

**Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene
der Universität Tübingen**

Ärztlicher Direktor: Professor Dr. I.B. Autenrieth

**Kausale Zusammenhänge der Expression des
Transkriptionsfaktorgens *TEC1*, des Regulatorgens *BCR1* und
des Agglutininsgens *ALS3* in *Candida albicans***

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

**vorgelegt von
Claudia Ley
aus
Lahr**

2012

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Privatdozentin Dr. U. Schumacher

2. Berichterstatter: Professor Dr. M. Schaller

Herrn Dr. phil. Fabian Wilmers,

*dessen Geduld und Humor maßgeblich zur Vollendung dieses Werks
beigetragen haben*

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1.	<i>Candida albicans</i>	1
1.2.	Genetische Regulation von Morphologie und Virulenz	2
1.2.1.	Hyphenspezifische Gene	2
1.2.2.	cAMP- und MAPK-abhängige Genregulation	3
1.2.3.	<i>TEC1</i>	6
1.2.4.	<i>BCR1</i>	8
1.2.5.	<i>ALS3</i>	8
1.3.	Experimentelle Untersuchung der genetischen Regulation: Funktion und Anwendung der quantitativen realtime-PCR	9
1.4.	Fragestellung	12
2.	Material und Methoden	13
2.1.	Material	13
2.1.1.	Kommerziell erhältliche Systeme	13
2.1.2.	Enzyme und Puffer	13
2.1.3.	DNA-Elektrophoresestandards	14
2.1.4.	Oligonukleotide	14
2.1.4.1.	Primer für Reverse Transkription und PCR	14
2.1.4.2.	Primer für qRT-PCR	14
2.1.4.3.	Sonden für qRT-PCR	15
2.1.5.	Medien	15
2.1.6.	Hefestämme	16
2.2.	Methoden	18
2.2.1.	Hyphenkinetik	18
2.2.2.	Induktion von Hyphenbildung	18
2.2.3.	Präparate für die Mikroskopie	18
2.2.4.	RNA-Extraktion	19

2.2.5.	Isolierung genomischer DNA	19
2.2.6.	RNA-Konzentrationsbestimmung	20
2.2.7.	Elektrophorese von Nukleinsäuren	21
2.2.8.	DNase-Verdau der RNA-Proben	21
2.2.9.	Reverse Transkription der RNA in cDNA	21
2.2.10.	PCR	22
2.2.11.	quantitative realtime-PCR	22
3.	Ergebnisse	24
3.1.	Aufbau der Messmethodik	24
3.1.1.	Erstellen der Standardkurven	24
3.1.2.	Festlegen geeigneter interner Kalibratoren	26
3.1.3.	Reproduzierbarkeit von Konzentrationsmessungen	32
3.1.3.1.	Prozessbedingte Messunterschiede	32
3.1.3.2.	Gerätebedingte Messunterschiede	33
3.1.4.	Reproduzierbarkeit, Validität und Reliabilität	33
3.1.5.	Evaluieren von Methoden zur RNA-Extraktion und -prozessierung zur cDNA	36
3.1.5.1.	Effizienz des DNase-Verdau	36
3.1.5.2.	Effizienz der Reversen Transkription	38
3.1.5.3.	Beurteilung der RNA-Qualität nach zwei unterschiedlichen RNA-Extraktionsverfahren	40
3.1.6.	Effekt der Vorbehandlung der Vorkulturzellen auf die Genexpression	41
3.2.	Anwendung der neuen Messmethodik: Genexpressionsanalysen von <i>TEC1</i> , <i>BCR1</i> und <i>ALS3</i>	44
3.2.1.	Genexpressionsanalyse unter Temperatur- und Seruminduktion	44
3.2.2.	Genexpressionsanalyse unter pH-Induktion	55
3.2.3.	Genexpressionsanalyse in Übernachtkulturen	63

3.2.4.	Expressionsdynamik in CaAS20	64
4.	Diskussion	68
4.1.	Aufbau der Messmethodik	68
4.1.1.	Normalisierung der Expressionsmesswerte	68
4.1.2.	Reproduzierbarkeit, Validität und Reliabilität	69
4.1.3.	Evaluieren von Methoden zur RNA-Extraktion und -prozessierung zur cDNA	70
4.1.4.	Vorbehandlung der Vorkulturzellen	71
4.2.	Anwendung der neuen Messmethodik	71
4.2.1.	<i>TEC1</i> -abhängige Genregulation von <i>BCR1</i> und <i>ALS3</i>	71
4.2.2.	Regulation der <i>ALS3</i> -Expression	75
5.	Zusammenfassung	79
6.	Literaturquellen	81
7.	Abkürzungsverzeichnis	85
8.	Danksagungen	86
9.	Lebenslauf	87

1. Einleitung

1.1. *Candida albicans*

Bei dem humanpathogenen Hefepilz *Candida albicans* handelt es sich um einen diploiden Fungus imperfectus mit asexueller Fortpflanzung. Beide Eigenschaften unterscheiden ihn grundlegend von *Saccharomyces cerevisiae*, der gemeinen Bierhefe, zu der ansonsten eine enge genetische Verwandtschaft besteht (Ernst, 2000). Für den Menschen erreicht er insofern eine Bedeutung, dass er einerseits als typischer Kommensale der Schleimhäute des Gastrointestinal- und Urogenitaltrakts vorkommt, andererseits bei entsprechender Immunabwehrschwäche als opportunistischer Krankheitserreger eine wichtige Rolle spielt (Pfaller et al, 1998). Die Erkrankung kann sich von einer oberflächlichen Hautinfektion bis hin zur lebensbedrohlichen Sepsis manifestieren (Hahn, Kaufmann, 2004).

Seine fakultative Pathogenität für den Menschen erreicht er durch die hohe Anpassungsfähigkeit seiner morphologischen Wachstumsform und metabolischen Aktivitäten an die jeweiligen Umgebungsbedingungen. So kann *C. albicans* alternativ Hefe- oder Hyphenform annehmen (Abb. 1.11). Hefezellen zeichnen sich durch ellipsenförmige Zellen mit polaren Zellknospen aus, Hyphen hingegen entstehen durch nicht polarisierte Ausstülpungen der Zelloberfläche, die schlauchförmig wachsen und Septierungen und Aufzweigungen aufweisen (Ernst, 2000). Eine weitere Sonderform stellen die so genannten Pseudohyphen dar, hierbei handelt es sich um ellipsenförmig verlängerte Zellen, deren Durchmesser größer als bei echten Hyphen ist und die im Gegensatz zu den Septierungen typischerweise Einschnürungen im Bereich der Zellgrenzen zeigen (Ernst, 2000). Die Fähigkeit, zwischen den Morphologien Hefe und Hyphe zu wechseln, wird als Dimorphismus bezeichnet. Dennoch zählt *C. albicans* nicht zu den dimorphen, sondern zu den Sprosspilzen (Hahn, Kaufmann, 2004), da ein Morphologiewechsel zu jedem Zeitpunkt des Wachstums noch möglich ist und die äußere Form bei Besiedlung eines neuen Lebensraumes nicht irreversibel festgelegt wird.

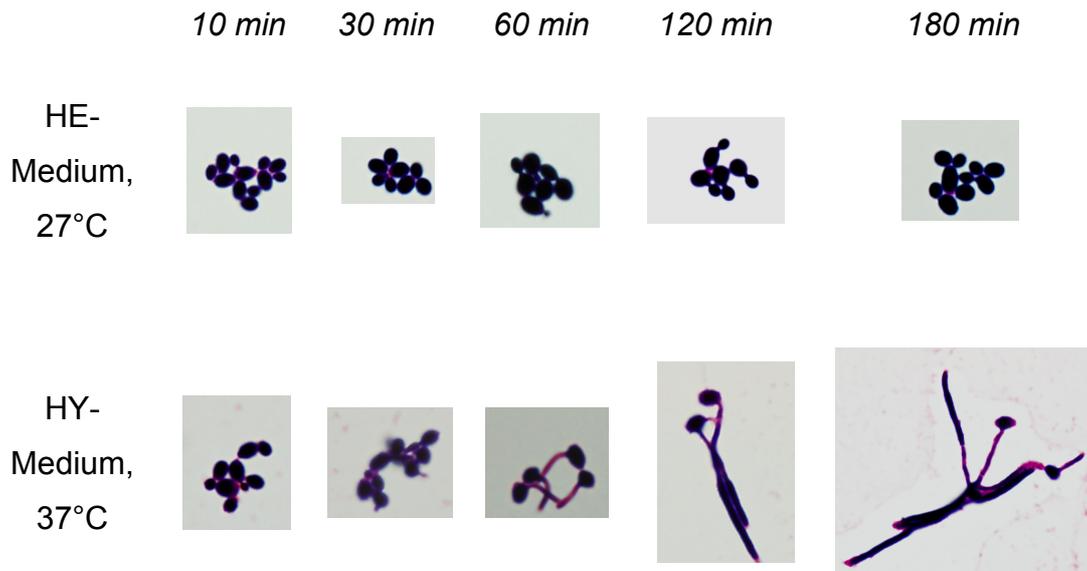


Abb. 1.11: Morphologie von *C. albicans* unter Hefe- und Hyphenbedingungen; Der wildtypäquivalente Stamm CaAS20 wurde parallel in HE-Medium, 27 °C und in HY-Medium, 37 °C für 10, 30, 60, 120 und 180 min inkubiert und die Zellen nach Gramfärbung bei 100x Vergrößerung photographisch dokumentiert.

Eine Induktion der Hyphenform kann insbesondere durch Anzucht in niedriger Zelldichte und Flüssigkultur bei 37°C unter Zugabe von Serum, GlcNAc oder Prolin bewirkt werden (Ernst, 2000). Dabei kommt es nicht nur zu einer Änderung der Morphologie, sondern auch zu Änderungen von Metabolismus und Oberflächenstrukturen (Lan et al, 2002; Tsong et al, 2003). Durch Umstellung der genetischen Regulation, auf welche im folgenden Abschnitt näher eingegangen wird, kommt es parallel dazu zur Expression von potentiellen Virulenzfaktoren, wie beispielsweise bestimmter Adhäsine, Invasine oder spezifischer Proteasen.

1.2. Genetische Regulation von Morphologie und Virulenz

1.2.1 Hyphenspezifische Gene

Der Übergang von der Hefe- in die Hyphenform von *C. albicans* geht mit der Hochregulation spezifischer Gene einher, die auf Grund dieser Tatsache auch

hyphenspezifische Gene (= HSG) genannt werden. Einer Suche auf candidagenome.org zufolge tragen momentan 156 Gene diese Bezeichnung. Zu den Genprodukten zählen in erster Linie Oberflächenproteine wie Hwp1p, Als1p und Als3p, aber auch zellzykluskontrollierende Kinasen wie Hgc1p, sekretorische Proteasen wie Sap2p und Sap6p, oder Transkriptionsfaktoren wie Tec1p und Bcr1p. Die Induktion dieser Gene wird über ein komplexes Zusammenspiel verschiedener Signalketten gesteuert (Abb. 1.2.21). Zu den beiden wichtigsten, die bisher identifiziert werden konnten, zählen die cAMP-abhängige Proteinkinase A- und die mitogenaktivierte Proteinkinase-(MAPK)-Signalkaskade (Ernst, 2000).

1.2.2 cAMP- und MAPK-abhängige Genregulation

Die Induktion der MAPK erfolgt über das G-Protein Ras1p und bewirkt den Ablauf einer Signalkaskade, die über die verschiedenen Kinasen Cst20p, Hst7p und Cek1p verläuft und terminal die Expression des Transkriptionsfaktors Cph1p reguliert (Liu, 2001; Monge et al, 2006). Unter spezifischen Wachstumsbedingungen wie Stickstoffmangel oder hoher GlcNAc-Konzentration kann bei Blockade dieses Signalweges kein Hyphenwachstum mehr beobachtet werden (Biswas et al, 2007). Damit scheint der MAPK-Signaltransduktionsweg eher für die Übermittlung nährstoffbedingter hypheninduzierender Signale zuständig zu sein. Neben diesen speziellen nutritiven Signalen erfolgt eine Induktion der MAPK-Kaskade auch bei anderweitig bedingtem Hyphenwachstum im Sinne eines sekundären Verstärkermechanismus (Monge et al, 2006).

Eine weitaus größere Relevanz für das Hyphenwachstum von *C. albicans* hat dagegen der cAMP-abhängige Signaltransduktionsweg. Seine Blockade hat fast immer den vollständigen Verlust des Hyphenwachstums zur Folge. Parallel dazu ist auch eine verminderte Virulenz dieser Stämme im systemischen Tierinfektionsmodell zu beobachten (Feng et al, 1999; Stoldt et al, 1997). Als

Auslöser dieser Signalkaskade wird ebenfalls das Ras1p angesehen, über welches die Aktivierung der Adenylatzyklase Cdc35p erfolgt. Diese sorgt für einen Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration, wodurch wiederum die Proteinkinase A aktiviert wird. Gegenspieler der Proteinkinase A ist die Phosphodiesterase 2 (=PDE2), welche zu einem Abbau von cAMP führt. (Biswas et al, 2007). Über den cAMP-Anstieg wird eine Expressionssteigerung des Transkriptionsfaktors Efg1p vermittelt, welcher eine zentrale Rolle bei zahlreichen Regulationsmechanismen in *C. albicans* einnimmt und unter anderem auch zu einer vermehrten Hyphenbildung führt (Stoldt et al, 1997). Die Expressionsdynamik von *EFG1* kennzeichnet das Protein als einen sogenannten späten Transkriptionsfaktor, dessen Expression in der frühen Wachstumsphase von ca. 60 min eher gehemmt und erst anschließend nach ca. 120 min gesteigert wird (Bassilana et al, 2005). Zu den Zielgenen von Efg1p gehören einerseits die hyphenspezifischen Gene, aber auch solche, welche den Metabolismus von *C. albicans* nachhaltig beeinflussen. So bewirkt der Transkriptionsfaktor unter anderem eine Aktivierung glykolytischer Prozesse, sowie eine Repression des oxidativen Stoffwechsels (Doedt et al, 2004). Entsprechend betreibt die Hyphenform des Pilzes im Gegensatz zur Hefeform mehr anaerobe Fermentation, was auch eine erhöhte Ethanolproduktion zur Folge hat. Eine ähnliche cAMP-abhängige Wirkung auf die Hyphenbildung scheint der Transkriptionsfaktor Flo8p zu haben, welcher möglicherweise auch einen Interaktionspartner von Efg1p darstellt (Cao et al, 2006). Der cAMP-abhängige Signaltransduktionsweg wird hauptsächlich durch Serum oder definierte Glucose-Konzentrationen von ca. 0,1%, wie sie auch im Blut von Säugetieren vorkommen, stimuliert. Es wurde deshalb bereits spekuliert, dass Glucose den Hauptstimulus der Seruminduktion darstellt (Hudson et al, 2004). Auf molekularer Ebene vermittelt Hgt4p, ein Glucosesensor und -transporter vermutlich über Ras1p die Hypheninduktion (Brown et al, 2006).

Neben diesen genannten Signaltransduktionswegen gibt es noch weitere Möglichkeiten, Hyphenwachstum von *C. albicans* zu induzieren. So läuft etwa

die pH-abhängige Hypheninduktion über den Transkriptionsfaktor Rim101p (Davis et al, 2000). Auch eine Induktion des Transkriptionsfaktors Cph2p über bisher unbekannte äußere Faktoren kann den Wechsel von Hefe- in Hyphenform des Pilzes hervorrufen (Lane et al, 2001a; Schweizer et al, 2000).

Neben diesen aktivierenden Transkriptionsfaktoren existiert auch noch eine negative Regulation des Hyphenwachstums. So stellt Tup1p einen globalen Repressor dar, welcher über die sequenzspezifischen DNA-Bindeproteine Nrg1p, Rfg1p oder Mig1p an die jeweilige Promotorregion verschiedener HSG gebunden wird. Homozygote *tup1/tup1*-Mutanten zeigen auch unter Hefebedingungen konstitutives Hyphenwachstum (Kadosh et al, 2005). Dabei scheint die Tup1p-vermittelte Repression vorwiegend über die Expression der DNA-Bindeproteine reguliert zu werden (Liu, 2001) und primär Auswirkung auf die *EFG1*-Expression zu haben (Biswas et al, 2007). So findet nachweislich eine Herunterregulation von *NRG1*-mRNA während der Hypheninduktion durch Serum und Temperatur statt (Kadosh et al, 2005). Auch Mig1p entfaltet im Komplex mit Tup1p über eine Repression bestimmter Hexosetransportergene bei hohen äußeren Glucosekonzentrationen eine hemmende Wirkung auf das Hyphenwachstum (Biswas et al, 2007). Daneben gibt es auch noch Tup1p-unabhängige hyphenwachstumshemmende Signalwege, z.B. über Hog1p, einer MAPK, welche durch osmotischen oder oxidativen Stress induziert wird und vermutlich über Aktivierung des Repressors Rbf1p unabhängig von Efg1p oder Cph1p auf noch unbekannte Weise den Übergang von der Hefe- in die Hyphenform verhindert (Biswas et al, 2007). Eine ähnliche Wirkung hat Farnesol, ein *quorum-sensing*-Molekül, das bei hoher Zelldichte vermehrt sezerniert wird und eine Repression der Cek1p-Kinase der MAPK-abhängigen Signalkaskade bewirkt (Sato et al, 2004).

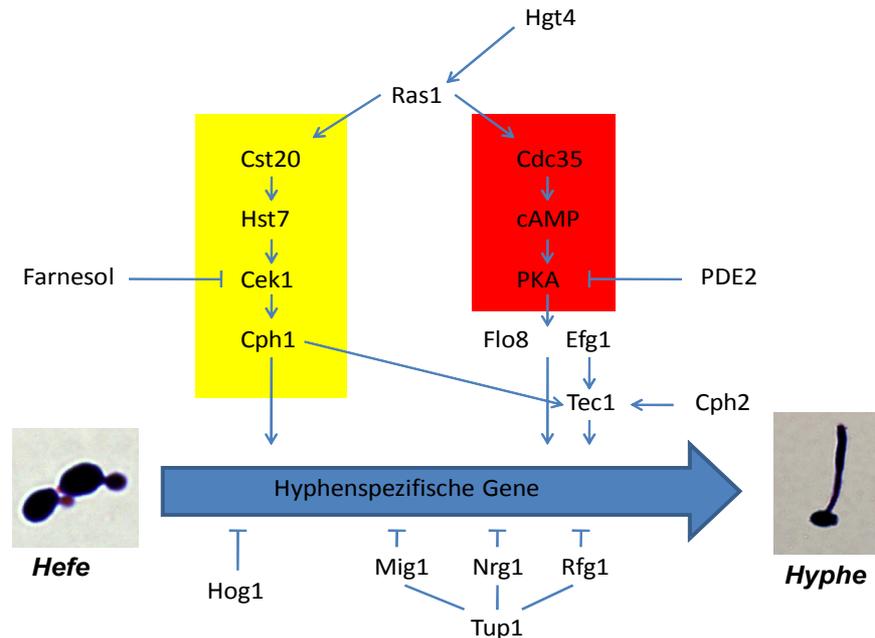


Abb. 1.2.21: Regulation des Dimorphismus von *C. albicans* über verschiedene Signaltransduktionswege. Die MAPK-Signalkaskade wurde gelb, die cAMP-abhängige Signalkaskade rot markiert. Pfeile symbolisieren positive und T-Balken negative Regulation.

Meine Arbeit beschäftigt sich hauptsächlich mit der Expression der Gene *TEC1*, *BCR1* und *ALS3*, weshalb diese im folgenden kurz vorgestellt werden sollen.

