidulans*. Das zu Efg1-homologe Protein, Efh1, in *C. albicans* zählt ebenfalls zu den APSES-Proteinen. Alle diese Proteine besitzen eine 100 Aminosäuren lange „basic helix-loop-helix“ (bHLH)-Domäne, die für die DNA-Bindung und Dimerisierung verantwortlich ist (Stoldt *et al.*, 1997; Doedt *et al.*, 2004). Wie alle APSES-Proteine reguliert Efg1 morphologische Prozesse, die mit dem Wechsel zwischen der Kugel- und Filamentform bei Pilzen zusammenhängen. So steuert Efg1 den Dimorphismus, die Bildung von Chlamydosporen und den spontanen Phänotypwechsel zwischen der *white*- und *opaque*-Form der Zelle (Sonneborn *et al.*, 1999; Srikantha *et al.*, 2000). Für die Regulation des Dimorphismus spielt der PKA-Weg eine entscheidende Rolle und für *C. albicans* wurden bereits viele Proteine dieses Weges aufgrund ihrer Homologie zu bekannten *S. cerevisiae*-Proteinen identifiziert.

Bei *C. albicans* wird im PKA-Weg ein Signal über das Ras-Protein an die Adenylatcyclase Cdc35 weitergeleitet. Daraufhin erhöht sich der Spiegel des „second messenger“ cAMP, der wiederum die Proteinkinase A aktiviert, indem durch die cAMP-Bindung die reprimierende Wirkung der regulatorischen Untereinheit Bcy1 der PKA-Isoformen aufgehoben wird. Die aktivierten katalytischen Untereinheiten der Proteinkinase A sind die Isoformen Tpk1 und Tpk2, die beide eine unterschiedliche Funktion besitzen. Während Tpk1 eher für die Hyphenbildung auf festem Medium verantwortlich ist, reguliert Tpk2 die Hyphenbildung in flüssigem Medium (Bockmühl *et al.*, 2001). Die Induktion der Hyphenbildung erfolgt durch die anschließende Signalweiterleitung auf den Transkriptionsfaktor Efg1 und nachgeschaltete Regulatoren.

Efg1 hat eine bivalente Funktion, da es sowohl als Aktivator als auch Repressor der Hyphenbildung fungieren kann. Während das filamentöse Wachstum in der frühen Phase der Induktion durch Efg1 aktiviert wird, übernimmt der Transkriptionsfaktor in einer späteren Phase des Hyphenwachstums eine reprimierende Funktion. Aus diesem Grund zeigen Stämme mit einer Efg1-Überexpression keine echten Hyphen, sondern Pseudohyphen, da die normale Hyphenbildung gestört ist (Tebarth *et al.*, 2003). Unter hypoxischen Bedingungen ist Efg1 ebenfalls Repressor der Hyphenbildung, da unter diesen Bedingungen *efg1*-Mutanten ein hyperfilamentöses Wachstum zeigen. Diese ungewöhnliche Hyphenbildung tritt jedoch nur bei Temperaturen von 25 – 35 °C auf, während ab einer Temperatur von 37 °C die Kolonien der *efg1*-Mutante keine Hyphen mehr zeigen und Efg1 somit ab dieser höheren Temperatur, wie unter normoxischen

Einleitung

Bedingungen, als Aktivator der Hyphenbildung wirkt (Sonneborn *et al.*, 1999; Setiadi *et al.*, 2006). Die Doppelmutante des Transkriptionsfaktors Efg1 und seines homologen Proteins Efh1 zeigte bei Hypoxie eine verstärkte Hyphenbildung im Vergleich zu der Einzelmutante, so dass Efh1 offenbar die Repressorwirkung von Efg1 noch unterstützt (Doedt *et al.*, 2004).

Efg1 steuert nicht nur die Morphologie der Zellen, sondern auch metabolische Prozesse. Unter normoxischen Bedingungen werden durch Efg1 Gene der Glykolyse aktiviert, während Gene für die Respiration reprimiert werden. Bei Hypoxie aktiviert Efg1 Gene der Stressantwort (*HSP12*, *DDR48* und *CTA1*) und für den Repressor des filamentösen Wachstums *NRG1*, was möglicherweise die erleichterte Hyphenbildung bei Hypoxie erklärt. Eine weitere große Gengruppe, die durch Efg1 bei Hypoxie reguliert wird, sind Gene der Fettsäuresynthese, wie z. B. *OLE1*, das für die Synthese von ungesättigten Fettsäuren wichtig ist (Setiadi *et al.*, 2006).

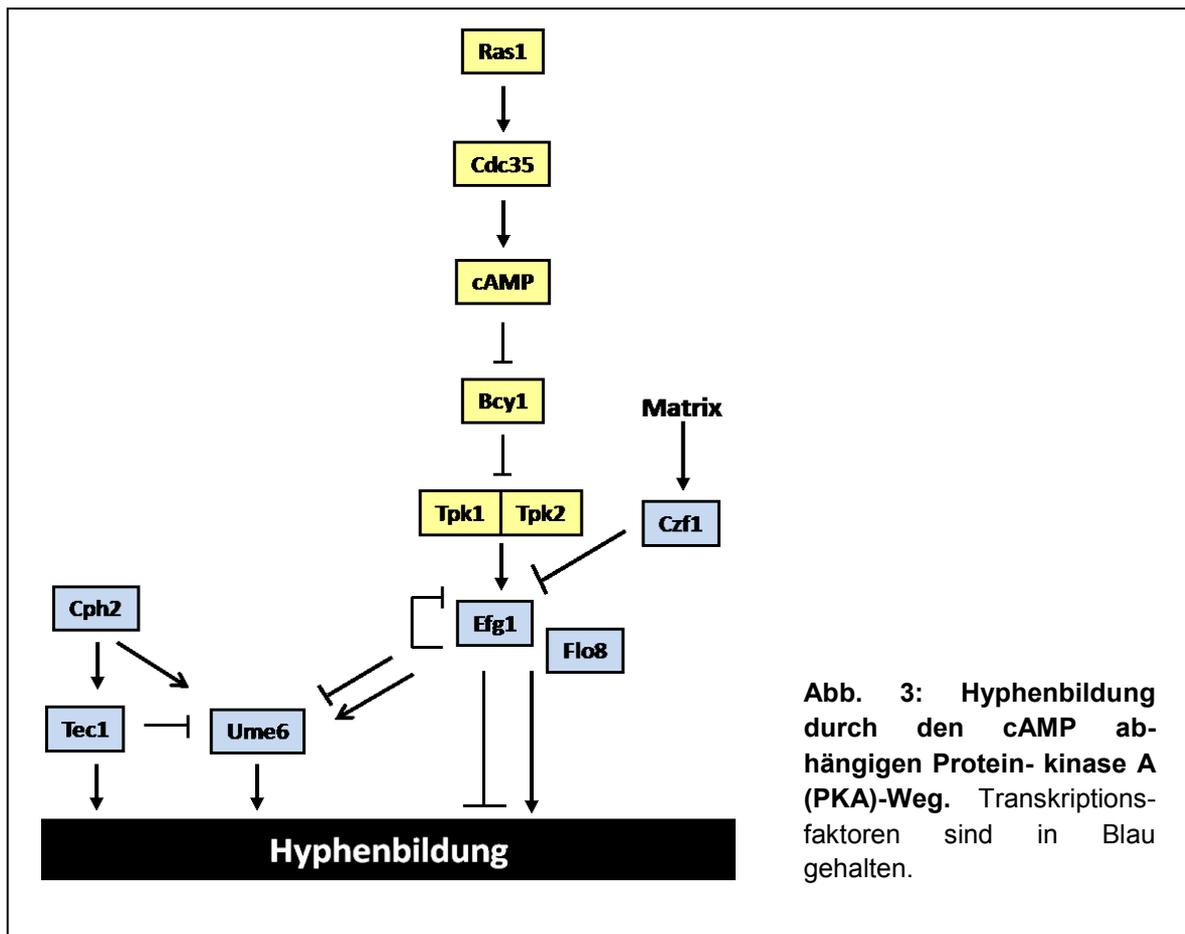


Abb. 3: Hyphenbildung durch den cAMP abhängigen Protein-kinase A (PKA)-Weg. Transkriptionsfaktoren sind in Blau gehalten.

1.3.2 Die AGC-Kinase Sch9

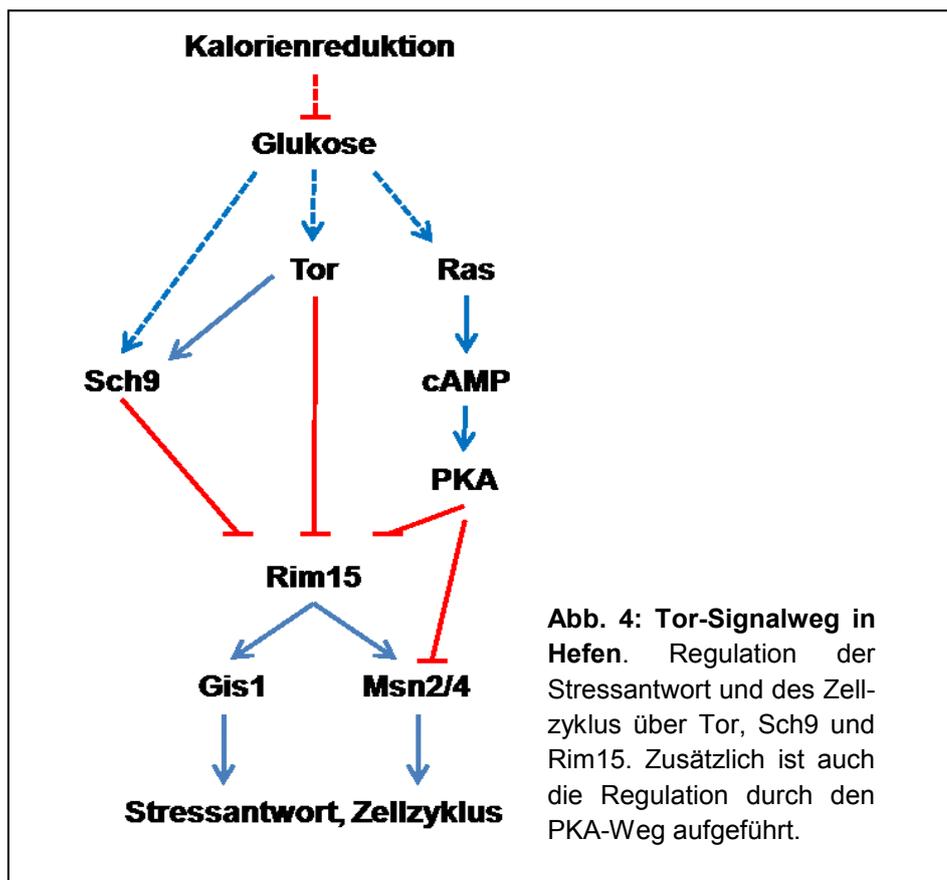
Die Serin-/Threoninkinase Sch9 ist ein Homolog zu AKT und S6K in Säugetierzellen (Urban *et al.*, 2007) und sie gehört zu der Familie der AGC-Kinasen, die nach den Proteinkinasen A (PKA), G (PKG) und C (PKC) benannt wurde (Sobko, 2006). Alle Mitglieder dieser Gruppe besitzen eine konservierte Domäne in ihrer Kinasesequenz. Außerhalb dieser katalytischen Domäne tragen sie dagegen nur wenige Gemeinsamkeiten, wodurch sie in unterschiedlichen Funktionen, wie z. B. bei der Zellteilung, dem Zellmetabolismus und der Zelldifferenzierung aktiv sein können (Frödlin *et al.*, 2002). Aktiviert werden diese Kinasen durch Phosphorylierung der Aktivierungsschleife (T-Schleife), der HM-Region (hydrophobic motif) und einiger Stellen des C-terminalen Endes, dem TM-Motiv (Jacinto und Lorberg, 2008). Bei *C. albicans* wurde die Kinase Sch9 als homologes Protein zu Sch9 in *S. cerevisiae* bereits identifiziert, jedoch existieren bislang kaum Erkenntnisse über ihre genaue Funktion oder Regulation. Für *S. cerevisiae* wurde die Funktion von Sch9 bereits detailliert untersucht. Dort ist sie Teil des TOR-Signalweges, der in Eukaryonten als globaler Regulator des Zellwachstums in Abhängigkeit vom Nährstoffangebot gilt.

Bei *S. cerevisiae* wurde bereits festgestellt, dass *in vivo* sieben Serin/Threonin-Reste des C-terminalen Endes von Sch9 phosphoryliert werden, wobei sechs von ihnen Rapamycin- und Nährstoff-sensitiv sind. Das lässt darauf schließen, dass Sch9 durch TOR (Target of Rapamycin) reguliert wird (Urban *et al.*, 2007). TOR besteht aus den zwei Isoformen, TORC1 und TORC2, die beide Rapamycin binden können, wobei nur TORC1 durch Rapamycin gehemmt wird (De Virgilio *et al.*, 2006). Wanke und Mitarbeiter (2008) fanden heraus, dass die Kinase Sch9, nachdem sie durch TOR aktiviert wurde, eine weitere Proteinkinase, Rim15, durch Phosphorylierung hemmt. Bei einem Unterangebot von Nährstoffen oder durch die Blockierung von TORC1 durch Rapamycin wird Rim15 nicht mehr durch Sch9 inhibiert. Dadurch werden die Transkriptionsfaktoren Msn2/4 und Gis1 aktiviert, die wiederum Gene induzieren, die den Eintritt der Zelle in die G₀-Phase und die Stressantwort (Cameroni *et al.*, 2004), aber auch Langlebigkeit und Zellgröße steuern (Fabrizio *et al.*, 2001; Jorgensen *et al.*, 2002). Weitere Studien haben gezeigt, dass bei einer Inhibierung von Sch9 Gene aktiviert werden, die nötig für eine Anpassung an nährstoffarme Bedingungen sind, wie Gene der ribosomalen Biogenese, der Translation und der Transkription (Powers und Walter, 1999; Cardenas *et al.*, 1999; Kubota *et al.*, 2003). Negativ reguliert wurden dagegen Gene des Katabolismus wie der Proteindegradation, der mRNA-Destabilisierung und der Autophagie (De Virgilio und Loewith, 2006). Schmelzle und Mitarbeiter (2004) stellen die These auf, dass der bereits beschriebene PKA-Signalweg über TOR reguliert wird und beide Signalwege gemeinsam Abläufe in der Zelle regulieren. Zurita-Martinez und Cardenas (2005) argumentieren

Einleitung

dagegen, dass beide Signalwege parallel agieren und unabhängig voneinander die Expression der verschiedenen Gene regulieren. Fest steht aber, dass die Kinase Rim15 Teil beider Signalwege ist und somit ein Bindeglied darstellen könnte. Chen *et al.* (2009) stellten außerdem fest, dass bei *C. elegans* der Transkriptionsfaktor Hif1 über TOR aktiviert wird. Somit könnte die Regulation durch den Tor-Signalweg mit dem Auftreten hypoxischer Bedingungen im direkten Zusammenhang zu stehen. Über Zusammenhänge zwischen Hypoxie und TOR bzw. Sch9 in Hefen ist noch nichts bekannt.

Setiadi untersuchte im Rahmen ihrer Dissertation (2006) die Funktion der Kinasen Sch9 und Rim15 in *C. albicans*. Dabei stellte sie fest, dass die Mutanten beider Kinasen bei Hypoxie und einer Temperatur von 24 °C eine stärkere Hyphenbildung zeigten als der Wildtyp (die *sch9*-Mutante nur bei gleichzeitiger Zugabe von CO₂). Durch eine Transkriptomanalyse stellte sie außerdem fest, dass bei Hypoxie durch Rim15 Gene reguliert wurden, die unter denselben Bedingungen auch durch den Transkriptionsfaktor Efg1 aktiviert oder reprimiert werden. Setiadi (2006) vermutete deshalb, dass unter hypoxischen Bedingungen Efg1 über Rim15 reguliert werden könnte.



Weiterhin verglich Sediadi (2006) das Wachstum der *sch9*-Mutante mit dem des Wildtyps und stellte fest, dass die *sch9*-Mutante, wie auch bei *S. cerevisiae*, einen deutlich späteren Eintritt in die stationäre Phase zeigt. Somit scheint Sch9 bei *C. albicans* so wie bei *S. cerevisiae* für die Regulation der Wachstumsprozesse in der Zelle verantwortlich zu sein. Außerdem wurde im Rahmen dieser Arbeit festgestellt, dass *sch9*-Mutanten sensitiv auf Hygromycin B reagieren. Da bekannt ist, dass diese Substanz Fehlesungen an Ribosomen induziert, könnte dies auf einen möglichen Einfluss von Sch9 auf die Ribosomenbiogenese hindeuten, wie es bei *S. cerevisiae* der Fall ist (Jorgensen *et al.*, 2002).

1.4 Ziel dieser Arbeit

Ein charakteristisches Verhalten von *C. albicans* ist es, verschiedene Nischen des menschlichen Körpers zu besiedeln. Dabei muss der Pilz sich an unterschiedliche Bedingungen, z. B. verschiedene Gas-, Temperatur- und Oberflächenbedingungen, anpassen. Es ist bekannt, dass *C. albicans* im Körper nicht nur als einzelne Zelle vorliegt, sondern auch in Hyphenform und als Biofilm. Biofilme stellen einen ganzen Zellkomplex dar, der hohe Resistenzen gegenüber dem Immunsystem besitzt. Ein Regulator der Biofilmbildung ist der Transkriptionsfaktor Efg1, der die Hyphenbildung unter normoxischen sowie hypoxischen Bedingungen reguliert. Frühere Studien ergaben außerdem, dass auch die AGC-Kinase Sch9 die Hyphenbildung unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen kontrolliert.

Ziel dieser Arbeit war es daher, die Rolle des Efg1-Proteins bei der Biofilmbildung und seinen Einfluss auf die Genregulation unter hypoxischen Bedingungen zu untersuchen. Außerdem sollte die Regulation der Morphologie und des Transkriptomts bei Hypoxie und Normoxie durch die Kinase Sch9 untersucht werden. Da bei *S. cerevisiae* das Rim15-Protein innerhalb des TOR-Signalwegs durch Sch9 und innerhalb des PKA-Signalwegs durch PKA inhibiert wird, wurden die Phänotypen der *rim15*-, *tpk1*- und *tpk2*-Mutanten untersucht. Ziel war es, Hinweise zum Einfluss von Efg1 und Sch9 auf die transkriptionelle und morphologische Regulation bei verschiedenen Sauerstoff und Kohlendioxidkonzentrationen zu erlangen. Dazu wurden unter anderem Transkriptomkinetiken in Abhängigkeit von dem Efg1-Protein durchgeführt.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien, Gase und Enzyme

In dieser Arbeit verwendete Chemikalien und Enzyme wurden von folgenden Firmen bezogen:

Amersham (Braunschweig), Biorad (München), B. Braun (Melsungen), Calbiochem (Bad Soden), Difco (Michigan), Fluka (Buchs, Schweiz), Gibco BRL (Eggenstein), Merck AG (Darmstadt), MBI Fermentas (St. Leon Rot), Millipore (Eschborn), New England Biolabs (Schwalbach), Pierce (Rockford), Promega (Madison), Qiagen (Hilden), Roche (Mannheim), Roth (Karlsruhe), Sigma (Deisenhofen). Soweit nicht anders vermerkt, wurden Chemikalien der Güteklasse reinst oder p.a. verwendet.

Genutzte Gase stammen von der Firma Air Liquide Deutschland GmbH (Düsseldorf).

2.2 Stämme und Medien

2.2.1 *E. coli*-Stämme

Für Klonierungen wurde ausschließlich der Stamm *DH5 α F'* benutzt.

DH5 α F': F'[Φ 80 (Δ *lacZ*)M15] Δ (*lacZYA-argF*)U169 *recA1 endA1 hsdR17 r_k⁻ m_k⁺ supE44 thi-1 gyrA relA* (Hanahan, 1983; Woodcock *et al.*, 1989)

2.2.2 *C. albicans*-Stämme

Stamm	Genotyp	Quelle/Referenz
CAF2-1	<i>URA3/ura3::imm434</i>	Fonzi und Irwin, 1993
CAI4	<i>ura3::imm434/ura3::imm434</i>	Fonzi und Irwin, 1993
HLC67	Wie CAI4, aber <i>efg1::hisG/efg1::his</i>	Lo <i>et al.</i> , 1997
CAS4	wie CAI4, aber <i>sch9::hisG/sch9::hisG</i>	Setiadi, Dissertation 2006
CAR 23-7-5-1	wie CAI4, aber <i>rim15::hisG/rim15::hisG</i>	Setiadi, Dissertation 2006

Material und Methoden

DSC10	wie CAI4, aber <i>efg1::hisG/efg1::hisG ura3::imm434/ura3::imm434::URA3</i>	Park <i>et al.</i> , 2005
CM1613	wie CAI4, aber <i>mkc1Δ::hisG-URA3-hisG/mkc1Δ::hisG</i>	Navarro-Carcia <i>et al.</i> , 1995
CSSK21	wie CAI4, aber <i>ssk1::hisG/ssk1::hisG-URA3-hisG</i>	Calera <i>et al.</i> , 2000
MK 106	wie SC5314, aber <i>ace2::FRT/ace2::FRT</i>	Kelly <i>et al.</i> , 2004
C4/d63	wie CAI4, aber <i>efh1::hisG/efh1::hisG-URA3-hisG</i>	Doedt <i>et al.</i> , 2004
CCF3	wie CAI4, aber <i>ura3::imm434/ura3::imm434 flo8::hisG/flo8::hisG-URA3-hisG</i>	Cao <i>et al.</i> , 2006
CaAS18	wie CAI4, aber <i>tec1/tec1</i> (pVEC)	Schweizer <i>et al.</i> , 2000
CKY230	wie CAI4, aber <i>Δczf1::hisG/Δczf1::hisG ade2::pDB152</i>	Brown <i>et al.</i> , 1999
CAYF178U	<i>als3::ARG4/als3::HIS1 arg4::hisG/arg4::hisG his1::hisG/his1::hisG ura3 ura3::imm434/ura3::imm434::URA3</i>	Nobile <i>et al.</i> , 2006
NGY357	wie CAI4, aber <i>och1Δ::hisG/och1Δ::hisG RPS1/rps1Δ::Clp10</i>	Bates <i>et al.</i> , 2006
SPCa2	wie CAI4, aber <i>pmt1Δ::hisG/pmt1Δ::hisG Δura3::imm434/URA3</i>	Peltroche-Llacsahuanga <i>et al.</i> , 2006
SPCa4	wie CAI4, aber <i>pmt2Δ::hisG/PMT2 ura3::imm434/URA3</i>	Peltroche-Llacsahuanga <i>et al.</i> , 2006
SPCa6	wie CAI4, aber <i>pmt4Δ::hisG/pmt4Δ::hisG ura3::imm434/URA3</i>	Peltroche-Llacsahuanga <i>et al.</i> , 2006
CCS1	wie HLC67, aber 8,3 kb Fragment (<i>SacII</i> , <i>Apal</i>) aus pCS1 integriert in <i>ADH1</i>	diese Arbeit
CCS2	wie HLC67, aber 8,3 kb Fragment (<i>SacII</i> , <i>Apal</i>) aus pCS1 integriert in <i>ADH1</i>	diese Arbeit
CCS3	wie CAS4, aber <i>URA3</i> am nat. Genort rekonstituiert	diese Arbeit
CCS4	wie CAS4, aber <i>leu2::ACT1p-SCH9 URA3</i>	diese Arbeit
CCS5	wie CAS4, aber <i>leu2::URA3</i>	diese Arbeit
CCS6	wie CAR23-7-5-1, aber <i>URA3</i> am nat. Genort rekonstituiert	diese Arbeit

Tab. 1: In dieser Arbeit verwendete *C. albicans*-Stämme

2.2.3 Medien zur Anzucht von *E. coli*

LB: 1 % Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 0,5 % NaCl

Festen Nährböden wurde 2 % Agar zugesetzt. Die Anzucht der Bakterien erfolgte bei 37° C. Zur Selektion plasmidkodierter Antibiotikaresistenz wurde dem Medium nach dem Autoklavieren Ampicillin in einer Konzentration von 100 µg/ml zugesetzt.

2.2.4 Medien zur Anzucht von *C. albicans*

YPD:	1 % Hefeextrakt, 2 % Pepton, 2 % Glukose
YPS:	1 % Hefeextrakt, 2 % Pepton, 2 % Saccharose
SD:	0,67 % YNB (Yeast Nitrogen Base, ohne Aminosäuren aber mit Ammoniumsulfat), 2 % Glukose, pH 6,9
RPMI1640	10,4 g RPMI1640 in 1l MOPS-Puffer (pH 7), 2 % Glukose

Festen Medien wurde 2 % Agar hinzugefügt. Zur Selektion des *SAT1*-Markers wurde dem YPD-Medium 150 µg/ml Nourseothricin zugegeben.

2.3 Anzucht von *C. albicans*-Stämmen

2.3.1 Inkubation von *C. albicans* unter normoxischen Bedingungen

Flüssigkulturen von *C. albicans*-Stämmen wurden bei 25 °C bzw. 37 °C in YPD-Medium angezogen. Zur Charakterisierung auf festen Medien wurden die jeweiligen Stämme bei Temperaturen von entweder 25 °C oder 37 °C angezogen.

2.3.2 Inkubation von *C. albicans* unter hypoxischen Bedingungen

Bei Inkubation auf festen Platten wurde die Gaskonzentration mit Hilfe einer Hypoxiebank (Invivo₂₀₀, Ruskinn England) erzeugt. Dazu wurden die Stämme auf YPS-Agarplatten vereinzelt und bei den jeweiligen Gas- und Temperaturwerten angezogen. Inkubationen in Flüssigmedium wurden ebenfalls in dieser Hypoxiebank durchgeführt. Dazu wurde das Medium vor jedem Versuch in Reagenzgläsern oder Kolben über Nacht bei den jeweiligen Gasbedingungen vorequibriert. Alternativ wurde zur Anzucht unter hypoxischen Bedingungen in Flüssigmedium eine 500 ml Gasflasche mit einer porösen Glasplatte verwendet (Firma SCHOTT, Mainz), durch die ein Gasgemisch (93,8 % N₂, 6 % CO₂, 0, 2 % O₂) mit konstanter Flussgeschwindigkeit durch das Medium geleitet wurde.

2.3.3 Hypheninduktion von *C. albicans*

Zur Hypheninduktion wurde flüssigem YP-Medium 10 % Pferdeserum (Sigma) zugegeben. Die Inkubation der Stämme erfolgte bei 37 °C.

2.3.4 Biofilmbildung von *C. albicans*

C. albicans-Stämme wurden in 5 ml YPD bei 37 °C über Nacht inkubiert. Anschließend wurden die Zellen geerntet (5 min, 3.500 Upm) und das Pellet in 5 ml PBS-Puffer (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 7,9 mM Na₂HPO₄, 1,5 mM KH₂PO₄, pH 7,4) resuspendiert. Um Zellaggregate zu lösen wurde die Suspension für 10 min in einem Ultraschallbad behandelt, erneut geerntet und in 1 ml PBS resuspendiert. Die Zellzahl jeder Kultur wurde durch Messen der OD₆₀₀ und Zuhilfenahme einer Standardkurve bestimmt und mit RPMI1640 auf eine Zellzahl von 10⁶ Zellen/ml eingestellt. Von jeder dieser Verdünnungen wurden 0,7 ml je Vertiefung in eine 24-Well-Platten aus Polystyren der Firma Sarstedt (Nümbrecht) gegeben, die vorher gewogen wurden. Die Platten wurden für 60 Stunden bei 37 °C inkubiert. Daraufhin wurde das Medium entfernt und jede Vertiefung mit 0,7 ml PBS-Puffer vorsichtig gewaschen. Bevor die Platten erneut gewogen wurden, um die Trockenmasse der Zellen zu ermitteln, wurden sie für 24 Stunden bei 37 °C getrocknet. Die Biofilmbildung jedes Stammes wurde dreimal bestimmt. Die statistische Signifikanz der Ergebnisse wurde mit Hilfe eines ungepaarten t-Tests überprüft, bei dem ein p-Wert ermittelt wurde (Graph-Pad Prism 4 Programm).

2.3.5 Adhäsion von *C. albicans*

Die *C. albicans*-Stämme wurden in 5 ml YPD bei 37 °C über Nacht angezogen. Anschließend wurde eine Verdünnung von 0,5 x 10⁶ Zellen hergestellt und je Stamm eine 96-Well-Platte angeimpft (0,1 ml je Vertiefung). Nach einer Inkubation von zwei Stunden bei 37 °C wurde der Überstand abgenommen und die nicht adhären Zellen vorsichtig mit 0,1 ml PBS-Puffer je Vertiefung gewaschen. Anschließend wurde eine XTT-Reduktionsmethode durchgeführt (Ramage *et al.*, 2001), bei der 0,1 ml einer 1:5-Mischung von 1,5 mM 2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-[(phenylamino)carbonyl]-2H-tetrazolium hydroxid (XTT) und 0,4 mM

Material und Methoden

Menadion in jede Vertiefung pipettiert und für zwei Stunden bei 37 °C in Dunkelheit inkubiert wurde. Anschließend wurde der Überstand abgenommen und die OD₄₉₀ des umgesetzten Substrates gemessen (Absorbance Microplate Reader ELx800™, BioTek, Friedrichshall). Anzucht und Adhäsion wurden unter normoxischen und hypoxischen (93,8 % N₂, 6 % CO₂, O₂ 0,2 %) Bedingungen durchgeführt. Für hypoxische Bedingungen wurde die Hypoxybank INVIVO₂ 200 von Ruskinn (England) verwendet.

2.4 Plasmide und Primer

2.4.1 Plasmide

Name	Beschreibung	Referenz
pBIHAHYD	<i>EFG1</i> unter der Kontrolle von <i>CaPCK1p</i>	Stoldt <i>et al.</i> , 1997
pNIM1	Tet-On Basis-Vektor	Park und Morschhäuser, 2005
HB5	<i>URA3</i> -ORF zur Rekonstitution	Losberger und Ernst, 1989
p2297S9	<i>SCH9</i> unter der Kontrolle von <i>CaACT1p</i>	Luc Giasson
pDS1044-1	<i>ACT1p</i>	Dominique Sanglard
pCS1	<i>EFG1</i> unter der Kontrolle von <i>tetOp</i>	diese Arbeit

Tab 2.: In dieser Arbeit verwendete Plasmide

2.4.2 Primer

Name	Sequenz
Sall-HA-EFG1 for	5'-TATATAGTCGACATGAGTCGATACCCATACGACG
Sall-HA-EFG1 rev	5'-ATATATGTCGACTTACTTTTCTTCTTTGGCAACAGTGC
pTET	5'-GATAGGGGAGTGGTAAACTCG
ADH1-CA	5'-GAGGTAAACCCAGAAAGC
i-p2-Ura3ver	5'-TTACAATCAAAGGTGGTCC
p3-Ura3ver	5'-GGTACAGTTGTTCCCTCACA
1RTEFG1	5'-ACCTTGAGGGATACCAGCAG
2RTEFG1	5'-GGTGGCAGTAATGTGTCTGG
ECE-L1	5'-TTCAAAGACTCCCACA ACTCA
ECE-RI	5'-ACCGACAGTTTCAATGCTCTT
HWP1-L1	5'-TCAGCCTGATGACAATCCTC
HWP1-R1	5'-GTAGCTGGAGTTGTTGGCTTT
ACT1(RT)-f	5'-TTGGATTCTGGTGATGGTGT
ACT1(RT)-r	5'-TGGACAAATGGTTGGTCAAG

Tab. 3: In dieser Arbeit verwendete Primer

2.5 Methoden zum Arbeiten mit Nukleinsäuren

2.5.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* im kleinen Maßstab erfolgte nach der Methode der alkalischen Lyse (Birnboim und Doly, 1979). Ausgegangen wurde von einer 5 ml Übernachtskultur. Die DNA wurde in 50 µl Wasser gelöst. Zur Gewinnung von größeren Mengen an Plasmid-DNA wurden Anionenaustauscher-Säulen von Qiagen (Hilden) nach Angaben des Herstellers verwendet. Ausgegangen wurde von einer 50 ml Übernachtskultur. Die DNA wurde in 200 µl Wasser gelöst.

Plasmid-DNA wurde gefällt, indem zu einem DNA-Ansatz 0,1 Volumen 3 M Natriumacetat pH 5,8 und 2,5 Volumen eiskalter absoluter Ethanol gegeben wurde (Sambrook *et al.*, 1989). Die Fällung erfolgte für mindestens 30 min bei -20 °C. Anschließend wurde die DNA mit 70 %igem Ethanol bei 4 °C zentrifugiert und gewaschen.

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

Für die RNA-Isolierung aus *C. albicans*-Stämmen in Flüssigmedium wurden die Zellen geerntet (5 min, 3.500 Upm), das Zellpellet im Restüberstand des Mediums resuspendiert und in flüssigen Stickstoff getropft. Die gefrorenen Zellen wurden anschließend zusammen mit einer Metallkugel (Durchmesser 7 mm) in ein vorgekühltes Teflongefäß gegeben und in einem Micro-Dismembrator (B. Braun Biotech International GmbH, Melsungen) für 2 min bei 2.600 Upm aufgeschlossen. Der Zellstaub wurde anschließend in 2 ml Trizol[®] (Invitrogen) resuspendiert und für eine Minute geschüttelt. Zur Dissotiation der Nukleoproteinkomplexe folgte eine 5 minütige Inkubation bei RT. Nach Zentrifugation von 10 Minuten bei 12.000 Upm wurde der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Dem Überstand wurden 0,4 Volumen Chloroform zugegeben, 15 Sekunden in der Hand geschüttelt, 3-10 Minuten bei RT inkubiert und erneut zentrifugiert. Die obere farblose Phase wurde in ein frisches Eppendorfgefäß überführt, mit 0,5 Volumen Isopropanol vermischt und die RNA für 5-15 Minuten bei RT präzipitiert. Nach 10 minütiger Zentrifugation bei 12.000 Upm wurde das Pellet mit 1 ml 70 %igen eiskalten Ethanol gewaschen und anschließend luftgetrocknet. Vor dem Einfrieren (ÜN, -20 °C) wurde das Pellet in 500 µl DEPC-Wasser (1 ml DEPC/ 1 l MilliQ Wasser) resuspendiert und anschließend mit 500 µl LiCl-Puffer (4 M LiCl; 20mM Tris/HCL pH 7,5; 10 mM EDTA) versetzt. Nach der Präzipitation wurde die RNA

30 min bei 13.000 Upm pelletiert und anschließend zweimal mit 70 %igem eiskalten Ethanol gewaschen (10 Minuten, 13.000 Upm). Zum Schluss wurde das RNA-Pellet kurz getrocknet und in 50 µl DEPC-Wasser resuspendiert. Zur Quantifizierung der RNA wurde eine Verdünnung von 1:1000 angesetzt.

2.5.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Für die photometrische Konzentrationsbestimmung wurde DNA oder RNA bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Die Extinktion $E_{260} = 1$ entspricht 50 µg/ml doppelsträngiger DNA bzw. 40 µg/ml RNA sowie 33 µg/ml Einzelstrang-DNA (Müller *et al.*, 1993).

Außerdem konnte die DNA-Konzentration auch anhand eines Größenstandards mit bekannter DNA-Menge in einem Agarosegel bestimmt werden.

2.5.4 Auftrennung von DNA-Fragmenten durch Gelelektrophorese

Für die Auftrennung von DNA wurden 1 % ige ethidiumbromidhaltige Agarosegele verwendet. Nach der Auftrennung wurde die DNA durch Bestrahlung mit UV-Licht (254 nm) sichtbar gemacht.

2.5.5 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Das gewünschte DNA-Fragment wurde aus dem Agarosegel unter langwelligem UV-Licht (366 nm) ausgeschnitten und unter Verwendung des „Gel-Extraction-Kit“ der Firma Qiagen entsprechend dem Protokoll des Herstellers extrahiert.

2.5.6 Phosphatasereaktion

Um für Klonierungszwecke eine Rezirkularisierung von geschnittenen Vektoren zu verhindern, wurden diese am 5'-Ende dephosphoryliert. Dazu wurde nach der Restriktionsendonukleaseolyse ein Überschuss an alkalischer Phosphatase zugegeben und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die dephosphorylierten DNA-Fragmente über eine Säule aufgereinigt (QIAquick^R, Qiagen, Hilden).

2.5.7 Ligation

Ligationsreaktionen zur Verknüpfung verschiedener DNA-Moleküle (Insert in dreifach molarem Überschuss zum Vektor) wurden in einem Volumen von 20 µl mit Ligationspuffer und 1 U T4 DNA-Ligase bei glatten Enden über nach bei 16 °C und bei überstehenden Enden für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.

2.5.8 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) von Mullis und Faloona (1987) wurden spezifische DNA-Sequenzen amplifiziert. Durchgeführt wurde die PCR in einem Thermozykler der Firma Biometra. Die Annealing-Temperaturen, sowie Elongationszeiten wurden den verwendeten Primern, bzw. dem erwarteten PCR-Fragment, angepasst. Zur Klonierung bestimmter PCR-Fragmente wurden diese mit dem „QIAquick PCR-Purification-Kit“ der Firma Qiagen aufgereinigt.

Zur Verifizierung von Transformanten von *C. albicans* wurde eine „Kolonie-PCR“ durchgeführt. Dazu wurde eine geringe Menge Zellmaterial in 40 µl 0,02 M NaOH resuspendiert und 10 Minuten bei 95 °C erhitzt. Anschließend wurde die Suspension kurz abzentrifugiert und auf Eis aufbewahrt. Für die PCR wurden 4 µl der Suspension bei einem Gesamtvolumen von 50 µl eingesetzt. Als Polymerase wurde eine Taq-Polymerase (Eppendorf) verwendet und die PCR nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.6 Transformation

2.6.1 Transformation von *E. coli*

Die Transformation von *E. coli* erfolgte nach der Rubidiumchlorid-Methode von Hanahan (1983).

2.6.2 Transformation von *C. albicans*

Die Transformation von *C. albicans* erfolgte nach der Methode von Mitchell (Wilson *et al.*, 2000). Dabei wurde 50 ml YPD mit 0,5 ml einer 5 ml YPD Übernachtskultur angeimpft. Die Zellen wurden 4 Stunden bei 30 °C im Schüttler inkubiert, so dass die Kultur eine OD von 0,5 - 0,8 erreichte. Die Zellen wurden geerntet (5 min, 3.500 Upm), mit 5 ml LATE-Puffer (0,1 M Lithiumacetat, 10 mM Tris-HCL (pH 7,5), 1 mM EDTA) gewaschen und anschließend in 0,5 ml desselben Puffers resuspendiert. Pro Transformationsansatz wurden 0,1 ml Zellen mit 50 µg Heringssperma-DNA sowie maximal 80 µl PCR-Produkt bzw. mindestens 2 - 10 µg DNA versetzt und bei 30 °C für 30 min inkubiert. Anschließend wurden 0,7 ml PLATE-Puffer (40 % PEG3350 in LATE-Puffer) hinzugefügt, die Probe kurz geschüttelt und über Nacht bei 30 °C inkubiert. Nach der Inkubation folgte ein einstündiger Hitzeschock bei 42 °C. Danach wurden die Zellen abzentrifugiert (5 min, 3.500 Upm) und in 1 ml TE-Puffer (10 mM TrisHCL pH 7,5, 1 mM EDTA) gewaschen. Nach Resuspendierung in 0,2 ml TE-Puffer wurden die Zellen auf Selektionsmedien ausplattiert und bei 30 °C inkubiert.

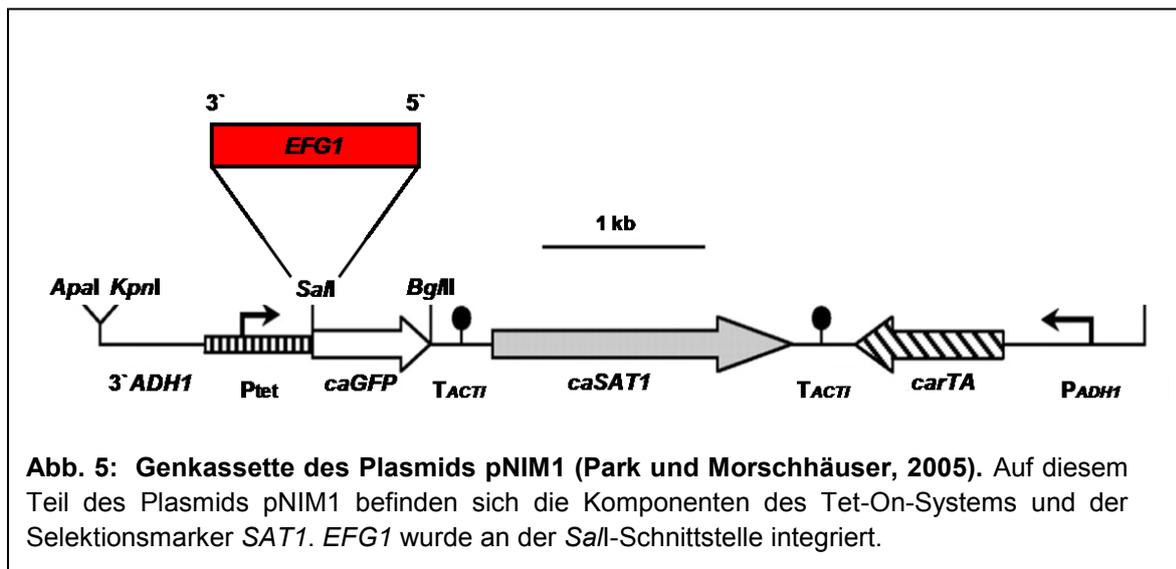
2.7 Konstruktion von Plasmiden und Stämmen

2.7.1 *EFG1* unter der Kontrolle des Tet-On-Systems

Um *EFG1* unter die Kontrolle des durch Doxycyclin induzierbaren Promotors (*tetO*) zu bringen, wurde zunächst das *EFG1*-Gen aus dem Plasmid pBI-HAHYD mit Hilfe einer PCR amplifiziert. Dazu wurden die Primer *Sall*-HA-EFG1 for und *Sall*-HA-EFG1 rev verwendet. Das entstandene *HA-EFG1*-Fragment trug an beiden Enden eine *Sall*-Sequenz und wurde in die singuläre *Sall*-Schnittstelle des

Material und Methoden

Plasmids pNIM1 stromabwärts des Promotors mit der Operatorsequenz *tetO* integriert. Das so konstruierte Plasmid (pCS1) besitzt zwischen den Schnittstellen *SacII* und *Apal* ein 8,3 kb großes Fragment, welches unter anderem den Selektionsmarker *SAT1*, die Komponenten des Tet-On-Systems und *EFG1* kodiert. Diese Genkassette wurde für die Transformation in den *ADH1*-Locus der *efg1*-Mutante HLC67 verwendet. Selektiert wurde auf YPD-Agarplatten mit 150 µg/ml Noruseothricin. Für die Auswahl eines Transformanten (CCS1) wurde die Integration des Genfragments in den *ADH1*-Locus mit Hilfe einer Kolonie-PCR überprüft. Verwendet wurden die Primer pTET (bindet innerhalb des *tetO-OP4* Promotors) und *ADH1-CA* (bindet außerhalb der *ADH1*-Region). Die Negativkontrolle (CCS2) wurde auf dem gleichen Weg wie CCS1 konstruiert und ebenfalls mit Hilfe einer Kolonie-PCR überprüft. Für die Negativkontrolle wurde die Genkassette aus pNIM1 ohne *EFG1* in den *ADH1*-Locus der *efg1*-Mutante integriert.



2.7.2 Rekonstitution des *URA3*-Gens an seinem nativen Locus

Die *URA3*-Expression ist vom Integrationsort abhängig und aufgrund der Genomlokalisierung können Phänotypeneffekte entstehen (Cheng *et al.*, 2003; Lay *et al.*, 1998). Um diesen Positionseffekt zu vermeiden, wurde das *URA3*-Gen der *ura3*-defizienten Stämme CAS4 (*sch9*) und CAR23-7-5-1 (*rim15*) am authentischen Genort rekonstituiert (Prill, 2004). Nach Behandlung des Plasmids HB5 (Losberger und Ernst, 1989) mit den Restriktionsendonukleasen *PstI* und *XhoI* erhält man ein etwa 4,3 kb großes Fragment, welches den *URA3*-Locus

trägt. Die beiden Stämme CAR23-7-5-1 und CAS4 wurden mit diesem Fragment transformiert und zur Selektion auf SD-Agarplatten ausplattiert. Mit Hilfe einer Kolonie-PCR wurde die richtige Integration des *URA3*-Gens am nativen Locus verifiziert. Dazu wurden die Oligonukleotide i-p2-URA3-ver und p3URA3ver eingesetzt und ein Produkt von etwa 800 bp erhalten.

2.7.3 Rekonstitution der *sch9*-Mutante

In Abschnitt 3.4.1 ist beschrieben, dass die *sch9*-Mutante (CCS3) bei 25 °C und Hypoxie mit 6 % CO₂ einen stark hyperfilamentösen Phänotyp zeigt. Um nachzuweisen, ob dieser Phänotyp tatsächlich auf das Fehlen des Gens *SCH9* zurückzuführen ist, wurde dieses in der *sch9*-Mutante (CAS4) rekonstituiert. Dazu wurde das Plasmid p2297S9 (*SCH9* unter der Kontrolle von *CaACT1p*) durch einen Verdau mit dem Restriktionsenzym *EcoRV* linearisiert, mit Hilfe einer Mitchell-Transformation in das Gen *LEU2* der *sch9*-Mutante transformiert und zur Selektion auf SD-Agarplatten ausplattiert. Zur Kontrolle wurde auf die gleiche Weise auch das Plasmid pDS1044-1 in den Deletionsstamm transformiert. pDS1044-1 ist das Ausgangsplasmid zu p2297S9 und enthält das Gen *SCH9* nicht. Von jeder Transformation wurden mindestens drei Kolonien ausgewertet.

2.8 qRT-PCR

Die real-time RT PCR ist eine Vervielfältigungsmethode für Nukleinsäuren, die auf dem Prinzip einer normalen Polymerase-Kettenreaktion beruht und zusätzlich die Quantifizierung der gewonnenen DNA ermöglicht. Mit Hilfe von Fluoreszenz-Messungen, die während eines PCR-Zyklus erfasst werden, wird die Quantifizierung in der exponentiellen Phase der PCR vorgenommen. In dieser Arbeit wurde der Fluoreszenzfarbstoff SYBR-Green verwendet, der bei einer Wellenlänge von 497 nm angeregt und bei 520 nm emittiert wird. Da dieser Farbstoff unspezifisch in doppelsträngige DNA interkaliert, ist es nötig die Spezifität der Reaktion mittels Schmelzkurve zu verifizieren. Die real-time RT PCR wurde in einem Real-time-PCR-Cycler ABI Prism 7000 der Firma Applied Biosystems durchgeführt.

2.8.1 cDNA-Synthese aus gesamt-RNA mit Oligo(dT) Primern

Zu Beginn wurde die gesamt-RNA wie in Abschnitt 2.4.2 beschrieben aus *C. albicans* isoliert. Anschließend folgte eine DNase Behandlung (TURBO DNase Kit, Ambion) mit 8 µg der isolierten RNA, die in einem 20 µl Ansatz mit 2 µl 10x DNase I Puffer und 1 µl DNase versetzt wurde. Der Ansatz wurde 30 min bei 30 °C inkubiert und nach Herstellerangaben mit Hilfe eines RNA Clean-up Kits (Zymoresearch) gereinigt. 1-2 µg der aufgereinigten RNA wurden mit 2 µl Oligo(dT) (RETROscript® First Strand Synthesis Kit for RT-PCR, Ambion) und Nukease freiem Wasser in einem Gesamtvolumen von 12 µl für 3 min bei 70 °C denaturiert und anschließend auf Eis gestellt. Für die reverse Transkriptase Reaktion wurde folgender Ansatz verwendet:

10x RT-Puffer	2 µl
dNTP-Mix	4 µl
RNase Inhibitor	1 µl
Reverse Transkriptase	1 µl
ad H ₂ O	20 µl

Die reverse Transkription verlief 1 Stunde bei 42 °C und wurde anschließend bei 92 °C für 10 min hitzeinaktiviert. Als Kontrolle („No RT control“) wurde nach jeder RNA-Aufreinigung RNA mit Wasser in einem Volumen von 20 µl angesetzt. Dieser Ansatz diente als Nachweis von Kontaminationen durch DNA im PCR-Ansatz.

2.8.2 Real-time PCR Reaktion und Quantifizierung

Die cDNA wurde wie in Abschnitt 2.8.1 hergestellt und im folgenden PCR-Reaktionsansatz eingesetzt:

cDNA	10 µl
SYBR Green Mix (Invitrogen)	12,5 µl
Primer-hin [10 pmol/µl]	1 µl
Primer-rück [10 pmol/µl]	1 µl

Die verwendeten Primer wurden mit Hilfe des Programms „Real-time PCR Design“ (www.genscript.com/ssl-bin/app/primer) ausgewählt und sind der Tabelle 3 zu entnehmen.

Material und Methoden

Von jeder cDNA wurde eine Doppelbestimmung in eine 96-well PCR Platte (Applied Biosystems, Frankfurt) pipettiert und mit 14,5 µl des Reaktionsansatzes vermischt. Für die Normalisierung wurden die Primer für Aktin [ACT1(RT)-for und ACT1(RT)-rev] bei jedem Lauf mit angesetzt. Anschließend wurde die Real-time PCR Maschine (ABI PRISM 7000, Applied Biosystems) mit folgendem Programm gestartet:

AmpliAq Aktivierung	95 °C, 10 min
PCR:Denaturierung	95 °C, 15 s
Annealing/Extension	60 °C, 1 min
	(40 x Wiederholung)

Nach jedem Zyklus wird die Fluoreszenz der Proben gemessen und protokolliert (ABI-Software). Zu Beginn der PCR-Reaktion wird lediglich die Basis- oder Hintergrundfluoreszenz gemessen, da die Reporterfluoreszenz wegen der geringen DNA-Menge noch nicht detektierbar ist. Anschließend steigt die Kurve exponentiell an und erreicht am Ende ein Plateau. Dieses Plateau entsteht weil die Enzymaktivität nachlässt und die amplifizierten DNA-Fragmente untereinander hybridisieren. Für die Auswertung einer Real-time PCR wird der Fluoreszenz-Schwellenwert (C_T -Wert) der Kurven ermittelt. Dieser Wert drückt die Zyklenzahl aus, bei der die Reporterfluoreszenz die Hintergrundfluoreszenz erstmals signifikant übersteigt. Durch Festlegen der Zyklenzahl für die Hintergrundfluoreszenz und des Threshold für jedes Primerpaar, können die C_T -Werte für jede Kurve berechnet werden.

Um die tatsächliche Änderung des Transkriptlevels unter bestimmten Bedingungen erhalten zu können, wurde der relative Transkriptspiegel ermittelt. Für die Auswertung und Darstellung der Daten wurden folgende Formel angewendet:

$$\Delta C_T = C_T(\text{Zielgen}) - C_T(\text{Normalisiergen})$$

$$\text{Effizienz} = 10^{(-1/\text{Eichgerade})}$$

$$\text{RTL} = \frac{(\text{Effizienz des Normalisiergens})^{C_T \text{ Normalisiergen}}}{(\text{Effizienz des Zielgens})^{C_T \text{ Zielgen}}}$$

2.9 Transkriptomanalyse

2.9.1 DNA-Microarrays

Mit Hilfe von DNA-Microarrays können genomweite Genexpressionsprofile verglichen werden. Es können Gene identifiziert werden, welche nur unter bestimmten Bedingungen reguliert sind. Dazu wird aus der Gesamt-RNA mit Hilfe einer Reversen-Transkriptase-Reaktion eine mit den Fluorochromen Cy3 und Cy5 markierte Komplementär-DNA (cDNA) hergestellt. Die unterschiedlich markierte cDNA zweier zu vergleichenden Proben wird vereinigt und zur Hybridisierung auf einen DNA-Chip gegeben. Dort bindet die markierte cDNA an komplementäre Sequenzen. Nach dem Scannen mit zwei unterschiedlichen Wellenlängen (Cy3: 532 nm und Cy5: 640 nm) erfolgt eine Quantifizierung der hybridisierten cDNA. Der Vergleich der Signalintensitäten der beiden Wellenlängen liefert eine Aussage über die Expression jedes einzelnen Gens. Die DNA-Arrays wurden vom „Galar Fungail Consortium“ (<http://www.galarfungail.org/>) entwickelt und von der Firma Eurogentec (Seraing, Belgien) hergestellt. Diese bestehen aus einem Aldehyd beschichteten Glasträger, auf dem kurze DNA-Sequenzen der 5.907 *C. albicans*-Gene sowie diverse Kontrollen (*C. albicans* mitochondriale Gene, *S. cerevisiae* und bakterielle Gene) punktgenau aufgebracht sind.

2.9.2 Anzucht der Zellen für Microarrays

Für die Transkriptomanalyse des Transkriptionsfaktors Efg1 wurden die Stämme CCS1 und CCS2 über Nacht bei 30 °C in 5 ml YPD angezogen und in YP (wie YPD, aber ohne Glukose) gewaschen. Anschließend wurden 100 ml YP-Medium mit 10 % Pferdeserum, 0,01 % Glukose, 0,002 % Uridin und 40 ppm Antifoam (Sigma) mit der jeweiligen Kultur auf OD₆₀₀ von 0,1 angeimpft. Das Medium befand sich in einer sterilen 500 ml Gasflasche mit Filterplättchen und einem Schraubverschluss mit Drechselkopf der Firma SCHOTT (Mainz). Um die Kulturen zu äquilibrieren wurden sie 10 min bei 37 °C entweder unter normoxischen Bedingungen inkubiert oder mit einem definierten Gasgemisch (93,8 % N₂, 6 % CO₂, 0,2 % O₂) behandelt. Nach der Vorinkubation wurden die Zellen für den Zeitpunkt Null (T₀) in einem vorgekühlten Falcongefäß geerntet und mit Wasser bei 4 °C gewaschen. Zu den restlichen Kulturen wurden je 40 µg/ml Doxycylin gegeben und weiterhin wie beschrieben mit Gas behandelt und nach definierten Zeitpunkten geerntet.

Material und Methoden

Für die Transkriptomanalyse der *sch9*-Deletionsmutante (Abschnitt 3.4.5) wurden hypoxische Bedingungen in Flüssigkulturen mit Hilfe einer Hypoxiebank der Firma Ruskinn (England) hergestellt. Dazu wurde 100 ml Kultur in 300 ml Kolben auf Magnetrührern angezogen. Vor jedem Versuch wurde das Medium über Nacht in den jeweiligen Gasbedingungen äquilibriert .

2.9.3 Synthese der Komplementär – DNA

Die Isolierung der Gesamt-RNA von *C. albicans* wurde bereits in Abschnitt 2.5.2 beschrieben. Anschließend wurde mit Hilfe einer Reversen-Transkriptase-Reaktion und Fluorochrom-modifizierten Nukleotiden (Cy3- und Cy5- dCTP) eine farblich markierte cDNA aus der Gesamt-RNA hergestellt. Da die verwendeten Fluorochrome lichtempfindlich sind, wurde unter Lichtausschluss gearbeitet. Der Reaktionsansatz (Tab. 4) wurde für 5 min bei 95 °C denaturiert, anschließend für 5 min bei 42 °C abgekühlt, mit je 3 µl RNasin (Promega) und Superscript II RT (Invitrogen) versetzt und für 2 Stunden bei 42 °C inkubiert. Nach 60 Minuten wurden erneut 3 µl Reverse Transkriptase zugegeben. Nach weiteren 60 Minuten wurde die Reaktion durch Zugabe von 15 µl EDTA (50 mM, pH 8,0) gestoppt. Zur Degradation der RNA wurde der Ansatz mit 10 µl 10 M NaOH-Lösung versetzt und für 20 min bei 65 °C inkubiert. Nach Neutralisierung des Ansatzes mit 20 µl Essigsäure (5M) wurde die cDNA mit Hilfe des Qia-quick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben aufgereinigt. Die Elution der cDNA von der Säule erfolgte abweichend vom Herstellerprotokoll mit 2 x 50 µl 42 °C warmen Wassers. Nach Vereinigung der zwei Eluate wurden diesen mit Hilfe von Microcon-YM30 Säulen (Milipore) auf ein Volumen von 10 µl konzentriert.

Komponente	Volumen (µl)
5 x Erststrang Puffer	24
<i>C. albicans</i> specific primer mix (0,1 pmol/µl)	3
AncT mRNA primr (1,5 µg/µl)	3
Oligo dT18-21 (0,5 µg/µl)	6
10 mM dNTP-dCTP	18
1 mM dCTP	3
1 mM Cy3- oder Cy5- dCTP	4,5
0,1 M DTT	12
RNasin	3
Gesamt-RNA	(30 µg)
ad H ₂ O	120 µl

Tab. 4: Reaktionsansatz zur Herstellung von markierter cDNA aus gesamt-RNA

2.9.4 Hybridisieren, Waschen und Scannen der DNA Microarrays

Für die Hybridisierung der markierten cDNA wurden die Objektträger mit einem Deckglas mit seitlichen Rändern bedeckt (Imölen GmbH, München). Durch die Ränder entstand ein Hohlraum zwischen Deckglas und Objektträger. Je 10 µl der markierten cDNA (Cy3 und Cy5) wurden zusammen mit 10 µl Heringsperma-DNA (10 mg/ml) für 2 min bei 95 °C denaturiert und auf Eis gekühlt. Die Probe wurde anschließend mit 60 µl Hybridisierungspuffer (Roche) versetzt und seitlich in den Zwischenraum von Deckglas und Objektträger pipettiert. Durch Kapillarkräfte wird die Hybridisierungslösung gleichmäßig unter das Deckglas gezogen. Der Objektträger wurde dann in eine Hybridisierungskammer gelegt (Corning) und am Rand mit zweimal 10 µl Wasser versehen. Die Hybridisierung erfolgte im Wasserbad für 24 Stunden bei 42 °C. Anschließend wurden die Objektträger aus der Hybridisierungskammer entnommen und je zweimal für 10 min mit Waschlösung I (30 mM NaCl, 3 mM Citrat, 0,1 % SDS) und Waschlösung II (30 mM NaCl, 3 mM Citrat) unter leichtem Schwenken gewaschen. Zum Schluss wurden sie in Falcon-Gefäßen durch Zentrifugation (5 min, 550 Upm) getrocknet. Restliche Tropfen der Waschlösung wurden mit Druckluft vorsichtig getrocknet. Gescannt wurden die Arrays bei den Wellenlängen 532 nm (Cy3) und 640 nm (Cy5). Für den Scanvorgang und der Erstellung einer gpr.-Datei wurde das Programm GenePix 6.0 verwendet.

2.9.5 Normalisierung und statistische Auswertung

Die Rohdaten wurden mit Hilfe des Programmes GeneSpring 10.2 (Agilent, USA) ausgewertet, über den LOWESS-Algorithmus normalisiert und anschließend in das Programm Excel (Microsoft) exportiert. Da auf den verwendeten Arrays jedes Gen doppelt aufgetragen ist und pro Versuch mindestens drei Replikate durchgeführt wurden, ergaben sich so für jedes Gen mindestens sechs Signalintensitätsverhältnisse (Intensität Experiment im Verhältnis zu Intensität Referenz). Als reguliert wurden die Gene bezeichnet, deren Mittelwert aus den sechs Einzelwerten (berechnet durch GeneSpring10.2) eine mindestens zweifache Änderung zeigte. Ein weiteres Auswahlkriterium war, dass nicht nur der Mittelwert, sondern auch im Fall der einzelnen Replikate die Gene von Interesse mindestens zweifach reguliert sein sollten. Nicht auswertbare Bereiche einzelner Arrays wurden manuell aussortiert.

2.10 Untersuchung der Virulenz mit Hilfe eines Mausmodells (durchgeführt von Prof. Anna Vecchiarelli, Universität Perugia, Italien)

Als Tiere wurden 8-10 Wochen alte CD1 Mäuse verwendet. Sie wurden von den Harlan Nossan Laboratories (Mailand, Italien) bezogen und in der Tierunterkunft der Universität von Perugia (Perugia, Italien) untergebracht nach nationalen und internationalen Rechten behandelt. Für systemische Infektionen wurde den Mäusen am Tag 0 intravenös die Stämme CAF2-1, CCS3 bzw. CCS4 in einer Konzentration von 1×10^6 Zellen/Maus (Verdünnt in 0,5 ml Kochsalzlösung) injiziert. Infizierte Mäuse wurden täglich auf ihr Ableben hin beobachtet. Das Experiment wurde dreimal wiederholt. Je Experiment und je Testgruppe wurden vier Mäuse verwendet (je *C. albicans*-Stamm insgesamt 12 Mäuse). Unterschiede und Abweichungen in den Ergebnissen wurden mit Hilfe eines Mann-Whitney-U-Tests ausgewertet.

3 Ergebnisse

3.1 Einfluss von Hypoxie auf das Hyphenwachstum von *C. albicans*

C. albicans besitzt verschiedene Virulenzfaktoren, wobei der Dimorphismus, bei dem die Zelle ihre Form von einer kugeligen Hefe zu einer echten Hyphe wechselt, als die bedeutenste Eigenschaft gilt (Odds, 1988). Der Transkriptionsfaktor Efg1 spielt bei diesem Wechsel des Phänotyps eine wichtige Rolle, denn durch ihn werden Gene des Metabolismus und der Morphogenese reguliert. Wird eine *efg1*-Mutante unter hypheninduzierenden und aeroben Bedingungen angezogen, wächst sie, im Gegensatz zum Wildtyp, in der Hefeform (Stoldt *et al.*, 1997; Lo *et al.*, 1997). Unter hypoxischen bzw. „eingebetteten“ Bedingungen zeigt der *efg1*-Deletionsstamm dagegen ein hyperfilamentöses Wachstum (Sonneborn *et al.*, 1999; Brown *et al.*, 1999). Dieses Verhalten weist darauf hin, dass Efg1 unter normoxischen Bedingungen eine induzierende und unter hypoxischen Bedingungen eine reprimierende Wirkung auf die Hyphenbildung hat. Somit scheint *C. albicans* unter verschiedenen Gasbedingungen unterschiedliche Regulationsmechanismen z. B. der Hyphenbildung zu aktivieren. Deshalb wird im Rahmen dieser Arbeit unter anderem der Einfluss von Sauerstoff und Kohlendioxid auf die Morphogenese und Genregulation von *C. albicans* untersucht.

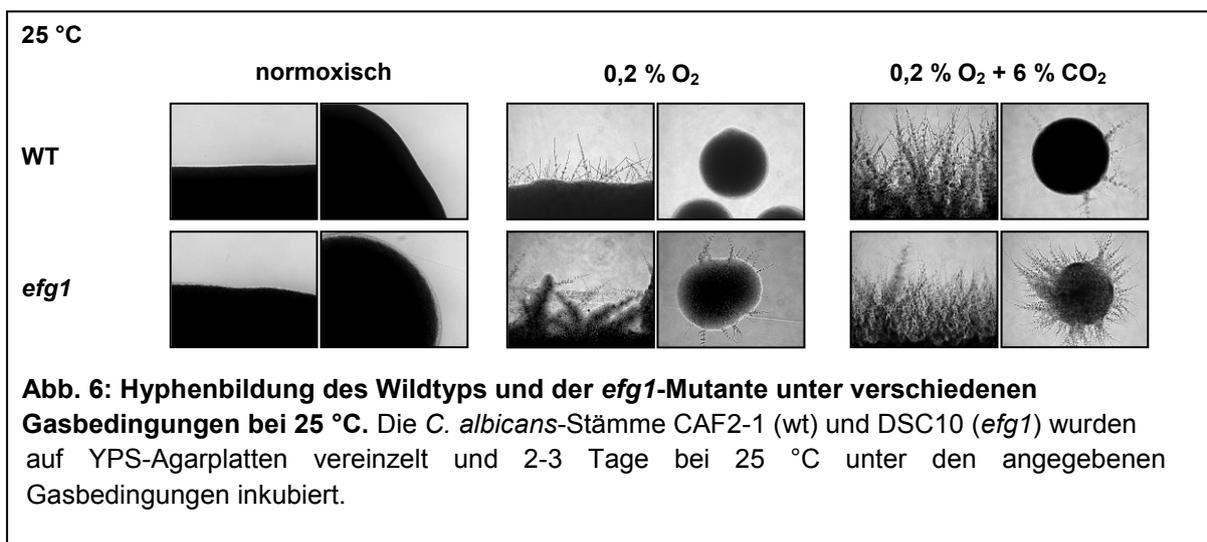
3.1.2 Koloniemorphologie des *efg1*-Deletionsstammes

Die Koloniemorphologien des Wildtyps und der *efg1*-Mutante wurden bei Hypoxie bereits untersucht und die hypoxischen Bedingungen dabei auf verschiedene Weise hergestellt. Einerseits wurden die Zellen unter „eingebetteten“ Bedingungen in Agar (Giusani *et al.*, 2002) oder unter einem Deckglas auf Maismehlagar (Sonneborn *et al.*, 1999) angezogen. In anderen Experimenten wurden ein Mikroaerobier-Topf (Doedt *et al.*, 2004) oder luftdicht verschließbare Kästen, die mit einem definierten Gasgemisch durchströmt wurden, verwendet (Setiadi *et al.*, 2006). Der Nachteil der meisten Verfahren bestand darin, dass keine exakte Bestimmung der Gaszusammensetzung möglich war. In dieser Arbeit konnten die gewünschten hypoxischen Bedingungen dagegen mit Hilfe der INVIVO₂₀₀-Hypoxiebank genau eingestellt werden. Dazu wurden der Wildtyp-Stamm und der *efg1*-Deletionsstamm auf YPS-Agarplatten vereinzelt und unter normoxischen, hypoxischen (0,2 % O₂) und hypoxischen Bedingungen mit einem erhöhten CO₂-

Ergebnisse

Wert (0,2 % O₂ mit 6 % CO₂) bei jeweils 25 °C und 37 °C angezogen. Das YPS-Medium wurde verwendet, da in vorangegangenen Versuchen (Setiadi *et al.*, 2006) ebenfalls mit diesem Medium gearbeitet wurde und die Ergebnisse so besser vergleichbar sind. Nach einem Wachstum von 3-4 Tagen wurde die Koloniemorphologie der verwendeten Stämme mit Hilfe eines Mikroskops (Axioskop 40, Zeiss) dokumentiert.

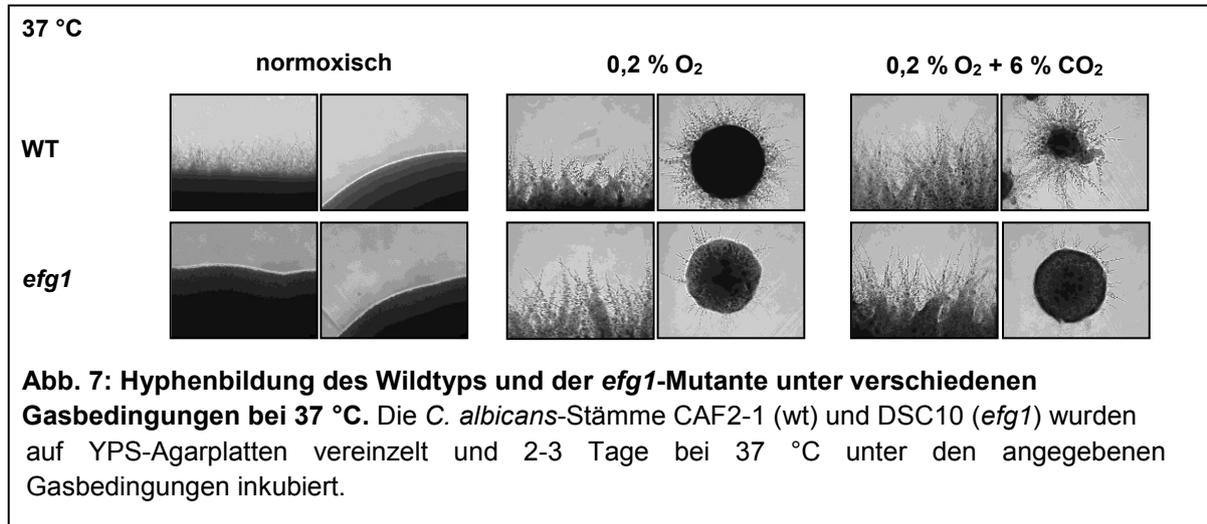
3.1.2.1 Morphogenese bei 25 °C



Die mikroskopischen Aufnahmen in Abb. 6 zeigen Ausstriche und einzelne Kolonien des Wildtyps und der *efg1*-Mutante bei einer Wachstumstemperatur von 25 °C unter den angegebenen Gasbedingungen. Unter normoxischen Bedingungen bildeten weder der Ausstrich, noch die Einzelkolonien beider Stämme Filamente. Nach Inkubation in 0,2 % O₂ zeigte der *efg1*-Deletionsstamm eine deutliche Hyphenbildung an Ausstrich und Kolonien, während der Wildtyp dagegen nur wenige Hyphen am Ausstrich ausbildete. Nach einer längeren Inkubationszeit waren jedoch auch an den Kolonien des Wildtyps Hyphen erkennbar (Daten nicht gezeigt). Unter hypoxischen Bedingungen mit einem erhöhten CO₂-Wert wurde die Hyphenbildung allgemein beschleunigt. Hier zeigten beide Stämme schon nach zwei Tagen ein starkes filamentöses Wachstum im Bereich des Ausstrichs. Wie unter hypoxischen Bedingungen ohne CO₂ wies die Einzelkolonie der *efg1*-Mutante hier ebenfalls eine stärkere Hyphenbildung auf als die des Wildtyps.

3.1.2.2 Morphogenese bei 37 °C

Da es sich bei *C. albicans* um einen humanpathogenen Pilz handelt, wurde das Wachstum der Stämme unter den beschriebenen Gasbedingungen auch bei einer Temperatur von 37 °C untersucht.



Es ist bereits bekannt, dass unter normoxischen Bedingungen und einer Temperatur von 37 °C die Hyphenbildung des Wildtyps induziert wird (Ernst, 2000). In Abb. 7 ist ebenfalls erkennbar, dass unter normoxischen Bedingungen der Wildtyp gegenüber der *efg1*-Mutante eine stärkere Hyphenbildung zeigte. Allerdings war das filamentöse Wachstum nur am Ausstrich und nicht an den Einzelkolonien sichtbar, da das verwendete YPS-Medium nicht stark hypheninduzierend wirkt. Dieser Phänotyp war auch unter hypoxischen Bedingungen erkennbar und somit verhielten sich die Stämme genau umgekehrt im Vergleich zu einer niedrigen Temperatur (25 °C). Die Anwesenheit von CO₂ änderte den Phänotyp gegenüber einer Gaskonzentration von 0,2 % O₂ nicht. Allerdings war die Hyphenbildung, wie bereits im vorherigen Abschnitt beschrieben, verstärkt.

3.2 EFG1 unter der Regulation des Tet-On-Systems

In den vorangegangenen Abschnitten wurde beschrieben, dass Efg1 eine wichtige Rolle bei der Hyphenbildung von *C. albicans* spielt. Aus diesem Grund wurden in der Vergangenheit zwar bereits Transkriptomvergleiche von Wildtyp und *efg1*-Mutante durchgeführt, doch können indirekte Regulationsvorgänge bei den dabei identifizierten Efg1-regulierten Genen nicht ausgeschlossen werden. Ein Ziel

dieser Arbeit war es, diejenigen Gene zu identifizieren, die unmittelbar auf die Anwesenheit von Efg1 reagieren und somit direkte Zielgene des Transkriptionsfaktors darstellen könnten. Es sollte daher eine Transkriptomkinetik in Abhängigkeit von Efg1 durchgeführt werden. Für die Regulation spezifischer Gene stehen in *C. albicans* mehrere Promotoren zur Verfügung, wie z. B. der *PCK1*- (Leuker *et al.*, 1997) oder der *MET3*-Promotor (Care *et al.*, 1999). Um diese Promotoren zu regulieren, müssen die Zellen in einem induzierenden oder reprimierenden Medium wachsen. In dieser Arbeit sollte die Expression von *EFG1* aktiviert werden, ohne dabei das Medium zu wechseln, um so den Einfluss des Mediums auf das Transkriptom zu minimieren. Deshalb wurde das Tet-System verwendet, bei dem für die Kontrolle der Expression von *EFG1* nur die Zugabe von Tetracyclin bzw. Doxycyclin nötig war.

3.2.1 Konstruktion der Tet-On-*EFG1* Stämme

Das Tet-System ist ein einfaches und effektives System zur Induktion der Genexpression. Es besteht aus dem Tetracyclin-Repressorprotein (TetR), welches an den *tet*-Operator (*tetO*) in der Promotorregion der Tetracyclinresistenzgene von *E. coli* bindet. Dadurch wird bei Abwesenheit von Tetracyclin die Expression dieser Gene unterdrückt. Ist Tetracyclin anwesend, bindet dieses an TetR, wodurch sich der Repressor von seinem Promotor löst und die Expression der *tet*-Gene gestartet werden kann (Hillen und Berens, 1994). Gossen und Bujard (1992) konnten zeigen, dass mit Hilfe des oben beschriebenen Systems aus *E. coli* auch die transgene Expression in Säugerzellen reguliert werden kann. Dazu wurde die VP16-Aktivierungsdomäne des *Herpes simplex-Virus* mit dem Repressorprotein TetR fusioniert. Es entstand der tTA-Transaktivator, der bei Abwesenheit von Tetracyclin in der Lage ist, spezifisch an den *tet*-Operator *tetO* zu binden, welcher mit einem Minimalpromotor fusioniert ist. Ein Gen, das unter der Kontrolle dieses Minimalpromotors steht, kann so exprimiert werden, während die Anwesenheit von Doxycyclin das Gen inaktiviert (Tet-Off-System). Um die Funktion von Tetracyclin umzukehren wurden einige Aminosäuren in TetR ausgetauscht und es entstand der reverse Tet-Repressor (rTetR). Dieser bindet nur in der Anwesenheit von Tetracyclin an *tetO* (Gossen *et al.*, 1995). Durch die Fusion von rTetR an eine Transkriptionsaktivierungsdomäne wurde ein reverser Tetracyclin-kontrollierter Transaktivator (rtTA) hergestellt, durch den nach Zugabe von Tetracyclin (bzw. seinem Derivat Doxycyclin) die Genexpression gestartet werden kann (Tet-On-System). In dieser Arbeit wurde das von Park und Morschhäuser (2005) für *C. albicans* entwickelte Tet-On-System verwendet.