1.2.3 *TEC1*

Tec1p (=“Ty1 enhancement control“) ist ein wichtiger Regulator des Hyphenwachstums in *C. albicans* und wird insbesondere durch die hyphenspezifischen Transkriptionsfaktoren Efg1p und Cph1p in seiner Expression induziert. Damit stellt Tec1p einen terminalen Konvergenzpunkt multipler hyphenspezifischer Signalkaskaden dar (Lane et al, 2001b) (Abb. 1.2.21). Er gehört zur Familie der TEA/ATTS-Transkriptionsfaktoren. Dieser Familienname leitet sich aus den Anfangsbuchstaben der zuerst entdeckten Mitglieder ab: *IEF-1* („transcription enhancer factors“ des Menschen), *ScTec1*, *abaA* (*Aspergillus nidulans* u. *Aspergillus fumigatus*)/ *abaA*, *IEF-1*, *ScTec1*

(*S. cerevisiae*), *scalloped* (*Drosophila melanogaster*) (Burglin, 1991). Diese Transkriptionsfaktoren spielen insbesondere bei der Regulation ontogenetischer Entwicklungsprozesse eine Rolle. Ihr Vorkommen ist keineswegs pilzspezifisch, sondern erstreckt sich über alle Eukaryonten. So sind beispielsweise vier verschiedene TEF-Proteine bekannt, die die Kardio- und Myogenese, die Lungen-, Gehirn- und Plazentaentwicklung des Menschen steuern. Ihnen allen gemeinsam ist eine hoch konservierte TEA-DNA-Bindedomäne aus 66-68 Aminosäuren (Burglin, 1991) am N-Terminus des Proteins. Die Bindung dieser Domäne erfolgt an ein ebenso konserviertes Sequenzmotiv, der „TEA consensus sequence“ (=TCS), in Promotorregionen spezifischer Gene. Dieses Motiv umfasst die Basenabfolge 5'-CATTCTY-3' und ist in nahezu allen Promotoren hyphenspezifischer Gene von *C. albicans* vertreten. Im Gegensatz zu ihrer hohen Ähnlichkeit in Bezug auf ihre DNA-Bindedomäne unterscheiden sich die TEA/ATTS-Transkriptionsfaktoren jedoch im Regulationsmechanismus ihrer Zielgene. Dabei kommen sowohl Kooperationen und Dimerbildung mit anderen oder gleichartigen Proteinen vor, als auch die direkte Bindung eines einzelnen Proteins an das TCS-Motiv vor. Dadurch ist einerseits eine feinere Regulierung spezifischer Gene möglich, aber auch unterschiedliche Wirkungsweisen ein und desselben Transkriptionsfaktors. Dabei scheint auch die Lage und Orientierung der TCS-Motive zueinander eine Rolle zu spielen (Andrianopoulos et al, 1994). Inwieweit Tec1p in *C. albicans* über die verschiedenen Regulationsmöglichkeiten seine Wirkung auf seine Zielgene entfaltet, ist noch unbekannt. Bislang geht man von einer direkten TCS-Bindung oder auch indirekten Wirkung über die Induktion eines zweiten Transkriptionsfaktors, Bcr1p, aus (Argimón et al, 2007; Nobile et al, 2005).

Mehrere Studien identifizierten 13 hyphenspezifische Gene als sichere Zielgene von Tec1p (Bassilana et al, 2005; Nobile et al, 2006; Schweizer et al, 2000), darunter die Zellwandproteine Ece1p, Cht2p, Hwp1p und Hyr1p, das Adhäsin Als3p, das G1-Cyclin Hgc1p, die sekretierten Aspartatproteinasen Sap4-6p, die die Zellpolarisation steuernden Proteine Cdc24p, Bem2p und Rho3p und der Transkriptionsfaktor Bcr1p. Damit nimmt Tec1p nicht nur Einfluss auf die

Morphologie von *C. albicans*, sondern auch auf dessen Virulenz. Zum einen wird dem Pilz durch die veränderte Oberflächenstruktur die Adhäsion an den Wirt erleichtert, zum anderen ermöglichen die Hyphen eine effizientere Invasion über mechanische Penetration und die Sekretion von Proteasen, die zum Abbau von Struktur- und Abwehrproteinen des Wirts führen. Auch die Evasion aus Makrophagen nach Phagozytose ist nur in der Hyphenform möglich. Entsprechend zeigen *TEC1*-deletierte Stämme eine attenuierte Virulenz im systemischen Tierinfektionsmodell (Schweizer et al, 2000), während eine Überexpression von *TEC1* wiederum eine Steigerung der Virulenz bewirkt (Schweizer, 2003).

1.2.4 BCR1

Der „Biofilm and Cell Wall Regulator“ ist ein Tec1p-abhängig exprimierter Transkriptionsfaktor, welcher essentiell an der Regulierung der Biofilmbildung von *C. albicans* beteiligt ist (Nobile et al, 2005). Dabei handelt es sich um ein Zink-Finger-Protein, das die Expression von spezifischen Oberflächenproteinen und Adhäsinen steigert. Seine Zielgene umfassen dabei die hyphen-spezifischen Gene *ECE1*, *CHT2*, *HYR1*, *HWP1*, *RBT5*, *ALS1* und *ALS3* (Nobile et al, 2006), weshalb ihm auch in Bezug auf die Morphogenese eine regulative Funktion zukommt.

1.2.5 ALS3

ALS3 ist ein hyphenspezifisches Gen der „Agglutinin-like-sequence“-Familie (Sundstrom, 2002), an dessen Expression Tec1p essentiell beteiligt ist (Argimón et al, 2007). Bei dem Produkt handelt es sich um ein Glykosylphosphatidylinositolverankertes Oberflächenprotein. Sein N-Terminus weist sowohl funktionell als auch strukturell eine hohe Ähnlichkeit mit den humanen Cadherinen auf (Phan et al, 2007). Damit kommt ihm eine besondere Bedeutung bei der Adhärenz und Invasion von *C. albicans* an und in menschliche Epithel- bzw. Endothelzellen zu. Durch Ausbildung einer Cadherin-

Cadherin-Bindung mit N- bzw. E-Cadherin induziert Als3p eine passive Endozytose des Pilzes durch die Wirtszellen (Phan et al, 2007). Diese Schritte der Adhäsion und Invasion sind Voraussetzung für eine effiziente Zellschädigung des Wirts und zur Initiation einer Infektion. Damit ist Als3p ein wichtiger Virulenzfaktor von *C. albicans*, insbesondere bei der oropharyngealen Candidiasis und der hämatogenen Dissemination.

1.3. Experimentelle Untersuchung der genetischen Regulation: Funktion und Anwendung der quantitativen realtime-PCR

Die Messung der Expression der o.g. Gene wurde mit Hilfe der quantitativen realtime-PCR durchgeführt, auf deren Prinzip hier näher eingegangen wird. Diese Methode beruht auf dem herkömmlichen Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion (PCR), ermöglicht aber zusätzlich die Quantifizierung der DNA-Amplifikate. Dabei werden Fluoreszenzsignale gemessen, welche sich in proportionaler Weise zur Menge an PCR-Produkt ändern. Der Zusatz „Realtime“ ergibt sich aus der Tatsache, dass diese Messung kontinuierlich während eines PCR-Zyklus erfolgt und nicht, wie bei anderen Methoden der Quantifizierung (z.B. kompetitiver PCR) erst nach Abschluss der Reaktion eine Auswertung erfolgt. Eine Auswertung der Quantifizierung ist aber auch bei der qRT-PCR erst nach Ende des Ablaufs möglich, da nur die PCR-Zyklen während der exponentiellen Phase der PCR in die Berechnung miteinbezogen werden. Nur in diesen wenigen Zyklen pro Lauf ist eine absolute Proportionalität zwischen Fluoreszenz- und Amplifikatzunahme gegeben. Dies ist durch die optimalen Reaktionsbedingungen während dieser Phase bedingt. Während davor die Wahrscheinlichkeit des Zusammentreffens von Template, Primer und Polymerase durch die begrenzte Templatemenge eher gering ist, wird gegen Ende der PCR die Amplifikation durch die entstandenen PCR-Produkte, die anstelle der Primer mit den DNA-Einzelsträngen hybridisieren, gehemmt (Holzapfel et al, 2007; Jahnson, 2006).

Die verschiedenen Arten der qRT-PCR unterscheiden sich in erster Linie in den verwendeten Fluoreszenzfarbstoffen. Diese sind meistens an spezielle Sonden gekoppelt, die ähnlich wie die PCR-Primer an eine spezifische Sequenz innerhalb der zu amplifizierenden Region binden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden so genannte Taqman-Sonden verwendet. Auf diesen ist sowohl ein Donorchromophor = Reporter, als auch ein Akzeptorchromophor = Quencher lokalisiert. Bedingt durch die enge räumliche Konstellation unterdrückt der Quencher durch Absorption die Fluoreszenzemission des Reporters. Nach Binden der Sonde an die Zielsequenz kommt es im Rahmen der Amplifikation durch die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der Taqpolymerase zur Hydrolyse der einzelnen Sondenbausteine, wodurch sich Quencher und Reporter voneinander entfernen und das nun nicht mehr unterdrückte Signal der Reporterfluoreszenz ansteigt.

Die Berechnung der Template-Konzentration in den einzelnen Proben erfolgt wie bereits oben beschrieben anhand der Fluoreszenzzunahme während der exponentiellen Phase der PCR. Um diese spezifischen PCR-Zyklen festzulegen wird zunächst der so genannte Ct-Wert (cycle threshold = Schwellenwert-Zyklus) bestimmt. Dabei handelt es sich um die Zyklenzahl, ab welcher das Fluoreszenzsignal signifikant über das Level des Grundrauschens ansteigt. Dieser Wert legt den Beginn der exponentiellen Amplifikation fest. Im nächsten Schritt wird das Ende dieser exponentiellen Phase bestimmt. Hierzu wird das Maximum der zweiten Ableitung der Fluoreszenzkurve, welche die Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit der absolvierten PCR-Zyklen beschreibt, berechnet (Pfaffl, 2004). Dieser Punkt stellt den Wendepunkt im Verlauf der Fluoreszenzzunahme und damit das Ende des exponentiellen Zuwachses dar. Ein Fluoreszenzpunkt innerhalb dieses so ermittelten Zyklusintervalls, der für alle Proben verbindlich ist, dient nun der Berechnung der Ausgangsmenge an Template-DNA. In der Regel wird der Einfachheit halber direkt der Ct-Wert verwendet. Dabei besteht eine lineare, umgekehrt proportionale Beziehung zwischen dem Logarithmus der eingesetzten Template-Menge und dem

festgelegten Ct-Wert. Um vom jeweiligen Ct-Wert auf eine Konzentrationsangabe rückschließen zu können, ist eine Standardkurve nötig, bei der der Logarithmus bekannter Template-Ausgangskonzentrationen gegen die gemessenen Ct-Werte aufgetragen wird. Diese Standardkurven sind abhängig von PCR-Effizienz und Länge des Amplifikats und müssen somit spezifisch für jedes PCR-Produkt erstellt werden. In der Regel wird dazu eine 5-8 Proben umfassende Verdünnungsreihe an Plasmid-DNA oder aufgereinigtem PCR-Produkt verwendet. Durch die einzelnen Punkte wird anschließend eine Regressionsgerade gelegt, anhand derer durch die Geradengleichung $x=(Ct-b)/m$ für jede unbekannte Probe der Logarithmus der Templatekonzentration berechnet werden kann (Pfaffl, 2004; Holzapfel et al, 2007).

Zur relativen Quantifizierung der Genexpression wird zunächst die mRNA in PCR-taugliche cDNA umgeschrieben und mittels qRT-PCR die Menge an zielgenspezifischem Template bestimmt. Da diese Konzentration auch von der Gesamtmenge an eingesetzter cDNA abhängig ist, wird die Menge an zielgenspezifischem Template stets anhand der Menge eines Referenzgen-Templates als internem Kalibrator normiert. Dieses Referenzgen sollte unabhängig von äußeren Einflüssen in allen Zellen in gleichem Maße exprimiert werden, so dass sich die ermittelte Template-Konzentration stets proportional zur Gesamtmenge an Gentranskripten verhält. Diese Normierung ermöglicht damit auch eine bessere Vergleichbarkeit verschiedener Proben (Pfaffl, 2004).

Es sei an dieser Stelle darauf hingewiesen, dass im Rahmen dieser Methodik zwar eine Beurteilung der Transkriptionsaktivität von Genen, nicht aber der Translation der exprimierten mRNA möglich ist.

1.4 Fragestellung:

Zielsetzung meiner Arbeit war zunächst der Aufbau einer zuverlässigen Labormethodik zur Messung der Genexpression ausgewählter Gene in *C. albicans*. Zur Überprüfung der Funktionalität wurde ein Vorhersagemodell aufgestellt, das sich an mehrfach bestätigten Messergebnissen aus Northernblot-Untersuchungen als bisheriger Goldstandard der Expressionsanalyse in unserem Labor orientierte. Nach Erfüllung dieses Vorhersagemodells sollten mit Hilfe dieser neuen Methode durch Analyse der Expressionsdynamik von *TEC1*, *BCR1* und *ALS3* die Möglichkeit eines kausalen Zusammenhangs zwischen *TEC1*- und *ALS3*-, bzw. zwischen *BCR1*- und *ALS3*-Expression näher untersucht werden. Als Arbeitshypothese wurde hierbei ein Funktionsmodell zugrunde gelegt, nach welchem Tec1p eine Hochregulation von *BCR1* und Bcr1p wiederum eine Hochregulation von *ALS3* zur Folge hat, jedoch keine direkte Wechselwirkung zwischen Tec1p und dem *ALS3*-Promotor stattfindet (Argimón et al, 2007). Demzufolge dürfte eine *tec1/tec1*-Mutante weder eine *BCR1*- noch eine *ALS3*-Expression aufweisen, eine *TEC1*-Überexpressionsmutante hingegen in erster Linie eine höhere *BCR1*- und damit korrelierend auch höhere *ALS3*-Expression zeigen. Als Alternativhypothese wurde angenommen, dass Tec1p auch einen direkten regulativen Einfluss auf die *ALS3*-Expression hat. Dieser Annahme nach sollte eher eine Korrelation der Expressionsdynamik von *TEC1* und *ALS3* als von *BCR1* und *ALS3* zu beobachten sein. Insgesamt boten diese Untersuchungen somit die Möglichkeit einer besseren Charakterisierung von Tec1p in seiner Rolle als hyphenregulierender Transkriptionsfaktor in *C. albicans*.

2.1. Materialien

Sämtliche Chemikalien wurden von den Firmen Sigma, Roth, Difco, Fermentas, Qbiogene, Gibco und Biochrom-AG bezogen. Die Oligonukleotide wurden bei den Firmen metabion, biomers und Applied Biosystems erworben, die DNA-Elektrophoresestandards bei der Firma Fermentas und die kommerziell erhältlichen Systeme bei den Firmen Promega und Roche (Mannheim).

Geräte und sonstige Hilfsmittel stammen von den Firmen Roche (Mannheim), Biometra (Göttingen), Eppendorf (Hamburg), Bio-Rad (München) und Heraeus (Hanau).

2.1.1. Kommerziell erhältliche Systeme:

Name	Zweck
Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System®	Aufreinigung von PCR-Produkten
Wizard Genomic DNA Purification Kit®	Aufreinigung genomischer DNA
LightCycler TaqMan Master®	qRT-PCR

2.1.2. Enzyme und Puffer:

Name	Zusatz	Zweck
DNase I	RNase free; 1u/µl	DNA-Verdau von RNA-Proben
DNase-Puffer	10x Buffer with MgCl ₂	
EDTA	25 mM	Stop des DNA-Verdaus
Reverse Transkriptase	RevertAid™ H Minus M-MuLV 200 u/µl	cDNA-Synthese aus RNA
RT-Puffer	5x Reaction Buffer for M-MuLV RT	
Taq-Puffer	10x Taq Buffer with (NH ₄) ₂ SO ₄	
MgCl ₂	25 mM	
dNTP-Mix	10 mM	
Taq DNA Polymerase	5 u/µl	DNA-Amplifikation

2.1.3. DNA-Elektrophoresestandards

Name	Zweck
1 kb Plus DNA Ladder	Prüfen der Spezifität von PCR-Produkten der Länge 50 – 500 bp
1 kb DNA Ladder	Prüfen der Spezifität von PCR-Produkten der Länge 200 – 5000 bp

2.1.4. Oligonukleotide

2.1.4.1. Primer für Reverse Transkription und PCR

Name	Sequenz (5'-3')	Funktion
Oligo (dT) ₁₈ Primer 25µM	(dT) ₁₈	Umschreiben von mRNA in cDNA
EFB1 03	AACGAATTCTTGGCTGACA	Detektion genomischer DNA
EFB1 04	GCGGCTGGGGCTTTACC	

2.1.4.2. Primer für qRT-PCR

Name	Sequenz (5'-3')
TEC1-1879F	AGAATCCGCCATGATGTGTA
TEC1-1951R	TGCTGTGGTTGTTGTTGTTG
ALS3-906F	TTGGCAACGTGCACCTTTC
ALS3-872R	ACCGTTAGATCCAGCATCACTATTT
BCR1-1283F	ACACGGTGACATCATCGATTACA
BCR1-1365R	AGGTGTTAATGAAGCTGCTGAAGTT
ACT1 FW	TTTCATCTTCTGTATCAGAGGAACTTATTT
ACT1 RV	ATGGGATGAATCATCAAACAAGAG
RPP2B FW	TGCTTACTTATTGTTAGTTCAAGGTGGTA
RPP2B RV	CAACACCAACGGATTCCAATAAA
PMA1 FW	TTGCTTATGATAATGCTCCATACGA
PMA1 RV	TACCCCAATCTTGGCAAGT

2.1.4.3. Sonden für qRT-PCR

Name	Sequenz (5'-3')
ACT1 MGB probe	6FAM-ATTATTTTCGTCACGGGTATT
RPP2B MGB probe	6FAM-CACCTCTCCATCAGCTT
PMA1 MGB probe	6FAM-CCAAAACCAGTTAAATGG
TEC1-1902T	6FAM-ACCACACCAAATGTG
BCR1-1307T	6FAM-CAGATGCAGTTTATCC
ALS3-926T	6FAM-CATTAAGATGGACTGGATACA

2.1.5. Medien:

Medium	Zusammensetzung	Zweck
<i>HE-Medium</i> =YPD	1% (w/v) Hefeextrakt, 2% (w/v) Pepton, 2% Glucose	Anzucht unter Hefebedingungen
<i>HY-Medium</i> =VLE-RPMI 1640 +10%(v/v)FCS	VLE-RPMI ohne Glutamin; 0,06 mM HEPES; 10% (v/v) FCS	Induktion von Hyphenbildung
Lee-Medium	<ul style="list-style-type: none"> • Dextrose 12,5 g/l • NaCl 5 g/l • Ammoniumsulfat 5 g/l • Di-Kalium-Phosphat 2,5 g/l • L-Leucin 1,3 g/l • L-Lysin 1 g/l • L-Alanin 0,5 g/l • L-Phenylalanin 0,5 g/l • L-Prolin 0,5 g/l • L-Threonin 0,5 g/l • L-Methionin 0,1 g/l • L-Ornithin 0,07 g/l • L-Arginin 0,07 g/l • d-Biotin 0,001g/l • Zinksulfat 0,0000287g/l • Magnesiumsulfat-Heptahydrat 0,2 g/l • HCl-Titration auf pH 4,8 / 7,0 	<ul style="list-style-type: none"> • pH 4,8: Hefeinduktion • pH 7,0: Hypheninduktion
YNB	Yeast Nitrogen Base	Übernachtskulturen
CSM-URA	2% (w/v) Glucose, 0,77 g/l Complete Supplement Mixture (CSM) ohne Uridin, 1,7 g/l YNB ohne Aminosäuren und (NH ₄) ₂ SO ₄ , 5 g/l (NH ₄) ₂ SO ₄ , 2% (w/v) Agar	Festmedium zur Anzucht von Kolonien
TES-Puffer	10 mM Tris-HCl (pH 7,5); 10 mM EDTA; 0,5 % SDS	RNA-Extraktion
SED	1 M Sorbitol, 25 mM EDTA, 50 mM Dithiothreitol (sterilfiltriert)	DNA-Isolierung

Medium	Zusammensetzung	Zweck
PBS	137 mM NaCl; 2,68 mM KCl; 7,3 mM Na ₂ HPO ₄ ; 1,47 mM KH ₂ PO ₄ ; 1 mM CaCl ₂ ; 2 mM MgCl ₂ ; pH 7,4	Waschen von Zellen
0,5 TBE	45 mM Tris-HCl; 45 mM Borsäure; 1,25 mM EDTA	Gelelektrophorese von DNA und RNA

2.1.6. Hefestämme

Stamm	Genotyp	Funktion
CaAS20	Δ tec1-pVEC- <i>TEC1</i>	Wildtyp
CaAS18	Δ tec1-pVEC	tec1-Deletion
16.13a	ADHp- <i>TEC1</i>	<i>TEC1</i> -Überexpression

Durch homologe Rekombination wurde aus dem Wildtyp-Stamm SC5314 eine homozygote *tec1/tec1*-Mutante kloniert (Schweizer, 2000). Aus dieser Deletionsmutanten leiten sich die beiden Stämme CaAS20 und CaAS18 ab:

CaAS20: Nach Transformation mittels pVEC*-*TEC1* zeigte der Stamm wieder den gleichen Phänotyp wie SC5314. Damit handelt es sich um eine Revertante bzw. einen funktionell wildtypäquivalenten Stamm.