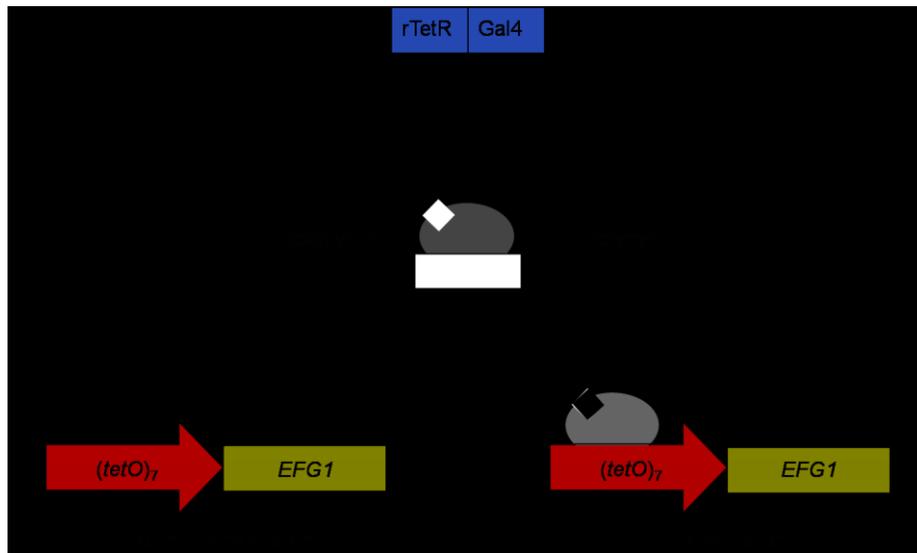


Abb. 8: Die Regulation von *EFG1* durch das Tet-On-System. Wird den Zellen Doxycyclin zugegeben, diffundiert dieses in das Zellinnere und bindet an die Fusion aus reversen Tet-Repressor (rTetR) und der Gal4-Aktivierungsdomäne. Dadurch ist diese in der Lage an den *tetO*-Promotor zu binden und die Transkription von *EFG1* zu aktivieren.

3.2.2 Ermittlung des relativen Transkriptspiegels des Gens *EFG1* unter der Regulation des Tet-On-Systems mit Hilfe einer Real-time qRT-PCR

Durch eine Transkriptomkinetik sollte die durch den Efg1-Transkriptionsfaktor unmittelbar hervorgerufene Genregulation ermittelt werden. Für die Transkriptomanalyse wurden die in Abschnitt 2.7.1 beschriebenen Stämme CCS1 und CCS2 verwendet, die unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen angezogen und zu definierten Zeitpunkten geerntet wurden (Abb. 9). Unter normoxischen Bedingungen wurden die Kulturen an der Luft angezogen und nach 0, 0,5, 1 und 3 min geerntet. Unter hypoxischen Bedingungen wurden sie mit einem Gasgemisch von 93,8 % N₂, 6 % CO₂ und 0,2 % O₂ behandelt und nach 0, 5, 10 und 20 min geerntet. Anschließend wurde der Transkriptlevel von *EFG1* mittels qRT-PCR überprüft, wozu die Gesamt-RNA der Stämme CCS1 und CCS2 zu jedem Zeitpunkt präpariert wurde.

Ergebnisse

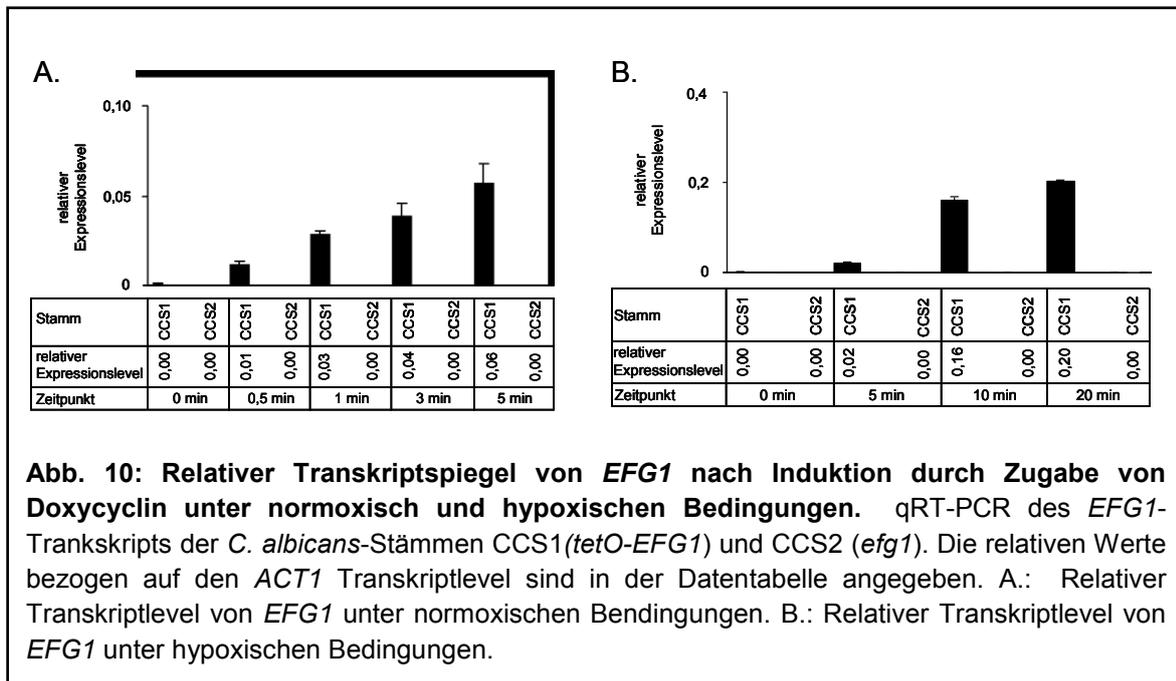
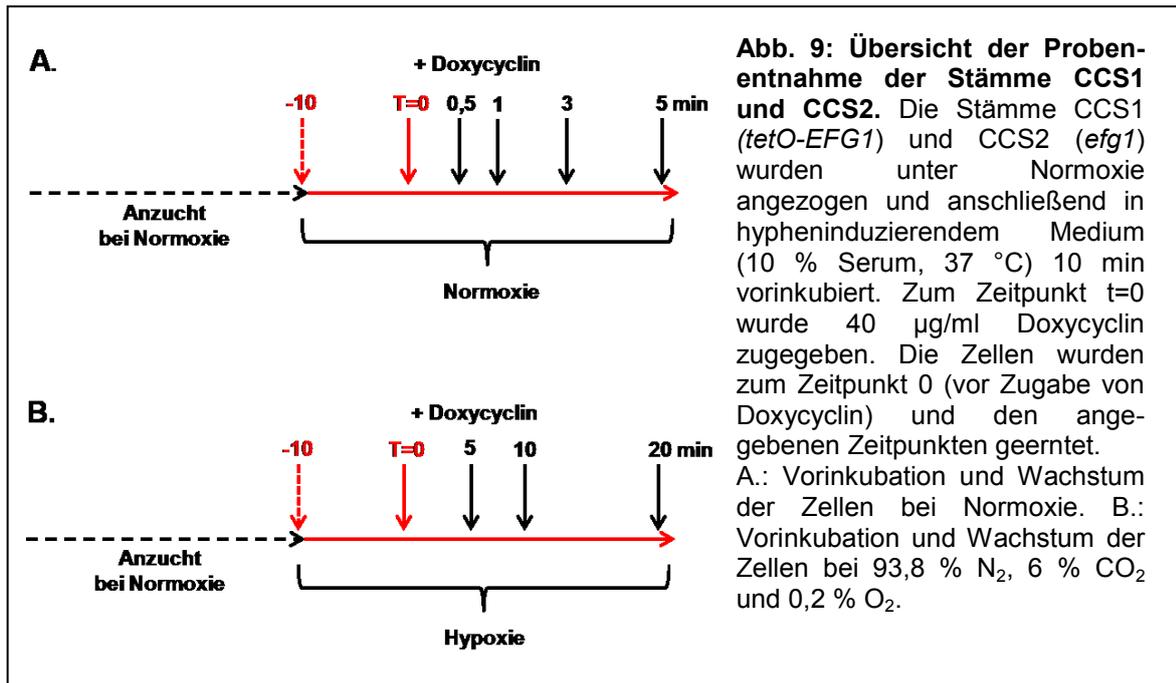


Abb. 10 zeigt den relativen Transkriptionsspiegel des *EFG1*-Gens (bezogen auf den *ACT1*-Transkriptionsspiegel) in den Stämmen CCS1 (*tetO-EFG1*) und CCS2 (*efg1*) nach Zugabe von Doxycyclin. Wie erwartet steigt im Verlauf der Kinetik im Stamm CCS1 der Expressionslevel von *EFG1* nach Zugabe von Doxycyclin unter

beiden Gasbedingungen (normoxisch und hypoxisch) stetig an. Der Kontrollstamm CCS2 zeigt kein *EFG1*-Transkript.

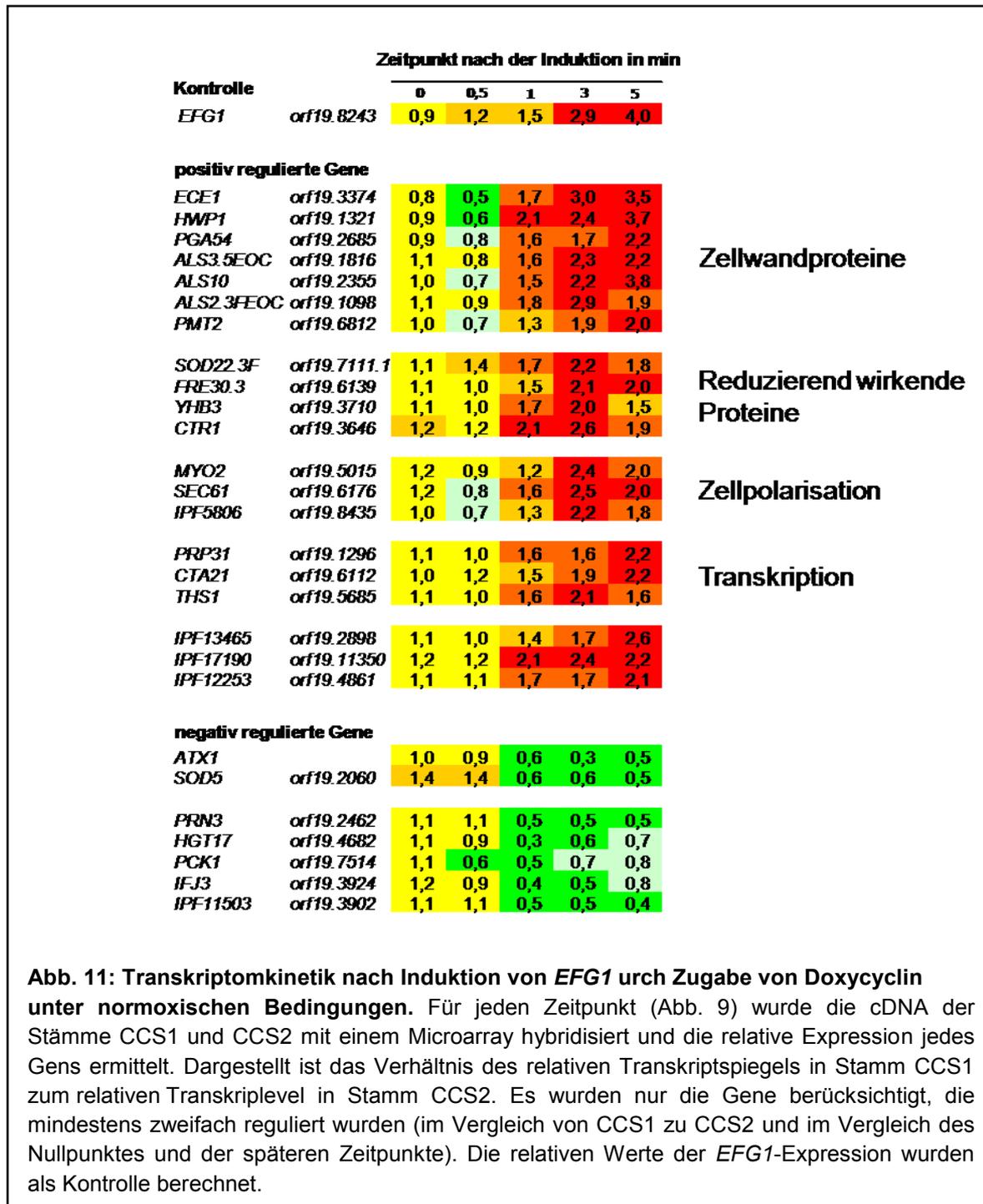
3.2.3 Genomweite Transkriptomanalyse von *EFG1* unter der Regulation des Tet-On-Systems

Die RNA der getesteten Stämme (Abschnitt 3.2.2) wurde für eine genomweite Transkriptomanalyse eingesetzt. Dazu wurden kommerzielle DNA-Microarrays der Firma Eurogentec genutzt, welche mit ca. 6.000 offenen Leserastern etwa 98 % der Gene von *C. albicans* enthalten. Die markierte cDNA der zu vergleichenden Proben (CCS1 und CCS1 des jeweiligen Zeitpunktes) wurde mit einem DNA-Microarray hybridisiert. Nach Waschen und Scannen erfolgte die Normalisierung und statistische Auswertung der Transkriptwerte. Als reguliert wurden die Gene bezeichnet, die eine mindestens 2-fache Änderung zur Referenz aufwiesen und einen eindeutigen Verlauf (Zu- oder Abnahme) des Transkriptspiegels zeigten. Durch die Berechnung des Verhältnis des relativen Transkriptspiegels in CCS1 zu CCS2, konnten Veränderungen auf das Transkriptom durch Doxycyclin ausgeschlossen werden. Die Daten der Arrayanalyse sind vollständig bei Array Express unter der Accession Nummer E-MEXP-2117 und E-MEXP-2119 einzusehen (<http://www.ebi.ac.uk/>).

3.2.3.1 Transkriptomanalyse normoxisch Efg1-regulierter Gene

In diesem Microarray-Experiment wurden 28 der rund 6.000 Gene als durch Efg1 signifikant reguliert identifiziert. Dabei wurde der Transkriptspiegel von 20 Genen erhöht und von 7 Genen gesenkt. Wie bereits durch qRT-PCR ermittelt (Abb. 10), wurde auch in der Array-Analyse der ansteigende Transkriptspiegel von *EFG1* durch Zugabe von Doxycyclin und zunehmender Inkubationszeit deutlich.

Ergebnisse



Die größte Gruppe der positiv regulierten Gene kodiert für Zellwandproteine, wie z. B. *Ece1*, *Hwp1*, *Pga54* und *Als2*. Außerdem zählt zu dieser Gruppe auch das Gen der O-Mannosyltransferase *Pmt2*, die die O-Mannosylierung von Zellwandproteinen bewirkt. Um das Ergebnis der Transkriptomanalyse zu bestätigen, wurde die Regulation der Gene *ECE1* und *HWP1* durch eine qRT-PCR verifiziert. Dazu wurde der Transkriptlevel dieser Gene bei den Zeitpunkten 0, 0,5,

Ergebnisse

1, 3 und 5 Minuten nach der Induktion durch Doxycyclin gemessen. In Tabelle 5 sind die relativen Transkriptspiegel dieser Gene (bezogen auf den Transkriptspiegel des *ACT1*-Transkripts) in CCS1 relativ zu CCS2 aufgeführt und bestätigen die Array-Daten.

	0 min	0,5 min	1 min	3 min	5 min
<i>ECE1</i>	1,2	0,8	2,4	3,4	2,8
<i>HWP1</i>	0,8	0,9	2,2	2,2	2

Tab. 5: Relativer Transkriptspiegel von *ECE1* und *HWP1* nach Induktion der Expression von *EFG1* unter normoxischen Bedingungen. Relativer Transkriptspiegel der Gene *ECE1* und *HWP1* in den Stämmen CCS1 (*tetO-EFG1*) und CCS2 (*efg1*) nach Zugabe von 40 µg/ml Doxycyclin.

Diese Gene wurden bereits bei früheren Transkriptomanalysen, in denen der Wildtyp mit einer *efg1*-Mutante verglichen wurde, als durch Efg1 regulierte Gene identifiziert (Nantel *et al.*, 2002; Doedt *et al.*, 2004; Setiadi *et al.*, 2006). Eine weitere Gruppe von Genen, die durch die Induktion von *EFG1* positiv reguliert wurden, umfasst Komponenten, die in der Zelle reduzierend wirken. Diese Gene kodieren unter anderem für die Superoxiddismutasen *SOD22* und *SOD3*, eine Fe³⁺-Reduktase (*FRE30*), Flavohämoglobin (*YHB3* bzw. *YHB5*) und ein Kupfertransportprotein (*CTR1*), welches möglicherweise die Aufnahme von Fe²⁺ unterstützt.

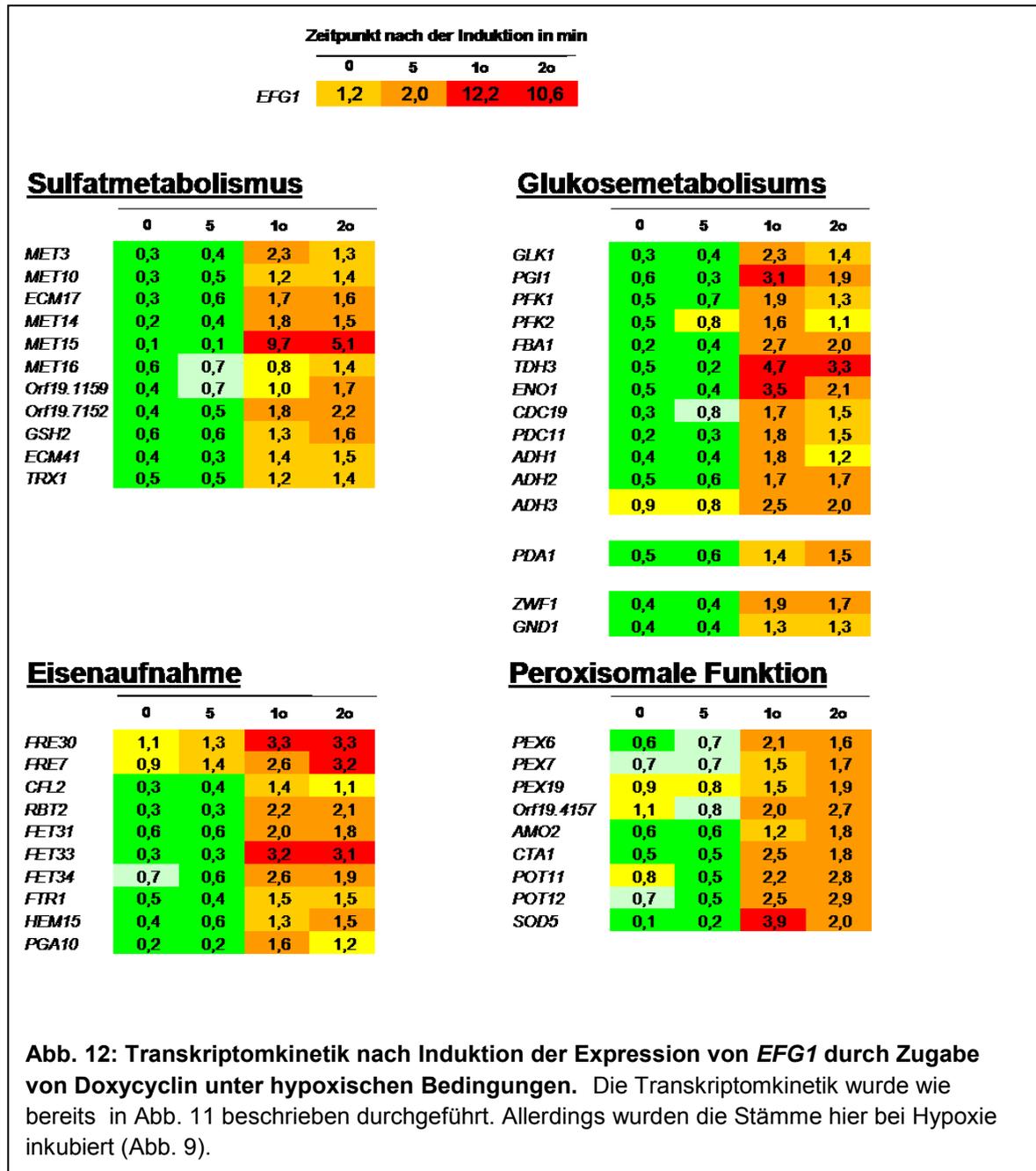
Insgesamt werden weniger Gene signifikant negativ als positiv reguliert. Auffällig ist auch, dass die wenigen negativ regulierten Gene nicht in funktionelle Gruppen eingeteilt werden konnten. Die geringe Zahl negativ regulierter Gene entstand eventuell dadurch, dass stabile RNA, deren Transkription durch Doxycyclin verringert wurde, in Zellen weiterhin nachgewiesen werden konnte.

3.2.3.2 Transkriptomanalyse hypoxisch Efg1-regulierter Gene

Unter hypoxischen Bedingungen stieg der relative *EFG1*-Transkriptspiegel in CCS1 innerhalb der ersten zehn Minuten nach Induktion um das 10fache an. Gleichzeitig wurden 45 weitere Gene identifiziert, deren Expression zunahm, während nur 13 Gene signifikant negativ reguliert wurden. Die Gruppe der 45 positiv regulierten Gene konnte in vier verschiedenen Gruppen eingeteilt werden (Abb. 12):

Ergebnisse

I.) Sulfatmetabolismus, II.) Glukosemetabolismus, III.) peroxisomale Funktion und IV.) Eisenaufnahme.



Drei dieser Gruppen beinhalten Gene, die während der Bildung eines Biofilms ebenfalls eine wichtige Rolle spielen. Die erste dieser drei Gruppen umfasst Gene mit glykolytischen Funktionen, wie z.B. die Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase *TDH3* und die Enolase *ENO1*. Beide Gene wurden in dieser funktionellen Gruppe sehr stark exprimiert (5-10 fach). Neben Genen der

Glykolyse wurden auch Gene des Pentosephosphatweges positiv reguliert (2-3fach). Diese sind *ZWF1* (Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase) und *GND1* (6-Phosphoglukonat-Dehydrogenase). Die zweite Gengruppe umfasst Gene, die dem Sulfatmetabolismus zugeordnet werden können. Dazu gehören Gene der Sulfatreduktion (z.B. *ECM17*) und der Cystein- und Methioninbiosynthese (z.B. *orf 19.7152* und *MET16*). Die genaue Funktion dieser Gene in Biofilmen ist noch unbekannt. Allerdings könnte ihre Funktion durch die Ansammlung von O₂-Radikalen in der hypoxischen Region des Biofilm erklärt werden, die durch reduzierende Moleküle wie Methionin und Cystein oder Proteine wie Thioredoxin neutralisiert werden (Dirmeier *et al.*, 2002). Gene der dritten Gruppe, die ebenfalls bei der Biofilmbildung aktiv sind, besitzen eine peroxisomale Funktion. Vertreter dieser Gruppe sind z.B. *CTA1* (Katalase) oder die Superoxiddismutase *SOD5*. Gene, die eine Rolle in der Eisenaufnahme der Zelle spielen, sind in der vierten Gruppe zusammengefasst. Diese Gene wurden in *C. albicans* zwar während des planktonischen Wachstums unter sauerstoffarmen Bedingungen als reguliert verifiziert, jedoch nicht in Transkriptomanalysen bei Biofilmbildung bei Normoxie. Eventuell werden Gene zur Eisenaufnahme in Biofilmen nur unter spezifischen Bedingungen aktiviert. Eine dieser Bedingungen könnte die Bildung eines Biofilms unter hypoxischen und eisenarmen Bedingungen sein. Abschließend ist noch zu bemerken, dass die Gene *FRE30* und *SOD5* unter normoxischen wie hypoxischen Bedingungen durch Efg1 reguliert wurden.

3.3 Biofilmbildung von *C. albicans*

C. albicans ist in der Lage einen komplexen Biofilm aufzubauen, bestehend aus einer inneren Schicht von hefeförmigen und einer äußeren Schicht von meist hyphenförmigen Zellen (Douglas, 2003). Beide Schichten werden zusätzlich von einer extrazellulären Matrix umgeben. Die Erforschung der Biofilmbildung in *C. albicans* gewinnt immer mehr an Bedeutung, da dieser für die Virulenz des Pilzes eine wichtige Rolle spielt und der Grund für viele Infektionen in Krankenhäusern ist (Douglas, 2003; Ramage *et al.*, 2005; Nobile und Mitchell, 2006). Im Patienten bilden sich Biofilme unter anderem auf medizinischen Implantaten (Kojic und Darouiche, 2004) oder venösen Kathetern aus, die durch ihre Resistenz gegen Fungizide oft nur schwer behandelbar sind (Chandra *et al.*, 2001; D'Enfert, 2006).

In vergangenen Studien wurden bereits 25 Gene beschrieben, die bei der Biofilmbildung von *C. albicans* eine Rolle spielen. Dazu gehören Oberflächenproteine (Nobile *et al.*, 2006; Zhao *et al.*, 2006; Pérez *et al.*, 2006; Nailis *et al.*, 2009) und Transkriptionsfaktoren (Ramage *et al.*, 2002; García-

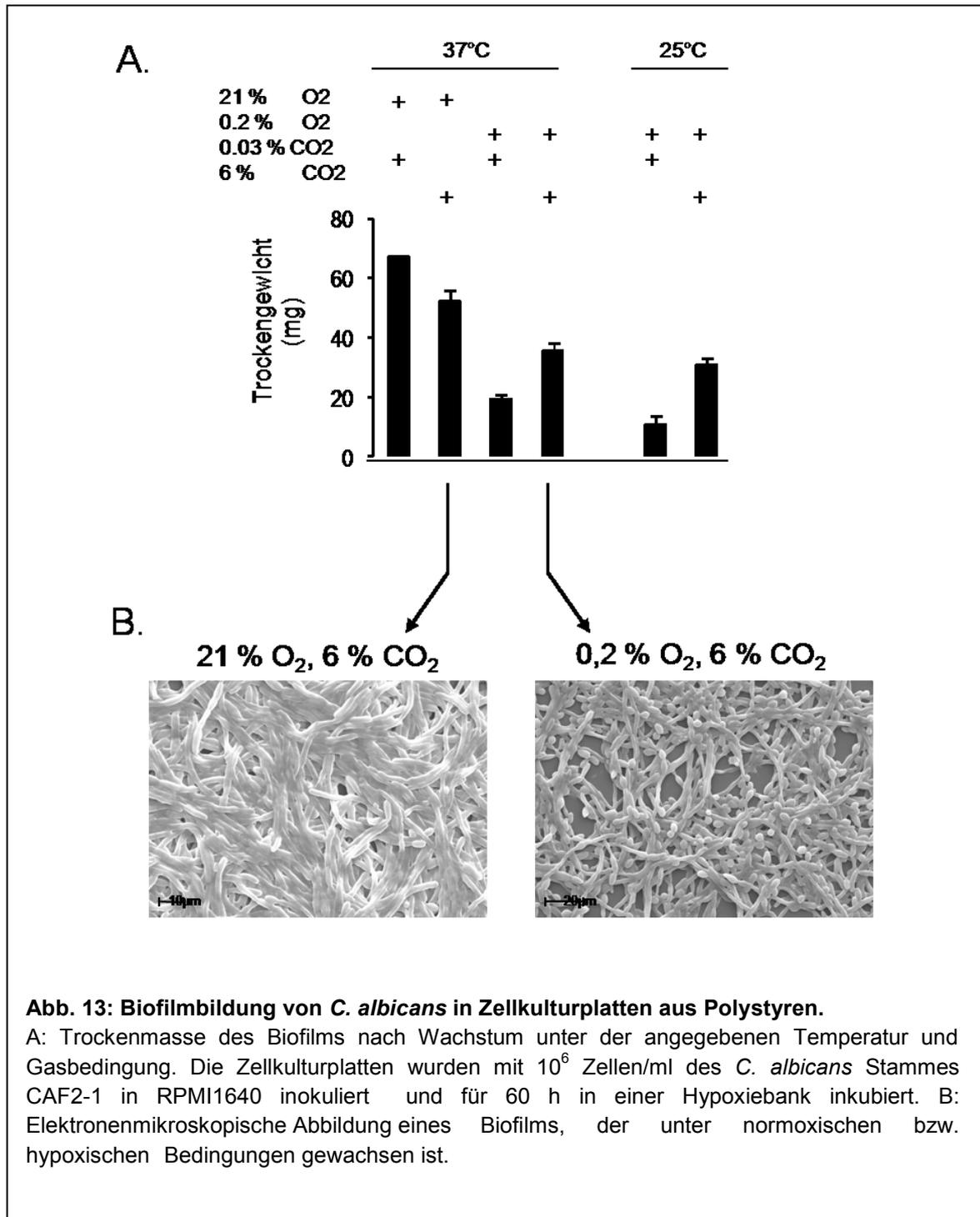
Sánchez *et al.*, 2004; Kelly *et al.*, 2004; Kumamoto, 2005; Nobile *et al.*, 2005; Nobile *et al.*, 2006; Peltroche-Llacsahuanga *et al.*, 2006). Da allerdings die Biofilmbildung in *C. albicans* in der Vergangenheit vorwiegend nur unter oxidischen Bedingungen untersucht wurde, wurde in dieser Arbeit untersucht ob verschiedene Transkriptionsfaktoren und Oberflächenproteine auch für die Biofilmbildung unter hypoxischen Bedingungen wichtig sind.

3.3.1 Biofilmbildung unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen

C. albicans befällt den menschlichen Körper und besiedelt dort sowohl oxidische, als auch hypoxische Nischen, oft unter Bildung eines Biofilms. Die Fähigkeit zur Biofilmbildung wurde in der Vergangenheit aber nur unter normoxischen Bedingungen untersucht. Deshalb sollte in dieser Arbeit die Biofilmbildung unter unterschiedlichen Gasbedingungen charakterisiert werden. Dazu wurden verschiedene *C. albicans*-Stämme auf Polystyren-Zellkulturplatten inkubiert und die Trockenmasse des gebildeten Biofilms wurde quantitativ ermittelt.

Abb. 13A zeigt die Trockenmasse des Biofilms des Wildtyps. Wie zu erkennen ist, bildete der Wildtyp unter normoxischen sowie unter hypoxischen Bedingungen (0,2 % O₂ und 6 % CO₂) bei 25 °C und bei 37 °C einen signifikanten Biofilm aus. Allerdings war die Trockenmasse bei Hypoxie ca. dreifach geringer als unter normoxischen Bedingungen. Die Anwesenheit von 6 % CO₂ verstärkte die Biofilmbildung unter hypoxischen, nicht aber unter normoxischen Bedingungen. Der Aufbau der Oberfläche beider Biofilme (Wachstum bei Normoxie bzw. Hypoxie) war sehr ähnlich, da diese bei mikroskopischer Betrachtung (Abb. 13B) eine Mischung von hefe- und hyphenförmigen Zellen zeigten. Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass auch unter geringen Sauerstoff- und erhöhten CO₂-Bedingungen, so wie sie auch im menschlichen Körper existieren, eine Biofilmbildung von *C. albicans* möglich ist.

Ergebnisse



Weiterhin wurde unter den beschriebenen Bedingungen die Biofilmbildung einer Reihe von Mutanten untersucht, von denen bekannt ist, dass sie eine defekte Biofilmbildung unter normoxischen Bedingungen aufweisen. Es wurde Mutanten verwendet, die Defekte in der Oberflächenstruktur der Zellwand zeigen. Darunter fallen zum Beispiel Mutationen verschiedenener Kinasen wichtiger Signalwege

Ergebnisse

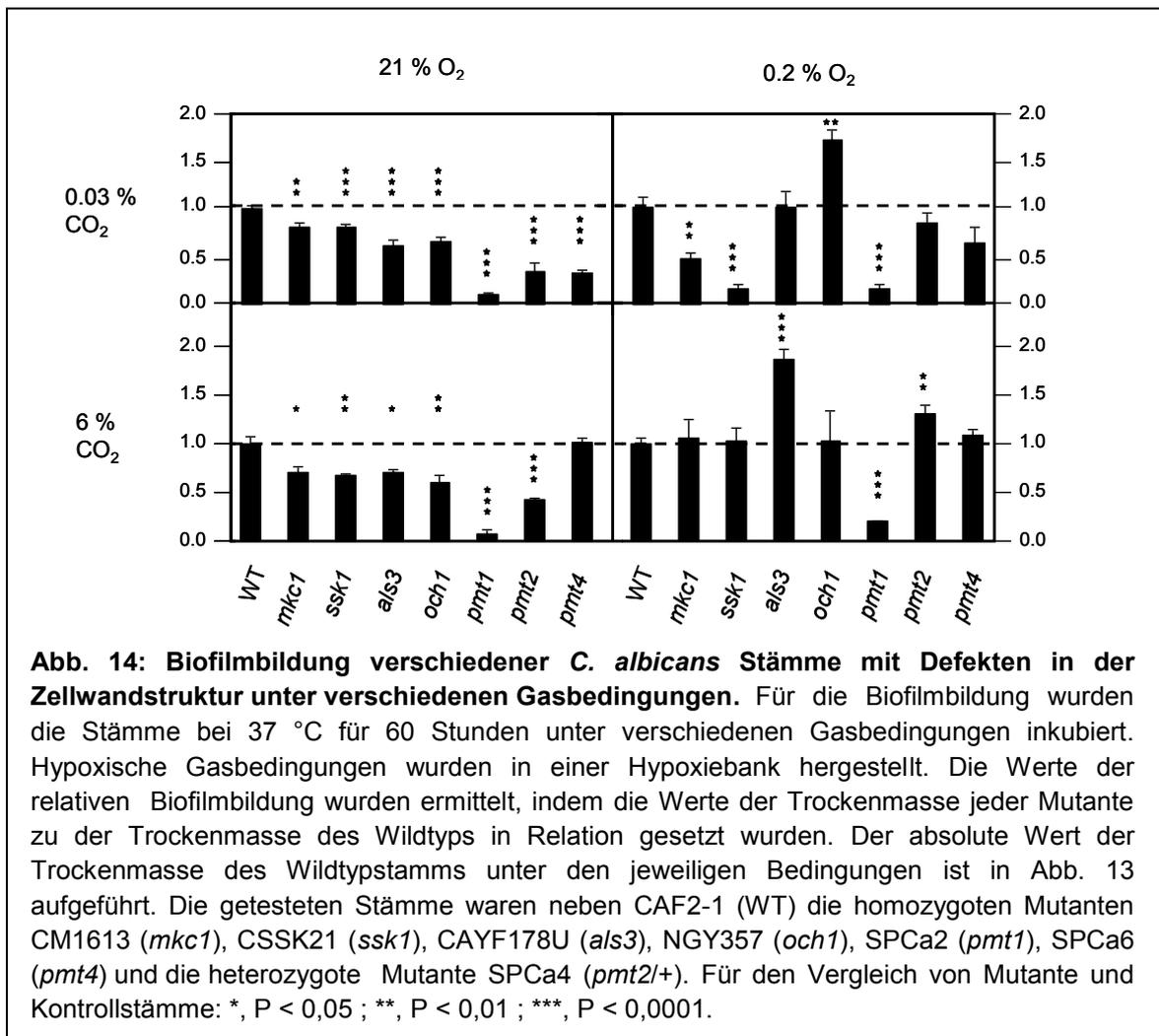
(*mkc1*, *ssk1*), eines Zellwandproteins (*als3*), der O-Mannosylierung (*pmt1*, *pmt2*, *pmt4*) oder verschiedener Transkriptionsfaktoren (*efg1*, *flo8*, *ace2*).

Anhand der Ergebnisse (Abb.14 und Abb. 15) konnten die eingesetzten Mutationsstämme in drei verschiedene Gruppen eingeteilt werden.

I.) Mutanten, die unabhängig von O₂ und CO₂ einen Defekt in der Biofilmbildung zeigten.

II.) Mutanten, die einen Defekt in der Biofilmbildung unter normoxischen, aber nicht unter hypoxischen Bedingungen aufwiesen.

III.) Mutanten, deren defekte Biofilmbildung bei Hypoxie mit CO₂ wieder hergestellt wurde.