CaAS18: Es erfolgte lediglich die Transformation durch den unveränderten pVEC-Vektor. Der Stamm zeigte weiterhin den gleichen Phänotyp wie die *tec1/tec1*-Mutante.

16.13a: Nach Konstruktion eines Plasmids mit einem *ADH*-Promotor, nachgeschaltetem *TEC1*-Gen, sowie einem von diesem Promotor unabhängigen *URA3*-Gen, wurde dieses in den uridinauxotrophen Wildtypstamm CAI-4 integriert. CAI-4 entstand aus dem *C. albicans*-Wildtyp-Stamm durch Deletion des gesamten *URA3*-Leserahmens (Fonzi et al, 1993). Der transformierte Stamm ist also wieder zur Uridin-Synthese fähig und zeigt eine konstitutive Überexpression von *TEC1*.

***pVEC:** Dieses Plasmid wird als Shuttle-Vektor genutzt. Es enthält eine *C. albicans* „autonomously replicating sequence“ und eignet sich für stabile extrachromosomale Transformationen von *C. albicans*-Zellen. (freundlicherweise von der AG Ekkehard Leberer, CNRC National Research Council Canada, Montreal-Canada, zur Verfügung gestellt)

2.2. Methoden:

2.2.1. Hyphenkinetik:

Es wurden monatlich frische Zellkolonien auf CSM-URA-Platten durch Beimpfung aus Glycerol-Stockkulturen angelegt. Diese Kolonien auf Festmedium dienten wiederum als Ursprungszellen von Vorkulturen in 20-40 ml YNB, die für ca. 12-20h über Nacht bei 24 °C und 130 rpm in einem Schüttelinkubator inkubiert wurden, bis das Medium eine deutliche Trübung als Zeichen des Erreichens der stationären Wachstumsphase aufwies. Nach Berechnung der Zelldichte mittels Auszählung in Neubauer-Zählkammern wurden jeweils 5 Mio Zellen/ml dieser Vorkulturen in 10 ml Kinetikmedium entsprechender Temperatur (27 °C zur Induktion von Hefe- bzw. 37 °C zur Induktion von Hyphenwachstum) und einer Schüttelfrequenz von 130 rpm inokuliert. Zum Ernten der Proben wurde das gesamte inkubierte Medium der Kinetik-Probe in ein eisgekühltes 15 ml-Falcon-Tube überführt und möglichst zeitnah bei 4000 rpm und 0 °C für 10 min abzentrifugiert. Jede Probe wurde anschließend je nach Zellausbeute zweimal mit 1-2ml eiskaltem PBS bei gleicher Zentrifugeneinstellung gewaschen und die Zellpellets zur länger-fristigen Lagerung bei -80 °C tiefgefroren.

2.2.2. Induktion von Hyphenbildung:

Das Hyphenwachstum wurde durch Inkubation der Zellen in HY-Medium bei 37 °C, pH 7,4 – 7,6 induziert. Die Induktion von Hefewachstum erfolgte durch Inkubation in HE-Medium bei 27 °C. In weiteren Versuchen wurde die Hypheninduktion auch allein durch unterschiedliche pH-Werte (4,8 und 7,0) in Lee-Medium bei 37 °C angeregt.

2.2.3. Präparate für die Mikroskopie:

Hierzu wurden kurz vor Ernten der Zellen 20 µl der Kinetik-Probe direkt auf

einem Objektträger ausgestrichen. Nach Trocknen wurden die Präparate über einer Bunsenbrennerflamme fixiert und anschließend gramgefärbt. Darstellung und Dokumentation der Präparate erfolgte mit der cellB-Imaging® Software von Olympus Soft Imaging Solutions über ein OlympusDP71-Mikroskop. Als Pseudohyphen wurden dabei solche Elongationen der Zelle definiert, deren Länge das Doppelte des Zelldurchmessers erreicht hatten. Die Unterscheidung zwischen Pseudohyphen und echten Hyphen wurde am Vorhandensein eines Schnürrings im Bereich der Septen festgemacht.

2.2.4. RNA-Extraktion:

Alle Arbeitsschritte, welche die weitere Verarbeitung von Nukleinsäuren betreffen, wurden grundsätzlich auf Eis und unter Verwendung von sterilen Filterspitzen durchgeführt. Die RNA-Extraktion erfolgte modifiziert gemäß der Methode nach Chomczynski (Chomczynski et al, 1993). Dabei wurden pro Zellpellet 1-2 ml TES-Puffer und ein äquivalentes Volumen an Phenol verwendet. Nach der Hitzeinkubation erfolgte eine 10 minütige Zentrifugation bei 4000 rpm und 0 °C, anschließend wurden 700 µl der RNA-haltigen Oberphase abgehoben und in frische eisgekühlte Reaktionsgefäße überführt. Auf eine Zugabe von Chloroform wurde verzichtet. Dem Fällungsschritt mit 1/10 v/v Na-Acetat und 1 v/v Isopropanol (100 %) folgte eine 30 minütige Inkubation bei -20 °C. Anschließend wurde die RNA pelletiert (12000 rpm, 20 min, 0°C), mit je 1 ml 70 %igem Ethanol für 20 min bei 12000 rpm und 0 °C gewaschen, und für 15 min unter Frischhaltefolie getrocknet. Je nach Ausbeute wurden zur Resuspension 50 – 100 µl DEPC-Wasser verwendet und durch eine 1 minütige Inkubation bei 65 °C eine möglichst vollständige Lösung der RNA erzielt. Die längerfristige Lagerung erfolgte bei -80 °C.

2.2.5. Isolierung genomischer DNA:

Die Isolation genomischer DNA war zur Überprüfung des DNase-Verdau bzw. als Template der Positivkontrolle der *EFB1*-PCR notwendig. Hierzu wurden

Kolonien auf Festmedium mittels Impföse gepickt und in 1 ml Milliporwasser aufgenommen. Das Zellpellet wurde bei 4000 rpm und 4 °C für 5 min abzentrifugiert und anschließend in 1 ml Sorbitol resuspendiert. Nach einer Wiederholung des Zentrifugationsschrittes wurden die Zellen in 1 ml SED bei 4000 rpm und 4 °C für 5 min gewaschen und in 100 µl SED überführt. Dieser Suspension wurden dann 5 mg/ml Zymolase-Enzym zugegeben und kurz gevortext. Anschließend wurden die Zellen mindestens 2 Stunden bei 30 °C im Heizblock inkubiert, bis mikroskopisch mehr als 90 % der Zellen als Spheroplasten vorlagen. Zum Ernten der Spheroplasten wurden diese nach Zugabe von 1 ml Sorbitol bei 700 g und 4 °C für 5 min abzentrifugiert. Der Zellaufschluß und die weitere Isolierung erfolgte entsprechend den Angaben des Herstellers mit dem „WizardGenomic DNA Purification Kit®“. Die Qualität der isolierten genomischen DNA wurde durch Einsetzen von 1 µl Isolat in der DNA-Gelelektrophorese überprüft, in welcher sich nach erfolgreicher DNA-Isolation eine klare, schmierfreie Bande darstellt.

2.2.6. RNA-Konzentrationsbestimmung:

Die Konzentration der extrahierten RNA wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm in einer Verdünnung von 1:60 bzw. 1:20 bestimmt. Die Qualität der RNA-Proben konnten zusätzlich an Hand des 260/280nm-Quotienten beurteilt werden, welcher bei hoher Reinheit des Extrakts zwischen 1,7 und 2,0 liegen sollte. Niedrigere Werte weisen auf eine Protein-kontamination hin. Eine weitere Kontrolle der RNA-Qualität und -Konzentration erfolgte durch die RNA-Gelelektrophorese mit anschließender Ethidiumbromidfärbung und Darstellung unter UV-Licht. Beim Auftragen intakter RNA-Proben sind nach entsprechender Laufzeit zwei deutliche Banden, welche der 18S bzw. 28S-rRNA entsprechen, zu sehen. Das Verhältnis der Fluoreszenzintensität der 28S- zur 18S-rRNA sollte hierbei im Idealfall 2:1 betragen. Ein Verlust der Bandenschärfe mit gleichzeitig auftretenden Schmierspuren im unteren Teil des Gels deuten auf degradierte RNA hin.

2.2.7. Elektrophorese von Nucleinsäuren:

Je nach Länge der zu trennenden RNA- bzw. DNA-Fragmente wurden Gele aus 0,8%-2,5% Agarose in 0,5xTBE verwendet. Je kürzer die erwarteten Fragmente, desto höherprozentig wurde das Gel gewählt, um eine scharfe Darstellung der Banden zu erreichen. Die Nucleinsäure-Proben wurden vor dem Auftragen mit 1/10 v/v DNA-Ladepuffer versetzt. Die Spezifität der Banden wurde anhand von Markerbanden eines DNA-Elektrophoresestandards beurteilt. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte für RNA 30-35 min bei 90 V, für DNA 25-30 min bei 110 V. Anschließend wurde das Gel 10-60 min in Ethidiumbromid (1 µg/l) gefärbt und nach äquivalenter Entfärbezeit in Wasser unter UV-Licht photographisch dokumentiert.

2.2.8. DNase-Verdau der RNA-Proben:

Je nach Bedarf wurden pro Ansatz 1-4 µg RNA verwendet und mit 1/5 v/v Mastermix (DNase I und DNase-Puffer im Verhältnis 1:1) versetzt. Der weitere Verdau erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers [Fermentas] mit 2 U DNase/µg RNA. Die RNA-Endkonzentration aller DNase-behandelten Proben betrug ca. 100 ng/µl. Die Funktionalität des DNase-Verdaus wurde durch einen parallelen Ansatz mit genomischer DNA statt RNA als Template überprüft, in welchem sich nach dem Verdau weder nach direktem Auftragen noch nach Amplifikation in der *EFB1*-PCR DNA-Fragmente in der Gelelektrophorese nachweisen ließen.

2.2.9. Reverse Transkription der RNA in cDNA:

Pro Ansatz wurden 500 ng RNA mit 1/10 v/v Oligo-d(pT)-Primer versetzt und für 5 min im Thermocycler bei 70 °C inkubiert. Nach Zugabe von 2/5 v/v Mastermix (bestehend aus 50% Reverse Transkriptase-Puffer, 25% dNTP-Mix und 25% DEPC-Wasser), 10 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur und Zugabe von 200 u Reverser Transkriptase erfolgte die Reaktion für 90 min bei 42 °C im

Thermocycler, gefolgt von einer Inaktivierung durch 10 minütiges Erhitzen auf 70 °C. Der Erfolg und die Qualität der Reversen Transkription wurde durch Einsatz von 1 µl cDNA sowie einer Negativkontrolle ohne DNA-Template in die unten beschriebene *EFB1*-PCR kontrolliert. Die längerfristige Aufbewahrung der cDNA erfolgte bei -20°C.

2.2.10. PCR:

Es wurden jeweils 25 ng cDNA in einem Endvolumen von 25 µl amplifiziert. Das Reaktionsgemisch setzte sich aus 1/10 v/v Taq-Polymerase-Puffer, 0,4 mM dNTP-Mix, 1,5 mM MgCl₂, DEPC-Wasser, je 0,4 µM *forward*- und *reverse*-Primer und 5 u Taq-Polymerase zusammen. Zum Ausschluß einer möglichen Kontamination wurden zusätzlich ein Ansatz ohne cDNA-Template als Negativkontrolle der PCR, sowie ein weiterer Ansatz mit 1 µl der Negativkontrolle der Reversen Transkription erstellt. Die Amplifikation wurde in einem Thermocycler mit Deckelheizung durchgeführt und erfolgte in 35 Zyklen jeweils bestehend aus einer Denaturierungsphase (1 min, 95 °C), Primeranlagerung (45 sec, 60 °C) und Elongationsphase (1 min, 72 °C). Eine zusätzliche initiale Denaturierung von 2 sec bei 95 °C fand vor dem ersten Zyklus statt, nach dem letzten Zyklus folgte eine abschließende Elongation von 10 min bei 72 °C. Die jeweiligen PCR-Produkte wurden mittels Gelelektrophorese auf ihre Spezifität hin überprüft.

Die PCR diente sowohl zur Erstellung einer primerspezifischen Verdünnungsreihe für die qRT-PCR, als auch zur Überprüfung der Qualität der cDNA-Proben. Da die Bindesequenzen der *EFB1*-Primer ein Intron umfassen, ergeben sich abhängig von Art der Template-DNA (genomische oder cDNA) zwei unterschiedliche PCR-Produkte von 148 bp vs. 538 bp Länge.

2.2.11. Quantitative realtime-PCR:

Das Pipettieren der qRT-PCR-Ansätze erfolgte gemäß den Herstellerangaben des Taqman-Master-Kits® in Lightcycler-Kapillaren (Roche). Pro Kapillare

wurden 25 ng cDNA als Template eingesetzt, wobei stets auch eine Negativkontrolle ohne Template angesetzt wurde. Die Amplifikation und Quantifizierung erfolgte in einem Lightcycler Version 3.5[®] (Roche) und umfasste insgesamt 45 Zyklen. Ein Zyklus bestand aus Denaturierungsphase (10 s, 95 °C), Primeranlagerung (30 s, 58 °C) und Elongationsphase (1 sec, 72 °C). Zusätzlich erfolgte eine initiale 10 minütige Denaturierung bei 95 °C sowie eine abschließende 30 s dauernde Cooling-Phase bei 40 °C. Die zugehörige Software (Lightcycler Version 3.5[®], Roche) ermöglichte dank dem Import der entsprechenden Standardkurve gleichzeitig eine Berechnung der Template-Konzentrationen der einzelnen Proben.

3. Ergebnisse

3.1. Aufbau der Messmethodik

Zur Darstellung der Expressionsniveaus von *TEC1*, *BCR1* und *ALS3* musste zunächst eine geeignete Methodik etabliert werden. Ziel war es, den relativen Anteil des jeweiligen Gentranskripts an der Gesamt-mRNA der Zelle zu ausgewählten Zeitpunkten zu bestimmen. Diese Messung sollte mit Hilfe der quantitativen realtime-PCR unter Verwendung von Taqman-Primern und -Sonden durchgeführt werden. Die Funktionalität der Methodik wurde anhand eines Vorhersagemodells geprüft. Dabei wurde die Genexpression unter bestimmten Bedingungen nach der neuen Methodik gemessen und mit entsprechenden mehrfach bestätigten Messungen aus Northern Blot-Untersuchungen verglichen.

3.1.1. Erstellen der Standardkurven

Es wurde zunächst für alle Primerpaare eine spezifische Standardkurve etabliert. Hierzu wurden zunächst im Rahmen einer normalen PCR in 16 Ansätzen à 25 µl eine ausreichend große Menge PCR-Produkt erstellt, wobei als Template je 1 µl genomische DNA des Stammes 16.13a und als Primer die späteren qRT-PCR-Primer in einer Konzentration von 50 µM für *TEC1*, *BCR1* und *ALS3* bzw. 10 µM für *ACT1*, *PMA1* und *RPP2B* verwendet wurden. Ein Ansatz diente als Negativkontrolle und enthielt folglich kein DNA-Template. Nach der Amplifikation und Kontrolle der Produktspezifität und -reinheit durch Gelelektrophorese wurden 10 Positiv-Ansätze gepoolt, das entstandene Volumen bestimmt und mit Hilfe des Wizard SV Gel and PCR Clean up Systems gemäß Herstellerangaben aufgereinigt. Das aufgereinigte Produkt wurde in gleicher Konzentration neben dem nicht-aufgereinigtem Produkt erneut in eine Gelelektrophorese eingesetzt, sowie die Konzentration photometrisch in 1:6-Verdünnung bestimmt. Ein größerer Verlust an spezifischem Produkt konnte so ausgeschlossen werden. Im nächsten Schritt

wurde eine Verdünnungsreihe des spezifischen PCR-Produktes bestehend aus 5-6 Proben in 1:10-Verdünnungsstufen in 10 µg/ml carrier DNA angelegt. Diese wurden anschließend als Template in der qRT-PCR eingesetzt. Nach dem Lauf wurden gemessene Ct-Werte und zugehörige Konzentrationen in einem Diagramm gegeneinander aufgetragen und eine Regressionsgerade durch die 5-6 Punkte gelegt (Abb. 3.1.11). Als Zielpunkte wurden eine Steigung dieser Geraden zwischen -3,5 und -3,9, entsprechend einer PCR-Effizienz von >1,8, sowie ein Korrelationskoeffizient zwischen Ct-Werten und Ausgangskonzentrationen von 1,0 festgelegt. Desweiteren wurden die Ct-Werte der Verdünnungsreihe mit jenen verglichen, die in einzelnen cDNA-Proben aus repräsentativen Hyphenkinetiken gemessen wurden, um sicher zu stellen, dass die Standardkurve auch den gewünschten Konzentrationsbereich abdeckte. Bei entsprechenden Defiziten wurde die Verdünnungsreihe erweitert und in einer weiteren qRT-PCR erneut getestet. Die so etablierten Standardkurven wurden in allen weiteren qRT-PCR anhand des Ct-Wertes einer Standardprobe der Verdünnungsreihe importiert. Zur Kontrolle der Effizienz und damit Vergleichbarkeit dieser Folge-PCR wurden stets drei weitere Standardproben mitgeführt und ihre Ct-Werte in den verschiedenen Läufen verglichen.

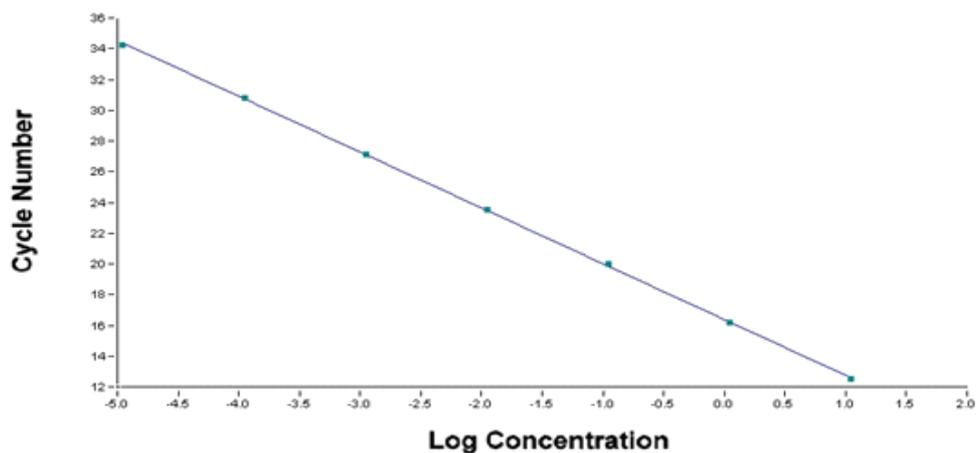


Abb. 3.1.11: Standardkurve für die qRT-PCR.

Die Etablierung erfolgte anhand von Konzentrationsmessungen einer 7fachen Verdünnungsreihe. Das Verdünnungsverhältnis betrug jeweils 1:10. Nach Abschluß der Messungen wurden die Ct-Werte (Y-Achse) gegen die Konzentrationen (X-Achse, logarithmische Skala) aufgetragen und eine Regressionsgerade durch die einzelnen Punkte gelegt.

Quelle: Auszug aus Standardkurvenansicht (Lightcycler Version 3.5®, Roche)

3.1.2. Festlegen geeigneter interner Kalibratoren

Da die gemessenen Templatekonzentrationen des GOI stark von Schwankungen des Gesamt-cDNA-Gehalts der Proben abhängig sind, sollten diese absoluten Messwerte zur jeweiligen cDNA-Konzentration normalisiert werden. Dies wird durch Quantifizierung der Genexpression sogenannter HKG als Referenzgene bewerkstelligt, die auch unter wechselnden äußeren Bedingungen eine konstante Genexpression aufweisen, so dass diese ermittelten Template-Konzentrationen repräsentativ für den Gesamt-cDNA-Gehalt der einzelnen Proben sind. Es wurden zunächst die drei HKG *ACT1*, *PMA1* und *RPP2B* bezüglich ihrer Expressionsstabilität unter verschiedenen äußeren Bedingungen getestet. Die entsprechenden Primer und Sonden wurden in ihrer Sequenz den Empfehlungen einer Studie [Nailis et al 2006] folgend übernommen und ihre Bindungsspezifität und Lokalisation mit Hilfe der Gensequenzanalyse-Software VectorNTI® [Invitrogen] geprüft. Die Produktlänge von 66-83 Basenpaaren entsprach ebenfalls den Anforderungen, da hierdurch eine besonders hohe Effizienz in der späteren qRT-PCR erreicht werden kann. Als mögliche Einflussfaktoren auf die Expression wurden hierbei verschiedene *TEC1*-Mutantenstämme, Inkubationstemperatur und -zeit sowie Unterschiede in der Mediumzusammensetzung (mit oder ohne FCS) in Betracht gezogen.

Zunächst wurden die Primer auf ihre Funktionsfähigkeit getestet, indem sie in einer normalen PCR mit genomischer DNA als Template eingesetzt und das entstandene Produkt später in der Agarose-Gelelektrophorese durch Abgleich mit einem DNA-Größenstandard auf seine Längenspezifität untersucht wurde. Für alle drei Primer stellte sich eine deutliche Bande im gewünschten Größenordnungsbereich dar (Abb. 3.1.21).

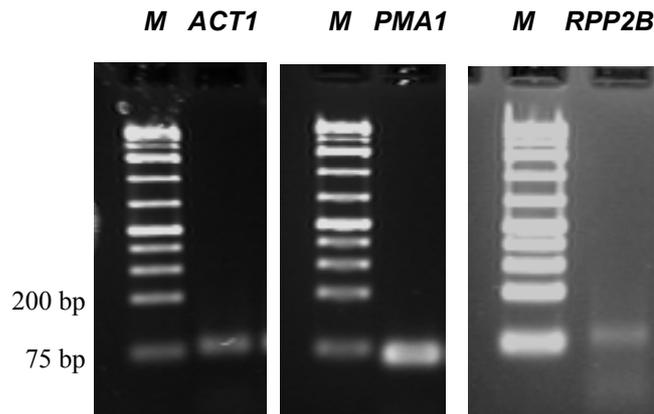


Abb. 3.1.21: PCR-Produkt der ACT1-, PMA1- und RPP2B-Primer nach einer normalen PCR und gelelektrophoretischer Auftrennung. Es stellte sich jeweils eine spezifische Bande gewünschter Größenordnung (60-80 bp) dar. Die Bestimmung der Fragmentlänge erfolgte durch Bandenabgleich mit einem DNA-Größenstandard (M), die Höhe der 75 bp- und 200 bp-Bande wurde links gekennzeichnet.

Zur Überprüfung der Expressionsstabilität wurde der sogenannte M-Wert pro HKG anhand von Konzentrationsmessungen der jeweiligen Templates in einer repräsentativen Kinetikprobenreihe ermittelt. Hierzu wurden für jedes einzelne HKG die errechneten Templatekonzentrationen innerhalb der Probenreihe zueinander relativiert, d.h. der höchsten Konzentration wurde der Wert 1 zugeordnet und die restlichen Konzentrationen innerhalb der Probenreihe dazu ins Verhältnis gesetzt. Diese relativen Messwerte wurden in eine Excel-Matrix eingetragen und mit Hilfe von geNorm VBA applet for Microsoft Excel® (Windows version, v3.5) die durchschnittliche Variation der jeweiligen HKG-Expression im Vergleich zur Expression der restlichen HKG ermittelt. Dazu wurde pro Kinetikprobe der Quotient aus den relativen Messwerten zweier HKG gebildet, wobei jedes HKG einmal im Zähler und die jeweils übrigen HKG einmal im Nenner auftauchen müssen. Bei idealen HKG ohne äußere Regulation sollte dieser Quotient in allen Proben gleich groß sein. Je größer die Variation dieses Werts zwischen den einzelnen Proben, desto instabiler die Expression eines der HKG. Pro spezifischem Quotient ergibt sich wiederum eine spezifische Variation, welche sich stets auf das HKG im Zähler bezieht. Der M-Wert ergibt sich aus dem Mittelwert dieser Variationen pro HKG. Zur

Ermittlung der stabilsten exprimierten HKG wird nun schrittweise jeweils das HKG mit dem höchsten M-Wert von der weiteren Berechnung ausgeschlossen, bis die beiden Gene übrig bleiben, welche die stabilste Expression innerhalb der Probenreihe aufweisen. Ab einem M-Wert >1,5 wurde das Gen als instabil in seiner Expression betrachtet und nicht mehr als HKG anerkannt.

Als mögliche Einflussfaktoren auf die Genexpression wurden Unterschiede in verwendetem Candida-Stamm (CaAS20, CaAS18 und 16.13a), Kinetikmedium (YPD mit oder ohne FCS), Inkubationsdauer (60 min – 360 min), und Inkubationstemperatur (22 °C, 37 °C) berücksichtigt (Tab. 3.1.21).

	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3
Konstante	Stamm Medium Temperatur	Zeit	Medium
Variable	Zeit	Stamm Medium Temperatur	Stamm Zeit Temperatur

Tabelle 3.1.21: Übersicht zum Versuchsaufbau zur Testung der HKG-Expressionsstabilität unter verschiedenen Einflussfaktoren

In Versuch 1 wurde zunächst der Einfluss der Inkubationszeit bewertet, wobei eine cDNA-Probenreihe einer Hyphenkinetik des Stammes CaAS20 zum Einsatz kam, welcher für 60, 120, 240 und 360 min bei gleicher Temperatur (37°C) und Medium (YPD+10% FCS) inkubiert worden war. Es ergaben sich für alle drei Gene ähnlich stabile Expressionsverhalten, den niedrigsten M-Wert zeigte dabei *RPP2B* (Tab. 3.1.22).

In Versuch 2 wurde nun die Expressionsstabilität der HKG in den verschiedenen Stämmen bei verschiedenen Temperaturen und Medien zu einem Zeitpunkt (240 min) ermittelt. Auch hierbei erwies sich *RPP2B* gemäß M-Wert als stabilstes HKG (Tab. 3.1.23).

In Versuch 3 erwies sich bei Variation von Stamm (CaAS20, CaAS18, 16.13a), Inkubationszeit (15 min, 240 min) und Temperatur (22 °C, 37 °C), aber Konstanz bezüglich Medium (YPD) *PMA1* als geeignetstes HKG (Tab. 3.1.24).

Versuch 1

	Inkubationsdauer	ACT1	PMA1	RPP2B
Relative Konzentrationen	60 min	0,794	0,325	0,515
	120 min	0,694	1,000	0,775
	240 min	1,000	0,814	1,000
	360 min	0,731	0,214	0,403
M-Wert		0,587	0,591	0,402

Tabelle 3.1.22: Relative Konzentrationen und M-Werte der HKG in Versuch 1: CaAS20 wurde 60, 120, 240 und 360 min in YPD+10%FCS bei 37 °C inkubiert. Die Templatekonzentrationen der HKG wurden mittels qRT-PCR ermittelt und pro HKG innerhalb der Probenreihe zueinander relativiert, so dass die höchste Konzentration einem Wert von 1,0 entspricht. Der M-Wert stellt die durchschnittliche Variation der Expression eines HKG gegenüber der Expression der anderen beiden HKG dar.

Versuch 2

	Medium + Temperatur	Stamm	ACT1	PMA1	RPP2B
Relative Konzentrationen	YPD ohne FCS, 22°C	CaAS20	0,115	0,216	0,204
		CaAS18	0,137	0,485	0,470
		16.13a	0,328	0,774	1,000
	YPD ohne FCS, 37°C	CaAS20	0,072	0,288	0,201
		CaAS18	0,335	1,000	0,610
		16.13a	1,000	0,334	0,320
	YPD+10%FCS, 22°C	CaAS20	0,102	0,148	0,220
		CaAS18	0,038	0,033	0,102
		16.13a	0,267	0,361	0,633
	YPD+10%FCS, 37°C	CaAS20	0,331	0,773	0,717
		CaAS18	0,365	0,260	0,265
		16.13a	0,892	0,300	0,570
M-Wert			1,143	0,939	0,859

Tabelle 3.1.23: Relative Konzentrationen und M-Werte der HKG in Versuch 2: CaAS20, CaAS18 und 16.13a wurden 240 min in YPD bzw. YPD+10%FCS bei 22 °C bzw. 37°C inkubiert. Die Templatekonzentrationen der HKG wurden mittels qRT-PCR ermittelt und pro HKG innerhalb der Probenreihe zueinander relativiert, so dass die höchste Konzentration einem Wert von 1,0 entspricht. Der M-Wert stellt die durchschnittliche Variation der Expression eines HKG gegenüber der Expression der anderen beiden HKG dar.

Versuch 3

	Inkubationsdauer + Temperatur	Stamm	ACT1	PMA1	RPP2B
Relative Konzentrationen	15 min, 22 °C	CaAS20	0,500	0,320	0,520
		CaAS18	0,070	0,200	0,340
		16.13a	0,800	0,340	0,510
	15 min, 37 °C	CaAS20	0,470	0,300	0,390
		CaAS18	0,080	0,210	0,280
		16.13a	0,560	0,310	0,350
	240 min, 22 °C	CaAS20	0,400	0,540	0,870
		CaAS18	0,220	0,530	0,910
		16.13a	0,510	0,590	1,000
	240 min, 37 °C	CaAS20	1,000	1,000	0,950
		CaAS18	0,400	0,610	0,840
		16.13a	0,630	0,660	0,840
M-Wert			0,971	0,590	0,648

Table 3.1.24: Relative Konzentrationen und M-Werte der HKG in Versuch 3: CaAS20, CaAS18 und 16.13a wurden 15 bzw. 240 min bei 22 °C bzw. 37 °C in YPD inkubiert. Die Templatekonzentrationen der HKG wurden mittels qRT-PCR ermittelt und pro HKG innerhalb der Probenreihe zueinander relativiert, so dass die höchste Konzentration einem Wert von 1,0 entspricht. Der M-Wert stellt die durchschnittliche Variation der Expression eines HKG gegenüber der Expression der anderen beiden HKG dar.

Beim Vergleich der Messergebnisse fiel ein abweichendes Verhalten der ACT1-Expression in den Mutanten-Stämmen CaAS18 und 16.13a auf: in Versuch 3 zeigte sich für CaAS18 eine gegenüber PMA1 und RPP2B deutlich verminderte relative Templatekonzentration von ACT1 für den Erntezeitpunkt 15 min (22 °C, YPD) (Abb. 3.1.21A). Umgekehrt konnte in Versuch 2 zum Erntezeitpunkt 240 min (37 °C, YPD) eine gegenüber PMA1 und RPP2B deutlich gesteigerte relative ACT1-Template-Konzentration für den Stamm 16.13a festgestellt werden (Abb. 3.1.21B). Diese Ergebnisse wurden durch die zugehörigen ermittelten M-Werte bestätigt, welche immer am höchsten für ACT1 ausfielen. Da es sich bei dem Genprodukt von ACT1 um Beta-Aktin, also einem zytoskelettalen Protein handelt, dessen Verteilung innerhalb der Zelle stark morphologieabhängig ist, lag ein kausaler Zusammenhang zwischen den bezüglich der TEC1-Expression variierenden Stämmen mit darauffolgenden Unterschieden in der Hyphenbildung und der variierenden ACT1-Expression nahe.

ACT1 ist somit als HKG beim Vergleich von Expressionsleveln innerhalb eines Stammes durchaus geeignet, nicht jedoch beim Vergleich zwischen den drei verschiedenen Stämmen.

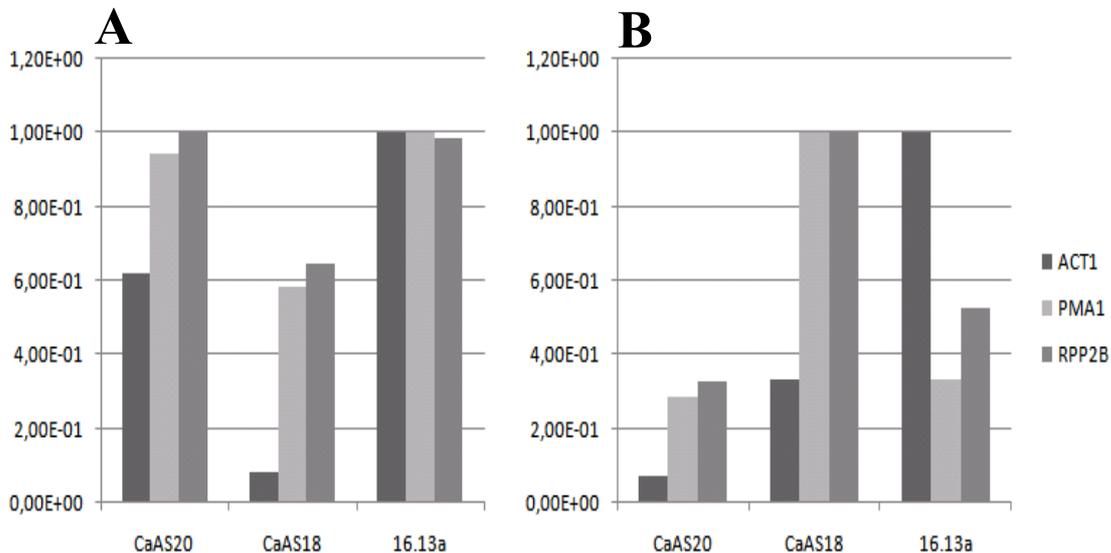


Abb. 3.1.21: relative Konzentrationen (Y-Achse) der HKG *ACT1*, *PMA1* und *RPP2B* in den drei verschiedenen Stämmen (X-Achse), die maximale Konzentration eines HKG wird jeweils mit 1,0 angegeben.

A: Vergleich der relativen Konzentrationen nach 15 min bei 22°C in YPD (Versuch 3)

B: Vergleich der relativen Konzentrationen nach 240 min bei 37°C in YPD (Versuch 2)

RPP2B und *PMA1* wiesen in den ersten Analysen eine ähnlich stabile Expression auf und waren somit beide als interne Kalibratoren geeignet. Da auch jedes HKG, wenn auch in viel geringerem Ausmaße, einer durch äußere Faktoren bedingten Regulation unterliegt, wurden in den weiteren Expressionsanalysen beide HKG zur validen Normalisierung herangezogen. Hierzu wurde der Quotient aus Templatekonzentration des GOI und dem geometrischen Mittel der Templatekonzentrationen von *RPP2B* und *PMA1* gebildet, so dass die Expression des GOI als Vielfaches der HKG-Expression ausgedrückt wird.

Die Expressionsstabilität der drei HKG wurde in späteren Kinetiken, in denen die genannten *Candida*-Stämme neuen Einflussfaktoren wie anderem Inkubationsmedium oder Temperaturen ausgesetzt waren, erneut durch Abgleich der jeweils gemessenen Ct-Werte überprüft.

3.1.3. Reproduzierbarkeit von Konzentrationsmessungen

Im nächsten Schritt sollte untersucht werden, inwieweit mit der Methode reproduzierbare Konzentrationsmessungen von cDNA-Templates möglich sind. Als mögliche Störfaktoren wurden die Prozessierungsschritte während der Umschreibung der RNA in cDNA sowie gerätebedingte Schwankungen in der Fluoreszenzmessung in verschiedenen qRT-PCR-Läufen ins Auge gefasst.

3.1.3.1. Prozessbedingte Messunterschiede

Die Prozessierung von RNA in verwendbare cDNA umfasst die Schritte des DNase-Verdau der RNA, der Reversen Transkription sowie die anschließende Verdünnung der cDNA in DEPC-Wasser. Es sollte nun die prozessbedingte Schwankungsbreite ermittelt werden, welche durch Prozessierung der gleichen RNA, aber in jeweils verschiedenen Ansätzen unter Verwendung des gleichen Verarbeitungsprotokolls, entstehen konnte.

Dazu wurden in sieben parallelen Ansätzen aus einer RNA-Probe sieben einzelne cDNA-Proben generiert und in einem einheitlichen qRT-PCR-Lauf die *PMA1*-Templatekonzentration gemessen (Tab. 3.1.3.11). Es ergab sich eine Spannweite der Ct-Werte von 0,37 Zyklen entsprechend einer Standardabweichung von 0,13 Zyklen.

	cDNA1	cDNA 2	cDNA 3	cDNA 4	cDNA 5	cDNA 6	cDNA 7
Ct	20,75	20,91	20,79	20,92	20,55	20,75	20,72

Tabelle 3.1.3.11: Ct-Werte der PMA1-qRT-PCR von sieben verschiedenen cDNA-Proben aus der gleichen Ursprungs-RNA. Die Prozessierung zur cDNA erfolgte in sieben parallelen Ansätzen.

Damit konnte auch ausgeschlossen werden, dass sich durch unterschiedliche Positionen innerhalb des Rotors im gleichen qRT-PCR-Lauf größere Messunterschiede ergeben.

3.1.3.2 Gerätebedingte Messunterschiede

Es sollte untersucht werden, wie groß die Messunterschiede bei einer Konzentrationsbestimmung ausfallen, wenn die gleiche cDNA in verschiedenen qRT-PCR-Läufen gemessen wird. Dazu wurden sechs Ct-Werte einer Standardprobe aus der *PMA1*- sowie der *RPP2B*-Verdünnungsreihe aus verschiedenen Läufen verglichen (Tab. 3.1.3.21).