Ergebnisse

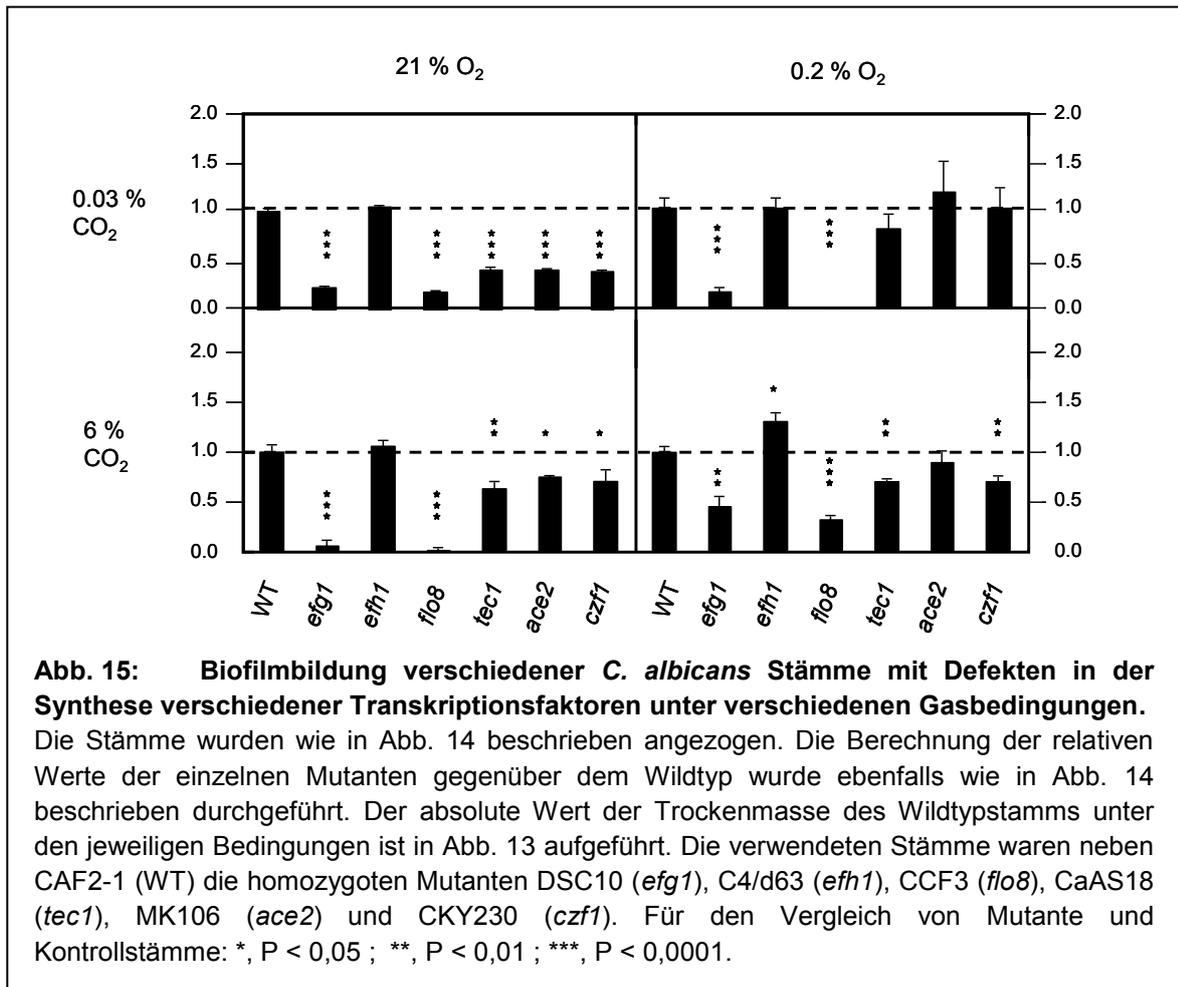


Abb. 15: Biofilmbildung verschiedener *C. albicans* Stämme mit Defekten in der Synthese verschiedener Transkriptionsfaktoren unter verschiedenen Gasbedingungen. Die Stämme wurden wie in Abb. 14 beschrieben angezogen. Die Berechnung der relativen Werte der einzelnen Mutanten gegenüber dem Wildtyp wurde ebenfalls wie in Abb. 14 beschrieben durchgeführt. Der absolute Wert der Trockenmasse des Wildtypstamms unter den jeweiligen Bedingungen ist in Abb. 13 aufgeführt. Die verwendeten Stämme waren neben CAF2-1 (WT) die homozygoten Mutanten DSC10 (*efg1*), C4/d63 (*efh1*), CCF3 (*flo8*), CaAS18 (*tec1*), MK106 (*ace2*) und CKY230 (*czf1*). Für den Vergleich von Mutante und Kontrollstämme: *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$; ***, $P < 0,0001$.

3.3.1.1 Mutanten, die unabhängig von Sauerstoff und CO₂ einen Defekt in der Biofilmbildung zeigen

Die Deletionsmutanten der *EFG1*-, *FLO8*- und *PMT1*-Gene zeigten eine defekte Biofilmbildung unter normoxischen sowie unter hypoxischen Bedingungen und unabhängig von der CO₂-Konzentration. *EFG1* ist ein Transkriptionsfaktor, der eine wichtige Rolle in Morphologie und Metabolismus von *C. albicans* spielt (Doedt *et al.*, 2004) und Ramage *et al.* (2002) zeigten bereits, dass die Anwesenheit von Efg1 für die Biofilmbildung unter oxischen Bedingungen notwendig ist. Die Mutante des Transkriptionsfaktors Flo8, der gemeinsam mit Efg1 eine Anzahl von Genen reguliert (Cao *et al.*, 2006), zeigte in dieser Arbeit wie die *efg1*-Mutante einen Defekt in der Biofilmbildung unter allen verwendeten Gasbedingungen. Das Gleiche gilt für die Mutante, der das Pmt1-Protein fehlt, welches die O-

Mannosylierung initiiert. Für *Pmt1* ist ebenfalls bereits bekannt, dass bei Fehlen dieses Gens die Biofilmbildung unter normoxischen Bedingungen sowohl in einem statischen, als auch in einem dynamischen Biofilmmodell, gestört ist (Peltroche-Llasahuanga *et al.*, 2006).

3.3.1.2 Mutanten, die einen Defekt in der Biofilmbildung unter normoxischen, aber nicht unter hypoxischen Bedingungen zeigen

Die Transkriptionsfaktoren *Tec1*, *Ace2* und *Czf1* spielen eine Rolle in der Hyphenbildung in *C. albicans*. Von *Tec1* und *Ace2* ist außerdem bekannt, dass sie für die Biofilmbildung unter oxischen Bedingungen nötig sind (Kelly *et al.*, 2004; Nobile und Mitchell, 2005). Der Transkriptionsfaktor *Tec1* wirkt unterhalb der *Cek1* MAP-Kinase und fördert die Hyphenbildung auf festen Medien (Schweizer *et al.*, 2000), während *Czf1* die Hyphenbildung unter eingebetteten Bedingungen ebenfalls aktiviert (Giusani *et al.*, 2002). Außerdem aktiviert *Ace2*, ähnlich wie *Efg1*, die Genexpression glykolytischer Gene und reprimiert dagegen respiratorische Gene (Kelly *et al.*, 2004). Hier konnte gezeigt werden, dass diese drei Transkriptionsfaktoren für die Biofilmbildung bei Normoxie nötig sind, aber nur eine geringe bzw. keine Rolle unter hypoxischen Bedingungen spielen. Die Biofilmbildung der *ace2*-Deletionsmutante zeigte unter hypoxischen Bedingungen dasselbe Niveau wie der Wildtyp-Stamm. Die Biofilmbildung der *tec1*- und *czf1*-Mutanten war unter hypoxischen Bedingungen zwar höher als unter normoxischen Bedingungen, aber geringer als die des Wildtyps.

Vier weitere Mutanten, die einen Defekt in der Biofilmbildung unter normoxischen, aber nicht unter hypoxischen Bedingungen zeigten, besitzen Defekte in der Bildung der Oberflächenstruktur von *C. albicans* (*als3*-, *och1*-, *pmt2/PMT2*- und *pmt4*- Mutanten). Fehlt in der Zelle das Zellwandprotein *Als3*, ist die Adhäsion und Biofilmbildung der Zelle eingeschränkt (Nobile und Mitchell, 2005; Zhao *et al.*, 2006). *Och1* und die *Pmt*-Isoformen spielen eine Rolle in der Glykosylierung von Proteinen. Eine *och1*-Mutante zeigt verkürzte N-Glykosylketten (Bates *et al.*, 2006) und die *pmt2/PMT2* heterozygote und die *pmt4* homozygote Mutante zeigen einen Defekt in der O-Mannosylierung von Glykoproteinen und der Biofilmbildung unter normoxischen Bedingungen (Peltroche-Llascahuanga *et al.*, 2006). In Abb. 14 ist zu erkennen, dass diese vier Mutanten unabhängig von dem CO₂-Wert einen Defekt in der Biofilmbildung unter oxischen Bedingungen zeigten. Eine Ausnahme stellt *pmt4* dar, dessen Biofilm bei Normoxie, aber erhöhtem CO₂-Gehalt, dem des Wildtyps gleich. Unter hypoxischen Bedingungen waren die Biofilme aller beschriebenen Mutanten wieder vollständig hergestellt und im Fall

der *och1*-Mutante war die Biofilmtrockenmasse bei Hypoxie und für *als3*- und *pmt2*/+-Mutanten bei Hypoxie mit erhöhtem CO₂-Gehalt sogar höher als beim Wildtyp.

3.3.1.3 Mutanten, deren defekte Biofilmbildung bei Hypoxie mit CO₂ wieder hergestellt wird

Die homozygoten *mkc1*- und *ssk1*-Mutanten zeigten ein bisher noch nicht beschriebenes Verhalten der Biofilmbildung. Das Protein Mkc1 ist eine MAP-Kinase, die unterhalb der Proteinkinase C aktiv ist und eine Rolle in der Oberflächenerkennung sowie der Filament- und Biofilmbildung in *C. albicans* spielt (Kumamoto, 2005). Ssk1 besitzt ebenfalls die Funktion einer Kinase. Sie ist Teil einer Kaskade, durch die die MAP-Kinase Hog1 aktiviert wird. Diese MAP-Kinase reguliert die Hyphenbildung und die Resistenz gegen oxidativen und osmotischen Stress (Calera, 2000).

Die *mkc1* - und *ssk1*-Mutanten zeigten einen Defekt in der Biofilmbildung bei Normoxie und bei Hypoxie mit niedrigem CO₂-Gehalt. Bei Hypoxie mit 6 % CO₂ (nicht aber bei Normoxie mit 6 % CO₂) glich die Biofilmbildung der des Wildtyp-Stammes. Das lässt annehmen, dass die Biofilmbildung im Wildtyp bei einer Kombination von Hypoxie und erhöhtem CO₂-Gehalt durch diese Proteine inhibiert wird.

Um auszuschließen, ob eine veränderte Biofilmbildung bei einem hohen CO₂-Gehalt nicht durch CO₂, sondern durch eine Abnahme des pH-Wertes im Medium (durch den hohen CO₂-Gehalt) hervorgerufen wurde, wurde der pH des Mediums vor und nach der 60-stündigen Inkubation mit Hilfe von Indikatorpapier bestimmt. Es wurde festgestellt, dass bei keinem der einzelnen Stämme eine signifikante Abnahme des pH-Wertes stattgefunden hatte.

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse, dass die vorherrschenden äußeren Bedingungen einen wichtigen Einfluss auf die Biofilmbildung in *C. albicans* besitzen. Geringe Sauerstoff- und erhöhte CO₂-Bedingungen, so wie sie auch im menschlichen Körper vorkommen, aktivieren bis jetzt noch unbekannte Mechanismen zur Biofilmbildung, die unter normoxischen Bedingungen bis jetzt noch nicht beobachtet wurden.

3.3.2 Adhäsion verschiedener *C. albicans* Mutantenstämme nach Wachstum unter normoxischen oder hypoxischen Bedingungen

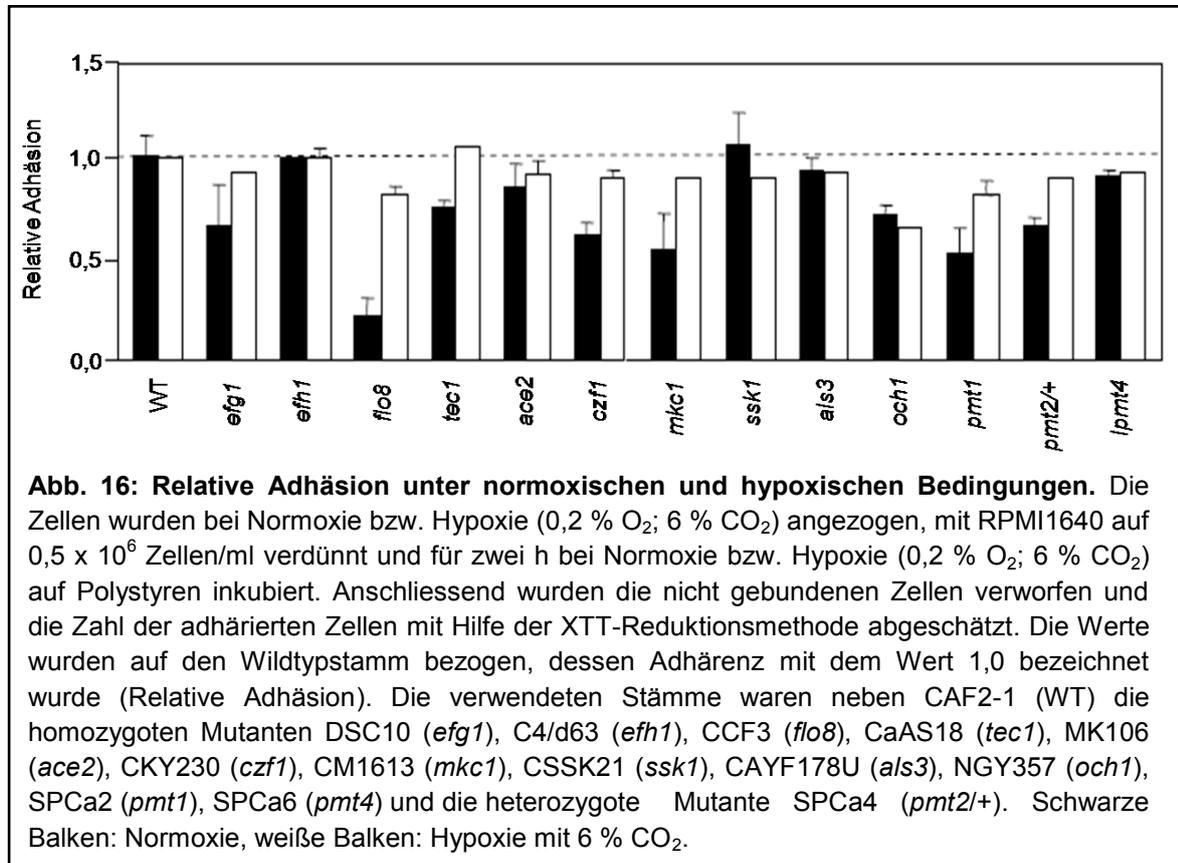
Die Bildung eines Biofilms besteht aus einer frühen Phase der Adhäsion, bei der Zellen an eine Oberfläche binden, gefolgt von weiteren Entwicklungsschritten, in denen die dreidimensionale Struktur des Biofilms geformt wird (Douglas, 2003).

In dem in Abschnitt 3.3 beschriebenen Experiment zur Biofilmbildung zeigten einige Mutanten bei Hypoxie eine stärkere Biofilmbildung als andere, obwohl alle Stämme unter gleichen (normoxischen) Bedingungen angezogen worden waren. Dabei war nicht auszuschließen, dass diese stärkere Biofilmbildung durch eine gegenüber dem Wildtyp gesteigerte Fähigkeit der Adhäsion hervorgerufen wurde. Um dieser Möglichkeit nachzugehen, wurden die bereits für die Biofilmbildung verwendeten Mutanten unter normoxischen oder unter hypoxischen (0,2 % O₂; 6 % CO₂) Bedingungen angezogen und zwei Stunden unter den jeweils gleichen Gasbedingungen in den gleichen Zellkulturplatten wie in Abschnitt 3.3 inkubiert. In dieser Zeit konnten die Zellen an die Oberfläche der Zellkulturplatten binden. Anschließend wurde der Überstand jeder Vertiefung abgenommen und die adhärenierten Zellen vorsichtig gewaschen. Wegen der geringen Zellzahl war eine Bestimmung der Trockenmasse wie bei der Biofilmbildung nicht möglich. Daher wurde die Zellzahl durch deren metabolische Aktivität mit Hilfe eines XTT-Tests (Ramage *et al.*, 2001) ermittelt. Das Ergebnis (Abb. 16) zeigt, dass der Wildtyp-Stamm nach Anzucht und Inkubation in Normoxie eine dreifach stärkere Adhäsion besaß, als nach Anzucht und Inkubation in Hypoxie. Daraus kann geschlossen werden, dass Gasbedingungen einen Einfluss auf die Oberflächenstruktur der Zelle und ihre Fähigkeit zur Adhäsion haben könnten. Einige der eingesetzten Mutanten hatten unter hypoxischen Bedingungen tatsächlich eine höhere Tendenz an die Plastikoberfläche zu adhärenieren als andere. Die Deletionsmutanten *tec1* und *czf1* gehören dieser Mutantengruppe an, da sie eine leicht stärkere Adhäsion nach einer Vorinkubation der Zellen in Hypoxie zeigten. Dieser Effekt war allerdings im Gegensatz zur geänderten Biofilmbildung relativ gering (ca. 20 % erhöhte Adhärenz). Für weitere Mutanten, die unter hypoxischen Bedingungen eine erhöhte Biofilmbildung zeigten (*ace2-*, *als3-*, *pmt4-*, *ssk1-*, *och1-* und *pmt2/PMT2-* Mutanten) bestand der Effekt einer verbesserten Adhäsion nach Wachstum in Hypoxie allerdings nicht. Die Biofilmbildung von Mutanten ohne Efg1, Pmt1 oder Flo8 wurde durch die Adhäsion nicht beeinflusst, da diese Mutantenstämme unter normoxischen wie auch hypoxischen Bedingungen keinen Biofilm zeigten.

Daraus kann man schließen, dass die gesteigerte Biofilmbildung einiger weniger, aber nicht der meisten getesteten Mutanten auf eine stärkere Adhärenz der Zellen zurückzuführen sein könnte. Möglicherweise haben *tec1-* und *czf1-*

Ergebnisse

Mutanten bei Hypoxie eine veränderte Zelloberfläche, die (anders als beim Wildtyp) eine erhöhte Adhärenz erlaubt.



3.4 Hypoxische Funktionen der Proteinkinase Sch9 und assoziierter Proteinkinasen

Sch9 ist eine Serin-Threonin-Kinase, die zur Familie der AGC-Kinasen gehört und in der Bäckerhefe *S. cerevisiae* unter anderem in Abhängigkeit der angebotenen Nährstoffe für die Langlebigkeit und Stressresistenz der Zellen verantwortlich ist. Dabei wachsen *sch9*-Mutanten langsamer, leben jedoch dreimal länger als der Wildtyp und sind zudem auch stressresistenter (Fabrizio *et al.*, 2001; Pedruzzi *et al.*, 2003). Eine weitere Kinase, die die Regulation von Langlebigkeit und Stressresistenz beeinflusst, ist Rim15. In *S. cerevisiae* sind beide Kinasen Bestandteil zweier prominenter und konservierter Signalwege. Zum einen wird im PKA-Weg Rim15 über die Proteinkinase A gehemmt (Reinders *et al.*, 1998; Pedruzzi *et al.*, 2000) und zum anderen wird in der TOR-

Signaltransduktionskaskade Sch9 durch die Kinase Tor aktiviert und Rim15 über Sch9 inhibiert (Wanke *et al.*, 2008).

In einem Screen nach Mutanten, die einen Defekt in der Chlamydosporenbildung zeigen, identifizierten Nobile *et al.* (2003) in *C. albicans* ein homologes Protein zu Sch9 und Setiadi konnte in ihrer Dissertation (2006) bereits erste Versuche zur Funktion der Sch9-Kinase in *C. albicans* durchführen. Zum einen beschrieb sie das Wachstum bzw. die Langlebigkeit des *sch9*-Deletionsstammes, indem sie die OD₆₀₀ des Wildtyp-Stammes und der *sch9*-Mutante über einen Zeitraum von 30 Stunden protokollierte. Dabei zeigte sie, dass bei *sch9*-Mutanten der Eintritt in die stationäre Phase deutlich langsamer erfolgte. Dieser Phänotyp wurde bereits auch schon für *S. cerevisiae sch9*-Mutanten beschrieben. Außerdem untersuchte Setiadi den Einfluss von Sch9 auf die Stressantwort in *C. albicans* und stellte fest, dass diese Kinase keinen Einfluss auf die Stressantwort ausübt. Eine weitere Auffälligkeit der *sch9*-Mutante, die gezeigt werden konnte, war die starke Sensitivität gegenüber Hygromycin B bei Wachstum auf Agarplatten unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen. Da bekannt ist, dass diese Substanz Fehlesungen an Ribosomen induziert, könnte dies auf einen möglichen Einfluss von Sch9 auf die Ribosomenbiogenese hindeuten, wie es in *S. cerevisiae* der Fall ist (Jorgensen *et al.*, 2002). Weiterhin wurde von Setiadi auch morphologische Phänotypen der *sch9*- und *rim15*-Mutanten untersucht. Sie konnte zeigen, dass beide Deletionsstämme bei Hypoxie eine stärkere Hyphenbildung aufweisen als der Wildtyp (die *sch9*-Mutante nur bei erhöhtem CO₂-Gehalt).

3.4.1 Zellmorphologie von Mutanten mit Defekten in Proteinkinasen

Wie in Abschnitt 3.1.2 beschrieben zeigte die *efg1*-Mutante gegenüber dem Wildtyp bei Hypoxie und einer Temperatur von 25 °C einen hyperfilamentösen Phänotyp. In diesem Abschnitt dieser Arbeit wurde unter verschiedenen Gas- und Temperaturbedingungen der Phänotyp mehrerer Mutanten bzw. Proteine für Zellkomponenten getestet, von denen vermutet wird (Sch9 und Rim15) bzw. bekannt ist (Efg1 und PKA), dass sie in *C. albicans* in gemeinsamen Signalwegen wirken. Um die Gasbedingungen genau bestimmen zu können, wurden die Stämme auf YPS-Agarplatten vereinzelt und in einer Invivo₂₀₀-Hypoxiebank inkubiert. Für diese Versuche wurden unter anderem auch *sch9*- und *rim15*-Mutantenstämme eingesetzt, die durch Insertion des *URA3*-Gens an seinem nativen Locus prototroph gemacht worden waren (siehe Abschnitt 2.7.2).

Ergebnisse

Wurden der Wildtyp-Stamm und die verschiedenen Mutanten auf YPD-Agarplatten vereinzelt und bei Normoxie 9 Tage bei einer Temperatur von 25 °C inkubiert, fiel auf, dass die Koloniengröße der *sch9*- und der *tpk1*-Mutante zu jedem Zeitpunkt kleiner war, als die des Wildtyps (Abb. 17). Dieser Phänotyp ist bereits von der *sch9*-Mutante in *S. cerevisiae* bekannt (Jorgensen *et al.*, 2002). Diese zeigt ebenfalls kleinere Kolonien, die sich nur langsam entwickeln.

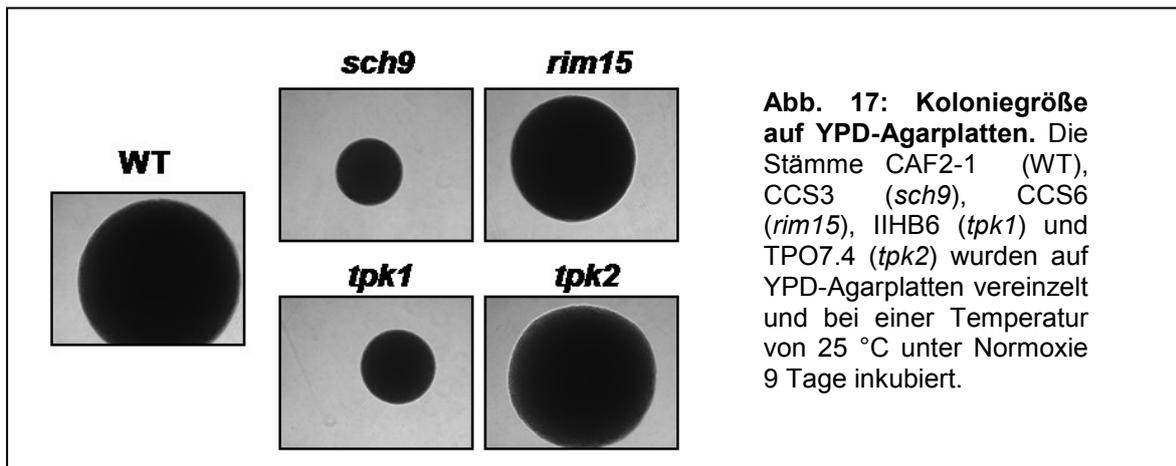
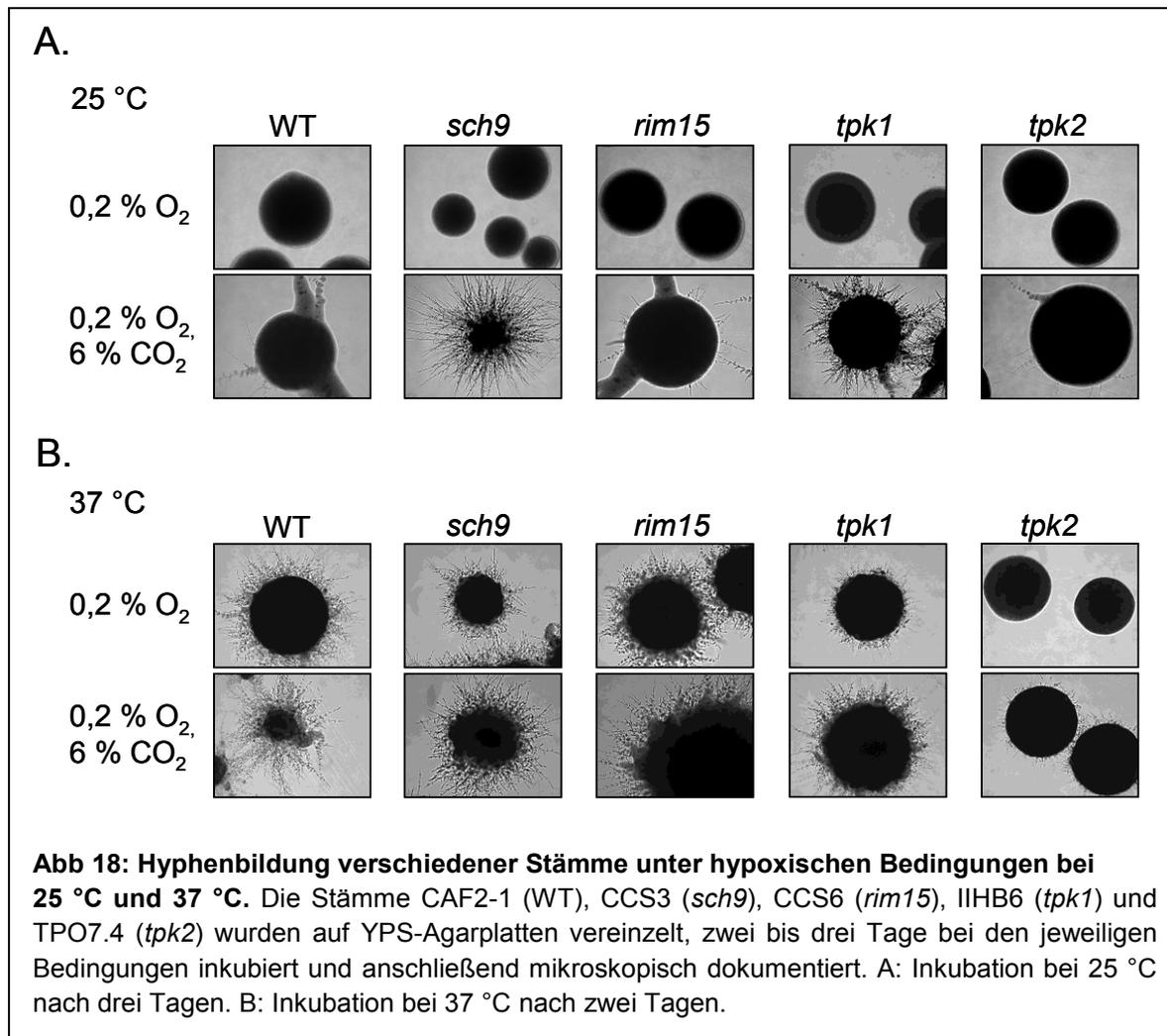


Abb. 18 zeigt den Phänotyp des Wildtyp-Stammes und verschiedener Mutantenstämme bei verschiedenen Gas- und Temperaturbedingungen. Bei 25 °C und hypoxischen Bedingungen bildete der Wildtyp-Stamm keine und unter Hypoxie mit 6 % CO₂ nur sehr vereinzelt Hyphen an den Kolonierändern aus. Bei Normoxie wurde derselbe Phänotyp wie unter Hypoxie ohne CO₂ beobachtet (Daten nicht gezeigt). Alle in Abb. 18 verwendeten Mutantenstämme wiesen bei 25 °C unter Hypoxie und Normoxie (Daten nicht gezeigt) ebenfalls keine Hyphen auf. Unter Hypoxie in Anwesenheit von 6 % CO₂ zeigten die *sch9*- und *tpk1*-Mutante jedoch (als einzige) ein starkes filamentöses Wachstum. Vergleicht man das hyperfilamentöse Wachstum der *sch9*-, *tpk1*- und *efg*- Mutanten (3.1.2), so bildete die *sch9*-Mutante unter Hypoxie mit CO₂ die stärksten Filamente aller drei Mutanten aus. Die *rim15*-Mutante entwickelte dagegen unter allen Bedingungen den gleichen Phänotyp wie der Wildtyp. Somit konnte das von Setiadi (2002, 2006) beschriebene hyperfilamentöse Wachstum der *rim15*-Mutante unter Hypoxie nicht reproduziert werden. Die *tpk2*-Mutante zeigte unter Hypoxie mit Anwesenheit von CO₂ fast keine Hyphenbildung.

Ergebnisse



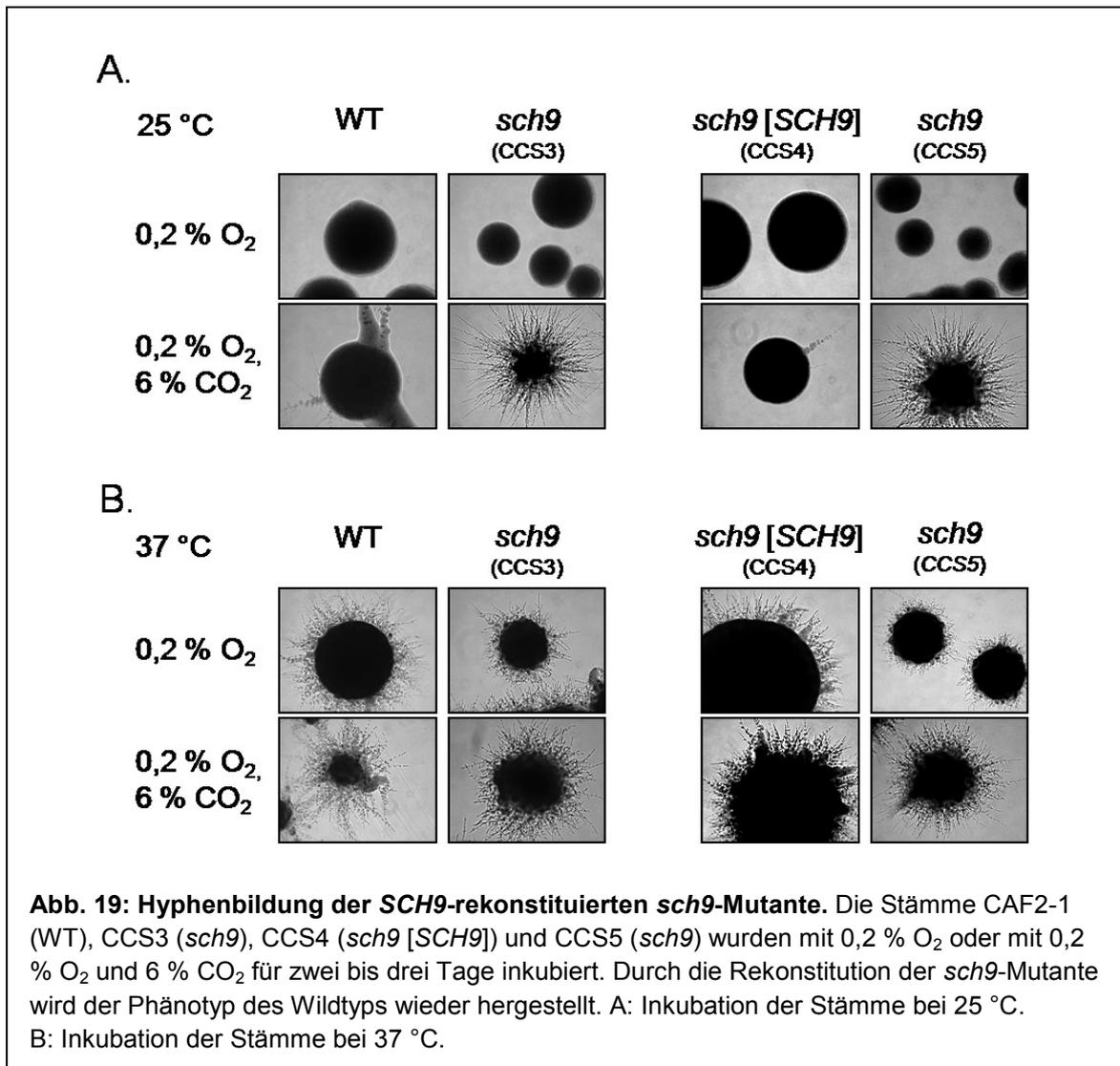
Bei einer Temperatur von 37 °C veränderte sich der hyphale Phänotyp der meisten Stämme gegenüber einer Temperatur von 25 °C. Bei Normoxie zeigte der Wildtyp als einziger Stamm an seinem Zellausstrich ein leichtes Hyphenwachstum (Daten nicht gezeigt), welches durch Hypoxie noch verstärkt wurde. Die *tpk1*-Mutante zeigte unter hypoxischen Bedingungen ebenfalls ein filamentöses Wachstum, welches jedoch schwächer war als das des Wildtyps. Die *sch9*- und *rim15*-Mutanten wiesen dagegen ein etwa gleich starkes Hyphenwachstum wie der Wildtyp auf. Durch Zugabe von CO₂ verstärkte sich der hyphale Phänotyp bei allen Stämmen.

Somit stellte bei *sch9*- und *tpk1*-Mutanten Hypoxie mit CO₂ bei 25 °C bzw. Hypoxie alleine bei 37 °C die Fähigkeit zur Hyphenbildung wieder her. Die *tpk2*-Mutante zeigte unter hypoxischen wie normoxischen Bedingungen keine bzw. eine nur sehr schwache Hyphenbildung.

3.4.2 Abhängigkeit der Hyphenbildung von verschiedenen Sauerstoff- und Kohlendioxidkonzentrationen

In Abschnitt 3.4.1 wird beschrieben, dass die Deletionsmutanten von *SCH9* und *TPK1* bei Hypoxie mit einem erhöhtem CO_2 -Gehalt und einer Temperatur von 25 °C einen hyperfilamentösen Phänotyp gegenüber dem Wildtyp zeigen. Daraus wird ersichtlich, dass die Zusammensetzung des Gases bei der Hyphenbildung eine wichtige Rolle spielt. Im Folgenden wurden die bereits beschriebenen Stämme unter verschiedenen Sauerstoff- bzw. CO_2 -Konzentrationen inkubiert. Hierdurch sollte gezeigt werden, wie sensitiv die Mutanten auf die verschiedenen Gaskonzentrationen reagieren. In diesem Versuch wurde zusätzlich zur *sch9*-Mutante ein rekonstituierter Stamm verwendet, der zusätzlich zu beiden deletierten *sch9*-Allelen ein *SCH9*-Wildtypgen enthält. Die Konstruktion dieser Stämme ist in Abschnitt 2.6.3 beschrieben. In Abb. 19 ist die Koloniemorphologie der Mutantenstämme und der rekonstituierten Stämme unter verschiedenen Gasbedingungen zu sehen. Bei 25 °C unter hypoxischen Bedingungen zeigten der Wildtyp und die *sch9*-Mutante keine Hyphen und der *SCH9*-rekonstituierte Stamm und die Kontrolle ebenfalls nicht. Bei Hypoxie mit 6 % CO_2 zeigte die *sch9*-Mutante gegenüber dem Wildtyp einen starken filamentösen Phänotyp. Dieser wurde durch die Rekonstituierung von *SCH9* komplett aufgehoben. Der Kontrollstamm zeigte wieder starke Hyphenbildung. Wurden die Stämme bei 37 °C inkubiert, bildeten der Wildtyp-Stamm und die *sch9*-Mutante ein ähnlich starkes Hyphenwachstum, genauso wie der rekonstituierte und der Kontrollstamm. Die Tatsache, dass der veränderte Phänotyp der *sch9*-Mutante durch Rekonstitution wieder hergestellt werden konnte, bestätigt die Annahme, dass Sch9 verantwortlich für den starken hyperfilamentösen Phänotyp bei 25 °C und Hypoxie mit einer hohen CO_2 -Konzentration ist.