		1. Lauf	2. Lauf	3. Lauf	4. Lauf	5. Lauf	6. Lauf
RPP2B	Ct	24,65	24,70	24,72	24,53	24,63	24,69
	E	1,8664	1,8648	1,8731	1,8798	1,8838	1,8805
PMA1	Ct	24,65	24,75	24,74	24,87	24,84	24,67
	E	1,9282	1,9164	1,9182	1,9042	1,8991	1,9168

Table 3.1.3.21: Ct-Werte (Ct) aus RPP2B- bzw. PMA1-qRT-PCR der gleichen Standardprobe und jeweilige PCR-Effizienzen (E) in sechs verschiedenen qRT-PCR-Läufen.

Für *PMA1* ergab sich hierbei eine Spannbreite von 0,22, für *RPP2B* von 0,19 Zyklen.

Da auch die Effizienz der qRT-PCR eine Auswirkung auf das Messergebnis haben kann, wurden außerdem die Effizienzen der entsprechenden Läufe jeweils anhand der Steigung der Regressionsgeraden, die durch die vier Ct-Werte der jeweils mitgeführten Standardproben ermittelt wurde, berechnet (Tab. 3.1.3.21). Für *PMA1* ergaben sich Effizienzen zwischen 1,899 und 1,928, für *RPP2B* zwischen 1,865 und 1,883. Die durchschnittlich etwas geringere Effizienz bei Messung der *RPP2B*-Template-Konzentration hängt mit dem geringfügig längeren PCR-Produkt zusammen. Damit war bei konstanter PCR-Effizienz eine gute Reproduzierbarkeit der Templatekonzentrationsmessungen bei einer natürlichen Streubreite von maximal ca. 0,3 Zyklen gegeben.

3.1.4. Reproduzierbarkeit, Validität und Reliabilität

Abschließend sollte geprüft werden, inwieweit Expressionsmesswerte von Zellen, die zwar unter gleichen Bedingungen, aber an verschiedenen Tagen inkubiert worden waren, vergleichbar bzw. reproduzierbar sind. Zur Testung der

Validität sollten die Messwerte der neuen Methode außerdem mit den Ergebnissen eines Northern Blot als etabliertem Goldstandard verglichen werden.

Hierzu wurden die drei *Candida*-Stämme CaAS20, CaAS18 und 16.13a parallel unter Hefebedingungen in YPD, 27 °C und unter Hyphenbedingungen in RPMI+10%FCS, 37 °C für jeweils 10 min inkubiert. Die Berechnung der *TEC1*-Expression erfolgte anhand dem arithmetischen Mittel und den Standardabweichungen biologischer Triplikate. Mittels *two-tailed t-test* wurde dann die Signifikanz der messbaren Expressionsunterschiede von *TEC1* in Hefe- und Hyphenform von CaAS20, sowie zwischen CaAS20, CaAS18 und 16.13a jeweils in Hefe- bzw. Hyphenform ermittelt.

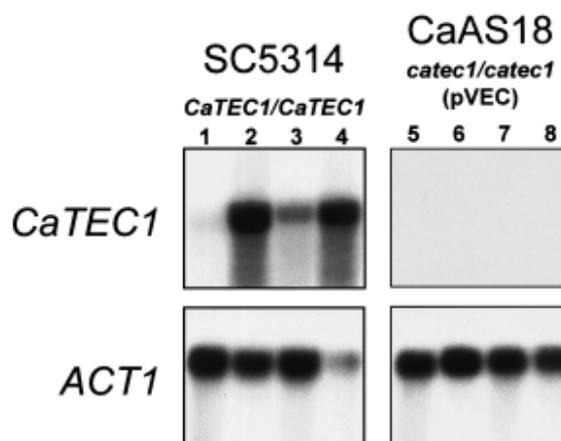


Abb. 3.1.41: Northern Blot von *Tec1*-mRNA: Gegenüberstellung von Wildtyp (*SC5314*) und *tec1/tec1*-Mutante (*CaAS18*):

Bahn 1+5 = Inkubation unter Hefebedingungen;

Bahn 2-4/ 6-8 = Inkubation unter Hyphenbedingungen

Quelle: Schweizer et al, 2000

In bisherigen Northern Blots konnte gezeigt werden, dass der Wildtypstamm *SC5314* (funktionell äquivalent zu *CaAS20*) unter Hefebedingungen keine messbare *TEC1*-Expression aufweist (Abb. 3.1.41: Bahn 1), sehr wohl aber unter Hyphenbedingungen (Abb. 3.1.41: Bahn 2-4). Für den Stamm *CaAS18* war sowohl unter Hefe- (Abb. 3.1.41: Bahn 5), als auch unter Hyphenbedingungen (Abb. 3.1.41: Bahn 6-8) keine *TEC1*-Expression nachweisbar.

Mit der neuen Messmethode konnte für CaAS20 ebenfalls eine signifikant ($p < 0,05$) höhere *TEC1*-Expression unter Hyphenbedingungen als unter Hefebedingungen nachgewiesen werden (Abb. 3.1.42).

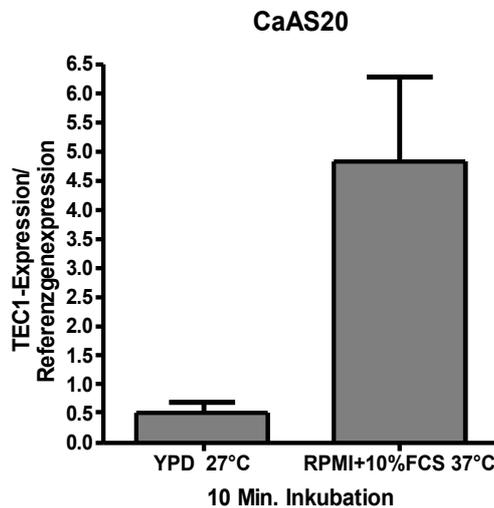


Abb. 3.1.42: *TEC1*-Expression als Vielfaches der Referenzgenexpression dargestellt: Gegenüberstellung der Expressionslevel in CaAS20 nach 10 min Inkubation in HE-Medium, 27°C und in HY-Medium, 37°C. Standardabweichungen und Mittelwerte wurden anhand von drei unabhängigen Experimenten erhoben.

Bezüglich der Stämme CaAS20, CaAS18 und 16.13a konnte unter Hefebedingungen eine signifikant höhere *TEC1*-Expression für 16.13a gegenüber den beiden anderen Stämmen gezeigt werden (Abb. 3.1.43A). Unerwarteterweise war auch in den Proben von CaAS18 eine geringe *TEC1*-Expression messbar, welche auf Kontamination bzw. Grundrauschen zurückgeführt werden muss (Abb. 3.1.43A/B). CaAS20 zeigte unter Hefebedingungen keine signifikant höhere *TEC1*-Expression als CaAS18 ($p = 0,19$), weswegen auch diese eher dem Grundrauschen zugeordnet wurde (Abb. 3.1.43A). Unter Hyphenbedingungen war wiederum für 16.13a gegenüber CaAS20 und CaAS18 eine signifikant ($p < 0,05$) höhere *TEC1*-Expression nachweisbar (Abb. 3.1.43B). Auch CaAS20 zeigte nun ein signifikant ($p < 0,05$) höheres *TEC1*-Expressionslevel als CaAS18 (Abb. 3.1.43B).

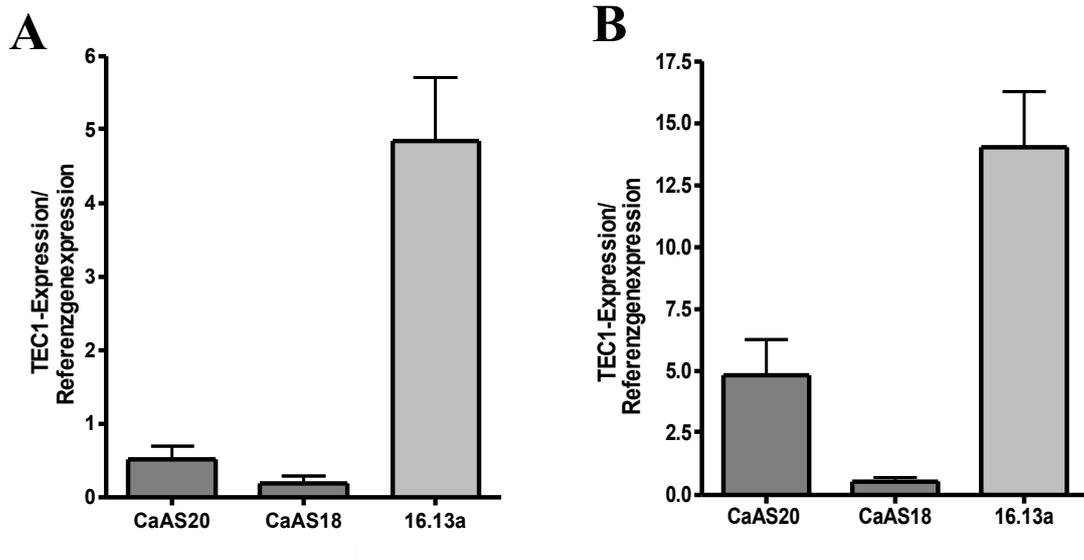


Abb. 3.1.43: *TEC1-Expression als Vielfaches der Referenzgenexpression dargestellt: Vergleich der drei Stämme CaAS20, CaAS18 und 16.13a nach 10 min Inkubation in HE-Medium, 27 °C (A) und in HY-Medium, 37 °C (B). Standardabweichungen und Mittelwerte wurden anhand von drei unabhängigen Experimenten erhoben.*

Damit waren die Ergebnisse der Goldstandard-Methode bestätigt worden. Eine zuverlässige Messung der Genexpression in *C. albicans* mit der neuen Messmethodik war möglich.

3.1.5. Evaluieren von Methoden zur RNA-Extraktion und –prozessierung zur cDNA

Nach Sicherstellung der Funktionalität der neuen Messmethode, bot sich hierdurch auch die Möglichkeit der Evaluation der Qualität von Prozessierungsmethoden der verwendeten RNA. Diese umfassten RNA-Extraktion, DNase-Verdau und die Reverse Transkription.

3.1.5.1. Effizienz des DNase-Verdaus

Zunächst wurden zwei Verdünnungsstufen (1:10 und 1:100) genomischer DNA von *C. albicans* angefertigt und davon jeweils 7/20 v/v pro Ansatz in den DNase-Verdau eingesetzt. Anschließend wurde mittels *PMA1*- und *RPP2B*-

qRT-PCR die Templatekonzentration vor und nach DNase-Verdau ermittelt, so dass bilanziert werden konnte, wieviel genomische DNA nach 30 min Verdau noch nachweisbar ist (Abb. 3.1.5.11). Zum Vergleich wurden die gleichen Templates auch in einer normalen *EFB1*-PCR amplifiziert und ein Bandenabgleich in der anschließenden Gelelektrophorese durchgeführt (Abb. 3.1.5.12).

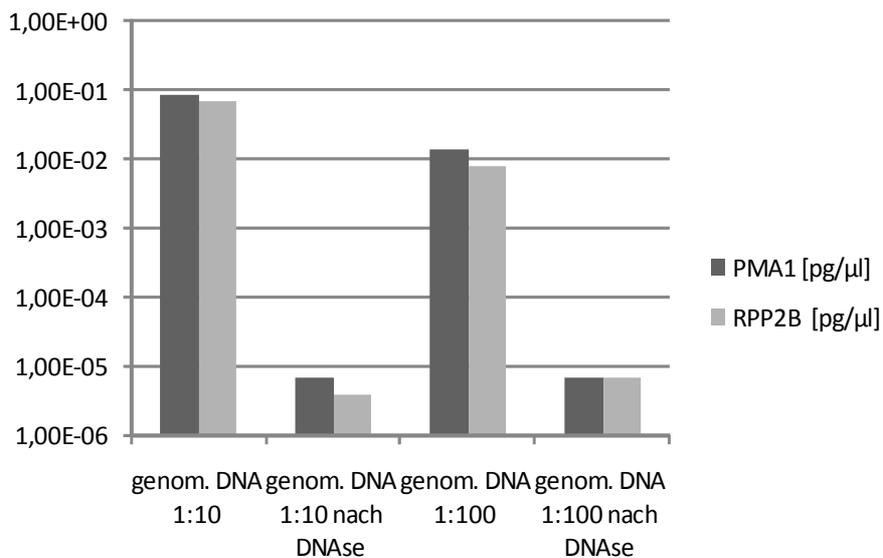
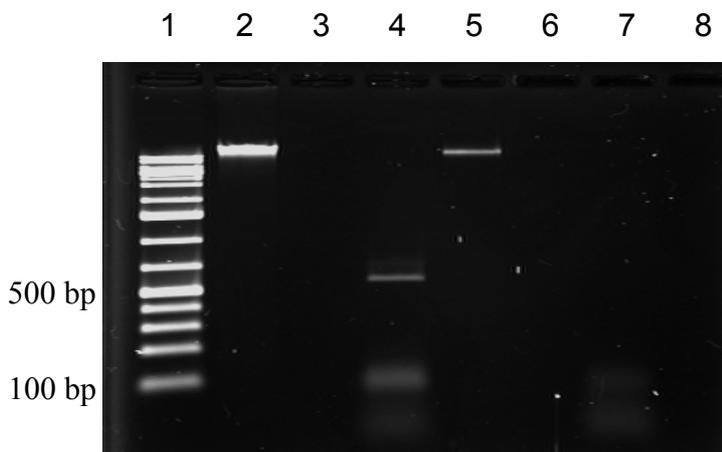


Abb. 3.1.5.11: Konzentrationsmessung der PMA1- bzw. RPP2B-Template-DNA in der qRT-PCR vor und nach DNase-Verdau [pg/μl] von genomischer DNA in zwei Verdünnungsstufen (1:10, 1:100) Y-Achse: Konzentration der Template-DNA [pg/μl], log₁₀-Skala X-Achse: Art der verwendeten DNA-Templates

Abb. 3.1.5.12: Effizienz des DNase-Verdaus: Gelelektrophorese von DNA vor (Bahn 2+5) bzw. nach DNase-Verdau (Bahn 3+6), sowie nach Amplifikation der DNA nach DNase-Verdau in einer *EFB1*-PCR (Bahn 4+7)



Auftrageschema:
 1 = DNA-Marker: links sind die Längenstandards, welche 100 bzw. 500 bp entsprechen, angegeben
 2 = genomische DNA, 1:10 verdünnt
 3 = Nr. 2 nach DNase-Verdau
 4 = *EFB1*-PCR-Produkt von Nr. 3
 5 = genomische DNA, 1:100 verdünnt
 6 = Nr. 5 nach DNase-Verdau
 7 = *EFB1*-PCR-Produkt von Nr. 6
 8 = Negativkontrolle der *EFB1*-PCR

In der *EFB1*-PCR zeigte sich, dass nach dem Verdau der 1:10-verdünnten DNA noch ausreichend Template zur Bildung eines PCR-Produktes vorhanden war, jedoch nicht mehr nach dem Verdau der 1:100-verdünnten DNA. Das für genomische DNA spezifische PCR-Produkt hat eine Länge von 538 bp und entspricht damit der sichtbaren Bande. Da zur Bildung eines längeren Produkts auch längere intakte Fragmente an DNA notwendig sind, erklärt sich auch der negative Befund bei Verwendung von 1:100-verdünnter DNA im DNase-Verdau. Das PCR-Produkt der qRT-PCR umfasst dagegen lediglich 66 bzw. 83 bp, so dass erst bei einem nahezu vollständigen DNA-Abbau von einem negativen Messergebnis ausgegangen werden kann. Damit können Reste von genomischer DNA auch noch in niedrigen Konzentrationen sehr sensibel nachgewiesen werden.

Nach DNase-Verdau waren in der qRT-PCR weniger als 0,01% der ursprünglichen DNA-Konzentration nachweisbar. Das entspricht einer Reduktion der Templatemenge um den Faktor 10.000. Dies wurde für die Aufreinigung von RNA-Proben als ausreichend befunden. Bei Einsetzen von DNase-verdauter RNA als Template konnten keinerlei DNA-Reste mehr nachgewiesen werden.

3.1.5.2. Effizienz der Reversen Transkription

Hierzu wurde eine RNA-Probe nach DNase-Verdau (1 µg/µl) auf sieben Verdünnungsstufen (im Verhältnis von 1:1, 1:2, 1:5, 1:10, 1:20, 1:50 und 1:100) gebracht. Pro Ansatz wurde je ¼ v/v dieser RNA-Proben als Template in die Reverse Transkription eingesetzt und der Erfolg der cDNA-Synthese mittels *EFB1*-PCR bestätigt. Die cDNA der Reversen Transkription, in welche die RNA 1:1-verdünnt eingesetzt wurde, wurde anschließend ebenfalls auf verschiedene Verdünnungsstufen (im Verhältnis von 1:5, 1:10, 1:20, 1:50 und 1:100) gebracht. Alle Proben wurden in gleicher Menge sowohl in eine qRT-PCR mit *PMA1*- als auch mit *RPP2B*-Primern eingesetzt. Dabei sollte vor allem getestet werden, ob die Effizienz der Reversen Transkriptase mit niedrigeren Konzen-

trationen an RNA-Template zu- oder abnimmt. Als Vergleichswerte dienten dabei die Ct-Werte der entsprechenden Verdünnungsstufen der cDNA (Tab. 3.1.5.21).

Verdünnung	Ct PMA1 bei RNA-Verdünnung	Ct PMA1 bei cDNA-Verdünnung	Ct RPP2B bei RNA-Verdünnung	Ct RPP2B bei cDNA-Verdünnung
1:5	21,04	21,15	20,56	21,14
1:10	22,28	22,52	21,74	22,78
1:20	23,29	23,71	22,78	23,77
1:50	24,95	25,13	24,64	25,44
1:100	26,25	26,05	25,78	26,37

Tabelle 3.1.5.21: Ct-Werte (Ct) der PMA1- bzw. RPP2B-qRT-PCR: Gegenüberstellung der Messwerte bei Verwendung verschiedener Template-Konzentrationen prätranskriptionell (RNA-Verdünnungen) und posttranskriptionell (cDNA-Verdünnungen). Es wurden in der PMA1- und RPP2B-qRT-PCR die gleichen Proben verwendet.

Für *PMA1* zeigten sich in der RNA- und cDNA-Verdünnungsreihe fast identische Ct-Werte im Sinne einer gleich bleibenden Effizienz des Enzyms unabhängig von der RNA-Template-Konzentration. Für *RPP2B* zeigte sich bei einer Verdünnung der RNA um 1:10 bis ca. 1:50 eine effektivere Transkription mit einer ca. doppelt so hohen cDNA-Ausbeute. Ausschlaggebend ist vermutlich die Länge der Template-mRNA, welche für *PMA1* 2688 bp, für *RPP2B* dagegen nur 336 bp umfasst. Die Reverse Transkription erfolgte mit 18dT-Primern, welche unspezifisch am A-Schwanz jeglicher mRNA binden, so dass die Wahrscheinlichkeit einer vollständigen Umschreibung kürzerer mRNA-Fragmente höher als für längere Fragmente ist. Folglich kann durch eine Steigerung des Verhältnisses Enzym:RNA ein deutlicherer Anstieg der Effizienz erreicht werden.

Da sich hiermit doch Hinweise auf einen Effizienzverlust der Reversen Transkription bei Einsetzen hoher RNA-Template-Konzentrationen ergaben, wurde in den weiteren Experimenten maximal 500ng RNA pro Ansatz in der Reversen Transkription verwendet.

3.1.5.3. Beurteilung der RNA-Qualität nach zwei unterschiedlichen RNA-Extraktionsverfahren

Zur besseren Einschätzung der RNA-Qualität bzw. des bisher angewendeten Extraktionsverfahrens mit Phenol (nach Chomczynski) sollte ein Vergleich mit RNA erfolgen, welche mittels eines Kits (RNeasy, Qiagen) extrahiert worden war. Hierzu wurden jeweils zwei Phenol- bzw. Kit-extrahierte RNA-Proben in gleicher Konzentration in den DNase-Verdau und anschließend die Reverse Transkription eingesetzt. Der Qualitätsvergleich erfolgte zum einen durch einen Vergleich der Bandenintensität der rRNA-Banden in der RNA-Gelelektrophorese, zum andern durch Messung der *PMA1*- und *RPP2B*-Template-Konzentration in den zugehörigen cDNA-Proben (Abb. 3.1.5.32). Es zeigten sich bereits in der Gelelektrophorese ein höherer Degradationsgrad der Kit-extrahierten RNA mit einer niedrigeren Bandenintensität und deutlicherem „Schmier“ im unteren Gelbereich (Abb. 3.1.5.31). Dieses Ergebnis wurde in qRT-PCR bestätigt, in welcher für die Phenol-extrahierte RNA ca. 10x höhere cDNA-Konzentrationen ermittelt werden konnten. Diesen Ergebnissen zufolge stellt die Phenol-Extraktion der RNA das schonendere und effizientere Verfahren zur RNA-Gewinnung dar, allerdings unterlagen die RNA-Proben unterschiedlich langen Lagerungszeiten, weswegen eine endgültige Beurteilung anhand von frisch extrahierter RNA erfolgen sollte.

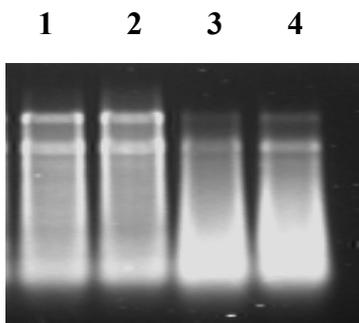


Abb. 3.1.5.31: Darstellung von rRNA-Banden nach Gelelektrophorese von RNA-Proben, deren Extraktion nach der Phenol-Methode von Chomczynski (1,2) bzw. mithilfe eines Kits (3,4) durchgeführt wurde.

- 1= Phenol-extrahierte RNA 1
- 2= Phenol-extrahierte RNA 2
- 3= RNeasy RNA SC5314 1
- 4= RNeasy RNA SC5314 2

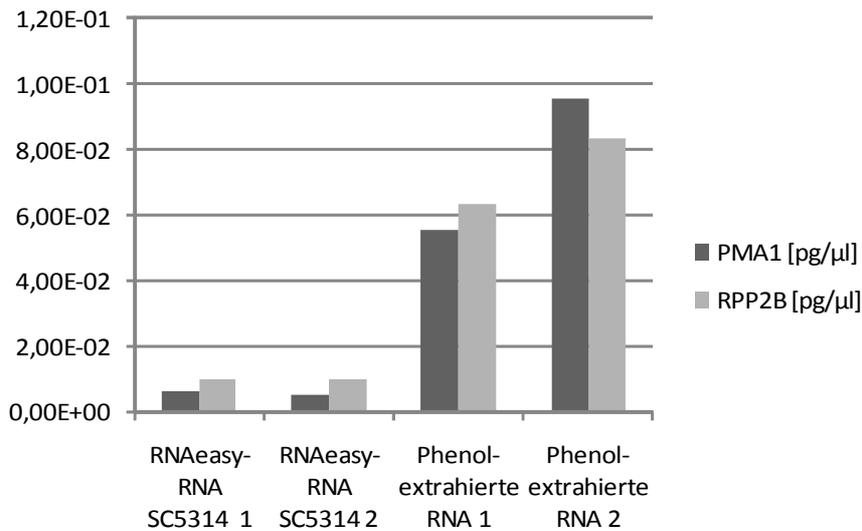


Abb. 3.1.5.32: qRT-PCR-ermittelte PMA1- bzw. RPP2B-Template-konzentrationen bei Einsetzen vier unterschiedlicher RNA-Proben in die Reverse Transkription.

Y-Achse: Templatekonzentration [pg/μl]

X-Achse: Probenbezeichnung:

RNAeasy-RNA = mittels Qiagen-Kit extrahiert

Phenol-extrahierte RNA = nach Chomczynski extrahiert

3.1.6. Effekt der Vorbehandlung der Vorkulturzellen auf die Genexpression

Um eine noch bessere Vergleichbarkeit und Reproduzierbarkeit der Expressionsmesswerte zu erreichen, sollte der Versuch einer Synchronisation der Vorkulturzellen unternommen werden. Ziel war dabei, die Zellen möglichst in die gleiche Zellzyklusphase zu überführen und so auch in Bezug auf Zellteilung, Transkription und Translation während der Kinetik eine höhere Proportionalität zu bewirken. Hierzu wurden in drei unabhängigen Experimenten parallel Zellen von CaAS20 unter hypheninduzierenden Wachstumsbedingungen inkubiert, wobei zum Animpfen der Kulturen einerseits ungewaschene, andererseits vorbehandelte Zellen aus der gleichen Übernachtskultur verwendet wurden. Zur Vorbehandlung wurde ein Volumen von 5 ml aus der Übernachtskultur entnommen und diese Zellen bei 4000 rpm und 0 °C 5 min abzentrifugiert, in

einem äquivalenten Volumen PBS bei gleicher Temperatur und Drehzahl gewaschen und in 5 ml PBS resuspendiert. Zum Animpfen der Kinetikkulturen wurden jeweils das gleiche Volumen aus unbehandelter und vorbehandelter Vorkultur eingesetzt. Das Ernten dieser Kinetikkulturen erfolgte nach 10 min, 60 min und 300 min. Anschließend wurden die Expressionsniveaus von *TEC1*, *BCR1* und *ALS3* zu diesen Zeitpunkten ermittelt und die Mittelwerte und Standardabweichungen der jeweiligen biologischen Triplikate berechnet. Dabei wurde erwartet, dass sich für die Triplikate mit den gewaschenen Vorkulturen im Falle einer erfolgreichen Synchronisation deutlich kleinere Standardabweichungen ergeben. Gleichzeitig konnte evaluiert werden, inwieweit der Waschvorgang auch quantitativ eine Auswirkung auf die Expression von *TEC1*, *BCR1* und *ALS3* während der Kinetik hatte. Es zeigte sich, dass die Vorbehandlung zwar keine Auswirkung auf die Standardabweichung bezüglich biologischer Replikate erzielte, aber eine auffallend höhere *TEC1*-Expression der betreffenden Zellen nach 10 min sowie insgesamt eine geringfügig höhere *ALS3*-Expression zur Folge hatte (Abb. 3.1.61). Damit sprachen die vorbehandelten Zellen stärker auf die äußeren hypheninduzierenden Faktoren an, als die ungewaschenen Zellen der Vergleichsproben.

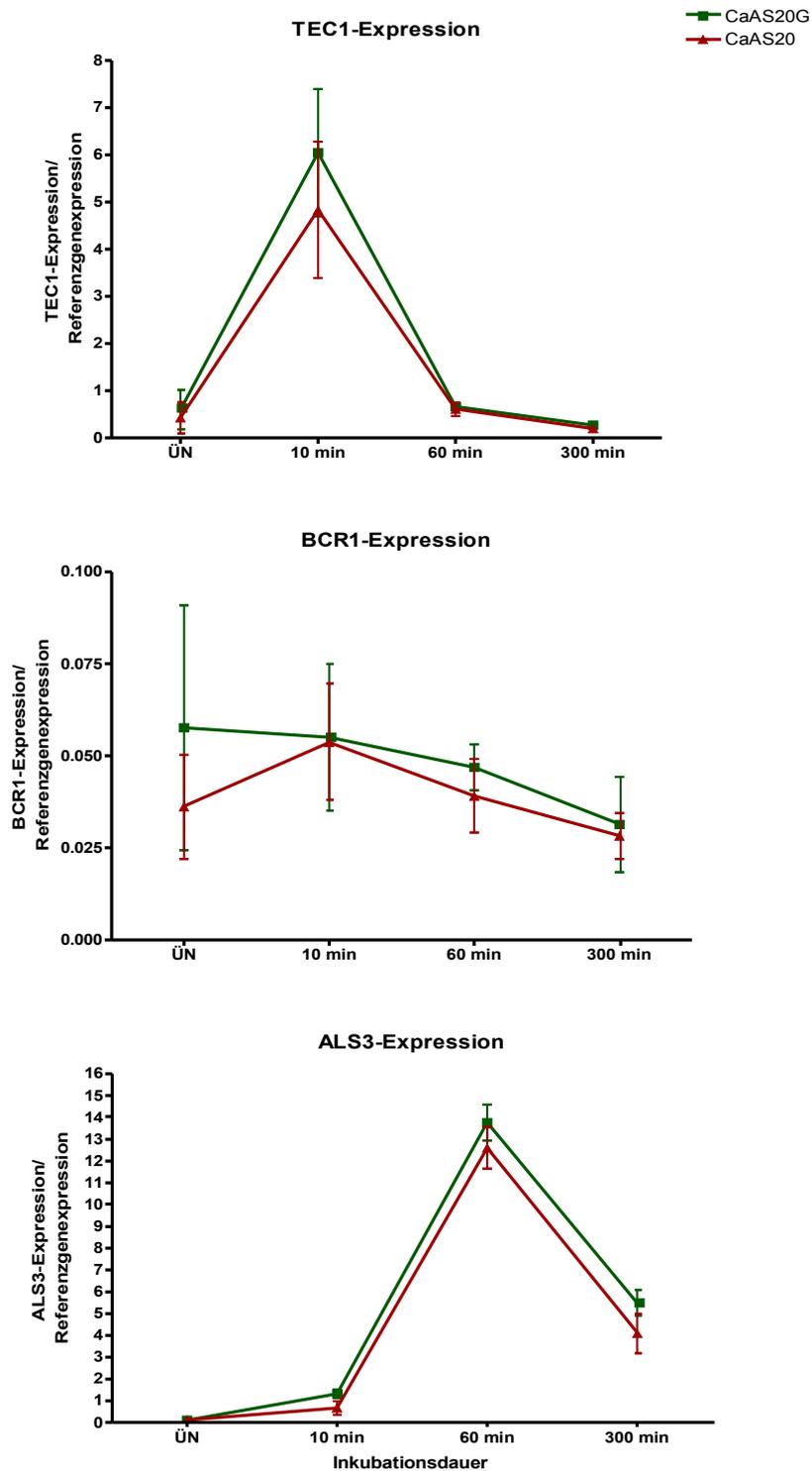


Abb. 3.1.61: Expression der GOI als Vielfaches der Referenzgenexpression dargestellt. Die Inkubation der Zellen erfolgte jeweils in HY-Medium bei 37 °C.

ÜN = Übernachtskultur, entspricht der nativen bzw. vorbehandelten Vorkultur (Zeitpunkt 0)

CaAS20 = Animpfung der Kinetikproben mit nativer Vorkultur

CaAS20g = Animpfung der Kinetikproben mit vorbehandelter Vorkultur

3.2 Anwendung der neuen Messmethode:

Genexpressionsanalysen von *TEC1*, *BCR1* und *ALS3*

Nach erfolgreicher Etablierung der Messmethode sollte nun durch einen Vergleich der Expressionsdynamik von *TEC1*, *BCR1* und *ALS3* in CaAS20, CaAS18 und 16.13a eine genauere Analyse der Signalwirkungskette zwischen den drei Genen erfolgen. Dabei sollte geprüft werden, ob die Expressionsdynamik von *ALS3* sich eher an der Expressionsdynamik von *BCR1* (gemäß dem Modell von Argimón et al 2007) oder an der von *TEC1* orientiert.

3.2.1 Genexpressionsanalyse unter Temperatur- und Seruminduktion

Zu diesem Zweck wurden CaAS20, CaAS18 und 16.13a in zwei unabhängigen Experimenten parallel unter hefe- (HE-Medium, 27 °C) und hyphen-induzierenden (HY-Medium, 37 °C) Bedingungen inkubiert und je nach 10, 60 und 300 min geerntet, so dass für jeden Erntezeitpunkt biologische Duplikate vorlagen. RNA-Extraktion und -transkription wurde pro Experiment an verschiedenen Tagen durchgeführt.

***TEC1*-Expression**

Wie in Abb. 3.2.12 ersichtlich wird, konnte unter hefeinduzierenden Wachstumsbedingungen für 16.13a gegenüber CaAS18 und CaAS20 eine zu allen drei Zeitpunkten deutlich ($p < 0,05$) höhere *TEC1*-Expression nachgewiesen werden. Dabei wurden 5-10x höhere Expressionslevel erreicht als in den beiden anderen Stämmen. Der Expressionsunterschied zwischen CaAS20 und CaAS18 stellte sich hingegen als irrelevant dar, so dass im Wildtyp-äquivalent unter Hefebedingungen keine relevante *TEC1*-Expression stattzufinden scheint.

Die Inkubation in HY-Medium bei 37 °C führte in CaAS20 im Gegensatz zu CaAS18 zu einer Induktion des *TEC1*-Gens, was sich als im Vergleich zur Hefeform deutlich stärkere *TEC1*-Transkription messen ließ. Die *TEC1*-Expression in 16.13a war stets um das 2- bis 10fache ($p < 0,05$) höher als in CaAS20 zum jeweiligen Zeitpunkt. Dies erklärt sich durch die neben der induzierten zusätzlich stattfindende konstitutive *TEC1*-Expression. Dieser Expressionsunterschied fiel am deutlichsten in der späten Inkubationsphase nach 300 min auf, was als möglicher Hinweis auf eine positive Feedbackschleife der Genregulation von *TEC1* gewertet werden kann.

Im Zeitverlauf zeigt *TEC1* ein frühes Expressionsmaximum mit einem raschen Rückgang der Expression innerhalb der ersten 60 min, entsprechend dem Expressionsverhalten eines frühen Transkriptionsfaktors, der vor allem zur Initialisierung hyphenspezifischer Gene beiträgt.

***BCR1*-Expression**

Unter hefeinduzierenden Bedingungen war die *BCR1*-Expression in 16.13a insbesondere während der frühen (nach 10 min) und der späten Inkubationsphase (nach 300 min) um das 1,6- bis 1,8fache ($p < 0,05$) höher als in den beiden anderen Stämmen. Damit fiel der quantitative Expressionsunterschied im Vergleich zur *TEC1*-Expression unerwartet gering aus. Es stellte sich für alle drei Stämme eine proportional zur *TEC1*-Expression verlaufende Dynamik dar, Gemäß der geringen *TEC1*-Transkription zeigte CaAS20 unter diesen Bedingungen auch keine gegenüber CaAS18 relevant höhere *BCR1*-Expression (Abb. 3.2.13A).

Bei Induktion von Hyphenwachstum waren sowohl in 16.13a als auch in CaAS20 deutlich ($p < 0,05$) höhere *BCR1*-Expressionen messbar als in CaAS18 (Abb. 3.2.11B), wie es bei den nachgewiesenen deutlichen Unterschieden in der *TEC1*-Transkription zu erwarten war. Ein relevanter Expressionsunterschied zwischen 16.13a und CaAS20 fiel insbesondere in der frühen (nach 10 min) und in geringerer Ausprägung in der späten Inkubationsphase (nach 300 min)

auf (Abb. 3.2.13B). Überraschenderweise erreichten die beiden Stämme im Widerspruch zu ihren unterschiedlich starken *TEC1*-Expressionen nach 60 min ein nahezu identisches *BCR1*-Expressionsniveau. Dies deutet auf eine Tec1p-unabhängige Regulation während dieser Inkubationsphase hin, während zu früheren bzw. fraglich auch späteren Zeitpunkten erwartungsgemäß bei gesteigerter *TEC1*-Transkription auch eine stärkere *BCR1*-Expression beobachtet werden kann (Abb. 3.2.13A,B).

In der Expressiondynamik stellt sich *BCR1* ebenfalls als früher Transkriptionsfaktor dar, welcher aber insbesondere im Wildtypäquivalent CaAS20 eine im Vergleich zu *TEC1* weniger stark ausgeprägte Abnahme der Expression im Zeitverlauf (während der ersten 300 min) zeigt, was als Hinweis auf eine sekundäre Geninduktion, vermutlich durch Tec1p, verstanden werden kann.

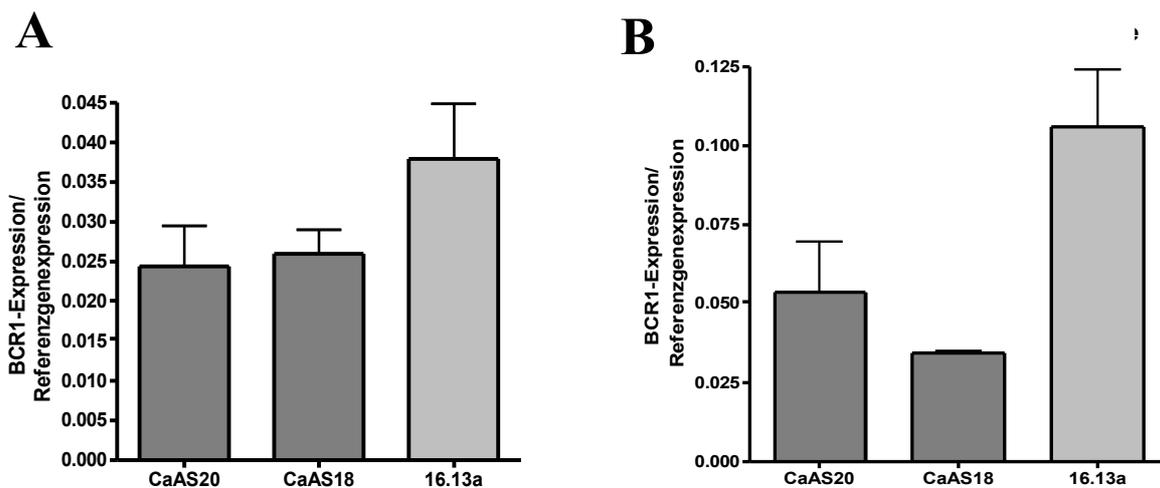


Abb. 3.2.11: *BCR1*-Expression in CaAS20, CaAS18 und 16.13a nach 10 min in HE-Medium bei 27°C (A) und in HY-Medium bei 37°C (B); dargestellt werden die Expressionsmesswerte von *BCR1* als Vielfaches der Referenzgenexpression; Standardabweichungen und Mittelwerte wurden anhand von zwei unabhängigen Experimenten erhoben.