Ergebnisse

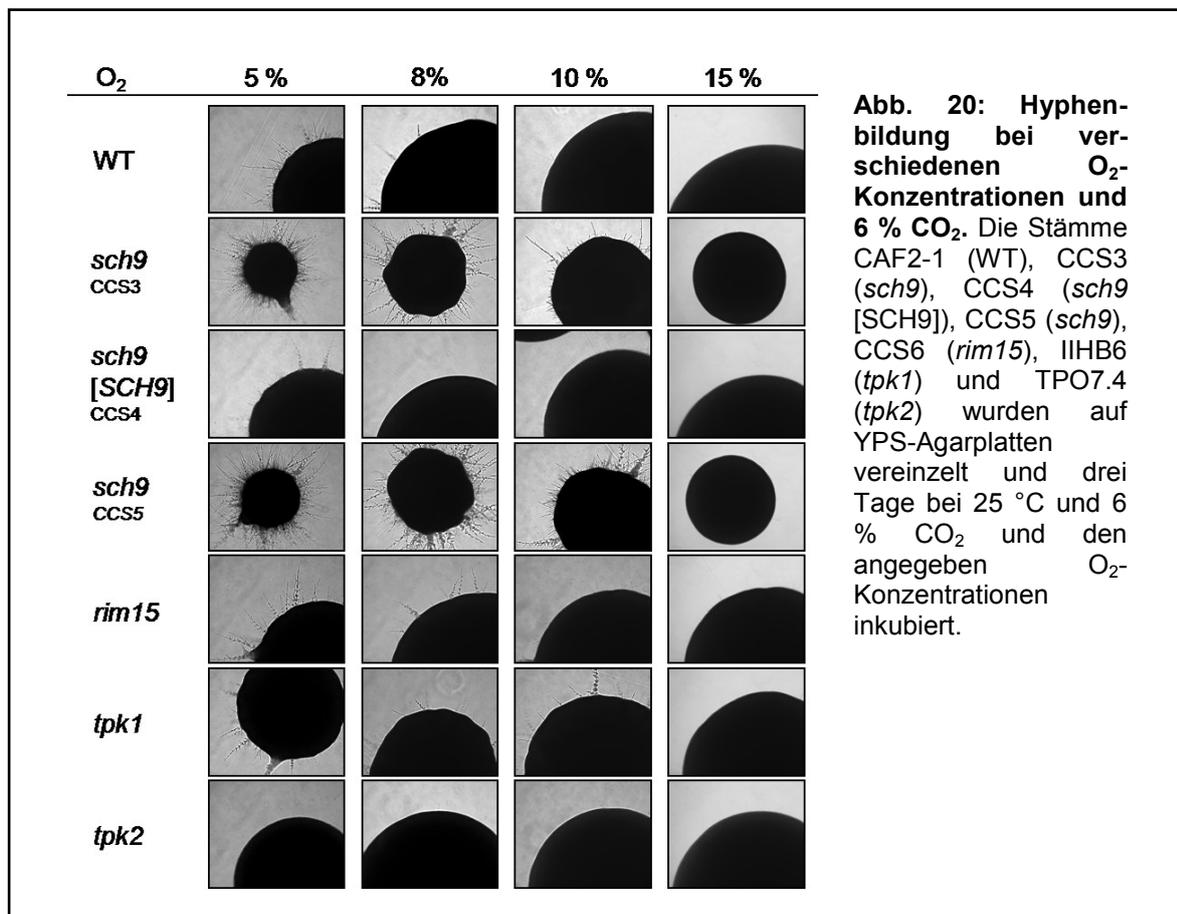


3.4.2.1 Sensitivität gegenüber Sauerstoff

Um die Sauerstoffsensitivität der Mutanten und des Wildtyps bezüglich der Filamentbildung zu testen, wurden diese auf YPS-Agarplatten vereinzelt und drei Tage bei 25 °C und 6 % CO₂ inkubiert; die Sauerstoffkonzentration wurde zwischen 5 % und 15 % variiert. Bei einer Sauerstoffkonzentration von 5 % und 8 % war der starke hyperfilamentöse Phänotyp der *sch9*-Mutante gegenüber dem Wildtyp noch deutlich zu erkennen (Abb. 20). Dieser nahm bei einer Sauerstoffkonzentration von 10 % deutlich ab und bestand bei 15 % gar nicht mehr. Bei dieser Sauerstoffkonzentration besaß die *sch9*-Mutante den gleichen Phänotyp wie der Wildtyp. Das bei Hypoxie mit einem erhöhten CO₂-Gehalt

Ergebnisse

gesteigerte filamentöse Wachstum der *tpk1*-Mutante war dagegen nur noch bei einer Sauerstoffkonzentration von 5 % zu erkennen. Ab einer O₂-Konzentration von 8% glich der Phänotyp des *tpk1*-Deletionsstammes dem des Wildtyps. Insgesamt zeigte die *tpk1*-Mutante bei 5 % O₂ einen weitaus schwächeren hyperfilamentösen Phänotyp als bei 0,2 % O₂ (Abb. 20). Der *SCH9*-rekonstituierte Stamm und die *rim15*-Mutante wuchsen unter allen Bedingungen wie der Wildtyp, während die *tpk2*-Mutante dagegen unter keiner der eingesetzten Gasbedingungen filamentöses Wachstum zeigte. Das Ergebnis zeigt, dass Sch9 und Tpk1 in Wildtypzellen bis zu einer O₂-Konzentration von 5 - 8 % bei 6 % CO₂ das filamentöse Wachstum in der Zelle hemmen.

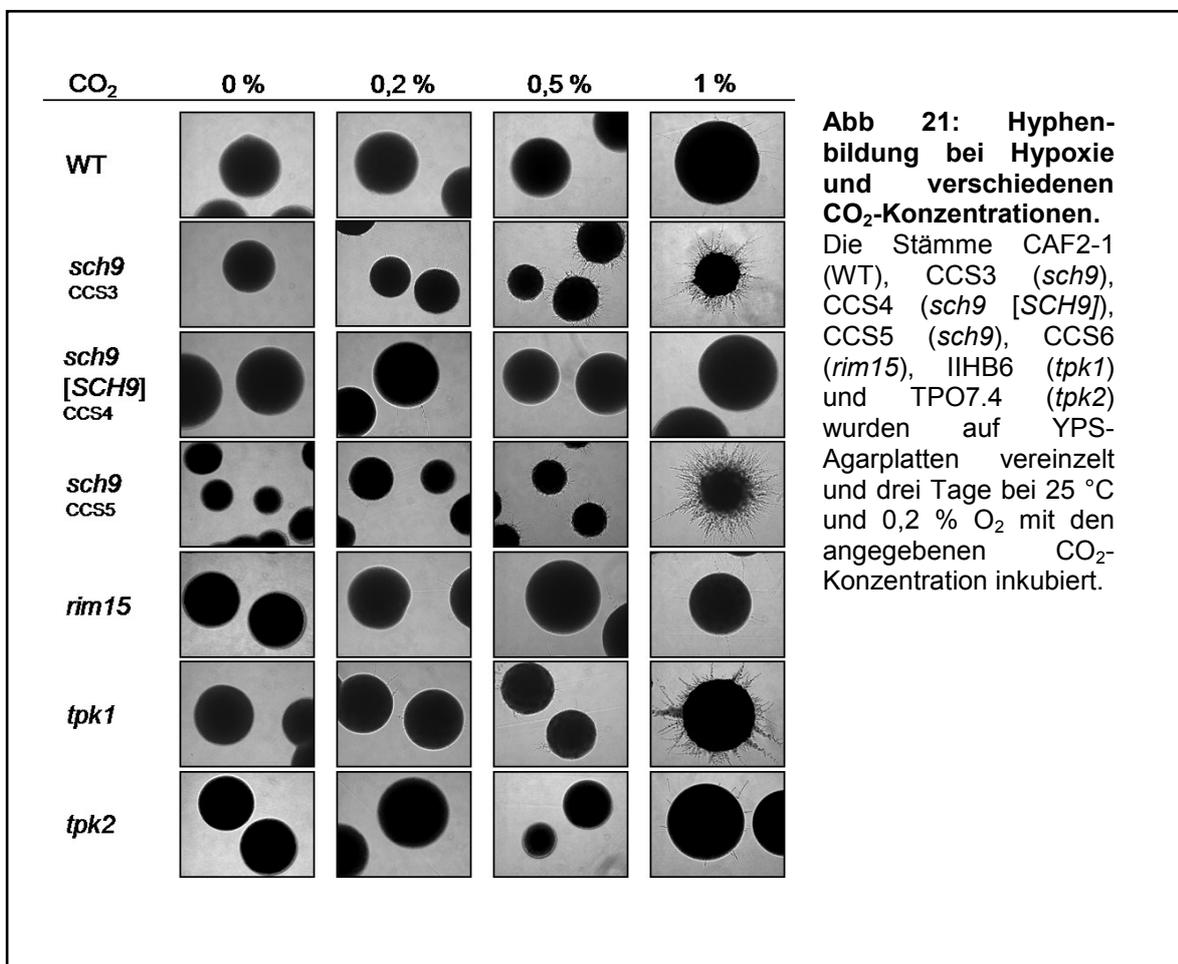


3.4.2.2 Sensitivität gegenüber Kohlendioxid

Um zu ermitteln, wie die Hyphenbildung der Stämme, insbesondere der *sch9*- und *tpk1*-Mutante, durch verschiedene CO₂-Konzentrationen gesteuert wird, wurden diese für drei Tage bei 25 °C bei Hypoxie (0,2 % O₂) mit steigendem CO₂-Gehalt auf

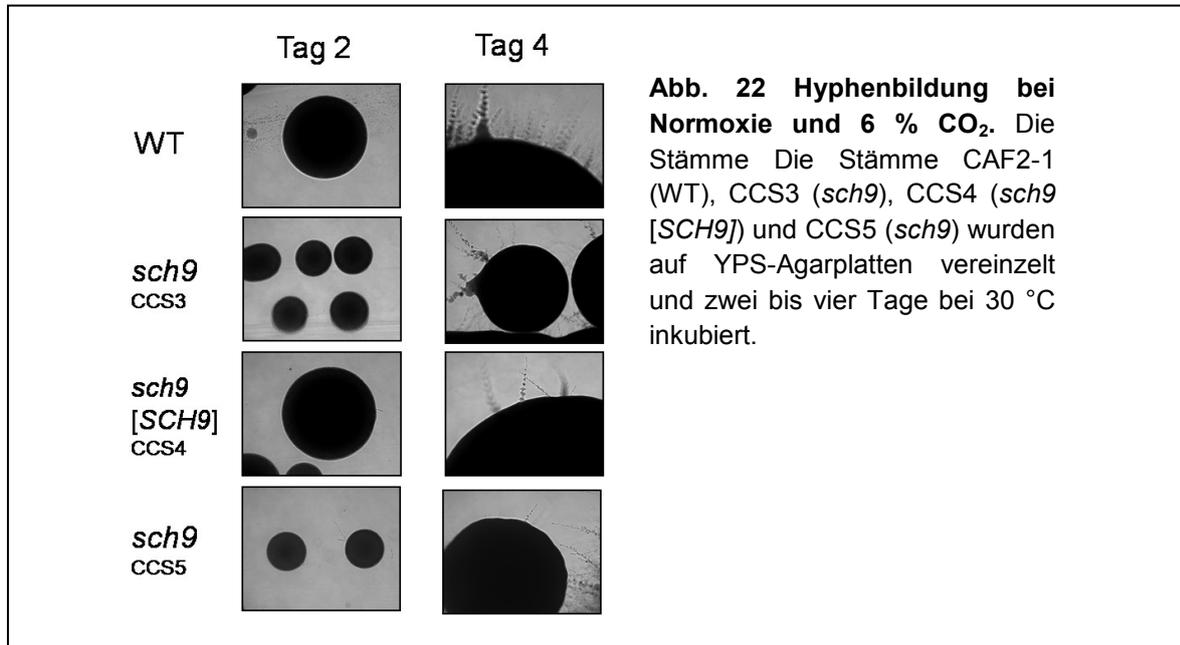
Ergebnisse

YPS-Agarplatten inkubiert. In Abb. 21 ist zu erkennen, dass das verstärkte filamentöse Wachstum der *sch9*- und *tpk1*-Mutanten gegenüber dem Wildtyp ab einer CO₂-Konzentration von 0,5 % auftrat und bei einer Konzentration von 1 % schon stark ausgeprägt war. Die *rim15*- und *tpk1*-Mutante, der *SCH9*-rekonstituierte Stamm und der Wildtyp zeigten dagegen unter allen Bedingungen keine bzw. nur sehr leichte Hyphenbildung. Das Ergebnis zeigt, dass *C. albicans*-Zellen über die Sch9- und Tpk1-Proteine sensitiv auf CO₂ reagieren und den hyperfilamentösen Phänotyp schon bei einem weitaus niedrigerem CO₂-Gehalt als 6 % entwickeln. In Wildtypzellen haben beide Komponenten offenbar die Aufgabe, ab ca. 1 % CO₂ die Hyphenbildung unter hypoxischen Bedingungen zu unterdrücken.



3.4.2.3 Sensitivität gegenüber Kohlendioxid unter normoxischen Bedingungen

Im vorherigen Abschnitt wurde gezeigt, dass die *sch9*-Mutante unter hypoxischen Bedingungen sensitiv auf CO₂ reagiert und gegenüber dem Wildtyp hyperfilamentös wächst. In einem weiteren Experiment sollte getestet werden, ob das hyperfilamentöse Wachstum auf eine erhöhte CO₂-Konzentration alleine, oder auf eine erhöhte CO₂-Konzentration in Verbindung mit Hypoxie zurückzuführen ist. Dazu wurden der Wildtyp-Stamm, die *sch9*-Mutante, der *SCH9*-rekonstituierte Stamm und der Kontrollstamm zur Rekonstitution auf YPS-Agarplatten vereinzelt und bei einer Temperatur von 25 °C und Normoxie mit 6 % CO₂ mehrere Tage inkubiert. Anschließend wurden die Kolonien mit Hilfe eines Mikroskops dokumentiert. In Abb. 22 ist deutlich erkennbar, dass nach zwei Tagen weder der Wildtyp, noch die *sch9*-Mutante einen hyphalen Phänotyp besaß. Nach vier Tagen bildeten alle getesteten Stämme wenige Hyphen aus. Deutlich erkennbar ist jedoch, dass die *sch9*-Mutante bei Normoxie mit einem erhöhten CO₂-Gehalt kein hyperfilamentöses Wachstum gegenüber dem Wildtyp zeigte. Daraus kann man schließen, dass die Kinase Sch9 nur in Zusammenhang mit Hypoxie auf einen hohen CO₂-Wert reagiert.



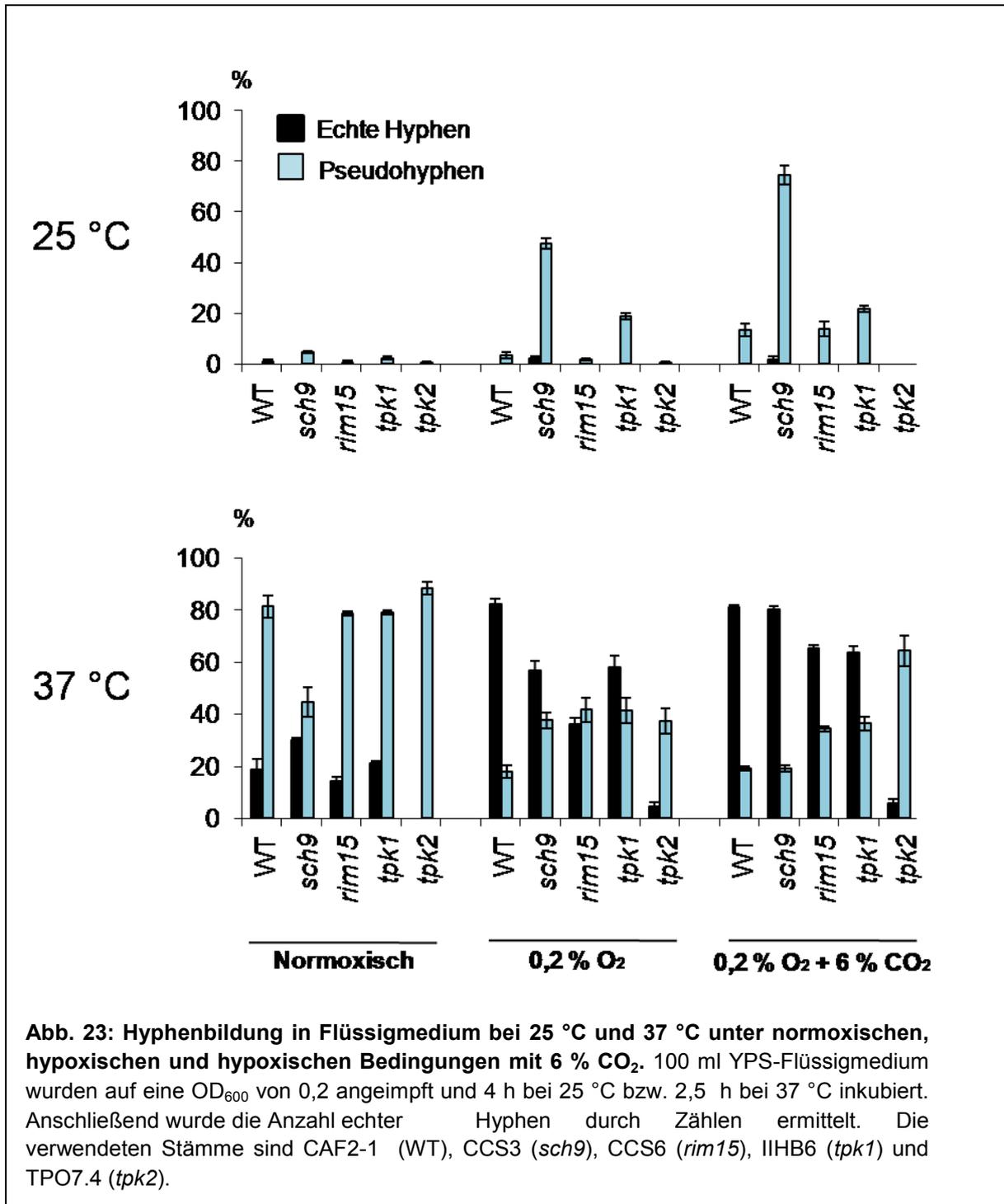
3.4.3 Wachstum und Zellmorphologie in Flüssigmedium

In Abschnitt 3.4.2 wurde das Hyphenwachstum des Wildtyps und der Mutanten von *sch9*, *rim15*, *tpk1* und *tpk2* auf YPS-Agarplatten unter verschiedenen Gas- und Temperaturbedingungen untersucht. Um das Wachstum dieser Stämme in Flüssigmedium zu untersuchen, wurden sie unter den gleichen Bedingungen in YPS-Flüssigmedium inkubiert und anschließend wurde die Zahl der Hyphen ermittelt. Dazu wurden 100 ml YPS-Medium jeweils auf eine OD₆₀₀ von 0,2 angeimpft und unter normoxischen, hypoxischen (0,2 % O₂) oder hypoxischen Bedingungen mit CO₂ (0,2 % O₂ + 6 % CO₂) bei 25 °C bzw. 37 °C wachsen gelassen. Um das Medium zu äquilibrieren, wurde es vor Versuchsstart für ca. 12 Stunden in den verschiedenen Gasatmosphären vorinkubiert. Anschließend erfolgte die Beimpfung des Mediums.

Zum Zeitpunkt des Animpfens und nach 4 h (25 °C) bzw. 2,5 h (37 °C) wurde die Hyphenzahl der Zellen der einzelnen Stämme mit Hilfe eines Mikroskops ermittelt. In Abb. 23 ist die prozentuale Hyphenbildung des Wildtyp-Stammes und der Mutantenstämme in YPS-Flüssigmedium unter verschiedenen Gas- und Temperaturbedingungen abgebildet.

Bei 25 °C und Normoxie wuchsen die Zellen aller Stämme nach 4 Stunden in Form einer kugelige Hefezelle. Unter hypoxischen Bedingungen bildeten die Zellen der *sch9*- und *tpk1*-Mutante Pseudohyphen, die durch apikale Knospung und Einschnürungen an den Zellverbindungen zu erkennen waren. Daraus kann geschlossen werden, dass die Pseudohyphenbildung unter diesen Bedingungen im Wildtyp durch Sch9 und Tpk1 inhibiert wird. Bei Hypoxie mit 6 % CO₂ besaß die *sch9*-Mutante eine stärkere Pseudohyphenbildung als bei Hypoxie ohne CO₂ und zeigte somit einen Einfluss von CO₂ auf die Hyphenbildung, wie er schon bei Wachstum auf Agarplatten beobachtet werden konnte (Abb. 18). Der Anteil der Pseudohyphen der *tpk1*-Mutantenzellen erhöhte sich mit einem steigenden CO₂-Gehalt dagegen nicht und erreichte einen ähnlich hohen Wert, wie der Wildtyp-Stamm und die *rim15*-Mutante, die unter diesen Bedingungen ebenfalls Pseudohyphen bildeten. Die Zellen der *tpk2*-Mutante entwickelten als einziger Stamm unter allen getesteten Bedingungen gar keine Hyphen.

Ergebnisse



Wurden die Stämme bei einer Temperatur von 37 °C inkubiert, bildeten alle, bis auf die *tpk2*-Mutante, neben Pseudohyphen auch echte Hyphen aus. Während bei Normoxie alle Stämme mehr Pseudohyphen als echte Hyphen bildeten, änderte sich diese Verteilung bei Hypoxie und alle Stämme, bis auf die *tpk2*-Mutante, bildeten nun mehr oder etwa gleich viele echte Hyphen wie Pseudohyphen. Auffällig war, dass der

Wildtyp-Stamm bei Hypoxie die meisten echten Hyphen bildete. Somit scheinen unter diesen Bedingungen alle getesteten Gene bzw. Proteine, die den Mutantenstämme fehlen, wichtig für die Bildung echter Hyphen zu sein. Bei Zugabe von CO₂ erhöht sich die Bildung echter Hyphen in fast allen Stämmen. Bemerkenswert ist, dass unter diesen Bedingungen die *sch9*-Mutante den gleichen Phänotyp zeigte wie der Wildtypstamm. Sch9 scheint bei Wachstum in Flüssigmedium, einer Temperatur von 37 °C und Hypoxie mit CO₂ für die Bildung echter (aber auch Pseudohyphen) keine Rolle mehr zu spielen.

Die Hyphenbildung des *SCH9*-rekonstituierte Stammes CCS4 bzw. des Kontrollstammes CCS5 in Flüssigmedium wurde ebenfalls unter allen Bedingungen getestet und zeigte den gleichen Phänotyp wie der Wildtyp bzw. die *sch9*-Mutante (Daten nicht gezeigt).

3.4.4 Chronologische Alterung

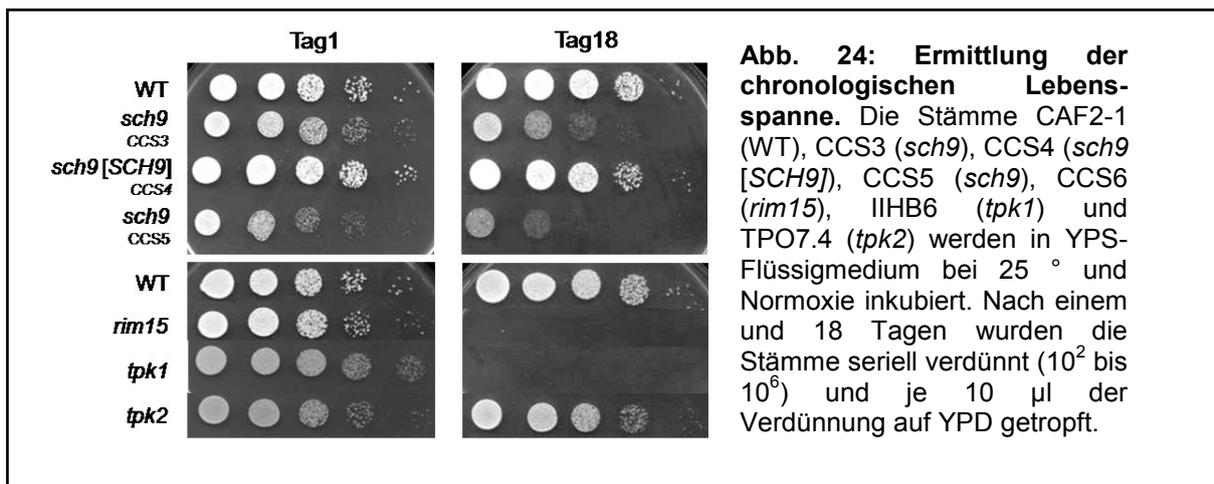
Die chronologische Alterung (chronological life span, CLS) ist die Dauer der Lebensfähigkeit von Zellen in der stationären Phase des Wachstums; sie wurde in der Bäckerhefe *S. cerevisiae* bereits detailliert untersucht. Von *S. cerevisiae* ist bekannt, dass die Kinase TORC1 die Kinase Sch9 durch Phosphorylierung aktiviert, welche wiederum die Kinase Rim15 durch Phosphorylierung hemmt (Wanke *et al.*, 2008). Werden die Aktivitäten von TORC1, Sch9 oder von Proteinkinase A (PKA) gehemmt, wird die chronologische Lebenserwartung erhöht (Fabrizio *et al.*, 2001; Kaeberlein *et al.*, 2005; Powers *et al.*, 2006; Urban *et al.*, 2007; Lavoie und Whiteway, 2008), während sie im Gegenteil dazu durch die Hemmung von Rim15 reduziert wird (Fabrizio *et al.*, 2001; Wei *et al.*, 2008). Von TORC1-Sch9 und PKA wird angenommen, dass diese in parallelen Signalwegen die Glykolyse, Ribosomenbiogenese und das Wachstum positiv regulieren (Jorgensen *et al.*, 2004). Beide Signalwege treffen sich, indem sie die Kinase Rim15 blockieren, die eine Rolle in der Stressantwort, dem Zellzyklus, CLS und der Autophagie der Zelle spielt (Reinders *et al.*, 1998; Pedruzzi *et al.*, 2003; Wanke *et al.*, 2005; Yorimitsu *et al.*, 2007).

Um zu ermitteln, welche Rolle Sch9, PKA und Rim15 bei der chronologischen Lebenserwartung in *C. albicans* spielen, wurden Mutanten dieser Stämme in 100 ml YPD-Flüssigmedium auf eine OD₆₀₀ von 0,1 angeimpft und für ca. zwei Wochen bei 25 °C inkubiert. Die Lebendzellzahl wurden bestimmt indem zu definierten Zeitpunkten mehrere Verdünnungen des jeweiligen Stammes auf YPD-Agarplatten ausplattiert und die Kolonien anschließend gezählt wurden. Tag eins stellt dabei den Zeitpunkt 24 Stunden nach Beimpfung des Mediums dar.

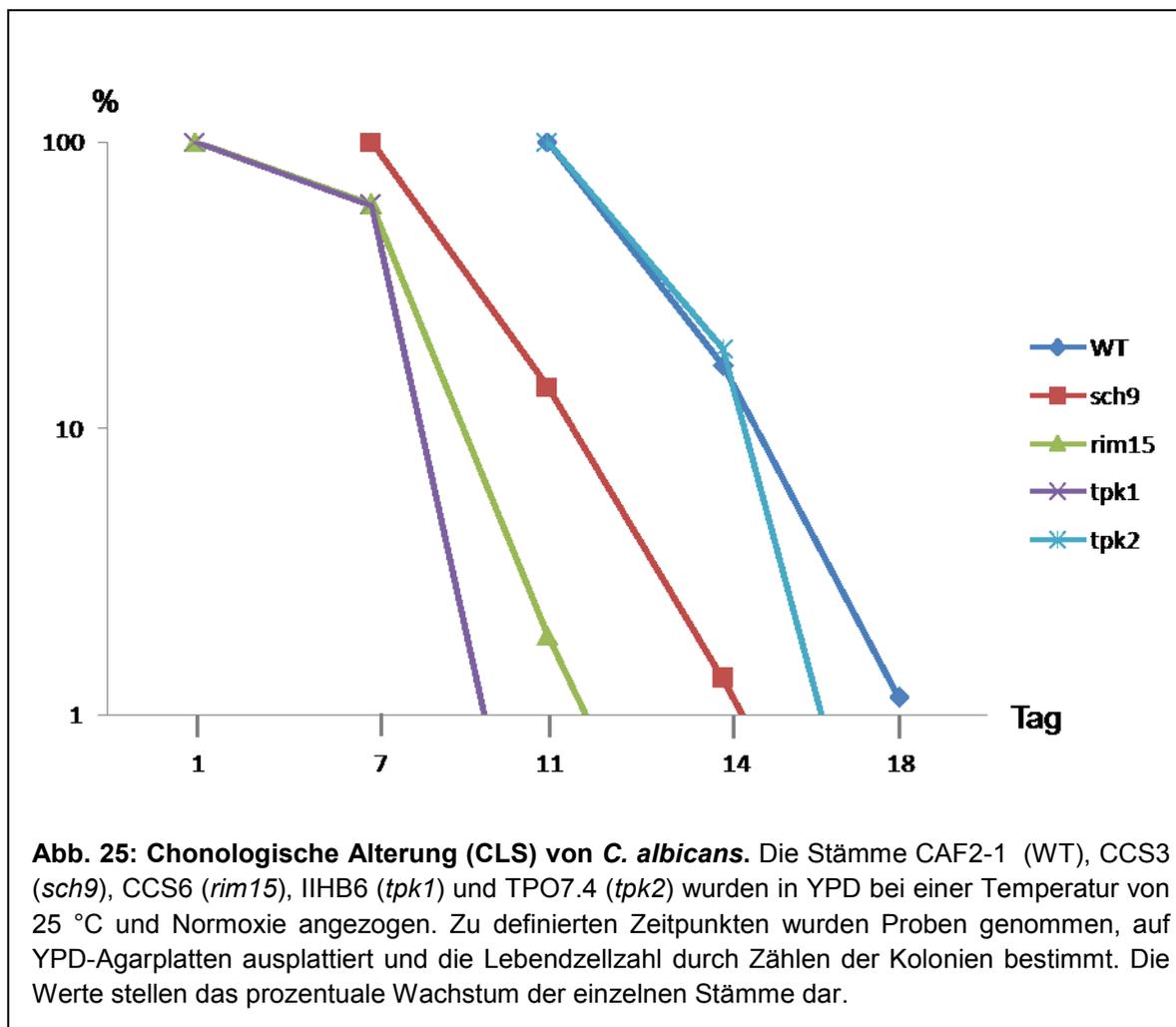
Ergebnisse

Zusätzlich wurde zu Beginn und am Ende jeder Versuchsreihe von jedem Stamm eine serielle Verdünnung hergestellt (10^{-2} - 10^{-6}), 10 μ l von jeder Verdünnung auf eine YPD-Agarplatte getropft und bei 30 °C inkubiert. Der Versuch wurde dreimal unabhängig voneinander durchgeführt.

Abb. 24 zeigt die auf Agar aufgetropften Verdünnungen des Wildtyps und der Mutantenstämme. Es ist erkennbar, dass nach Tag eins die *sch9*-Mutante eine leicht schwächere und die *tpk1*-Mutante eine leicht höhere Zellzahl als der Wildtyp besitzen. Der *SCH9*-rekonstituierte Stamm (CCS4), die *rim15*- und die *tpk2*-Mutante zeigten dagegen eine ähnlich hohe Zellzahl wie der Wildtyp. Nach 18 Tagen war das Wachstum der *sch9*-Mutante dem Wildtyp gegenüber stark eingeschränkt und die *rim15*- und *tpk1*-Mutante besaßen gar kein Wachstum mehr. Das verminderte Wachstum der *sch9*-Mutante in *C. albicans* war überraschend, da durch Fehlen von Sch9 in *S. cerevisiae* eine verlängerte Lebenserwartung ausgelöst wurde. Das Ergebnis der *rim15*-Mutante stimmte dagegen mit dem Phänotyp in *S. cerevisiae* überein (Wanke *et al.*, 2008).



In Abb. 25 ist die Lebendzellzahl zu definierten Zeitpunkten und somit der Wachstumsverlauf der einzelnen Stämme dargestellt. Es ist zu erkennen, dass die Wachstumskurve der *tpk1*-, *rim15*- und *sch9*-Mutante früher sankt, als die des Wildtyps und der *tpk2*-Mutante. Die CLS des *SCH9*-rekonstituierten Stammes und der dazugehörigen Kontrolle wurden ebenfalls ermittelt. Das Wachstum der Stämme glich dem Wildtyp bzw. der *sch9*-Mutante (Daten nicht gezeigt). Somit wird deutlich, dass die Proteine Sch9, Rim15 und Tpk1 die Langlebigkeit der Zellen in *C. albicans* steuern, Sch9 allerdings einen entgegengesetzten Einfluss auf das Überleben der Zellen ausübt als bei *S. cerevisiae*.



3.4.5 Genomweite Transkriptomanalyse der *sch9*-Mutante

Auf YPS-Agarplatten besitzt die *sch9*-Mutante bei 25 °C und Hypoxie mit erhöhter CO₂-Konzentration einen hyperfilamentösen Phänotyp, während diese in Flüssigmedium unter den verschiedenen Gasbedingungen eine erhöhte Pseudohyphenbildung zeigte. Es sollte untersucht werden, welche Gene bzw. Gengruppen unter normoxischen, hypoxischen und hypoxischen Bedingungen mit 6 % CO₂ bei Anzucht in YPS-Flüssigmedium durch Sch9 beeinflusst werden. Um das Transkriptom des Wildtyps und der *sch9*-Mutante miteinander vergleichen zu können, wurden die Zellen beider Stämme auf eine OD₆₀₀ von 0,2 angeimpft und 4 Stunden bei 25 °C und Normoxie, Hypoxie (0,2 % O₂) und Hypoxie mit 6 % CO₂ inkubiert. Anschließend wurden die Zellen geerntet, aufgeschlossen und deren RNA isoliert. Diese wurde mit Hilfe von reverser Transkriptase in cDNA

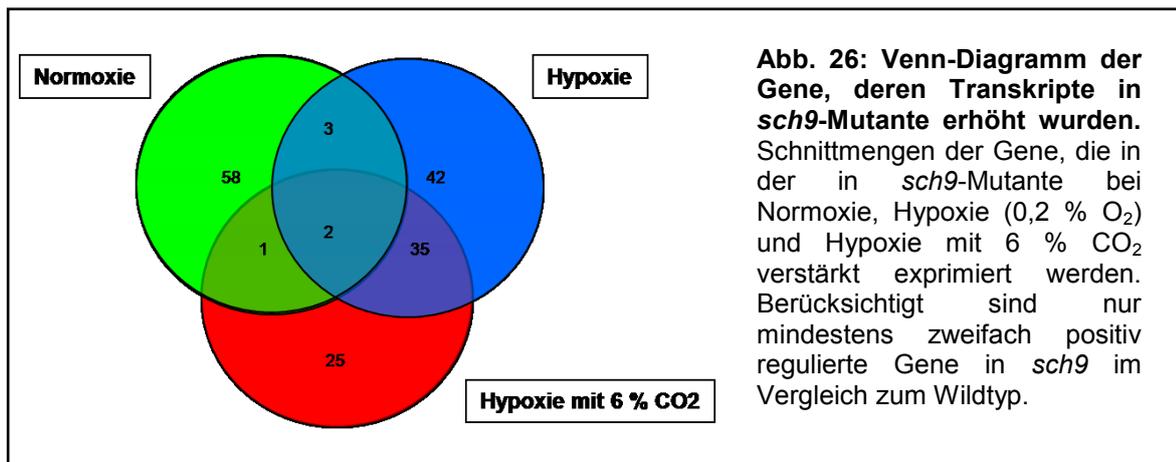
umgeschrieben und gleichzeitig mit fluoreszierenden Farbstoffen markiert bevor sie zur Hybridisierung auf Microarray-Objektträger gegeben wurde. Nach der Hybridisierung wurden die Microarrays gewaschen, gescannt und ausgewertet. Um nach dem Scannen die DNA-Spots auf den Array-Objektträgern zu digitalisieren und den lokalen Hintergrund zu subtrahieren, wurde das Programm GenePix 6.0 verwendet. Anschließend wurden die Werte mit Hilfe des Programms GeneSpring 10.2 normalisiert (LOWESS) und der Mittelwert der gemessenen Werte der einzelnen DNA-Spots ebenfalls durch GeneSpring 10.2 errechnet.

Unter allen Gasbedingungen wurden insgesamt 166 Gene mindestens zweifach positiv und 144 Gene mindestens zweifach negativ reguliert. Die Venn-Diagramme in Abb. 26 und 27 geben die Zahl der Gene wieder, die unter den angegebenen Bedingungen reguliert wurden. Die Schnittmengen der einzelnen Kreise zeigen die Zahl der Gene, die bei zwei bzw. drei Gasbedingungen gleichzeitig reguliert wurden. In den Tabellen 6 und 8 sind die Gene aufgelistet, deren Transkripte in der *sch9*-Mutante erhöht- bzw. erniedrigt wurden und die in funktionelle Gruppen eingeteilt werden konnten. Die Daten der Arrayanalyse sind vollständig bei Array Express unter der Accession Nummer E-MEXP-2407 einzusehen.

3.4.5.1 Gene, deren Transkripte in der *sch9*-Mutante erhöht wurden

In Abb. 26 ist zu erkennen, dass unter normoxischen Bedingungen 58 Gene reguliert wurden, während die Schnittmenge der normoxisch regulierten Gene mit denen beider hypoxischer Bedingungen sehr gering war (ein bis drei Gene). Unter nur hypoxischen Bedingungen wurden insgesamt 42 Gene und unter hypoxischen Bedingungen mit 6 % CO₂ insgesamt 25 Gene reguliert. Die Schnittmenge dieser beiden Gruppen ist mit 35 Genen sehr hoch, woraus man schließen kann, dass die Genregulation dieser beiden Gruppen hauptsächlich durch den niedrigen Sauerstoffgehalt beeinflusst wurde.

Ergebnisse



Tab. 6 zeigt funktionelle Gruppen der erhöht exprimierten Gene. Gene der Zellwand/-membran wurden unter allen Gasbedingungen durch Sch9 reguliert. Unter normoxischen Bedingungen waren vor allem Gene der ALS-Gruppe betroffen, die für Adhäsine kodieren und einen wichtigen Virulenzfaktor in *C. albicans* darstellen. Auch Transkripte für Transkriptionsfaktoren waren sowohl bei Normoxie, als auch bei Hypoxie mit CO₂ erhöht. Die Gengruppen der Zuckersynthese und des Hexose-, Ionen- und Aminosäuretransport wurden ebenso vorwiegend nur unter normoxischen Bedingungen durch Sch9 reguliert. Bei Hypoxie (alleine und mit CO₂) waren vor allem Gene, die während der Translation eine Rolle spielen (z. B. Gene für ribosomale Proteine) am häufigsten durch Sch9 reguliert. Die meisten dieser Gene kodieren dabei für eine ribosomale Untereinheit. Eine weitere funktionelle Gruppe, die vorwiegend unter hypoxischen Bedingungen und hypoxischen Bedingungen mit CO₂ präsent ist, umfasst Gene, die bei der Struktur der Chromosomen eine Rolle spielen. Diese Gene kodieren für Histone wie z. B. *HTA1* und *HHT21*. Zwei weitere Gruppen, die in der *sch9*-Mutante vorwiegend bei Hypoxie (mit und ohne CO₂) positiv reguliert wurden, sind Gene, die für die Eisenaufnahme kodieren (z. B. *FET34* und *FET35*) und hyphenspezifische Gene wie *CZF1*, *CDC10* und *CDC11*. Die Gruppe der Ergosterolsynthese-Gene war ebenfalls vorwiegend unter allen hypoxischen Bedingungen zu finden und war die einzige Gengruppe, die bei Hypoxie mit und ohne CO₂ reguliert wurde. Als letztes kann noch die Gruppe der Gene für Mikrotubuli abhängige Prozesse genannt werden. Dabei handelt es sich um Gene für Tubuline, wie z. B. *TUB1* und *TUB4*, die unter anderem eine Rolle in der Trennung der Chromosomen spielen. Der Transkriptionsspiegel dieser Gengruppe wurde in der *sch9*-Mutante nur bei Hypoxie erhöht. Unter hypoxischen Bedingungen mit hohem CO₂-Wert trat diese Gruppe nicht auf. Es wurden nur sehr wenige Gene bei Normoxie und Hypoxie gleichzeitig reguliert, die nicht in funktionelle Gruppen eingeteilt werden konnten. Zusammenfassend kann

Ergebnisse

festgestellt werden, dass Sch9 in Wildtypzellen verschiedene Gengruppen reprimiert und überwiegend unterschiedlich in unterschiedlichen Gasatmosphären.

Gene, deren Transkriptspiegel in der <i>sch9</i> -Mutante erhöht wurde	
Normoxie	
Zellwand/-membran (6)	<i>ALS1, ALS2, ALS3, ALS4, orf19.1098, orf19.2121</i>
Hexosetransmembrantransport (5)	<i>HGT2, HGT17, SNF3, HXT5, orf19.4386</i>
Ionen transport (5)	<i>PMC1, FRP3, orf19.5170, orf19.6070, orf19.2959.1</i>
Transkriptionsfaktoren (4)	<i>ZCF5, MDM34, GAT2, orf19.5026</i>
Zuckersynthese (4)	<i>GAL1, GAL7, GAL10, ARD</i>
Aminosäuretransport (3)	<i>DIP5, orf19.2943, orf19.7566</i>
keine spezifische Gruppe (31)	<i>GPR1, CTN1, HMX1, HSP12, CIT1, ANT1, DPP3, CUP9, HAP41, PXA1, RGS2, PDK2, orf19.4445, orf19.6169, orf19.215, orf19.6996, orf19.6281, orf19.4531, orf19.1225, orf19.1344, orf19.2030, orf19.2496, orf19.3073, orf19.3029, orf19.3439, orf19.3984, orf19.6169.2, orf19.5125, orf19.5843, orf19.6311, orf19.79</i>
Hypoxie	
Translation (7)	<i>RPS20, RPL6, RPL23A, RPL29, RPL30, RNR1, YST1</i>
Zellwand/-membran (6)	<i>HWP1, HYR1, SAM2, PGA39, PGA45, RBT5</i>
Chromatin-/Chromosomenstruktur (5)	<i>CTF8, HHO1, HTA3, SET3, orf19.581</i>
Mikrotubuli abh. Prozesse (5)	<i>MLC1, TUB1, TUB4, orf19.708, orf19.5008.1</i>
Hyphenspezifische Gene (3)	<i>CZF1, CDC10, CDC11</i>
Ergosterolsynthese (2)	<i>ERG2, ERG3</i>
keine spezifische Gruppe (14)	<i>CFL2, MYO2, STE18, orf19.6184, orf19.5735.3, orf19.2397.3, orf19.5491, orf19.5069, orf19.6579, orf19.453, orf19.6837, orf19.5012, orf19.1116, orf19.1691</i>
Hypoxie mit 6 % CO₂	
Transkriptionsfaktoren (2)	<i>ZCF4, orf19.3088</i>
Ergosterolsynthese (2)	<i>ERG10, ERG26</i>
Polyamintransport (2)	<i>UGA4, UGA6</i>
keine spezifische Gruppe (19)	<i>HGT7, SOD6, RPS1, EXG2, orf19.1583, orf19.2583.2, orf19.4982, orf19.47, orf19.5831, orf19.7147, orf19.3903, orf19.6518, orf19.68.2, orf19.3387, orf19.2734, orf19.7273, orf19.467, orf19.3118, orf19.2350</i>
Hypoxie mit und ohne 6 %CO₂	
Translation (5)	<i>ASC1, RPL12, RPL82, RPS24, orf19.3690.2</i>
Eisenaufnahme (5)	<i>FET34, FET35, FTR1, PGA10, SIT1</i>
Ergosterolsynthese (5)	<i>ERG1, ERG5, ERG6, ERG11, ERG251</i>
Chromatin-/Chromosomenstruktur (4)	<i>HHF1, HHT21, HTA1, orf19.1052</i>
Hyphenspezifische Gene (3)	<i>PTP3, FGR51, RFX2</i>
Zellwand/-membran (3)	<i>ECE1, PHR1, RBT1</i>
keine spezifische Gruppe (10)	<i>CAR1, orf19.1074, orf19.5193, orf19.7296, orf19.2426, orf19.5137, orf19.1982, orf19.7070, orf19.7455, orf19.2452</i>
Normoxie und Hypoxie	
Ionen transport (1)	<i>SEO1</i>
Eisenaufnahme (1)	<i>FRE10</i>
Unbekannt (1)	<i>orf19.699</i>
Normoxie und Hypoxie mit 6 % CO₂	
Hexosetransmembrantransport (1)	<i>HGT12</i>
Alle Bedingungen	
Chromatin-/Chromosomenstruktur (1)	<i>HTA2</i>
Hyphenspezifisches Gen (1)	<i>orf19.4459</i>

Tab. 6: Funktionelle Gruppen der Gene, deren Transkriptspiegel in der in *sch9*-Mutante erhöht wurde. Transkriptomanalyse der *sch9*-Mutante im Vergleich zum Wildtyp. Die Zellen wurden unter normoxischen, hypoxischen (0,2 % O₂) und hypoxischen Bedingungen mit 6 % CO₂ für vier Stunden inkubiert. Anschließend wurde eine Transkriptomanalyse in drei unabhängigen Experimenten angefertigt. Es wurden die Stämme CAF2-1 (WT) und CCS3 (*sch9*) verwendet und nur die Gene berücksichtigt, die in allen Experimenten mindestens zweifach reguliert wurden.

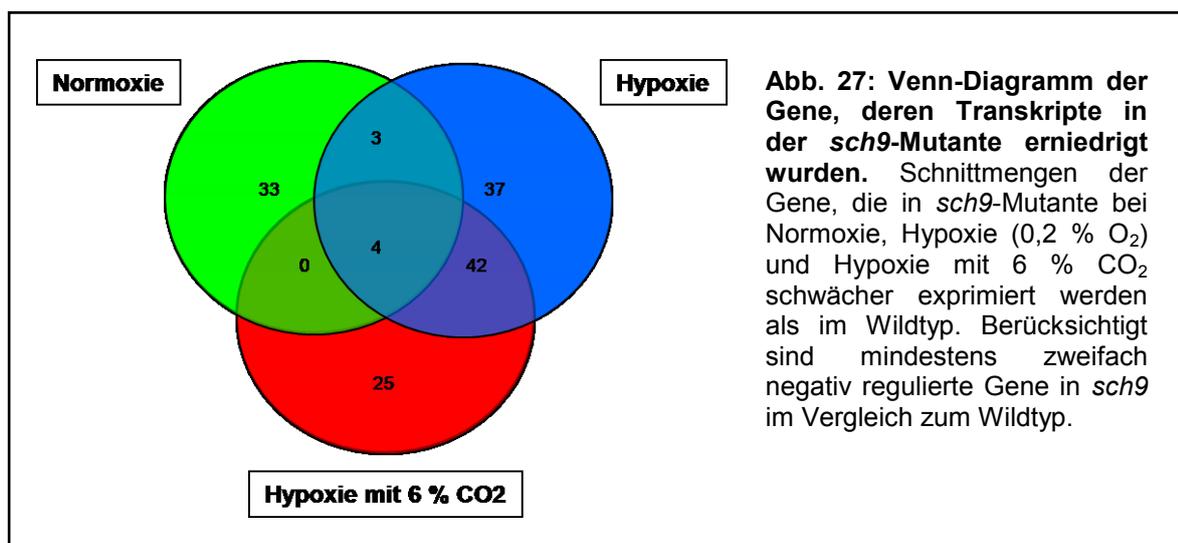
Ergebnisse

Gene, deren Transkriptspiegel in der <i>sch9</i> -Mutante erhöht waren			
	Normoxie	Hypoxie	Hypoxie mit CO ₂
<i>HGT12</i>	24,0	-	-
<i>HGT2</i>	18,7	-	-
<i>ALS3</i>	7,1	-	-
<i>orf19.6311</i>	9,3	-	-
<i>orf19.6169</i>	8,6	-	-
<i>orf19.79</i>	6,3	-	-
<i>orf19.3439</i>	6,1	-	-
<i>ALS1</i>	6,0	-	-
<i>HAP41</i>	5,9	-	-
<i>HTA1</i>	-	7,0	-
<i>orf19.5831</i>	-	-	7,5
<i>PTP3</i>	-	-	5,7
<i>ECE1</i>	-	11,1	17,4
<i>orf19.3384</i>	-	10,9	12,6
<i>HHF1</i>	-	7,1	5,7

Tab. 7: 15 Gene, deren Transkriptspiegel in der *sch9*-Mutante am stärksten erhöht waren.

3.4.5.2 Gene, deren Transkripte in der *sch9*-Mutante erniedrigt wurden

Insgesamt wurden in der *sch9*-Mutante die Transkripte von 104 Genen unter hypoxischen und 33 Gene unter normoxischen Bedingungen erniedrigt. Wieder war die Schnittmenge der gemeinsam regulierten Gene unter hypoxischen Bedingungen größer, als unter hypoxischen mit normoxischen Bedingungen (Abb. 27).



Ergebnisse

In Tab. 8 sind die durch Sch9 positiv regulierten Gene in funktionelle Gruppen eingeteilt. Die größte Genruppe unter normoxischen Bedingungen stellen Gene des Glukosemetabolismus bzw. der Glykolyse dar. Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass Sch9 neben anderen Regulatoren, wie z. B. der PKA in Wildtypzellen, einen positiven Einfluss auf den Glukosemetabolismus hat. Zwei weitere Gruppen, die in der *sch9*-Mutante negativ reguliert wurden, umfassen Gene für die Chromatin- und Chromosomenstruktur und hyphenspezifische Gene. Eine große funktionelle Gengruppe, deren Transkriptspiegel in der *sch9*-Mutante unter hypoxischen Bedingungen (mit und ohne CO₂) erniedrigt wurde, umfasst Gene der Stressantwort. Dazu gehören z.B. *SOD1*, *SOD2* und *DDR48*, die bei oxidativem Stress in Wildtypzellen verstärkt exprimiert werden. Offenbar ist Sch9 an dieser Antwort beteiligt. Weiterhin wurden in der *sch9*-Mutante unter hypoxischen Bedingungen (mit und ohne CO₂) Gene der Zuckersynthese und ATP-Biosynthese schwächer exprimiert. Weitere kleine funktionelle Gruppen die bei Hypoxie mit CO₂ bzw. unter beiden hypoxischen Bedingungen reguliert wurden umfasst Gene der Arginin- und Glutamatsynthese und des Aminosäuretransports.

Zusammengefasst kann festgestellt werden, dass in Wildtypzellen die Transkriptspiegel verschiedener Gengruppen durch Sch9 in Abhängigkeit von verschiedenen Gasbedingungen aktiviert werden.

Ergebnisse

Gene, deren Transkriptspiegel in <i>sch9</i> -Mutante erniedrigt wurden	
Normoxie	
Glukosemetabolismus (6)	<i>CDC19, GPM2, PDC11, PFK1, PFK2, PGI1</i>
Chromatin-/Chromosomenstruktur (2)	<i>RNR22, orf19.6910</i>
keine spezifische Gruppe (25)	<i>COX15, HEM13, RHR2, TPO3, QDR1, ZRT2, MSM1, CWH8, LYS12, LEU2, MEP1, GSG1, SUR2, OSM1, RSN1, orf19.6816, orf19.4617, orf19.4581, orf19.5136, orf19.5534, orf19.1691, orf19.2804, orf19.5103, orf19.6834, orf19.4620</i>
Hypoxie	
Stressantwort (6)	<i>SOD1, SOD2, 19.345, FRE30, ASR2, DDR48</i>
Zuckersynthese (3)	<i>AMS1, GPH1, 19.3982</i>
Hypenspezifische Gene (2)	<i>CHA1, UCF1</i>
ATP-Biosynthese (2)	<i>ATP1, ATP2</i>
keine spezifische Gruppe (24)	<i>CYB2, ARG8, PRC2, ARO10, OSM2, HGT6, XYL2, CDR4, orf19.5245, orf19.7310, orf19.2591, orf19.4121, orf19.1584, orf19.5614, orf19.1775, orf19.682, orf19.6877, orf19.3435, orf19.1473, orf19.1469, orf19.1368, orf19.3372, orf19.4636, orf19.6342</i>
Hypoxie mit 6 % CO₂	
Argininsynthese (3)	<i>ARG1, ARG2, 19.3418</i>
Chromatin-/Chromosomenstruktur (2)	<i>CDC54, orf19.810</i>
Stressantwort (2)	<i>GAD1, HSP70</i>
keine spezifische Gruppe (18)	<i>FAA2-3, FOX2, HGT17, HMX1, TCC1, STE2, ILV5, PCL1, IFD6, orf19.553, orf19.7513, orf19.2065, orf19.1072, orf19.670.2, orf19.40, orf19.6004, orf19.4834, orf19.994</i>
Hypoxie mit und ohne 6 %CO₂	
Zuckersynthese (3)	<i>GCA1, MAL2, NTH1</i>
Aminosäuretransport (2)	<i>CAN2, orf19.7566</i>
Argininsynthese (2)	<i>ARG3, CPA1</i>
Glutamatsynthese (2)	<i>PUT1, PUT2</i>
keine spezifische Gruppe (33)	<i>MAL31, ASR1, PHO84, ADH2, CLN3, MRF1, MLS1, OYE23, CSH1, UGA11, FMP45, PST1, orf19.2296, orf19.822, orf19.1172, orf19.5975, orf19.1117, orf19.7491, orf19.6592, orf19.566, orf19.823, orf19.7283, orf19.4735, orf19.7437, orf19.803, orf19.7490, orf19.3976, orf19.4128, orf19.320, orf19.2168, orf19.5295, orf19.3434, orf19.77.1</i>
Normoxie und Hypoxie	
Isoleucinsynthese (1)	<i>orf19.1997</i>
Unbekannt (2)	<i>orf19.1257, orf19.3968</i>
Normoxie und Hypoxie mit 6 % CO₂	
keine Gene	
Alle Bedingungen	
Aminosäuresynthese (1)	<i>ARO3</i>
Formiatkatabolismus (1)	<i>orf19.1774</i>
Glyoxylatkatabolismus (1)	<i>orf19.2989</i>
Unbekannt (1)	<i>orf19.2048</i>

Tab. 8: Funktionelle Gruppen der in *sch9*-Mutante mindestens zweifach negativ regulierten Gene. Transkriptomanalyse der *sch9*-Mutante im Vergleich zum Wildtyp. Die Zellen wurden unter normoxischen, hypoxischen (0,2 % O₂) und hypoxischen Bedingungen mit 6 % CO₂ für vier Stunden inkubiert. Anschließend wurde eine Transkriptomanalyse in dreifacher Ausführung angefertigt. Es wurden die Stämme CAF2-1 (WT) und CCS3 (*sch9*) verwendet und nur die Gene berücksichtigt, die in allen Experimenten mindestens zweifach reguliert wurden.

Ergebnisse

Gene, deren Transkriptspiegel in der <i>sch9</i> -Mutante erniedrigt waren			
	Normoxie	Hypoxie	Hypoxie mit CO ₂
<i>RNR22</i>	22,2	-	-
<i>orf19.1691</i>	20,2	-	-
<i>RHR2</i>	15,0	-	-
<i>orf19.1257</i>	11,8	-	-
<i>GCA1</i>	-	14,3	-
<i>PUT1</i>	-	-	20,1
<i>orf19.5975</i>	-	-	13,5
<i>orf19.320</i>	-	-	13,5
<i>GCA1</i>	-	-	11,2
<i>orf19.823</i>	-	-	24,4
<i>MAL2</i>	-	56,0	39,4
<i>MAL31</i>	-	29,7	23,1
<i>orf19.566</i>	-	14,7	20,1
<i>orf19.822</i>	-	14,7	12,6
<i>CAN2</i>	-	11,3	18,8

Tab. 9: 15 Gene, deren Transkriptspiegel in der *sch9*-Mutante am stärksten erniedrigt waren.

3.4.6 Einfluss der Kinase Sch9 auf die Virulenz von *C. albicans*

Wie hier gezeigt regulieren Sch9 und Efg1 beide das filamentöse Wachstum und steuern die Expression wichtiger Virulenzfaktoren (*ALS*-Gene) in *C. albicans*. Zusätzlich zeigt die Deletion von *EFG1* in *C. albicans* eine deutlich reduzierte Virulenz im Mausmodell (Lo *et al.*, 1997). Daher wurde die Virulenz der *C. albicans sch9*-Mutante in Zusammenarbeit mit A. Vecchiarelli (Universität Perugia, Italien) in einem Mausmodell der systemischen Infektion untersucht. Dazu wurden CD1-Mäusen Zellen des Wildtyps, der *sch9*-Mutante und des *SCH9*-rekonstituierten Stammes intravenös injiziert. Die Tiere wurden 60 Tage bzw. bis zu ihrem Tod beobachtet. Das Experiment wurde dreimal mit je vier Tieren wiederholt.

	MÜZ	Sterberate	Tage
WT	5,5	12/12	2-8
<i>sch9</i>	27*	7/12	7->60
<i>sch9</i> [<i>SCH9</i>]	7	12/12	2-10

Tab. 10: Überlebensrate von Mäusen nach Infektion mit *C. albicans*. Mäusen wurde 10⁶ Zellen/0,5 ml der Stämme CAF2-1 (WT), CCS3 (*sch9*) und CCS4 (*sch9* [*SCH9*]) injiziert und ihre Überlebenszeit dokumentiert. MÜZ: Mediane Überlebensrate in Tagen, Sterberate: Zahl der gestorbenen Mäuse im Vergleich zur gesamt eingesetzten Zahl an Mäusen, * p<0,01, CCS3 vs. CAF2-1.

Ergebnisse

In Tab. 10 ist zu erkennen, dass die mediane Überlebenszeit der mit dem Wildtyp und dem rekonstituiertem Stamm infizierter Mäuse bei 5,5 bzw. 7 Tagen lag. Dabei starben alle Tiere im Verlauf des Experiments. Mäuse, die mit der *sch9*-Mutante infiziert wurden, hatten dagegen eine mediane Überlebensdauer von 27 Tagen und 40 % der Tiere überlebten sogar die Beobachtungszeit von 60 Tagen. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Kinase Sch9 für die Virulenz von *C. albicans* eine signifikante Rolle spielt.

4. Diskussion

In dieser Arbeit wurden Wachstum und Morphologie des opportunistischen Krankheitserregers *C. albicans* unter unterschiedlichen O₂- und CO₂-Bedingungen erforscht. Diese beiden Gase stellen die physiologisch wichtigsten Gase für den Menschen dar.

Sauerstoff ist das häufigste Element der Erde und in einer Konzentration von 20,922 % in der Atemluft enthalten. Der Mensch, aber auch andere Eu- und Prokaryoten benötigen Sauerstoff zur Energiegewinnung. Dabei spielt dieser als starkes Oxidationsmittel eine wichtige Rolle in der Elektronentransportkette, die bei Eukaryoten in die innere Mitochondrienmembran eingebettet ist. Während Elektronen sich entlang dieser Kette aus Elektronenakzeptor- und Elektronendonormolekülen bewegen, fallen sie schrittweise auf immer niedrigere Energieniveaus. Die dabei abgegebene Energie wird für den Transport von H⁺-Ionen aus dem Inneren des Mitochondriums durch die Membran nach außen verwendet. Dabei entsteht ein H⁺-Ionengradient, der als Energiequelle für z. B. die ATP-Bildung genutzt wird. Am Ende dieses Elektronentransfers werden die Elektronen auf O₂ übertragen, welches in das Mitochondrium diffundiert ist. Die reduzierten Sauerstoffmoleküle reagieren mit H⁺-Ionen zu Wasser. Während der Übertragung von Elektronen auf O₂ können durch eine unvollständige Reduktion des O₂-Moleküls verschiedene Sauerstoffradikale entstehen, wie z. B. Hydroxylradikale (OH[•]) oder Hydrogenperoxid (H₂O₂). Jedes dieser Zwischenprodukte kann die Zelle schädigen, indem es umliegende biologische Makromoleküle (z. B. DNA, Proteine und Lipide) oxidiert. Als Schutz vor ROS (reactive oxygen species) besitzt die Zelle antioxidierende Enzyme, wie z. B. Katalasen oder Peroxidasen. ROS fügen der Zelle jedoch nicht nur Schäden zu, sondern sie fungieren auch als wichtige Signalmoleküle, z. B. für die Entwicklung der Immunantwort (Theopold, 2009).

Im menschlichen Körper bestehen Bereiche mit einer hohen, aber auch mit einer sehr geringen O₂-Konzentration. Arterielles Blut besitzt eine hohe O₂-Konzentration von 95 mm Hg, während venöses Blut nur noch 40 mm Hg O₂ enthält. Niedrige Sauerstoffkonzentrationen im menschlichen Körper entstehen z. B. durch einen niedrigen arteriellen Sauerstoffpartialdruck (z. B. bei Aufenthalt in großer Höhe), eine verminderte Gesamt-O₂-Menge, die an Hämoglobin gebunden ist (z. B. durch einen starken Blutverlust) oder einen verminderten Blutfluss (z. B. durch Schock oder einer Thrombose). In allen Fällen ist die Diffusion von Gasen zwischen den Alveolen der Lunge und dem Blut beeinträchtigt und muss schnellstmöglich behoben werden. Allerdings bestehen im menschlichen Körper auch „natürliche“ bzw. nicht krankhafte hypoxische Bereiche, wie z. B. der Darm mit einer O₂-Konzentration von 0 – 70 mm Hg oder Zellen der Leber mit < 1-60 mm Hg (Kessler *et al.*, 1974).

Diskussion

In wässrigen Lösungen besitzt Sauerstoff eine geringe Löslichkeit. Bei einem Partialdruck von 100 mm Hg lösen sich nur $0,1 \text{ mmol l}^{-1}$ Sauerstoff. Diese geringe Löslichkeit stellt den Grund für die evolutionäre Entwicklung von Sauerstofftransportierenden Molekülen dar, wie z. B. von Hämoglobin. Durch das Hämoglobin werden 98 % des Sauerstoffs im Blut zu den jeweiligen Zellen transportiert. Die restlichen 2 % sind im Blutplasma gelöst.

Neben Sauerstoff spielt auch CO_2 für viele Pro- und Eukaryoten eine entscheidene Rolle. Es entsteht z. B. durch den Abbau organischer Moleküle während des Citratzyklus. In der Atemluft ist Kohlendioxid zu 0,033 % enthalten. Im menschlichen Körper ist diese Konzentration oft viel höher, wie z. B. in arteriellem Blut mit einer Konzentration von 40 mm Hg (5 %) oder in venösem Blut mit einer Konzentration von 46 mm Hg (6 %). Die Löslichkeit von CO_2 in einer wässrigen Lösung ist 20-mal stärker als die von O_2 . Etwa 7 % des CO_2 liegen im Blutplasma frei gelöst vor, während die restlichen 93 % in die Erythrocyten diffundieren, wo etwa 70 % durch die Carboanhydrase in Hydrogencarbonat umgewandelt werden, während 23 % an Hämoglobin binden. Die Umwandlung von CO_2 zu Hydrogencarbonat hat zwei Gründe: 1.) CO_2 wird von den Zellen zur Lunge transportiert, wo es an die Umwelt abgegeben wird und 2.) Hydrogencarbonat dient als Puffersubstanz, durch die in den Körperflüssigkeiten ein konstanter pH-Wert eingehalten werden kann.

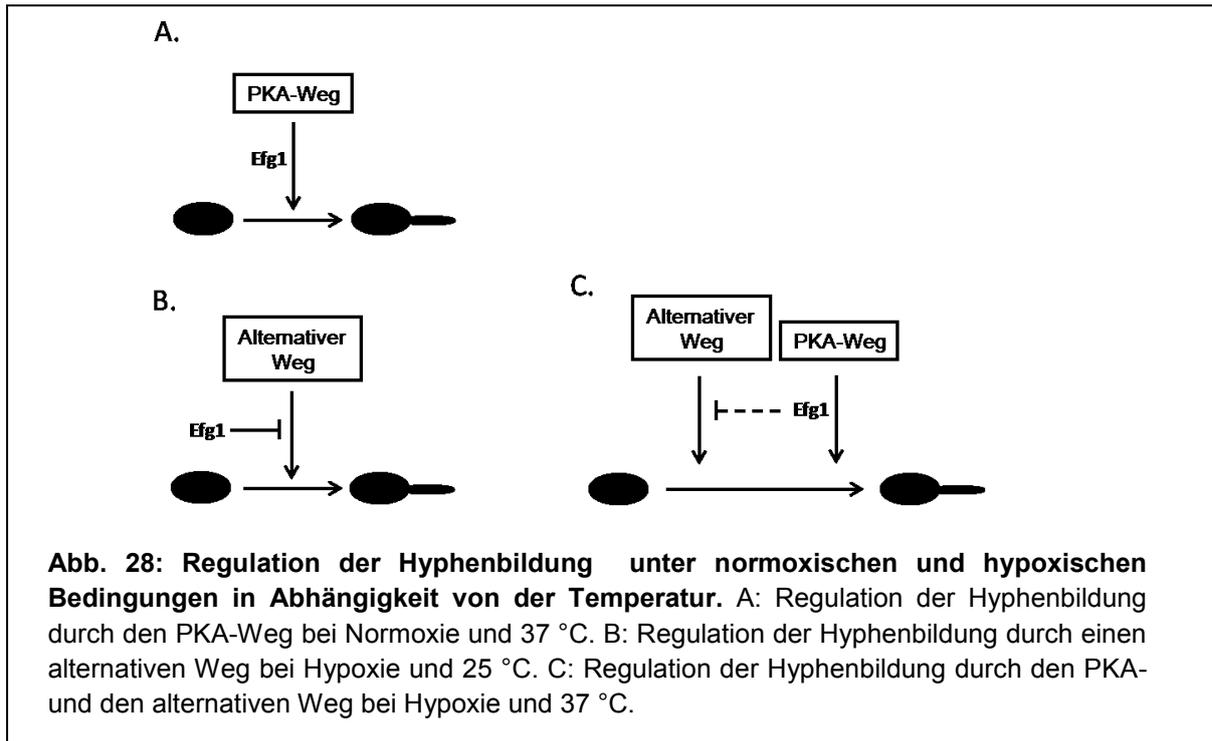
CO_2 besitzt auch die Funktion eines Signalmoleküls, da es verschiedene Regulationsmechanismen beeinflusst. Bei *C. albicans* wird durch CO_2 der PKA-Wege aktiviert, der unter anderem den Wechsel von der Hefeform in die Hyphenform induziert. Bei einer hohen CO_2 -Konzentration von 5-6 %, wie sie z. B. im Blut vorliegt, reagiert CO_2 mit H_2O spontan zu HCO_3^- und H^+ . HCO_3^- aktiviert die Adenylatcyclase Cdc43, die durch die Synthese von cAMP die Proteinkinase A aktiviert. Wächst *C. albicans* jedoch in einer Region mit einem geringeren CO_2 -Gehalt, wie z. B. auf der menschlichen Haut, dann wird die Reaktion von CO_2 zu HCO_3^- durch die Carboanhydrase Nce103 katalysiert (Bahn und Mühlischlegel, 2006; Klengel *et al.*, 2005). Für das Wachstum bei Normoxie ist Nce103 ein essentielles Enzym. Wird eine *nce103*-Mutante allerdings unter einer erhöhten CO_2 -Konzentration (5 %) angezogen, zeigt sie ein normales Wachstum (Klengel *et al.*, 2005).

4.1 Die Regulation der Hyphenbildung bei Hypoxie erfolgt durch einen alternativen Signalweg

Vorangegangene Studien zeigten bereits, dass der Efg1 Transkriptionsfaktor die Hyphenbildung bei Normoxie induziert, sie aber bei Hypoxie und einer Temperatur von $< 37\text{ °C}$ reprimiert (Brown *et al.*, 1999; Sonneborn *et al.*, 1999; Setiadi *et al.*, 2006). Setiadi und Mitarbeiter (2006) stellten fest, dass der hyperfilamentöse Phänotyp des *efg1*-Deletionsstammes nur durch Hypoxie und nicht durch einen erhöhten CO_2 -Gehalt hervorgerufen wird.

In dieser Arbeit wurde der *efg1*-Deletionsstamm mit Hilfe einer INVIVO₂₀₀-Hypoxiebank unter verschiedenen Gasbedingungen angezogen und die bivalente Funktion von Efg1 als Regulator der Hyphenbildung unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen, sowie bei unterschiedlichen Temperaturen bestätigt. Bei Normoxie zeigte der *efg1*-Deletionsstamm eine defekte Hyphenbildung, während bei Hypoxie und einer Temperatur von 25 °C ein hyperfilamentöses Wachstum gegenüber dem Wildtyp beobachtet wurde. Unter letzteren Bedingungen fungiert Efg1 somit als Repressor der Hyphenbildung. Bei Hypoxie und einer Temperatur von 37 °C zeigte der *efg1*-Deletionsstamm keine Hyphen (im Gegensatz zum Wildtyp), was darauf hinweist, dass Efg1 bei 37 °C unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen immer als Aktivator für die Hyphenbildung wirkt. Diese Ergebnisse bestätigten die Theorie, dass in Abhängigkeit von der Sauerstoffkonzentration, aber auch von der Temperatur die Hyphenbildung durch einen alternativen Signalweg gesteuert wird (Setiadi *et al.*, 2006; Ernst und Tielker, 2009). Bei niedrigen Temperaturen ($< 35\text{ °C}$) reprimiert Sauerstoff einen alternativen Signalweg, für den Efg1 notwendig ist. Diese Repression ist jedoch nicht vollständig, da der Wildtyp eine leichte Hyphenbildung bei Hypoxie und einer Temperatur von 25 °C zeigte.

Da bei einer Temperatur von 37 °C und Hypoxie der *efg1*-Deletionsstamm fast keine Hyphen ausbildete, wird Efg1 bei dieser erhöhten Temperatur wahrscheinlich, ähnlich wie bei Normoxie, durch den PKA-Weg aktiviert. Das restliche Hyphenwachstum der *efg1*-Mutante unter diesen Bedingungen könnte darauf zurückzuführen sein, dass beide Signalwege (PKA- und alternativer Weg) aktiv sind (Abb. 28). Fehlt Efg1 kann somit die Hyphenbildung weder über den PKA-Weg induziert, noch über den alternativen Weg reprimiert werden. Es ist aber noch unklar, wie die Temperatur und/oder das Efg1 Protein die Signalwege auf molekularer Ebene regulieren.



4.2 Efg1 als Regulator des filamentösen Wachstums und der Biofilmbildung bei Hypoxie

Um die Regulation durch Efg1 auf transkriptomaler Ebene zu untersuchen, wurden bereits vergleichende Transkriptomanalysen des Wildtypstamms und der *efg1*-Mutante unter normoxischen sowie hypoxischen Bedingungen durchgeführt (Doedt *et al.*, 2004; Setiadi *et al.*, 2006). In dieser Arbeit wurde *EFG1* mit Hilfe des „Tet-on“-Systems im Rahmen einer zeitlichen Kinetik mit kurzen Induktionszeiten bei Normoxie und Hypoxie exprimiert. Ziel war es hierbei, die Gene zu ermitteln, die unmittelbar durch Efg1 beeinflusst werden.

In den vorangegangenen Arbeiten wurde unter normoxischen Bedingungen bereits festgestellt, dass Efg1 die Expression von Zellwandproteinen und Genen mit antioxidativer Wirkung reguliert (Lane *et al.*, 2001; Nantel *et al.*, 2002; Doedt *et al.*, 2004; Setiadi *et al.*, 2006). In dieser Arbeit zeigte sich bei Normoxie innerhalb der ersten 5 Minuten nach Induktion von *EFG1* ebenfalls eine Regulation von Genen für Zellwandproteine, wie z. B. von *HWP1*, *ECE1* und *ALS3*. Da diese Gene außerdem bei Normoxie hyphenspezifisch exprimiert werden, wird erneut deutlich, dass Efg1 ein Regulator der Hyphenbildung bei Normoxie ist. Ebenfalls wurden durch Efg1 Gene positiv reguliert, die für reduzierend wirkende Moleküle kodieren. Darunter fallen die Superoxiddismutase *SOD22.3.F*, aber auch die

Diskussion

Eisenreduktase *FRE30.3*. Diese Gruppe regulierter Gene weist darauf hin, dass Efg1 einen Einfluss auf die Neutralisierung der z. B. durch die unvollständige Reduktion von Sauerstoff entstandenen Radikale (ROS) der Atmungskette hat. Insgesamt wurden unter normoxischen Bedingungen weniger Gene negativ als positiv durch Efg1 reguliert. Dieses Ergebnis könnte durch die sehr kurze Induktionszeit des *EFG1*-Gens begründet sein, in welcher stabile RNA negativ regulierter Gene noch nicht abgebaut wurde.