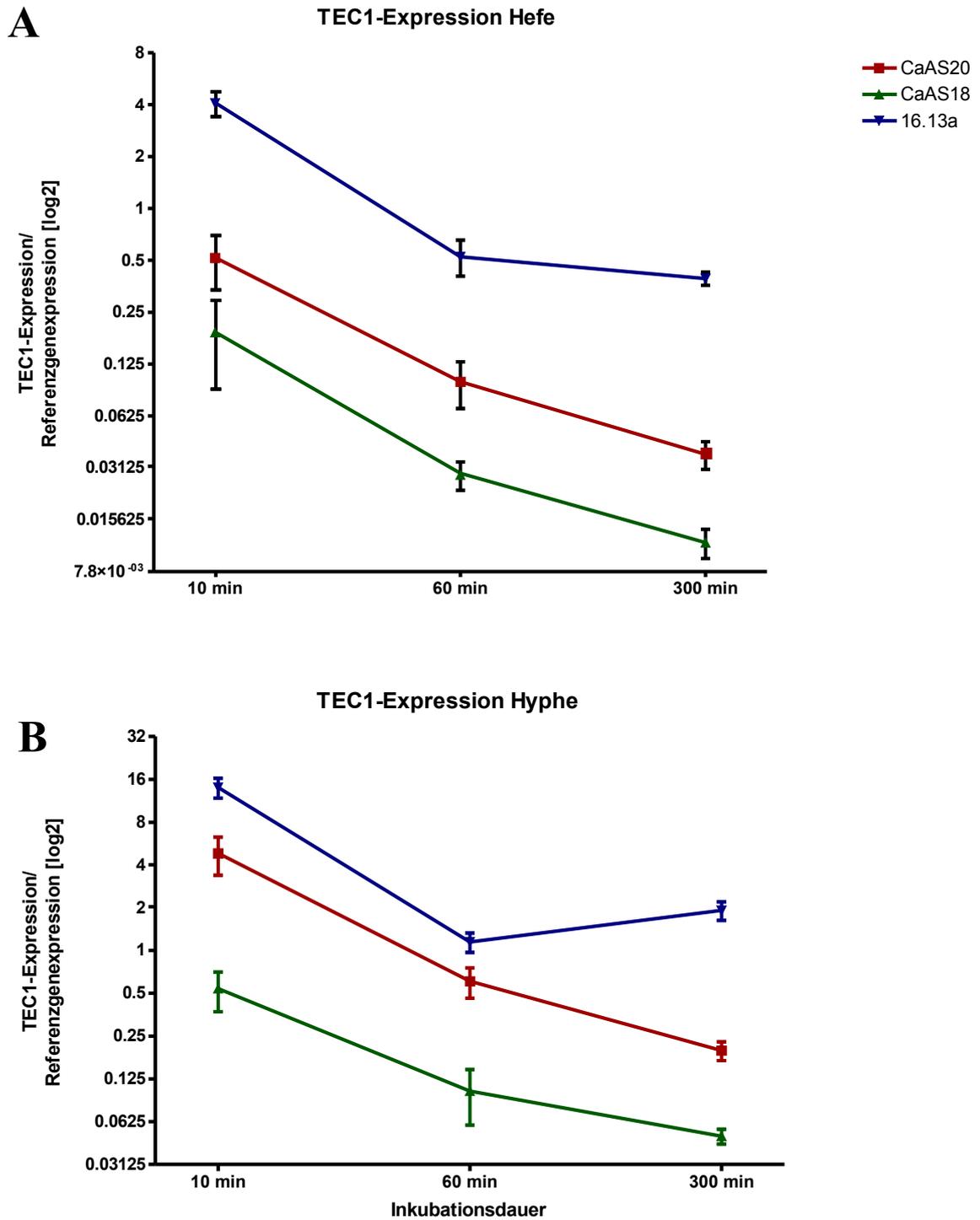


Abb.3.2.12: TEC1-Expression in CaAS20, CaAS18 und 16.13a in HE-Medium bei 27°C (A) und in HY-Medium bei 37°C (B) als Vielfaches der Referenzgenexpression auf einer log₂-Skala dargestellt. Mittelwerte und Standardabweichungen wurden anhand von zwei unabhängigen Experimenten erhoben.

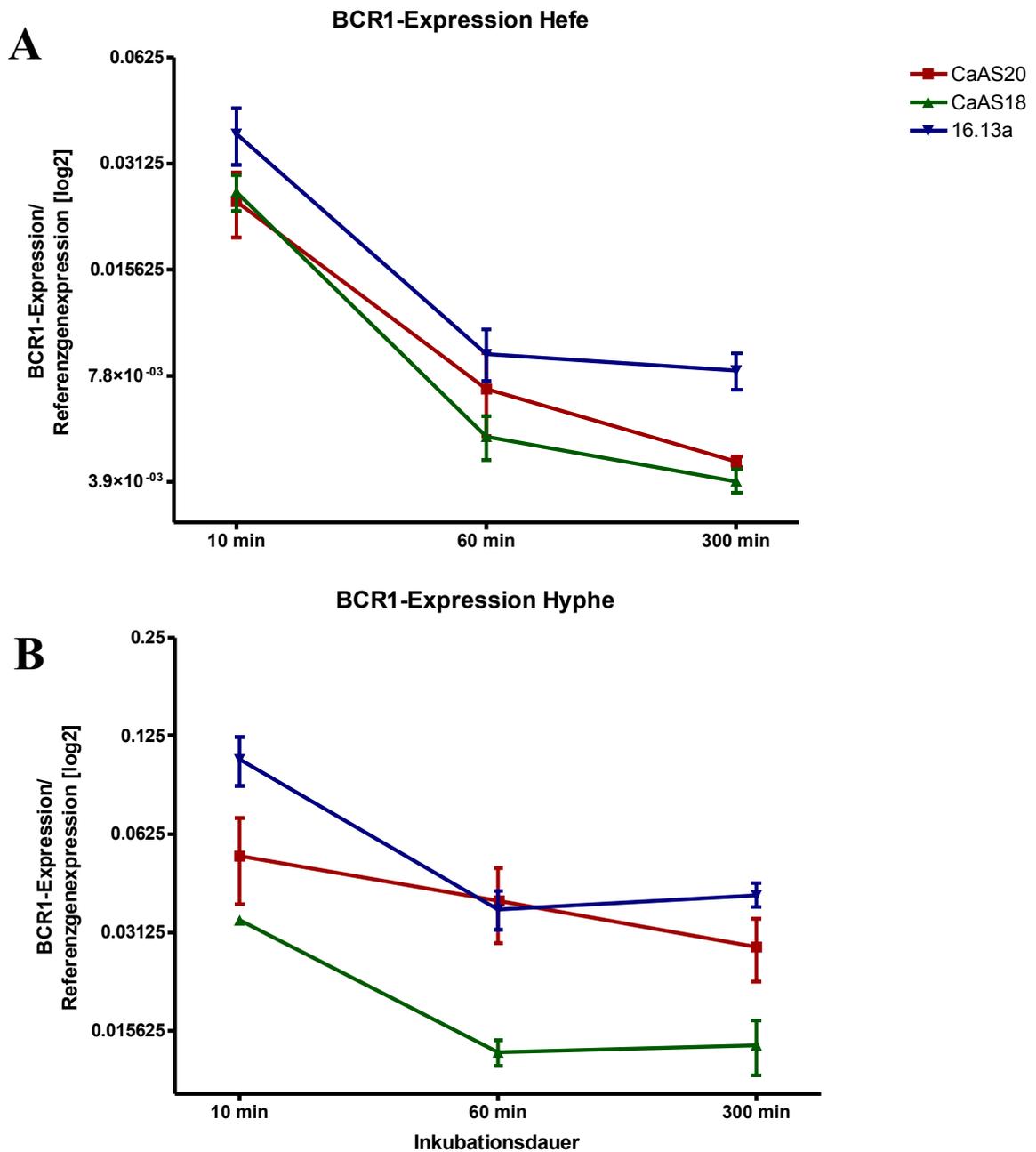


Abb. 3.2.13: BCR1-Expression in CaAS20, CaAS18 und 16.13a in HE-Medium bei 27°C (A) und in HY-Medium bei 37°C (B) als Vielfaches der Referenzgenexpression an einer log₂-Skala dargestellt. Mittelwerte und Standardabweichungen wurden anhand von zwei unabhängigen Experimenten erhoben.

ALS3-Expression

Gemäß den gemessenen *TEC1*- und *BCR1*-Expressionen waren unter hefeinduzierenden Wachstumsbedingungen auch keine relevanten Unterschiede bezüglich der *ALS3*-Transkription zwischen CaAS20 und CaAS18 messbar, so dass die Hefeform des Wildtypäquivalents keine *ALS3*-Expression zu zeigen scheint. 16.13a wies nach 10 min bei bekanntermaßen erhöhter *TEC1*- und *BCR1*-Expression eine doppelt so hohe *ALS3*-Transkription auf. Überraschenderweise war dieser Expressionsunterschied im Gegensatz zu den bestimmten *TEC1*- und *BCR1*-Expressionen im weiteren Zeitverlauf stark rückläufig und nach 300 min quasi nicht mehr nachweisbar (Abb. 3.2.14A). Somit scheinen beide Transkriptionsfaktoren hauptsächlich in der frühen Inkubationsphase ihre Wirkung auf die *ALS3*-Transkription zu entfalten.

Unter hypheninduzierenden Wachstumsbedingungen exprimierten sowohl CaAS20 als auch 16.13a zu allen drei Zeitpunkten deutlich ($p < 0,05$) mehr *ALS3* als CaAS18, im Sinne einer *Tec1p*-abhängigen Geninduktion. Während 16.13a in der frühen Inkubationsphase (nach 10 min) eine 12x höhere *ALS3*-Expression als CaAS20 zeigte, war dies nach 300 min nur noch um den Faktor 1,4 der Fall (Abb. 3.2.14B). Im Bezug auf den zeitlichen Verlauf deutet dies eher auf Parallelen zur *BCR1*-Expression hin.

Insgesamt fiel in CaAS20 und 16.13a unter hypheninduzierenden Bedingungen eine gegenüber der Hefeform völlig andere Expressionsdynamik auf. Beide Stämme zeigten in HY-Medium bei 37 °C eine weitere Steigerung der *ALS3*-Expression innerhalb der ersten 60 min, welche erst im weiteren Verlauf der 300 min Inkubationszeit wieder abfiel. Damit weist *ALS3* im Gegensatz zu *TEC1* und *BCR1* eine verzögerte Induktion auf, wie es für ein *Tec1p*- bzw. *Bcr1p*-abhängiges hyphenspezifisches Gen zu erwarten ist. Die unter Hefebedingungen gemessene *TEC1*- bzw. *BCR1*-Expression in 16.13a scheint hierbei nicht auszureichen, um einen vergleichbaren Effekt auf die *ALS3*-Expression zu erzielen.

Zur besseren Beurteilung der *TEC1*-abhängigen Wirkung auf die Genexpression wurden nochmals speziell die Expressionsverläufe von *TEC1*, *BCR1* und *ALS3* von CaAS20 unter Hyphenbedingungen mit denen von 16.13a unter Hefebedingungen verglichen (Abb. 3.2.15A). Dabei zeigte sich, dass trotz ähnlich hoher *TEC1*-Expression, CaAS20 insbesondere in der späten Inkubationphase eine deutlich höhere *BCR1*- (Abb. 3.2.15B) und *ALS3*-Transkription aufwies (Abb. 3.2.15C). Damit blieb der bei konstitutiver *TEC1*-Transkription zu erwartende Effekt auf *BCR1*- und *ALS3*-Expression aus, was gegen einen direkten Zusammenhang zwischen *TEC1*-Transkription und *BCR1*- bzw. *ALS3*-Expression spricht, so dass neben der Transkriptionsrate noch weitere Faktoren zur Tec1p-abhängigen Genregulation beizutragen scheinen. Damit kann diese Beobachtung eher als Hinweis auf einen kausalen Zusammenhang zwischen *BCR1*-Transkription und *ALS3*-Expression gewertet werden.

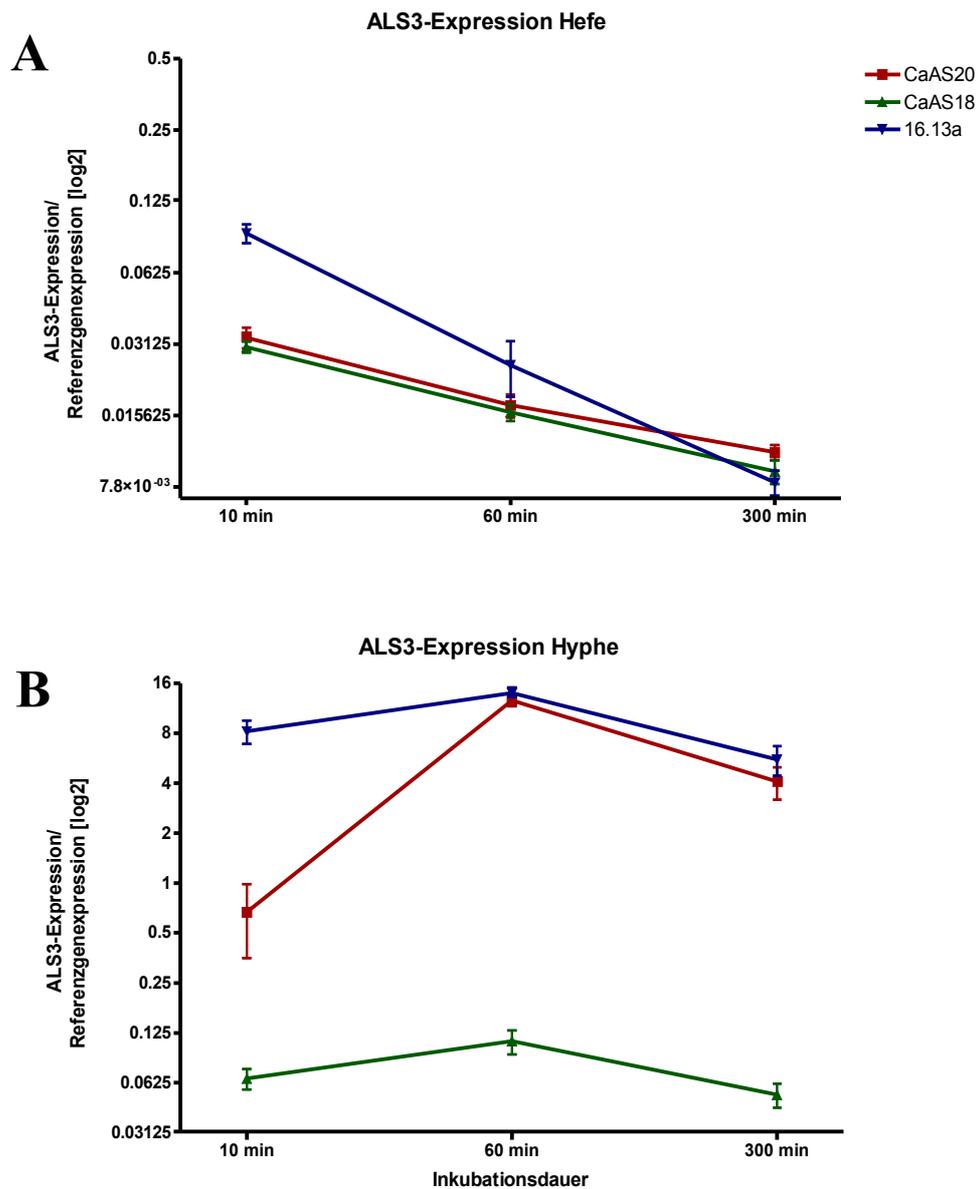


Abb. 3.2.14.: ALS3-Expression in CaAS20, CaAS18 und 16.13a in HE-Medium bei 27°C (A) und in HY-Medium bei 37°C (B) als Vielfaches der Referenzgenexpression an einer log₂-Skala dargestellt. Mittelwerte und Standardabweichungen wurden anhand von zwei unabhängigen Experimenten erhoben.

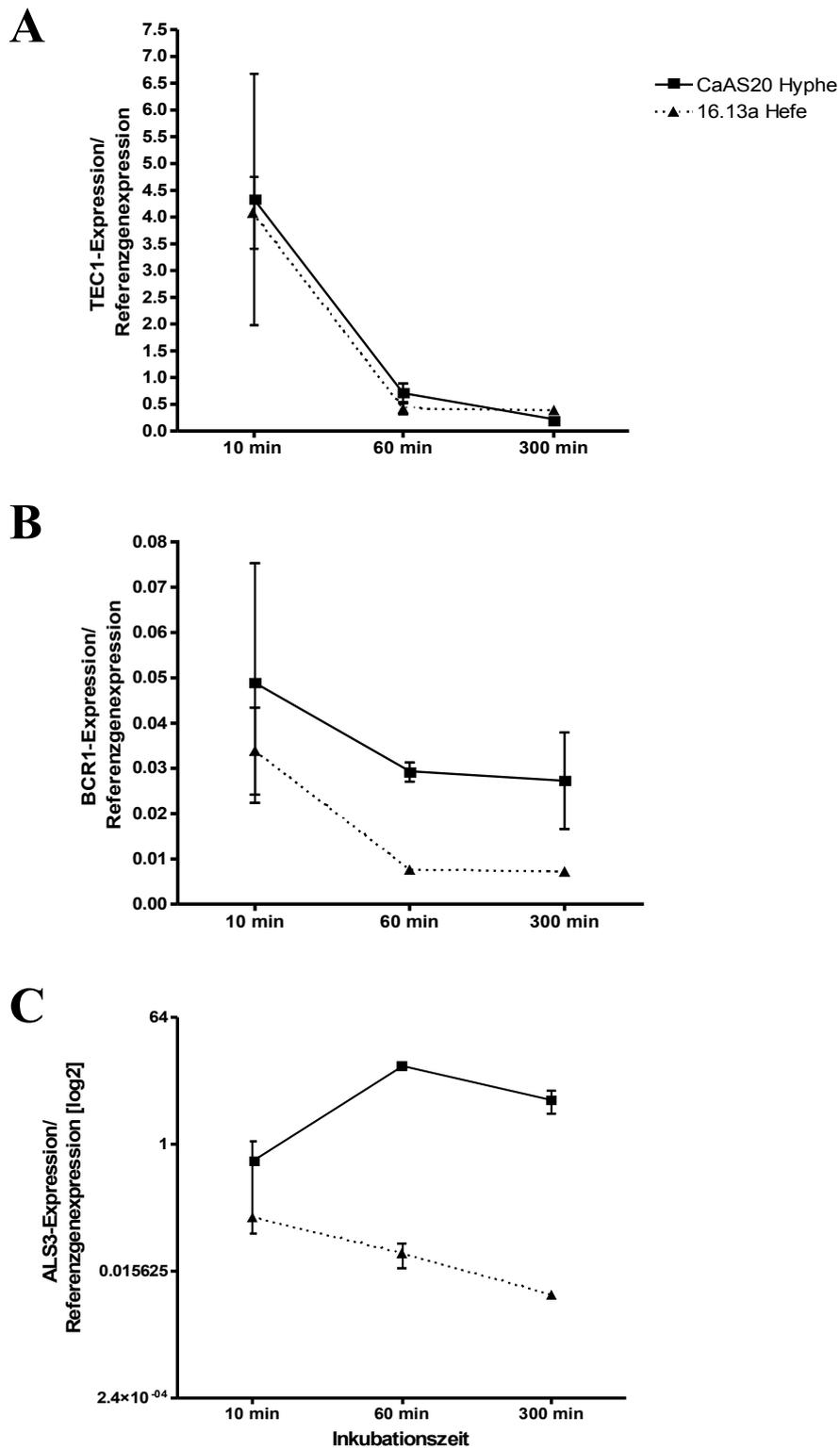


Abb. 3.2.15.: *TEC1*- (A), *BCR1*- (B) und *ALS3*-Expression (C) von *CaAS20* in *HY*-Medium, 37 °C und von 16.13a in *HE*-Medium, 27 °C als Vielfaches der Referenzgenexpression an linearer (A,B) bzw. log₂-Skala (C) dargestellt. Mittelwerte und Standardabweichungen wurden anhand von zwei unabhängigen Experimenten erhoben.