Vorherige Transkriptomanalysen unter hypoxischen Bedingungen zeigten, dass Efg1 einer der Hauptregulatoren der hypoxischen Antwort ist, da dieser Transkriptionsfaktor die Expression etwa der Hälfte der in *C. albicans* hypoxisch regulierten Gene steuert. Positiv wurden Gene der Stressantwort (z. B. *HSP12*, *CTA1* und *DDR48*), der Fettsäurebiosynthese (z. B. *OLE1* und *FAS2*), sowie einzelne Gene der Glykolyse und der fermentativen Antwort der Zelle durch Efg1 reguliert (Setiadi *et al.*, 2006). Die geringe Regulation glykolytischer Gene in der Arbeit von Setiadi (2006) war überraschend, da diese bei Normoxie durch Efg1 induziert werden. Efg1 schien demnach kein entscheidender Regulator der Glykolyse bei Hypoxie zu sein. Durch die transkriptionelle Kinetik der *EFG1*-Expression in dieser Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, dass fast alle Gene der Glykolyse nach der *EFG1*-Induktion bei Hypoxie (nicht aber bei Normoxie) induziert wurden. Somit wird Efg1 vermutlich für die schnelle Anpassung an hypoxische Bedingungen benötigt, während es bei einer längeren Anpassung an Hypoxie zur Induktion von Glykolysegenen nicht benötigt wird. Wahrscheinlich übernehmen andere hypoxische Regulatoren die langfristige Induktion dieser Gene (Askew *et al.*, 2009).

Ein weiteres überraschendes Ergebnis der Transkriptomkinetik war, dass durch *EFG1* bei Hypoxie Gene aktiviert wurden, von denen bekannt ist, dass sie bei einer Biofilmbildung unter normoxischen Bedingungen induziert werden. Da Mutanten, denen das *EFG1*-Gen fehlt, unter keinen Umständen mehr in der Lage sind, einen Biofilm zu bilden (Abb. 15), ist Efg1 ein zentraler Regulator der Biofilmbildung. Diese Wirkung ist auch bei normoxischer Biofilmbildung wichtig, da auch bei Normoxie in Biofilmen hypoxische Bereiche entstehen, die sich wahrscheinlich besonders in tieferen Schichten des Biofilms, nahe der Adhäsionsoberfläche, bilden.

Die Gengruppen, die bei der Expression von *EFG1* unter hypoxischen Bedingungen positiv reguliert wurden, waren 1.) Gene der Glykolyse, 2.) Gene des Schwefelmetabolismus, 3.) Gene der Eisenaufnahme und 4.) Gene, die für peroxisomale Funktionen kodieren. Somit scheint eine erhöhte Aktivität der Glykolyse essentiell für die Biofilmbildung von *C. albicans* zu sein, was bereits durch mehrere Studien bestätigt wurde (Mukherjee *et al.*, 2006; Yeater *et al.*, 2007; Rossignol *et al.*, 2009; Sellam *et al.*, 2009). Andererseits konnten Mukherjee und Mitarbeiter (2006) ebenfalls zeigen, dass Ethanol, welches durch die Glykolyse entsteht, das Ausmaß der Biofilmbildung beschränkt.

Weiterhin wurden Gene für die Schwefelassimilation und der Biosynthese von schwefelhaltigen Aminosäuren reguliert (García-Sánchez *et al.*, 2004; Nailis *et al.*, 2009). Diese Gruppe wurde hier bei Hypoxie durch Efg1 schnell induziert, während sie in vorherigen Transkriptomanalyse der *efg1*-Mutante nicht entdeckt wurden (Setiadi *et al.*, 2006). Wie im Fall der glykolytischen Gene scheint Efg1 bei Hypoxie für die schnelle Adaptation, aber nicht die langfristige Induktion der Schwefelassimilationsgene notwendig zu sein. Der Nutzen der Schwefelassimilation bei Hypoxie könnte damit erklärt werden, dass durch den gestörten Ablauf der Atmungskette bei Hypoxie Radikale (ROS) entstehen, die umliegende Moleküle oxidieren und somit schädigen (Dirmeier *et al.*, 2002). Verbindungen wie Methionin, Cystein, Thioredoxin oder das Coenzym-A besitzen eine Sulfhydrylgruppe und sind in der Lage, freie Radikale zu reduzieren. Eine gesteigerte Bereitstellung von Schwefel bzw. Schwefelverbindungen bei Hypoxie könnte somit dem Schutz der Zelle vor Oxidation dienen.

Die dritte Gruppe der durch Efg1 unter hypoxischen Bedingungen induzierten Gene besitzt in der Zelle peroxisomale Funktionen. Diese Gene kodieren für Proteine, die ebenfalls die Aufgabe haben, ROS in der Zelle zu neutralisieren, z. B. *SOD5* und *CTA1*. Die vierte Klasse hypoxisch Efg1-regulierter Gene umfasst Gene für die Eisenaufnahme. Die gesteigerte Expression dieser Gene könnte den Versuch der Zelle widerspiegeln das geringe Sauerstoffangebot durch die Optimierung der Funktion der eisenhaltigen Proteine der Atmungskette auszugleichen. Durch verstärkte Eisenaufnahme kann die *EFG1*-Expression ebenfalls aktiviert werden, um die Filamentierung und die Biofilmbildung zu aktivieren (Hameed *et al.*, 2008).

Zusammengefasst kann festgehalten werden, dass die durch Efg1 unter hypoxischen Bedingungen schnell induzierten Gene mit den Genen übereinstimmen, die ebenfalls in einem unter normoxischen Bedingungen entstandenem Biofilm induziert werden. Efg1 ist somit ein positiver Regulator der Biofilmbildung, bei der auch bei Normoxie hypoxische Bereiche entstehen (z. B. in tiefen Schichten des Biofilms).

4.3 Biofilmbildung verschiedener Mutantenstämme variiert in Abhängigkeit des O₂- und CO₂-Gehalts

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass *C. albicans* bei Hypoxie alternative Regulationswege der Morphologie und des Metabolismus verwendet. Um festzustellen, ob die Bildung von Biofilmen von *C. albicans* unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen von denselben Komponenten gesteuert wird, wurden in dieser Arbeit Mutanten untersucht, denen Proteine fehlen, die bei

Normoxie für die Biofilmbildung notwendig sind. Ziel war es, Verhalten und Fähigkeit zur Biofilmbildung dieser Mutantenstämme bei Hypoxie zu beobachten. Es ist bereits bekannt, dass die Biofilmbildung einer *efg1*-Mutante bei Normoxie defekt ist (Ramage *et al.*, 2002; García-Sánchez *et al.*, 2004). Dieser Phänotyp zeigte sich ebenso bei Hypoxie und allen getesteten CO₂-Bedingungen. Ein *flo8*-Deletionsstamm zeigte den gleichen defekten Phänotyp wie die *efg1*-Mutante. Da schon für die Hyphenbildung beschrieben wurde, dass Flo8 und Efg1 in ihrer Funktion synergistisch sind (Cao *et al.*, 2006), scheint die Induktion auch für die Biofilmbildung wichtig zu sein. Einen ähnlichen Biofilmdefekt zeigte eine *pmt1*-Mutante, in der die O-Mannosylierung sekretorischer Proteine gestört ist (Timpel *et al.*, 1998)

Andere Deletionsstämme zeigten überraschenderweise eine unterschiedliche Biofilmbildung bei Normoxie und Hypoxie. Die Deletionsstämme der Transkriptionsfaktoren Tec1, Ace2 und Czf1 waren bei Normoxie nicht in der Lage einen Biofilm zu bilden (Ramage *et al.*, 2002; García-Sánchez *et al.*, 2004; Kelly *et al.*, 2004; Nobile und Mitchell, 2005), während sie bei Hypoxie keine oder nur eine geringe Rolle zu spielten, da alle Mutanten in der Lage waren, einen Biofilm zu bilden. Überraschend war, dass die *czf1*-Mutante bei Wachstum unter Hypoxie einen Biofilm bilden konnte, da dieser Stamm unter sauerstoffarmen Bedingungen (embedded) eine defekte Hyphenbildung zeigt (Giusani *et al.*, 2002). Weitere untersuchte Mutanten, die einen Defekt der Oberflächenstruktur oder Signalweiterleitung besitzen und bei Normoxie Biofilm-defekt sind, zeigten ebenfalls keine gestörte Biofilmbildung bei Hypoxie. Dazu gehören Mutanten mit Defekten für das Zellwandprotein Als3 (Nobile *et al.*, 2006; Zhao *et al.*, 2006) und Proteine, die für die N- (Och1) oder O-Glykosylierung (Pmt2 und Pmt4) notwendig sind (Bates *et al.*, 2006; Peltroche-Llacsahuanga *et al.*, 2006). Der *als3*-Deletionsstamm zeigte bei Normoxie *in vitro* eine defekte Biofilmbildung, war *in vivo* aber wohl in der Lage einen intakten Biofilm zu bilden. Es scheint also, dass die Biofilmbildung *in vivo* und *in vitro*, bzw. bei Normoxie und Hypoxie unterschiedlich reguliert werden. Überraschend war auch, dass Mutanten verschiedener MAP-Kinasewege (*mkc1* und *ssk1*) nicht nur auf ein vermindertes Angebot an Sauerstoff reagierten, sondern auch auf einen erhöhten CO₂-Gehalt. Dieses Verhalten wurde dadurch deutlich, dass die Deletionsstämme bei Normoxie und Hypoxie eine defekte Biofilmbildung besaßen, die bei Hypoxie mit 6 % CO₂ wieder normalisiert wurde. Durch dieses Ergebnis wird klar, dass die Biofilmbildung nicht nur durch die Sauerstoff-, sondern auch durch die CO₂-Konzentration reguliert wird.

Zusammengefasst ist festzustellen, dass die Biofilmbildung sehr sensitiv auf die Umgebungsbedingung reagiert. Weiterhin wird deutlich, dass für die Biofilmbildung je nach Umweltbedingung unterschiedliche Regulatoren benötigt werden.

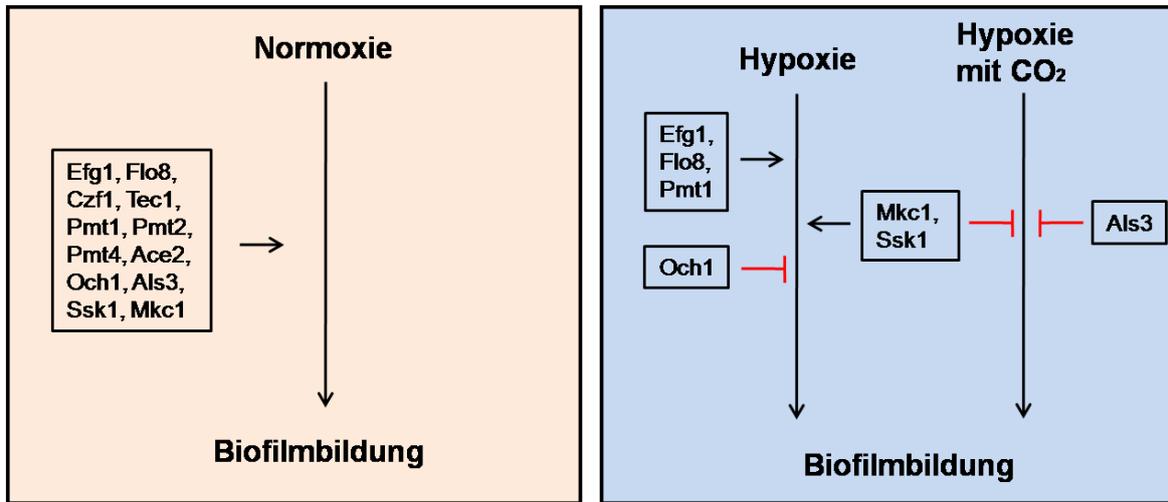


Abb. 29: Modell der Regulation der Biofilmbildung bei Normoxie und Hypoxie. Alle in dieser Arbeit getesteten Gene waren bei Normoxie für die Biofilmbildung notwendig. Bei Hypoxie waren nur noch ein Teil der getesteten Gene für die Biofilmbildung notwendig. Andere Gene inhibierten die Biofilmbildung.

4.4 Eine *SCH9*-Deletion in *C. albicans* verkürzt die Lebensspanne (CLS) im Gegensatz zu einer *sch9*-Deletion in *S. cerevisiae*

Als chronologische Lebensspanne (CLS) wird die zeitliche Lebensfähigkeit bzw. Langlebigkeit einer Zelle bezeichnet. Von der Bäckerhefe *S. cerevisiae* ist bereits bekannt, dass die CLS durch eine Hemmung oder Deletion von Sch9 verlängert wird (Fabrizio *et al.*, 2001; Wanke *et al.*, 2008). Durch Versuche zur CLS wurde außerdem die direkte Hemmung von Rim15 durch Sch9 bestätigt (Wanke *et al.*, 2008). In dieser Arbeit wurden ebenfalls Versuche zur Abhängigkeit der CLS von der Sch9-Kinase bei *C. albicans* durchgeführt, die überraschenderweise von den Ergebnissen bei *S. cerevisiae* abweichen. Bei *C. albicans* führte eine Deletion der Sch9-Kinase nicht zu einer verlängerten, sondern im Gegenteil, zu einer verkürzten chronologischen Alterung. Die Deletion der Tpk1-Isoform der PKA führte ebenfalls zu einer dem Wildtyp gegenüber verkürzten Überlebensrate. Die *rim15*-Deletion bei *C. albicans* zeigte einen der Bäckerhefe ähnlichen Phänotyp, da diese ebenfalls eine verkürzte Lebensspanne besaß, während eine Deletion der Tpk2-Isoform kaum oder gar keinen Einfluss auf die chronologische Lebensspanne hatte. Neben der verkürzten Lebenszeit fiel auf, dass die Zellgröße der *sch9*- und *tpk1*-Mutante kleiner war als die des Wildtyps, was für eine Deletion von *SCH9* in *S. cerevisiae* bereits beschrieben wurde (Jorgensen *et al.*, 2002).

Dort proliferieren die Zellen ebenfalls langsamer und verweilen in der G₁-Phase, was durch eine eingeschränkte Expression der Gene für ribosomale Proteine und der ribosomalen Biogenese verursacht wird (Jorgensen *et al.*, 2002).

Zusammengefasst ähnelt sich der Phänotyp der Koloniegröße der *sch9*-Mutante von *C. albicans* und *S. cerevisiae*. Jedoch wird die chronologische Lebensspanne in beiden Pilzen unterschiedlich reguliert.

4.5 Die Genregulation durch Sch9 in *C. albicans* unterscheidet sich unter hypoxischen und normoxischen Wachstumsbedingungen

Da Sch9 verantwortlich für eine komplexe Regulation bei Hypoxie ist, wurde mit Hilfe von Microarray-Analysen das gesamte Transkriptom der *C. albicans sch9*-Mutante unter oxischen und hypoxischen Bedingungen untersucht. Es wurden Gengruppen identifiziert, deren Gene unter den einzelnen Bedingungen mindestens zweifach positiv bzw. zweifach negativ reguliert wurden. Bei *S. cerevisiae* wurden ebenfalls bereits Transkriptomanalysen durchgeführt, in denen die Regulation einer *sch9*-Mutante mit der des Wildtyps verglichen wurde. In diesen Studien wurde deutlich, dass Sch9 im Wildtyp bei Normoxie verantwortlich für die negative Regulation typischer Stressantwortproteine (Osmostress, Hitzestress, oxidativer Stress) (Pascual-Ahuir und Proft, 2007; Smets *et al.*, 2008) und ein positiver Regulator der Translationsmaschinerie ist (Jorgensen *et al.*, 2004; Urban *et al.*, 2007). Diese Gengruppen wurden auch bei *C. albicans* durch Sch9 reguliert, allerdings nur bei Hypoxie. Dabei wurden im Wildtyp von *C. albicans* durch Sch9 Gene der Stressantwort erhöht und Gene der Translation erniedrigt, also genau umgekehrt zur Regulation bei Normoxie bei *S. cerevisiae*. Daraus könnte man schließen, dass bei *S. cerevisiae* und *C. albicans* die Zielgene von Sch9 ähnlich sind, diese jedoch unterschiedlich reguliert werden. Andererseits wurden in dieser Arbeit die Stämme für die Transkriptomanalyse in Medium mit 2 % Saccharose statt Glukose angezogen und für *S. cerevisiae* ist bekannt, dass eine Kalorienrestriktion die Kinase Sch9 hemmt. Es kann demnach nicht ausgeschlossen werden, dass in diesem Experiment das Fehlen von Glukose im Medium teilweise zu einer erniedrigten Aktivität von Sch9 führt.

Vergleicht man die Ergebnisse der Transkriptomanalyse der *sch9*- mit der *efg1*-Mutante bei *C. albicans*, fällt auf, dass unter hypoxischen Bedingungen Gene der Translation sowohl durch Efg1, als auch durch Sch9 reprimiert werden. Gene der Glykolyse und der Stressantwort werden dagegen durch beide Proteine induziert.

Zwei dominante Gengruppen, die im Wildtyp durch Sch9 bei Hypoxie negativ reguliert werden, enthalten Gene der Ergosterolbiosynthese und der Eisenaufnahme. Beide Gruppen besitzen Gene, die für typische Sauerstoffsensoren kodieren. Da die Expression dieser Gene durch Sch9 allerdings negativ reguliert wird, könnte die Proteinkinase ein Gegenspieler der hypoxischen Antwort sein.

Zusammenfassend werden bei verschiedenen Gasbedingungen durch Sch9 verschiedene Gengruppen reguliert. Die meisten Übereinstimmungen der durch Sch9 regulierten Gengruppen befanden sich zwischen den hypoxisch angezogenen Zellen. Weiterhin wurden bei *C. albicans* und *S. cerevisiae* durch Sch9 ähnliche Gengruppen, teilweise jedoch gegensätzlich, reguliert. Außerdem existieren auch einige Überschneidungen mit den durch Efg1 regulierten Gengruppen. Es werden zwar ähnliche Gengruppen durch Sch9 und Efg1 bei *C. albicans* und durch Sch9 bei *C. albicans* und *S. cerevisiae* reguliert, jedoch scheinen die jeweiligen Umwelteinflüsse eine unterschiedliche Wirkung auf diese Regulation zu haben.

4.6 Sch9 als Teil des alternativen Signalweges der Hyphenbildung unter hypoxischen Bedingungen

Die *sch9*-Mutante war unter normoxischen Bedingungen unabhängig von der Temperatur nicht in der Lage Hyphen zu bilden. Bei einer Temperatur von 25 °C und einer O₂-Konzentration von 0,2 % zeigte sie ebenfalls keine Hyphenbildung, anders als der hyperfilamentöse Phänotyp der *efg1*-Mutante bei Hypoxie. Wurde jedoch gleichzeitig die CO₂-Konzentration auf 6 % erhöht, bildeten sich sehr starke Hyphen, die sogar stärker waren als die des *efg1*-Deletionsstammes. Somit scheint die Kinase Sch9 wie Efg1 bei Hypoxie ein Repressor der Hyphenbildung zu sein, jedoch nur in Anwesenheit von hohen CO₂-Konzentrationen. Bestätigt wurde dieses Ergebnis durch die Rekonstitution des *sch9*-Deletionsstammes, der nach der Integration von *SCH9* den gleichen Phänotyp wie der Wildtyp zeigte. Experimente zur Abhängigkeit von der Sauerstoffkonzentration ergaben, dass für die Sch9-Funktion bei der Hyphenbildung eine Herabsetzung der Sauerstoffkonzentration von 21 % auf etwa 10 % bereits reicht. Auch eine CO₂-Konzentration von 6 % konnte bis zu einer Konzentration von 0,5 % reduziert werden, um noch einen leicht hyperfilamentösen Phänotyp hervorzurufen. Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass die Kinase Sch9 sehr sensitiv gegenüber Sauerstoff (als Inhibitor) und Kohlendioxid (als Aktivator) ist. Bei einer Wachstumstemperatur von 37 °C änderte sich der Phänotyp des *sch9*-Deletionsstammes gegenüber einer Temperatur von 25 °C, da er nun dem des

Diskussion

Wildtyps gleich und die Kolonien unabhängig der CO₂-Konzentration Filamente zeigten. Es scheint, als ob die Repression der Hyphenbildung unter diesen Umständen nun aufgehoben und Sch9 unter diesen Bedingungen für die Hyphenbildung nicht mehr zwingend notwendig ist.

Im Gegenteil zum Wachstum auf festem Medium zeigte der *sch9*-Deletionsstamm bei Wachstum in Normoxie und flüssigem Medium und einer Temperatur von 25 °C eine starke Pseudohyphenbildung. Echte Hyphen traten erst bei einer Temperatur von 37 °C auf. Das weist darauf hin, dass das Vorhandensein einer Matrix bzw. einer Oberfläche die Kinase Sch9 auf eine andere Weise reguliert als planktonisches Wachstum. Zum Beispiel könnte das Wachstum echter Hyphen im menschlichen Körper in einem flüssigen Medium mit einem hohen Sauerstoffgehalt (z. B. arterielles Blut) durch Sch9 gehemmt werden. Adhärert *C. albicans* dagegen an weitere Zellen im Körper und dringt in diese ein, würden wahrscheinlich der Oberflächenkontakt, das hypoxische Milieu und der erhöhte CO₂-Gehalt innerhalb der Zellen das filamentöse Wachstum steuern.

Aus früheren Untersuchungen ist bereits bekannt, dass bei *S. cerevisiae* die Kinase Rim15 sowohl über die Kinase des PKA-Weges, als auch über Sch9 reguliert wird (Wanke *et al.*, 2008). Bei *C. albicans* ist die genaue Funktion und Anordnung der beiden Kinasen Rim15 und Sch9 noch unbekannt. Um Hinweise auf Funktion und Regulation dieser Proteine zu erhalten, wurde in dieser Arbeit neben Sch9 und Efg1 auch die Morphologie der Proteinkinaseuntereinheiten Tpk1 und Tpk2, sowie der Kinase Rim15 bei Normoxie und Hypoxie, mit und ohne erhöhtem CO₂-Gehalt untersucht. Dabei fiel auf, dass die *tpk1*-Mutante einen ähnlichen Phänotyp zeigte wie die *sch9*-Mutante. Auch hier war eine Sensitivität gegenüber CO₂ in Verbindung mit Hypoxie zu beobachten. Allerdings war der Phänotyp nicht ganz so stark ausgeprägt, wie der der *sch9*-Mutante. Die Deletion von Rim15 zeigte dagegen keine Veränderung zum Wildtyp, was darauf hinweisen könnte, dass Rim15 nicht in einem alternativen Signalweg der Hyphenbildung aktiv ist. Tpk2 wird dagegen unter allen Bedingungen für die Hyphenbildung benötigt.

Bezieht man die Ergebnisse der *efg1*-Deletionsmutante mit ein (Abschnitt 3.1.2), so scheint, dass bei *C. albicans* die Hyphenbildung durch mehrere Signaltransduktionswege kontrolliert wird. Unter normoxischen Bedingungen ist der PKA-Weg ein Hauptregulator der Hyphenbildung. Bei Hypoxie und Temperaturen unter 37 °C wird ein zum PKA-Weg paralleler Signaltransduktionsweg durch Efg1 gehemmt. Steigt die CO₂-Konzentration, wird dieser zusätzlich auch durch Sch9 und Tpk1 gehemmt. Dabei ist nicht bekannt, ob Sch9, TPK1 und Efg1 in unterschiedlichen oder gleichen Wegen aktiv sind. Weiterhin konnte beobachtet werden, dass bei Temperaturen ab 37 °C unter hypoxischen Bedingungen wieder ein PKA ähnlicher Weg oder der PKA-Weg selber aktiviert wird. Warum *C. albicans* die Hyphenbildung auf diese Weise reguliert, ist noch unklar. Es ist aber festzustellen, dass Temperaturen unter 37 °C

Diskussion

und Kontakt zu einer Oberfläche (z. B. Agar) den hyperfilamentösen Phänotyp der einzelnen Mutanten bei Hypoxie *in vitro* fördern. Ob diese Regulation auf eine spezielle Nische im menschlichen Körper zugeschnitten ist, oder ob es Überbleibsel aus einer Zeit sind, in der *C. albicans* oder seine evolutionären Vorfahren noch in einer deutlich kühleren Umwelt als dem menschlichen Körper lebten, ist unbekannt.

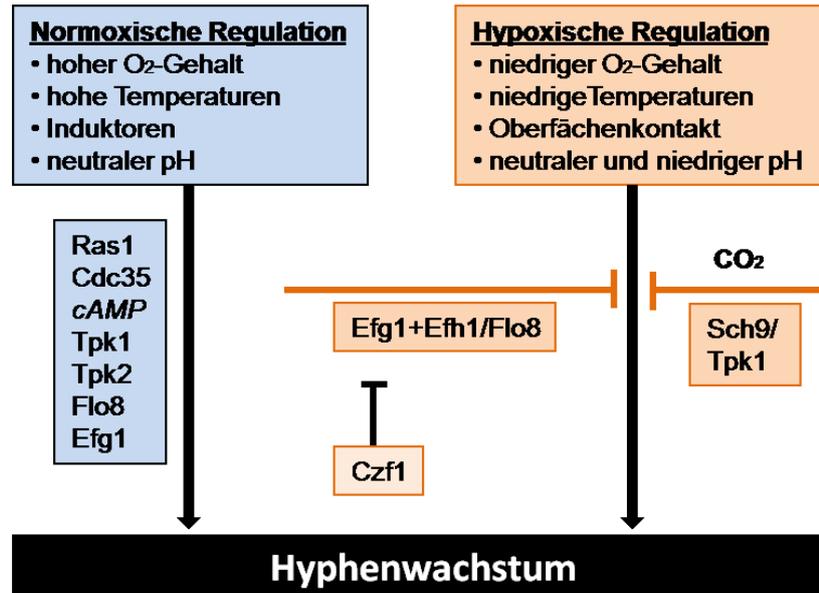


Abb.30: Regulation des Hyphenwachstums unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen. Bei Normoxie wird das Hyphenwachstum durch den PKA-Weg induziert. Bei Hypoxie wird das Hyphenwachstum durch einen alternativen Signalweg induziert, der durch Efg1 und bei Anwesenheit von CO₂ durch Sch9 und Tpk1 gehemmt wird. In dieses Schema wurden auch die Transkriptionsfaktoren Flo8, Czf1 und das homologe Protein zu Efg1, Efh1, integriert.

5. Zusammenfassung

Candida albicans ist ein humanpathogener Pilz, der oberflächliche, aber auch systemische Mykosen hervorrufen kann. Dabei besiedelt der Pilz normoxische Bereiche wie die Haut, aber auch hypoxische Nischen, wie innere Organe. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Beteiligung des Transkriptionsfaktors Efg1 und der Kinase Sch9 an der hypoxischen Adaptation von *C. albicans* untersucht.

Das Efg1-Protein ist als Teil des Proteinkinase A-Signalweges ein zentraler Regulator der Morphogenese und des Metabolismus von *C. albicans*. Efg1 hat eine bivalente Funktion, da es unter normoxischen Bedingungen die Hyphenbildung induziert, während es diese unter hypoxischen Bedingungen reprimiert. In vorigen Transkriptomanalysen wurde bereits gezeigt, dass Efg1 eine Vielzahl von Genen direkt oder indirekt reguliert. In dieser Arbeit wurden durch eine transkriptomale Kurzzeitkinetik im Anschluss an die *EFG1*-Expression mit dem "tet-on"-System die direkten oder frühen Zielgene von Efg1 ermittelt. Dabei zeigte sich, dass bei Normoxie die Expression der Gene für Zellwandproteine (z. B. *HWP1*, *ECE1*) und für reduzierend wirkende Enzyme (z. B. *SOD22*) unmittelbar durch Efg1 induziert wurden. Unter hypoxischen Bedingungen wurden überraschend vor allem solche Gengruppen durch Efg1 positiv reguliert, von denen bekannt ist, dass sie bei der Biofilmbildung von *C. albicans* induziert werden. Zu diesen Gengruppen zählen Gene der Glykolyse, des Schwefelmetabolismus, der Eisenaufnahme, sowie Gene mit peroxisomaler Funktion. Efg1 ist somit ein positiver Regulator der Biofilmbildung, bei der vermutlich auch bei Normoxie hypoxische Bereiche entstehen.

Die Fähigkeit von *C. albicans*, auch unter hypoxischen Bedingungen Biofilme zu bilden und dafür benötigte Proteine wurden in einem Mikrotiterplatten-Biofilmsystem untersucht. Hierbei wurde festgestellt, dass einige der untersuchten Komponenten, die bei Normoxie notwendig sind, unter hypoxischen Bedingungen für die Biofilmbildung entbehrlich sind, wie z. B. Ace2, während andere Proteine, wie Och1, bei Hypoxie die Biofilmbildung inhibieren. Andere Proteine einschließlich Efg1 und Flo8 waren unter allen Bedingungen für die Biofilmbildung erforderlich oder wurden in Abhängigkeit von dem Kohlendioxidgehalt benötigt. Diese Ergebnisse zeigen, dass Gasbedingungen einen signifikanten Einfluss auf die Regulation bzw. Bildung eines *C. albicans*-Biofilms haben.

Versuche zur Sch9 Kinase zeigten, dass dieses Protein nicht nur durch Sauerstoffmangel, sondern auch durch den Kohlendioxidgehalt den Phänotyp von *C. albicans* kontrolliert. Eine *sch9*-Mutante bildete bei Hypoxie keine Hyphen, während bei Hypoxie und einer hohen Kohlendioxidkonzentration ein starkes hyperfilamentöses Wachstum beobachtet wurde. Transkriptomanalysen zeigten, dass Sch9 bei Normoxie den Transkriptspegel von Genen für Zellwand- oder Membrankomponenten und den Hexosetransport erniedrigt, während es Gene für den Glukosemetabolismus induziert. Unter hypoxischen Bedingungen dagegen reprimiert Sch9 Gene für Translationskomponenten, während es Gene für die zelluläre Stressantwort induziert.

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass Morphologie und Genexpression bei *C. albicans* unter Hypoxie anders als bei Normoxie reguliert werden. Möglicherweise unterdrückt *C. albicans* bei Hypoxie die Hyphenbildung in bestimmten Wirtsnischen, um als Hefe zu proliferieren oder als kommensale Hefe dem Immunangriff zu entgehen.

Summary

Candida albicans is a pathogenic fungus that can cause superficial, but also systemic infections. The fungus colonizes normoxic areas like the skin, but also hypoxic niches, like internal organs. In this work the involvement of the transcription factor Efg1 and the Sch9 kinase in the hypoxic adaptation of *C. albicans* was investigated.

The Efg1 protein is part of the protein kinase A signaling pathway functioning as a central regulator of morphogenesis and metabolism. Efg1 has a bivalent function because it induces hypha formation during normoxia, while it represses hypha formation under hypoxic conditions. Previous transcriptome analyses have already revealed that Efg1 is a direct or indirect regulator of a variety of genes. In this work early Efg1-regulated genes were determined by a short-term transcriptomal kinetic analysis subsequent to *EFG1* expression by the "tet-on" system. The results showed that in normoxia the expression of genes for cell wall proteins (e.g. *HWP1*, *ECE1*) and of enzymes that have a reducing effect (e.g. *SOD22*) were induced rapidly by Efg1. Under hypoxic conditions, however, mainly genes known to become induced during biofilm formation of *C. albicans* were upregulated by Efg1. The respective groups of genes include genes involved in glycolysis, sulfur metabolism, iron uptake, as well as genes with peroxisomal function. Therefore, Efg1 is a positive regulator of biofilm formation, which appears to contain hypoxic areas, even during normoxic growth.

The ability of *C. albicans* to form a biofilm even under hypoxic conditions and the regulatory proteins involved were examined in a microtiter plate system of biofilm formation. It was found that several of the components that are needed for biofilm formation under normoxia are dispensable under hypoxic conditions including Ace2, while other proteins, such Och1, inhibit biofilm formation under hypoxia. Yet other proteins including Efg1 and Flo8, were required under all conditions for biofilm formation or were required depending on the carbon dioxide concentration. These results show that gas conditions have a significant influence on the regulation and formation of biofilms in *C. albicans*.

It was also shown that the phenotype of *C. albicans* is controlled by the Sch9 kinase not only by the lack of oxygen, but also by levels of carbon dioxide. A *sch9* mutant was not able to form hyphae under hypoxic conditions, while during hypoxia and high carbon dioxide concentrations, a strong hyperfilamentous phenotype was observed. Transcriptome analyses revealed that Sch9 in normoxia lowered the transcription level of genes for cell wall or membrane components and the transport of sugars, while it induced genes for glucose metabolism. Under hypoxic conditions, however, Sch9 repressed genes for translational components, while it induced genes for the cellular stress response.

These results indicate that morphology and gene expression in *C. albicans* are differently regulated during normoxia and hypoxia. Conceptionally *C. albicans* suppresses filamentation under hypoxia in certain host niches in order to proliferate in the yeast form, or to evade the immune attack as a commensal yeast.

6. Literatur

Aguirre, J., Ríos-Momberg, M., Hewitt, D. und Hansberg, W. (2005) Reactive oxygen species and development in microbial eukaryotes. *Trends in Microbiology* 3, 111-118.

Alcaide-German, M. L., Vara-Vega, A., Garcia-Fernandez, L. F., Landazuri, M. O. und del Peso, L. A. (2008) Yeast three-hybrid system that reconstitutes mammalian hypoxia inducible factor regulatory machinery. *BMC Cell Biol* 9,18 doi: 10.1186/1471-2121-9-18.

Askew, C., Adnane, S., Elias, E., Hogues, H., Mullick, A., Nantel, A. und Whiteway, M. (2009) Transcriptional Regulation of Carbohydrate Metabolism in the Human Pathogen *Candida albicans*. *PLoS Pathog* 5, e1000612.

Bahn, Y. S. und Mühlischlegel, F. (2006) CO₂ sensing in fungi and beyond. *Curr Op in Microbiol* 9, 572-578.

Bates, S., Hughes, H. B., Munro, C. A., Thomas, W. P., MacCallum, D. M., Bertram, G., Atrih, A., Ferguson, M. A., Bain, J. M., Brand, A., Hamilton, S., Westwater, C., Thomson, L. M., Brown, A. J., Odds, F. C. und Gow, N.A. (2006) Outer chain *N*-glycans are required for cell wall integrity and virulence of *Candida albicans*. *J Biol Chem* 281, 90–98.

Becerra, M., Lombardía-Ferreira, L. J., Hauser, N. C., Hoheisel, J. D., Tizon, B. und Cerdán, M. E. (2002) The yeast transcriptome in aerobic and hypoxic conditions: effects of *hap1*, *rox1*, *rox3* and *srb10* deletions. *Mol Microbiol* 43, 545-555.

Bex, C., Knauth, K., Dambacher, S. und Buchberger, A. (2007) A yeast two-hybrid system reconstituting substrate recognition of the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *Nucleic Acids Res* 35, e142.

Braliou, G. G., Venieris, E., Kalousi, A. und Simos, G. (2006) Reconstitution of human hypoxia inducible factor HIF-1 in yeast: a simple *in vivo* system to identify and characterize HIF-1alpha effectors. *Biochem Biophys Res Commun* 346, 1289-1296.

Brown, D. H., Giusani Jr., A. D., Chen, X. und Kumamoto, C. A. (1999) Filamentous growth of *Candida albicans* in response to physical environmental cues and its regulation by the unique *CZF1* gene. *Mol Microbiol* 34, 651-662.

Brown, A. J. und Gow, N. A. (1999) Regulatory networks controlling *Candida albicans* morphogenesis. *Trends Microbiol* 7, 333-338.

Calera, J. A., Zhao, X. J. und Calderone, R. (2000) Defective hyphal development and avirulence caused by a deletion of the *SSK1* response regulator gene in *Candida albicans*. *Infect Immun* 68, 518-525.

Cameroni, E., Hulo, N., Roosen, J., Winderickx, J. und De Virgilio, C. (2004) The novel yeast PAS kinase Rim 15 orchestrates G₀-associated antioxidant defense mechanisms. *Cell Cycle* 3, 462-468.

Cao, F., Lane, S., Raniga, P. P., Lu, Y., Zhou, Z., Ramon, K. J., Chen, J. und Liu, H. (2006) The Flo8 transcription factor is essential for hyphal development and virulence in *Candida albicans*. *Mol Biol Cell* 17, 295–307.

Cardenas, M. E., Cutler, N. S., Lorenz, M. C., Di Como, C. J. und Heitman, J. (1999) The TOR signaling cascade regulates gene expression in response to nutrients. *Genes Dev* 13, 3271-3279.

Care, R. S., Trevethick, J., Binley, K. M. und Sudbery, P. E. (1999) The *MET3* promoter: a new tool for *Candida albicans* molecular genetics. *Mol Microbiol* 34, 792-798.

- Chandra, J., Kuhn, D. M., Mukherjee, P. K., Hoyer, L. L., McCormick, T. und Ghannoum, M. A. (2001)** Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. *J Bacteriol* 183, 5385-5394.
- Cheng, S., Nguyen, M. H., Zhang, Z., Jia, H., Handfield, M. und Clancy, C. J. (2003)** Evaluation of the role of four *Candida albicans* genes in virulence by using gene disruption strains that express *URA3* from the native locus. *Infect Immun* 71, 6101-6103.
- Clifford, S. C., Astuti, D., Hooper, L., Maxwell, P. H., Ratcliffe, P. J. und Maher, E. R. (2001)** The pVHL-associated SCF ubiquitin ligase complex: molecular genetic analysis of elongin B and C, Rbx1 and HIF-1alpha in renal cell carcinoma. *Oncogene* 20, 5067-5074.
- Cutler, J. E. (1991)** Putative virulence factors of *Candida albicans*. *Annu Rev Microbiol* 45, 187-218.
- Dignard, D., El-Naggar, A. L., Logue, M. E., Butler, G. und Whitewayl, M. (2007)** Identification and characterization of *MFA1*, the gene encoding *Candida albicans* a-factor pheromone. *Eukaryot Cell* 6, 487-494.
- DeBose-Boyd, R. A., Brown, M. S., Li, W. P., Nohturfft, A., Goldstein, J. L. und Espenshade, P. J. (1999)** Transport-dependent proteolysis of SREBP: relocation of site-1 protease from Golgi to ER obviates the need for SREBP transport to Golgi. *Cell* 99, 703-712.
- d'Enfert, C. (2006)** Biofilms and their role in the resistance of pathogenic *Candida* to antifungal agents. *Curr Drug Targets* 7, 465-470.
- De Virgilio, C. und Loewith, R. (2006)** The TOR signalling network from yeast to man. *Int J Biochem Cell Biol* 38, 1476-81.
- Dirmeier, R., O'Brien, K. M., Engle, M., Dodd, A., Spears, E. und Poyton, R. O. (2002)** Exposure of yeast cells to anoxia induces transient oxidative stress. *J Biol Chem* 277, 34773-34784.
- Doedt, T., Krishnamurthy, S., Bockmühl, D. P., Tebarth, B., Stempel, C., Russell, C. L., Brown, A. J. und Ernst, J. F. (2004)** APSES proteins regulate morphogenesis and metabolism in *Candida albicans*. *Mol Biol Cell* 15, 3167-3180.
- Donlan, R. M. (2001)** Biofilm formation: a clinically relevant microbiological process. *Clin Infect Dis* 33, 1387-1392.
- Douglas, L. J. (2003)** *Candida biofilms* and their role in infection. *Trends Microbiol* 11, 30-36.
- Dumitru, R., Navarathna, D. H., Semighini, C. P., Elowsky, C. G., Dumitru, R. V., Dignard, D., Whiteway, M., Atkin, A. L. und Nickerson, K. W. (2007)** *In vivo* and *in vitro* anaerobic mating in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* 6, 465-472.
- Kojic, E. M. und Darouiche, R. O. (2004)** *Candida* Infections of Medical Devices. *Clinical Microbiology Reviews* 17, 255-267.
- Ernst, J. F. (2000)** Transcription factors in *Candida albicans* - environmental control of morphogenesis. *Microbiology* 8, 1763-1774.
- Ernst, J. F. und Tielker, D. (2009)** Responses to hypoxia in fungal pathogens. *Cell Microbiol* 11, 183-190.
- Fabrizio, P., Pozza, F., Pletcher, S. D., Gendron, C. M. und Longo, V. D. (2001)** Regulation of longevity and stress resistance by Sch9 in yeast. *Science* 292, 288-290.
- Ferreira, T. C., Hertzberg, L., Gassmann, M. und Campos, E. G. (2007)** The yeast genome may harbor hypoxia response elements (HRE). *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 146, 255-263.

- Fonzi, W. A. und Irwin, M. Y. (1993)** Isogenic strain construction and gene mapping in *Candida albicans*. *Genetics* 134, 717-728.
- García-Sánchez, S., Aubert, S., Iraqui, I., Jambon, G., Ghigo, J. M. und D'Enfert, C. (2004)** *Candida albicans* biofilms: a developmental state associated with specific and stable gene expression patterns. *Eukaryot Cell* 3, 536–545.
- Giusani, A. D., Vinces, M. und Kumamoto, C. A. (2002)** Invasive filamentous growth of *Candida albicans* is promoted by Czf1p-dependent relief of Efg1p-mediated repression. *Genetics* 160, 1749-1753.
- Gossen, M. und Bujard, H. (1992)** Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci USA* 89, 5547-5551.
- Gossen, M., Freundlieb, S., Bender, G., Müller, G., Hillen, W. und Bujard, H. (1995)** Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. *Science* 268, 1766-1769.
- Guzy, R. D., Hoyos, B., Robin, E., Chen, H., Liu, L., Mansfield, K. D., Simon, M. C., Hammerling, U. und Schumacker, P. T. (2005)** Mitochondrial complex III is required for hypoxia-induced ROS production and cellular oxygen sensing. *Cell Metab* 1, 401-408.
- Hameed, S., Prasad, T., Banerjee, D., Chandra, A., Mukhopadhyay, C. K., Goswami, S. K., Lattif, A. A., Chandra, J., Mukherjee, P. K., Ghannoum, M. A. und Prasad, R. (2008)** Iron deprivation induces *EFG1*-mediated hyphal development in *Candida albicans* without affecting biofilm formation. *FEMS Yeast Res* 8, 744–755.
- Hanahan, D. (1983)** Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166, 557-580.
- Hervouet, E., Simonnet, H. und Godinot, C. (2008)** Mitochondria and reactive oxygen species in renal cancer. *Biochimie* 89, 1080-1088.
- Hillen, W. und Berens, C. (1994)** Mechanisms underlying expression of Tn10 encoded tetracycline resistance. *Annu Rev Microbiol* 48, 345-369.
- Hoppe, T., Matuschewski, K., Rape, M., Schlenker, S., Ulrich, H. D. und Jentsch, S. (2000)** Activation of a membrane-bound transcription factor by regulated ubiquitin/proteasome-dependent processing. *Cell* 102, 577-586.
- Horton, J. D., Shah, N. A., Warrington, J. A., Anderson, N. N., Park, S. W., Brown, M. S. und Goldstein, J. L. (2003)** Combined analysis of oligonucleotide microarray data from transgenic and knockout mice identifies direct SREBP target genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 100, 12027-12032.
- Hostetter, M. K. (1994)** Adhesins and ligands involved in the interaction of *Candida ssp.* with epithelial and endothelial surfaces. *Con Microbiol Rev* 7, 29-42.
- Hughes, A. L., Todd, B. L. und Espenshade, P. J. (2005)** SREBP pathway responds to sterols and functions as an oxygen sensor in fission yeast. *Cell* 120, 831-842.
- Hull, C. M. und Johnson, A. D. (1999)** Identification of a mating type-like locus in the asexual pathogenic yeast *Candida albicans*. *Science* 285, 1271-1275.
- Ivan, M., Kondo, K., Yang, H., Kim, W., Valiando, J., Ohh, M., Salic, A., Asara, J. M., Lane, W. S. und Kaelin, W. G. Jr. (2001)** HIF α targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O₂ sensing. *Science* 292, 464-468.

- Jaakkola, P., Mole, D. R., Tian, Y. M., Wilson, M. I., Gielbert, J., Gaskell, S. J., Kriegsheim, A. V., Hebestreit, H. F., Mukherje, M., Schofield, C. J., Maxwell, P. H., Pugh, C. W. und Ratcliffe, P. J. (2001)** Targeting of HIF- α to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation. *Science* 292, 468-472.
- Jiang, B. H., Rue, E., Wang, G. L., Roe, R. und Semenza, G. L. (1996)** Dimerization, DNA binding, and transactivation properties of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem* 271, 17771-17778.
- Jorgensen, P., Nishikawa, J. L., Bretkreutz, B. J. und Tyers, M. (2002)** Systematic identification of pathways that couple cell growth and division in yeast. *Science* 297, 395-400.
- Jorgensen, P., Rupes, I., Sharom, J. R., Schneper, L., Broach, J. R. und Tyers, M. (2004)** A dynamic transcriptional network communicates growth potential to ribosome synthesis and critical cell size. *Genes Dev* 18, 2491-2505.
- Joshi, K. R., Solanki, A. und Prakash, P. (1993)** Morphological identification of *Candida* species on glucose agar, rice extract agar and corn meal agar with and without Tween-80. *Indian J Pathol Microbiol* 36, 48-52.
- Kadosh, D. und Johnson, A. D. (2001)** Rfg1, a protein related to the *Saccharomyces cerevisiae* hypoxic regulator Rox1, controls filamentous growth and virulence in *Candida albicans*. *Mol Cell Biol* 21, 2496-2505.
- Kaeberlein, M., Powers, R. W. 3rd, Steffen, K. K., Westman, E. A., Hu, D., Dang, N., Kerr, E. O., Kirkland, K. T., Fields, S. und Kennedy, B. K. (2005)** Regulation of yeast replicative life span by TOR and Sch9 in response to nutrients. *Science* 310, 1193-1196.
- Kastaniotis, A. J., Mennella, T. A., Konrad, C., Torres, A. M. und Zitomer, R. S. (2000)** Roles of transcription factor Mot3 and chromatin in repression of the hypoxic gene ANB1 in yeast. *Mol Cell Biol* 20, 7088-7098.
- Kastaniotis, A. J. und Zitomer, R. S. (2000)** Rox1 mediated repression. Oxygen dependent repression in yeast. *Adv Exp Med Biol* 475, 185-195.
- Kelly, M. T., MacCallum, D. M., Clancy, S. D., Odds, F. C., Brown, A. J. und Butler, G. (2004)** The *Candida albicans* CaAce2 gene affects morphogenesis, adherence and virulence. *Mol Microbiol* 53, 969-983.
- Kessler, M., Höper, J., Schäfe, D. und Starling, H. (1974)** Sauerstofftransport im Gewebe. In *Mikrozirkulation*. Ahnenfeld FW., Burri C., Dick W. und Halmágyi, M. (eds). Berlin, Heidelberg, New York: Springer Verlag, pp. 36-52.
- Khalaf, R. A. und Zitomer, R. S. (2001)** The DNA binding protein Rfg1 is a repressor of filamentation in *Candida albicans*. *Genetics* 157, 1503-1512.
- Klengel, T., Liang, W. J., Chaloupka, J., Ruoff, C., Schröppel, K., Naglik, J., Eckert, S. E., Mogensen, E. G., Haynes, K., Tuite, M. F., Levin, L. R., Buck, J. und Mühlischlegel, F. (2005)** Fungal Adenylyl Cyclases Integrates CO₂ Sensing with cAMP Signaling and Virulence. *Curr Biol* 15, 2021-2026.
- Kojic, E. M. und Darouiche R. O. (2004)** *Candida* infections of medical devices. *Clin Microbiol Rev* 17, 255-267.
- Kumamoto C. A. und Vines M. D. (2005)** Alternative *Candida albicans* lifestyles: growth on surfaces. *Annu Rev Microbiol* 59, 113-133.
- Kumamoto, C. (2005)** A contact-activated kinase signals *Candida albicans* invasive growth and biofilm development. *Proc Natl Acad Sci USA* 102, 5576-5581.

- Kvaal, C. A., Srikantha, T. und Soll, D. R. (1997)** Misexpression of the white-phase-specific gene *WH11* in the opaque phase of *Candida albicans* affects switching and virulence. *Infect Immun* 65, 4468-4475.
- Kvaal, C., Lachke, S. A., Srikantha, T., Daniels, K., McCoy, J. und Soll, D. R. (1999)** Misexpression of the opaque-phase-specific gene *PEP1 (SAP1)* in the white phase of *Candida albicans* confers increased virulence in a mouse model of cutaneous infection. *Infect Immun* 67, 6652-6662.
- Lachke, S. A., Lockhart, S. R., Daniels, K. J. und Soll, D. R. (2003)** Skin facilitates *Candida albicans* mating. *Infect Immun* 71, 4970-4976.
- Lan, C. Y., Rodarte, G., Murillo, L. A., Jones, T., Davis, R. W., Dungan, J., Newport, G. und Agabian N. (2004)** Regulatory networks affected by iron availability in *Candida albicans*. *Mol Microbiol* 53, 1451-69.
- Lane, S., Birse, C., Zhou, S., Matson, R. und Liu, H. (2001)** DNA array studies demonstrate convergent regulation of virulence factors by Cph1, Cph2, and Efg1 in *Candida albicans*. *J Biol Chem* 276, 48988–48996.
- Lando, D., Peet, D. J., Whelan, D. A., Gorman, J. J. und Whitelaw, M. L. (2002)** Asparagine hydroxylation of the HIF transactivation domain a hypoxic switch. *Science* 295, 858-61.
- Lavoie, H., Sellam, A., Askew, C., Nantel, A. und Whiteway, M. (2008)** A toolbox for epitope-tagging and genome-wide location analysis in *Candida albicans*. *BMC Genomics* 9, 578 doi:10.1186/1471-2164-9-578.
- Lay, J., Henry, L. K., Clifford, J., Koltin, Y., Bulawa, C. E. und Becker, J. M. (1998)** Altered expression of selectable marker *URA3* in gene-disrupted *Candida albicans* strains complicates interpretation of virulence studies. *Infect Imm* 66, 5301-5306.
- Leuker, C. E., Sonneborn, A., Delbrück, S. und Ernst, J. F. (1997)** Sequence and promoter regulation of the *PCK1* gene encoding phosphoenolpyruvate carboxykinase of the fungal pathogen *Candida albicans*. *Gene* 192, 235-240.
- Lewis, R. E., Kontoyiannis, D. P., Darouiche, R.O., Raad, I. I. und Prince, R. A. (2002)** Antifungal activity of amphotericin B, fluconazole, and voriconazole in an *in vitro* model of *Candida* catheter-related bloodstream infection. *Antimicrob Agents Chemother* 46, 3499-34505.
- Lo, H. J., Kohler, J. R., DiDomenico, B., Loebenberg, D., Cacciapuoti, A. und Fink, G. R. (1997)** Nonfilamentous *C. albicans* mutants are avirulent. *Cell* 90, 939-949.
- Losberger, C. und Ernst, J.F. (1989)** Sequence and transcript analysis of the *C. albicans URA3* gene encoding orotidine-5'-phosphate decarboxylase. *Curr Genet* 16, 153-158.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M. und Brock, T. D. (2006)** Brock Mikrobiologie, Spektrum Verlag, S 531 und 1033-34.
- McCullough, M. J., Ross, B. C. und Reade, P. C. (1996)** *Candida albicans*: a review of its history, taxonomy, epidemiology, virulence attributes and methods of strain differentiation. *Int J Oral Maxillofac Surg* 25, 136-144.
- Michiels, C. (2004)** Physiological and pathological responses to hypoxia. *Am J Pathol* 164, 1875-1882.
- Miller, M. G. and Johnson, A. D. (2002)** White-opaque switching in *Candida albicans* is controlled by mating-type locus homeodomain proteins and allows efficient mating. *Cell* 110, 293-302.

- Mukherjee, P. K., Mohamed, S., Chandra, J., Kuhn, D., Liu, S., Antar, O. S., Munyon, R., Mitchell A. P., Andes, D., Chance, M. R., Rouabhia, M. und Ghannoum, M. A. (2006)** Alcohol dehydrogenase restricts the ability of the pathogen *Candida albicans* to form a biofilm on catheter surfaces through an ethanol-based mechanism. *Infect Immun* 74, 3804-3816.
- Müller, H., Ziegler, B. und Schweizer, B. (1993)** UV/VIS-Spektroskopie in der Nucleinsäureanalytik. *BioTec* 4, 25-29.
- Mullis, K. B. und Faloona, F. A. (1987)** Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 155, 335-350.
- Nailis, H., Vandenbroucke, R., Tilleman, K., Deforce, D., Nelis, H. und Coenye, T. (2009)** Monitoring *ALS1* and *ALS3* gene expression during *in vitro* *Candida albicans* biofilm formation under continuous flow conditions. *Mycopathologia* 167, 9-17.
- Nantel, A., Dignard, D., Bachewich, C., Harcus, D., Marcil, A., Bouin, A.P., Sensen, C. W., Hogues, H., van het Hoog, M., Gordon, P., Rigby, T., Benoit, F., Tessier, D. C., Thomas, D. Y. und Whiteway, M. (2002)** Transcription profiling of *Candida albicans* cells undergoing the yeast-to-hyphal transition. *Mol Biol Cell* 13, 3452-3465.
- Navarro-Garcia, F., Sanchez, M., Pla, J. und Nombela, C. (1995)** Functional characterization of the *MKC1* gene of *Candida albicans*, which encodes a mitogen-activated protein kinase homolog related to cell integrity. *Mol Cell Biol* 15, 2197-2206.
- Nobile, C. J. und Mitchell, A. P. (2005)** Regulation of cell-surface genes and biofilm formation by the *C. albicans* transcription factor Bcr1p. *Curr Biol* 15, 1150-1155.
- Nobile, C. J., Andes, D. R., Nett, J. E., Smith, F. J., Yue Jr., F., Phan, Q. T., Edwards, J. E., Filler, S. G. und Mitchell, A. P. (2006)** Critical role of Bcr1-dependent adhesins in *C. albicans* biofilm formation *in vitro* and *in vivo*. *PLoS Pathog* 2, e63.
- Nobile, C. J. und Mitchell, A. P. (2006)** Genetics and genomics of *Candida albicans* biofilm formation. *Cell Microbiol* 8, 1382-1391.
- Nobile, C. J., Bruno, V. M., Richard, M. L., Davis, D. A. und Mitchell, A. P. (2003)** Genetic control of chlamyospore formation in *Candida albicans*. *Microbiology* 149, 3629-3637.
- Odds, F. C. (1988)** *Candida* and candidosis. 2nd ed., London: Bailliere Tindall.
- Odds, F. C., Webster, C. E., Mayuranathan, P. und Simmons, P. D. (1988)** *Candida* concentrations in the vagina and their association with signs and symptoms of vaginal candidosis. *J Med Vet Mycol* 26, 277-283.
- Odds, F. C. (1994)** Pathogenesis of *Candida* infections. *J Am Acad Dermatol* 31, 2-5.
- Park, Y. N. und Morschhäuser, J. (2005)** Tetracycline-inducible gene expression and gene deletion in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* 4, 1328-1342.
- Park, H., Myers, C. L., Sheppard, D. C., Phan, Q. T., Sanchez, A. A., J, Edwards, J. E. und Filler, S. G. (2005)** Role of the fungal Ras-protein kinase A pathway in governing epithelial cell interactions during oropharyngeal candidiasis. *Cell Microbiol* 7, 499-510.
- Pascual-Ahuir, A. und Proft, M. (2007)** Control of stress-regulated gene expression and longevity by the Sch9 protein kinase. *Cell Cycle* 6, 2445-2447.
- Passoth, V., Cohn, M., Schäfer, B., Hahn-Hägerdal, B. und Klinner, U. (2003)** Analysis of the hypoxia-induced *ADH2* promoter of the respiratory yeast *Pichia stipitis* reveals a new mechanism for sensing of oxygen limitation in yeast. *Yeast* 20, 39-51.

de Pauw, B. E. und Meunier, F. (1999) The challenge of invasive fungal infection. *Chemotherapy Suppl* 1, 1-14.

Pedruzzi, I., Dubouloz, F., Cameroni, E., Wanke, V., Roosen, J., Winderickx, J. und De Virgilio, C. (2003) TOR and PKA signaling pathways converge on the protein kinase Rim15 to control entry into G₀. *Mol Cell* 12, 1607-1613.

Pedruzzi, I., Burckert, N., Egger, P. und De Virgilio, C. (2000) *Saccharomyces cerevisiae* Ras/cAMP pathway controls post-diauxic shift element-dependent transcription through the zinc finger protein Gis1. *Embo J* 19, 2569-2579.

Peltroche-Llacsahuanga, H., Goyard, S., D'Enfert, C., Prill, S. K. und Ernst J. F. (2006) Protein O-mannosyltransferase isoforms regulate biofilm formation in *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother* 50, 3488–3492.

Pérez, A., Pedro´s, B., Murgui, A., Casanova, M., Lo´pez-Ribot, J. L. und Martínez, J. P. (2006) Biofilm formation by *Candida albicans* mutants for genes coding fungal proteins exhibiting the eight-cysteine-containing CFEM domain. *FEMS Yeast Res* 6, 1074–1084.

Potera, C. (1999) Forging a link between biofilms and disease. *Science* 283, 1837-1839.

Powers, T. und Walter, P. (1999) Regulation of ribosome biogenesis by the rapamycin-sensitive TOR-signaling pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* 10, 987-1000.

Powers, R. W. 3rd., Kaeberlein, M., Caldwell, S. D., Kennedy, B. K. und Fields, S. (2006) Extension of chronological life span in yeast by decreased TOR pathway signaling. *Genes Dev* 20, 174-184.

Prill, S. K.-H. (2004) Untersuchungen zur Funktion der fünf Isoformen der Protein-O-mannosyltransferase des humanpathogenen Pilzes *Candida albicans*. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

Ramage, G., VandeWalle, K., López-Ribot, J. L. und Wickes, B. L. (2002) The filamentation pathway controlled by the Efg1 regulator protein is required for normal biofilm formation and development in *Candida albicans*. *FEMS Microbiol Lett* 214, 95-100.

Ramage, G., VandeWalle, K., Wickes, B. L. und Lo´pez-Ribot, J. (2001) Standardized method for *in vitro* antifungal susceptibility testing of *Candida albicans* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* 45, 2475–2479.

Ramage, G., Saville, S. P., Thomas, D. P. und Lo´pez-Ribot, J. L. (2005) *Candida* biofilms: an update. *Eukaryot Cell* 4, 633–638.

Rape, M., Hoppe, T., Gorr, I., Kalocay, M., Richly, H. und Jentsch, S. (2001) Mobilization of processed, membrane-tethered SPT23 transcription factor by CDC48 (UFD1/NPL4), a ubiquitin-selective chaperone. *Cell* 107, 667-677.

Reinders, A., Burckert, N., Boller, T., Wiemken, A. und De Virgilio, C. (1998) *Saccharomyces cerevisiae* cAMP-dependent protein kinase controls entry into stationary phase through the Rim15p protein kinase. *Genes Dev* 12, 2943-2955.

Rolfs, A., Kvietikova, I., Gassmann, M. und Wenger, R. H. (1997) Oxygen-regulated transferrin expression is mediated by hypoxia-inducible factor-1. *J Biol Chem* 272, 20055-20062.

Rossignol, T., Ding, C., Guida, A., d'Enfert, C., Higgins, D. G. und Butler, G. (2009) Correlation between biofilm formation and the hypoxic response in *Candida parapsilosis*. *Eukaryot Cell* 8, 550–559.

Literatur

Rottmann, M. (2002) Untersuchungen zur Identifizierung von Komponenten morphogenetischer Signaltransduktionswege in dem humanpathogenen Pilz *Candida albicans*, Frauenhofer IRB Verlag.

Sambrook, J., Fritsch, E. F. und Maniatis, T. (1989) Molecular cloning: A laboratory manual. 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press NY.

Schmelzle, T., Beck, T., Martin, D. E. und Hall, M. N. (2004) Activation of the RAS/cyclic AMP pathway suppresses a TOR deficiency in yeast. *Mol Cell Biol* 24, 338-351.

Schroedl, C., McClintock, D. S., Budinger, G. R. und Chandel, N. S. (2002) Hypoxic but not anoxic stabilization of HIF-1alpha requires mitochondrial reactive oxygen species. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 283, 922-931.

Schumacker, P. T. (2002) Hypoxia, anoxia, and O₂ sensing: the search continues. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 283, 918-921.

Schweizer, A., Rupp, S., Taylor, B. N., Röllinghoff, M. und Schröppel, K. (2000) The TEA/ATTS transcription factor CaTec1p regulates hyphal development and virulence in *Candida albicans*. *Mol Microbiol* 38, 435-445.

Sellam, A., Al-Niemi, T., McInnerney, K., Brumfield, S., Nantel, A. und Suci, P. A. (2009) A *Candida albicans* early stage biofilm detachment event in rich medium. *BMC Microbiol* 9, 25 doi: 10.1186/1471-2180-9-25.

Semenza, G. L. und Wang, G. L. (1992) A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol* 12, 5447-5454.

Semenza, G. L., Roth, P. H., Fang, H. M. und Wang, G. L. (1994) Transcriptional regulation of genes encoding glycolytic enzymes by hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem* 269, 23757-23763.

Semenza, G. L., Jiang, B. H., Leung, S. W., Passantino, R., Concordet, J. P., Maire, P. und Giallongo, A. (1996) Hypoxia response elements in the aldolase A, enolase 1, and lactate dehydrogenase A gene promoters contain essential binding sites for hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem* 271, 32529-32537.

Semenza, G. L. (1998) Hypoxia-inducible factor 1: master regulator of O₂ homeostasis. *Curr Opin Genet Dev* 8, 588-594.

Semenza, G. L. (2007) Evaluation of HIF-1 inhibitors as anticancer agents. *Drug Discov Today* 12, 853-859.

Setiadi, E. R. (2006), Regulation der Morphogenese und der Genexpression von *Candida albicans* unter hypoxischen Bedingungen. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

Setiadi, E. R., Doedt, T., Cottier, F., Noffz, C. und Ernst, J. F. (2006) Transcriptional response of *Candida albicans* to hypoxia: linkage of oxygen sensing and Efg1p-regulatory networks. *J Mol Biol* 361, 399-411.

Slutsky, B., Staebell, M., Anderson, J., Risen, L., Pfaller, M. und Soll, D. R. (1987) "White-opaque Transition": a second high-frequency switching system in *Candida albicans*. *J Bacteriol* 169, 189-197.

Smets, B., De Snijder, P., Engelen, K., Joossens, E., Ghillebert, R., Thevissen, K., Marchal, K. und Winderickx, J. (2008) Genome-wide expression analysis reveals TORC1-dependent and -independent functions of Sch9. *FEMS Yeast Res* 8, 1276-1288.

Sobel, J. D. (1997) Vaginitis. *N Engl J Med* 337, 1896-1903.

- Sobko, A. (2006)** Systems biology of AGC kinases in fungi. *Sci STKE* 352:re9 DOI: 10.1126/stke.3522006re9.
- Sonneborn, A., Tebarth, B. und Ernst, J. F. (1999)** Control of white-opaque phenotypic switching in *Candida albicans* by the Efg1p morphogenetic regulator. *Infect Immun* 67, 4655-4660.
- Sonneborn, A., Bockmühl, D. P. und Ernst, J. F. (1999)** Chlamydospore formation in *Candida albicans* requires the Efg1p morphogenetic regulator. *Infect Immun* 67, 5514-5517.
- Sonneborn, A., Bockmühl, D. P., Gerads, M., Kurpanek, K., Sanglard, D. und Ernst, J. F. (2000)** Protein kinase A encoded by *TPK2* regulates dimorphism of *Candida albicans*. *Mol Microbiol* 35, 386-396.
- Sosinska, G. J., de Groot, P. W., Teixeira de Mattos, M. J., Dekker, H. L., de Koster, C. G., Hellingwerf, K. J. und Klis, F. M. (2008)** Hypoxic conditions and iron restriction affect the cell-wall proteome of *Candida albicans* grown under vagina-simulative conditions. *Microbiology* 154, 510-520.
- Srikantha, T., Tsai, L. K., Daniels, K. und Soll, D. R. (2000)** *EFG1* null mutants of *Candida albicans* switch but cannot express the complete phenotype of white-phase budding cells. *J Bacteriol* 182, 1580-1591.
- Stoldt, V. R., Sonneborn, A., Leuker, C. E. und Ernst, J. F. (1997)** Efg1p, an essential regulator of morphogenesis of the human pathogen *Candida albicans*, is a member of a conserved class of bHLH proteins regulating morphogenetic processes in fungi. *EMBO J* 16, 1982-1991.
- Tacchini, L., Bianchi, L., Bernelli-Zazzera, A. und Cairo, G. (1999)** Transferrin receptor induction by hypoxia. HIF-1-mediated transcriptional activation and cell-specific post-transcriptional regulation. *J Biol Chem* 274, 24142-24146.
- Tebarth, B., Doedt, T., Krishnamurthy, S., Weide, M., Monterola, F., Dominguez, A. und Ernst, J. F. (2003)** Adaptation of the Efg1p morphogenetic pathway in *Candida albicans* by negative autoregulation and PKA-dependent repression of the *EFG1* gene. *J Mol Biol* 329, 949-962.
- ter Linde, J. J., Liang, H., Davis, R. W., Steensma, H. Y., van Dijken, J. P. und Pronk, J. T. (1999)** Genome-wide transcriptional analysis of aerobic and anaerobic chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* 181, 7409-7413.
- Timpel, C., Strahl-Bolsinger, S., Ziegelbauer, K. und Ernst, J. F. (1998)** Multiple functions of Pmt1p-mediated protein O-mannosylation in the fungal pathogen *Candida albicans*. *J Biol Chem* 273, 20837-20846.
- Theopold, U. (2009)** A bad boy becomes good. *Nature* 461, 486-487.
- Todd, B. L., Stewart, E. V., Burg, J. S., Hughes, A. L. und Espenshade, P. J. (2006)** Sterol regulatory element binding protein is a principal regulator of anaerobic gene expression in fission yeast. *Mol Cell Biol* 26, 2817-2831.
- Urban, J., Soulard, A., Huber, A., Lippman, S., Mukhopadhyay, D., Deloche, O., Wanke, V., Anrather, D., Ammerer, G., Riezman, H., Broach, J. R., De Virgilio, C., Hall, M. N. und Loewith, R. (2007)** Sch9 is a major target of TORC1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell* 26, 663-674.
- Vasconcelles, M. J., Jiang, Y., McDaid, K., Gilooly, L., Wretzel, S., Porter, D. L., Martin, C. E. und Goldberg, M. A. (2001)** Identification and characterization of a low oxygen response element involved in the hypoxic induction of a family of *Saccharomyces cerevisiae* genes. Implications for the conservation of oxygen sensing in eukaryotes. *J Biol Chem* 276, 14374-14384.
- Vaupel, P. und Mayer, A. (2007)** Hypoxia in cancer: significance and impact on clinical outcome. *Cancer Metastasis Rev* 26, 225-239.

- Vázquez-Torres, A. und Balish, E. (1997)** Macrophages in resistance to candidiasis. *Microbiol Mol Biol Rev* 61, 170-192.
- Vik, A. und Rine, J. (2001)** Upc2p and Ecm22p, dual regulators of sterol biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 21, 6395-63405.
- Wanke, V., Pedruzzi, I., Cameroni, E., Dubouloz, F. und De Virgilio, C. (2005)** Regulation of G₀ entry by the Pho80-Pho85 cyclin-CDK complex. *EMBO J* 24, 4271-42718.
- Wanke, V., Cameroni, E., Uotila, A., Piccolis, M., Urban, J., Loewith, R. und De Virgilio, C. (2008)** Caffeine extends yeast lifespan by targeting TORC1. *Mol Microbiol* 69, 277-285.
- Wei, M., Fabrizio, P., Hu, J., Ge, H., Cheng, C., Li, L. und Longo, V. D. (2008)** Life span extension by calorie restriction depends on Rim15 and transcription factors downstream of Ras/PKA, Tor, and Sch9. *PLoS Genet* 4, e13 doi:10.1371/journal.pgen.0040013.
- Wey, S. B., Mori, M., Pfaller, M. A., Woolson, R. F. und Wenzel, R. P. (1988)** Hospital-acquired candidemia. The attributable mortality and excess length of stay. *Arch Intern Med* 148, 2642-2645.
- Wilcox, L. J., Balderes, D. A., Wharton, B., Tinkelenberg, A. H., Rao, G. und Sturley, S. L. (2002)** Transcriptional profiling identifies two members of the ATP-binding cassette transporter superfamily required for sterol uptake in yeast. *J Biol Chem* 277, 32466-32472.
- Wilson, R. B., Davis, D., Enloe, B. M. und Mitchell, A. P. (2000)** A recyclable *Candida albicans* URA3 cassette for PCR product-directed gene disruptions. *Yeast* 16, 65-70.
- Yeater, K. M., Chandra, J., Cheng, G., Mukherjee, P. K., Zhao, X., Rodriguez-Zas, S. L., Kwast, K. E., Ghannoum, M. A. und Hoyer, L. L. (2007)** Temporal analysis of *Candida albicans* gene expression during biofilm development. *Microbiology* 153, 2373-2385.
- Yorimitsu, T., Zaman, S., Broach, J. R. und Klionsky, D. J. (2007)** Protein kinase A and Sch9 cooperatively regulate induction of autophagy in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* 18, 4180-4189.
- Zhang, L. und Guarente, L. (1995)** Heme binds to a short sequence that serves a regulatory function in diverse proteins. *EMBO J* 14, 313-320.
- Zhang, L. und Hach (1999)** A Molecular mechanism of heme signaling in yeast: the transcriptional activator Hap1 serves as the key mediator. *Cell Mol Life Sci* 56, 415-426.
- Zhao, X., Daniels, K. J., Oh, S.-H., Green, C. B., Yeater, K., Soll, D. R. und Hoyer, L. L. (2006)** *Candida albicans* Als3p is required for wild-type biofilm formation on silicone elastomer surfaces. *Microbiology* 152, 2287-2299.
- Zitomer, R. S. und Lowry, C. V. (1992)** Regulation of gene expression by oxygen in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Rev* 56, 1-11.
- Zitomer, R. S., Carrico, P. und Deckert, J. (1997)** Regulation of hypoxic gene expression in yeast. *Kidney Int* 51, 507-513.
- Zurita-Martinez, S. A. und Cardenas M. E. (2005)** Tor and cyclic AMP-protein kinase A: two parallel pathways regulating expression of genes required for cell growth. *Eukaryot Cell* 4, 63-71.

7. Abkürzungen

°C	Grad Celsius
μ	mikro
Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
b (bp)	Basen (Basenpaare)
bHLH	basic Helix-Loop-Helix
bidest.	bidestilliert
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
cDNA	komplementäre DNA
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxinukleotid
DTT	1,4-Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Fa.	Firma
g	Gramm
h	Stunde
HRE	hypoxia response element
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
LB	Nährmedium nach Luria-Bertani
log	logarithmisch
M	Molar
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MOPS	4-Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	messenger RNA
nm	Nanometer
ODX	optische Dichte bei $\lambda = x$ nm
ORF	offener Leserahmen
PBS	Phosphate buffered saline
PCK1p	PCK1-Promotor
PCR	'polymerase chain reaction'
PEG	Polyethylenglycol

Abkürzungen

pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen- konzentration
PKA	Proteinkinase A
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
mRNA	messenger RNA
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	reverse transcriptase polymerase chain reaction
SAT1	Gen für Streptothricin-Acetyl-Transferase
s	Sekunde
<i>S.c.</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
ss	Einzelstrang
SSC	standard saline citrate
Tab.	Tabelle
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylen-diamin
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol
u	units
u.a.	unter anderem
ÜN	über Nacht
Upm	Umdrehungen pro Minute
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactopyranosid
vgl.	vergleiche
YNB	Yeast nitrogen base
wt	Wildtyp
z. B.	zum Beispiel

Danksagung

Ich danke **Herrn Prof. Dr. J. F. Ernst** für das interessante Doktorthema, für Rat und Tat und für eine sehr schnelle Korrektur.

Ich danke **Herrn Freudl** herzlich für die Übernahme des Koreferats.

Vielen Dank an **Denis**, an **meine Eltern**, an **meine Schwester** und an **Anselm**, die sich als Korrekturleser durch meine Arbeit gequält haben.

Vielen Dank auch an meine Laborkollegin **Inga Schmidt** für viel Spass und ihren beruhigenden Einfluss (und eine Katze) und an **Christine Noffz**, mit der ich viel lache und die meinen ersten Primer gebastelt hat.

Ebenso vielen Dank an das ganze **AG Ernst-Team**. In einem guten Team macht sogar ´ne Midi Spaß.

Dann danke ich sehr herzlich **meinen Eltern Jürgen und Edith**, **meiner Schwester Christine**, **meinem Schwager Ralf** und den **Schreckern Mark und Luuk** für ihre Unterstützung und offenen Ohren bei Freud und Leid.

Hallo **Bridlin, Anne-Kathrin, Annette und Steffi!** Ich habe wieder Zeit !!!!!

Und ein großen Dank an **Anselm Vogt**, der sämtliche Aufs und Abs miterlebt hat.

DANKE

Erklärung

Die hier vorgelegte Dissertation habe ich eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt. Die Dissertation wurde in der vorgelegten – oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Catrin Stichternoth und Joachim F. Ernst (2009)
Hypoxic Adaptation by Efg1 Regulates Biofilm Formation by *Candida albicans*.
Appl Environ Microbiol 75, 3663–3672

Sch9 kinase mediates CO₂- and hypoxia-dependent repression of hyphal morphogenesis in *Candida albicans* (in Vorbereitung)

Präsentationen:

Stichternoth, C., Bussmann, M., Szafranski, E., Kurtz, D., Hilbig, J., Doedt, T. and Ernst, J. F. (2008) Target specificity of the *Candida albicans* Efg1 regulator. 91th *Candida and Candidiasis* ASM conference, Jersey City, NH, 24.3.-28.3.08 (Poster)

Stichternoth, C. and Ernst, J. F. (2009) Hypoxic adaptation by Efg1 regulates biofilm formation of *Candida albicans*. 3rd FEBS Advanced Lecture Course "Human Fungal Pathogens", La Colle sur Loup, France, 2.-8.5.09 (Poster)

Stichternoth, C. and Ernst, J. F. (2009) Regulation der *Candida albicans* Biofilmbildung durch Hypoxie und Kohlendioxid. 43. Wissenschaftl. Tagung der DMYK, Köln, 3.-5.9.09 (C. Stichternoth invited speaker)

Düsseldorf, 29.10.2009

Catrin Stichternoth