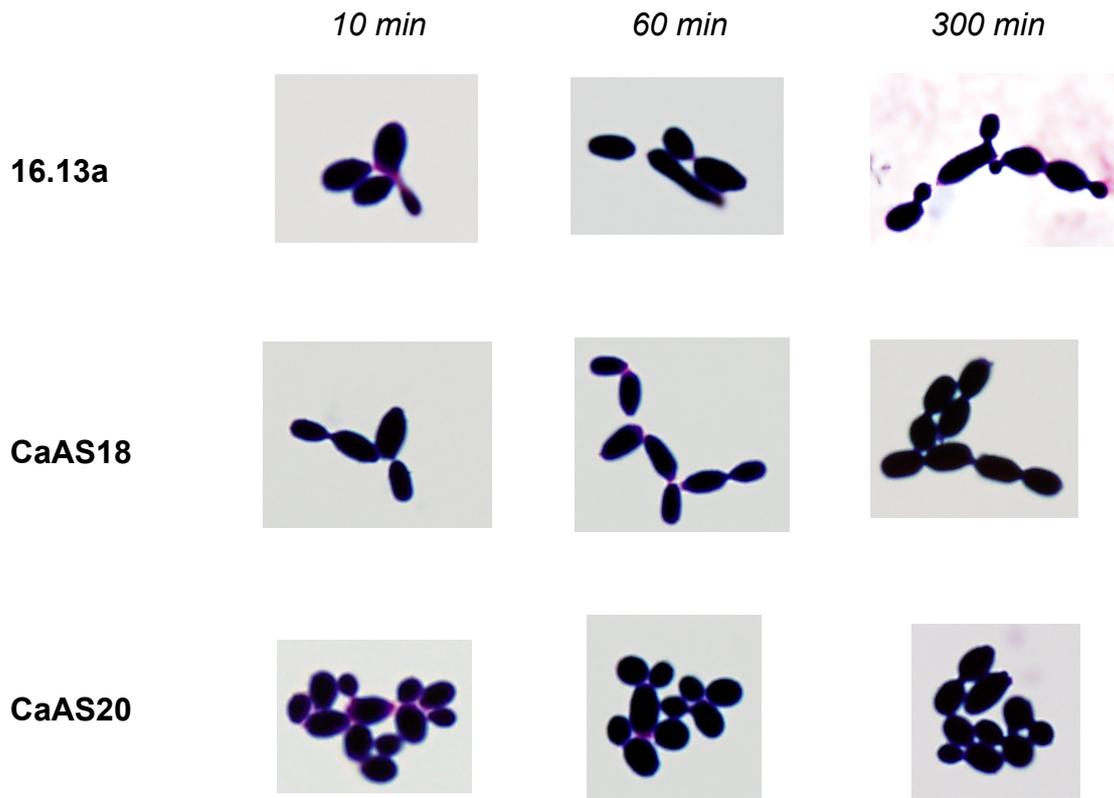


Abb. 3.2.16: Morphologien von 16.13a, CaAS18 und CaAS20 unter Inkubation in HE-Medium, 27 °C. Die Zellen wurden nach 10, 60 und 120 min geerntet, gramgefärbt und bei 100facher mikroskopischer Vergrößerung photographisch dokumentiert.

Zur Beurteilung der phänotypischen Relevanz der gemessenen Genexpressionen wurden die Zellen der entsprechenden Proben auch mikroskopisch dokumentiert (Abb. 3.2.16). Alle drei Stämme zeigten unter Hefebedingungen kein Hyphenwachstum. Unerwarteterweise bildete auch 16.13a lediglich in geringem Grad Pseudohyphen aus. Ansonsten war morphologisch kein Unterschied zwischen den einzelnen Stämmen zu erkennen. Die konstitutive *TEC1*-Transkription an sich scheint demnach noch keinen phänotypisch sichtbaren Morphologiewechsel herbeiführen zu können.

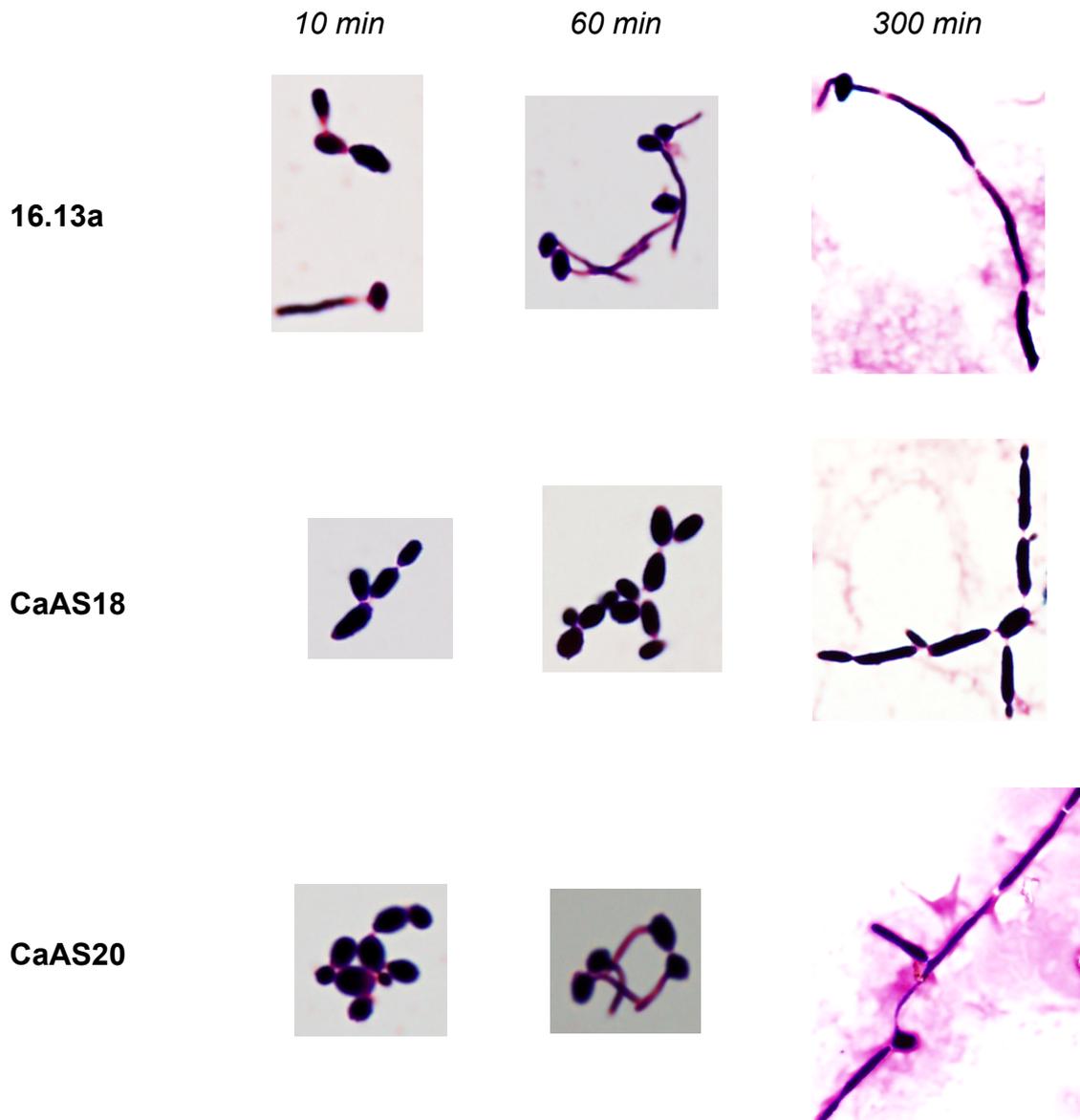


Abb. 3.2.17: Morphologien von 16.13a, CaAS18 und CaAS20 unter Inkubation in HY-Medium, 37 °C. Die Zellen wurden nach 10, 60 und 120 min geerntet, gramgefärbt und bei 100facher mikroskopischer Vergrößerung photographisch dokumentiert.

Unter Hyphenbedingungen kamen die Unterschiede der *TEC1*-Expression phänotypisch deutlicher zum Ausdruck (Abb. 3.2.17). So zeigten nach 60 min über 90% der Zellen von CaAS20 als auch von 16.13a echtes Hyphenwachstum, wobei die Hyphenfortsätze in 16.13a bezüglich der Länge einen Vorsprung gegenüber jenen von CaAS20 zu haben schienen. Auch lagen in 16.13a im Gegensatz zu CaAS20 bereits nach 10 min mehr als 50% der Zellen als Pseudohyphen vor. CaAS18 wuchs vorwiegend in der Hefeform, erst

nach fünf Stunden wiesen mehr als 90% der Zellen Pseudohyphenform auf. Das Pseudohyphenwachstum während der späten Inkubationsphase scheint somit Tec1p-unabhängig zu sein.

3.2.2. Genexpressionsanalyse unter pH-Induktion

Um sicher zu stellen, dass die oben gezeigten Effekte auf *BCR1*- und *ALS3*-Expression tatsächlich auf eine konstitutive *TEC1*-Überexpression zurückgeführt werden können, wurde das Experiment ein weiteres Mal unter pH-abhängiger Hypheninduktion durchgeführt.

Dazu wurden CaAS20, CaAS18 und 16.13a wieder jeweils parallel zum einen in Lee-Medium pH 4,8, zum anderen in Lee-Medium pH 7,0 bei 37 °C inkubiert. Das Ernten der Zellen erfolgte diesmal nach 10, 30, 60, 120 und 300 min. Da eine erste Analyse der Template-Konzentrationen der Referenzgene für *RPP2B* nach 300 min insbesondere für CaAS18 deutlich erniedrigte Werte ergab und damit große Unterschiede zwischen den drei Stämmen vorlagen, wurde darauf verzichtet, die Expressionslevel zum Erntezeitpunkt von 300 min in den Vergleich miteinzubeziehen.

***TEC1*-Expression**

Bei pH 4,8 zeigte 16.13a im gesamten Zeitverlauf eine deutlich höhere *TEC1*-Expression als die beiden anderen Stämme mit ca. 6x bis 25x höheren Expressionsniveaus. Auch in CaAS20 wurde die *TEC1*-Expression pH-abhängig nicht vollständig unterdrückt und war nach 60 min 1,6x höher als in CaAS18 (Abb. 3.2.21A).

Auch bei pH 7,0 wurde in 16.13a im Vergleich zu CaAS20 eine 3- bis 18x höhere *TEC1*-Expression gemessen. CaAS20 wies unter diesen Bedingungen bereits nach 30 min eine gegenüber CaAS18 deutliche *TEC1*-Induktion mit 2- bis 16x stärkerer *TEC1*-Transkription auf (Abb. 3.2.21B). Somit konnte durch die unterschiedlichen pH-Werte zwar eine deutliche Modulation, aber keine

vollständige Inhibition der *TEC1*-Expression erreicht werden. Im Vergleich zu den Vorversuchen unter hefe- und hypheninduzierenden Bedingungen ergab sich eine weniger stark ausgebildete Expressionsdynamik innerhalb der ersten 60 min.

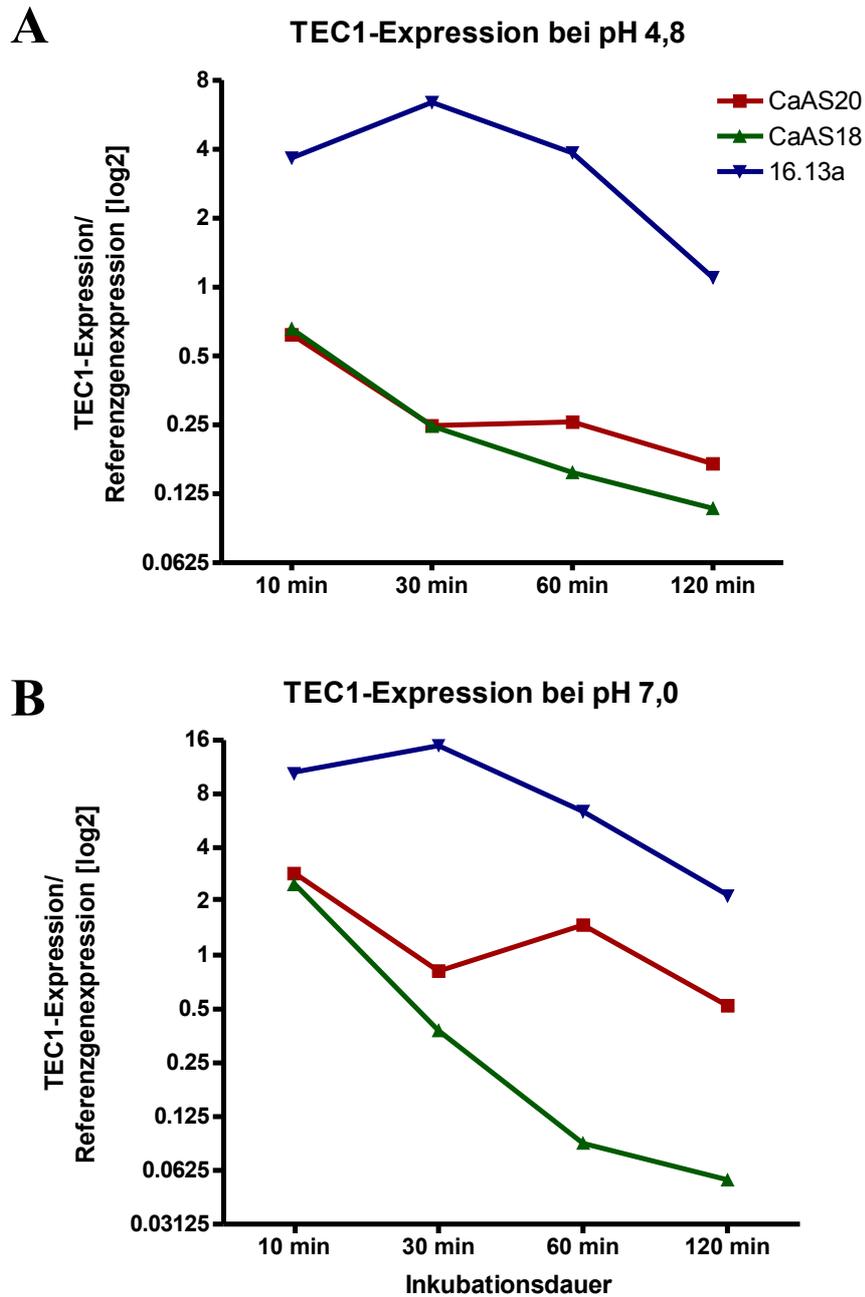


Abb.3.2.21: TEC1-Expression in CaAS20, CaAS18 und 16.13a in Lee-Medium pH 4,8 (A) und pH 7,0 (B); Darstellung an einer log₂-Skala als Vielfaches der Referenzgenexpression

***BCR1*-Expression**

Bei pH 4,8 war die *BCR1*-Expression in 16.13a nur während der ersten 30 min auffallend höher als in CaAS20 oder CaAS18 (Abb. 3.2.22A). Wie bereits in den Vorversuchen beobachtet, war nach 60 min entgegen der Erwartung bei weiterhin deutlichen höherer *TEC1*-Expression kein entsprechender Unterschied in der *BCR1*-Transkription messbar. CaAS20 zeigte bezüglich der *TEC1*- und *BCR1*-Expression ein proportionales Expressionsverhalten.

Auch bei pH 7,0 war die *BCR1*-Expression in 16.13a im Gegensatz zur *TEC1*-Expression nur in der frühen Inkubationsphase (nach 10 min) gegenüber CaAS20 deutlich erhöht (Abb. 3.2.22B). Danach war trotz auffallender Unterschiede in der Expressionsstärke von *TEC1* kein entsprechender Unterschied bezüglich der *BCR1*-Transkription zwischen den beiden Stämmen messbar. In CaAS20 zeigte sich hingegen wieder eine erwartungsgemäße Korrelation zwischen *TEC1*- und *BCR1*-Transkription im Sinne eines nahezu proportionalen Expressionsverhaltens.

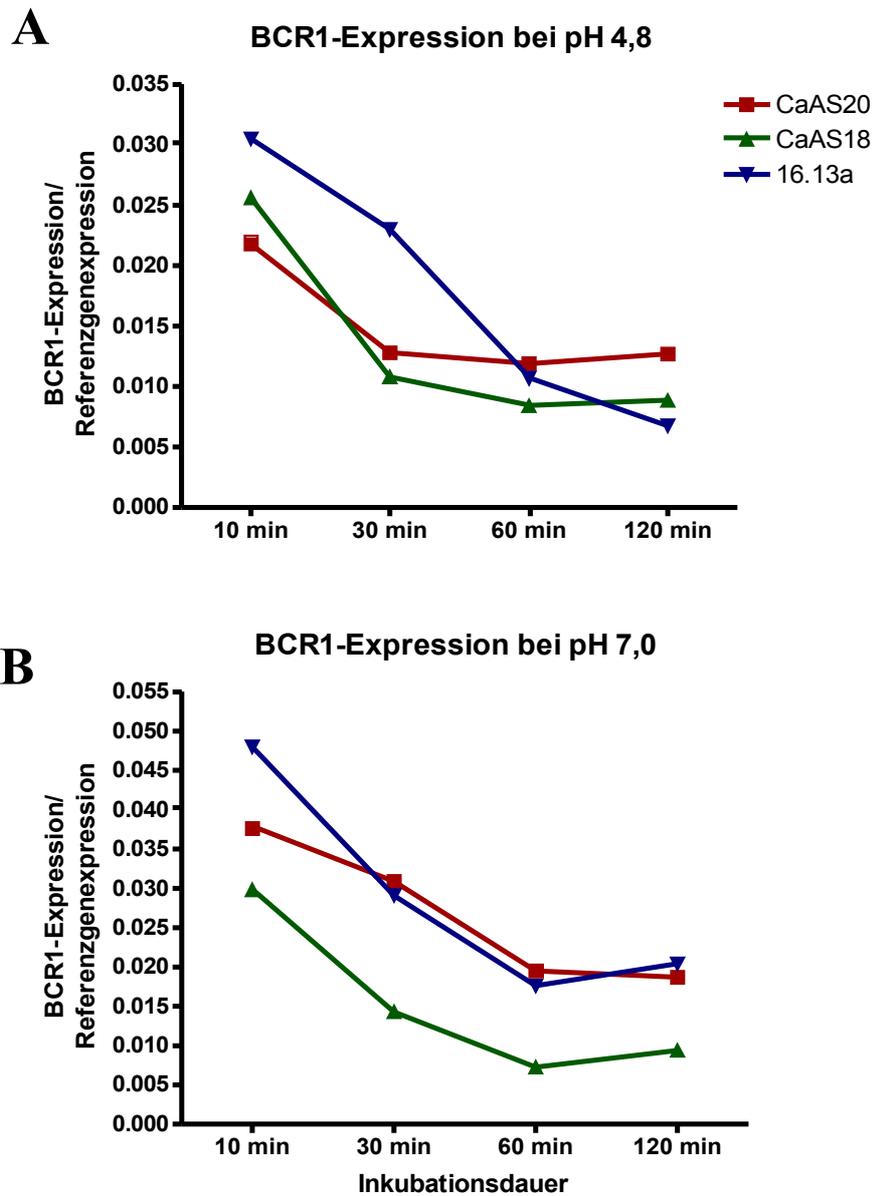


Abb.3.2.22: BCR1-Expression in CaAS20, CaAS18 und 16.13a in Lee-Medium bei pH 4,8 (A) und pH 7,0 (B) bei 37 °C; Darstellung als Vielfaches der Referenzgenexpression an einer linearen Skala.

ALS3-Expression

Bei pH 4,8 zeigte 16.13a eine 2,5- bis 6fach höhere *ALS3*-Expression als CaAS20 (Abb. 3.2.23A). Anders als unter Inkubation in HE-Medium bei 27 °C stellte sich damit eine der gesteigerten *TEC1*-Expression zeitlich verzögert folgende stärkere Transkription des *ALS3*-Gens dar. Eine gleichartige Dynamik war auch in CaAS20 zu beobachten, wobei ein Anstieg der *ALS3*-Expression entsprechend der späteren und schwächeren *TEC1*-Induktion erst nach 30-60 min auffiel. Dies deutet darauf hin, dass die späte Induktion von *ALS3*, wie sie auch bei Inkubation in HY-Medium bei 37 °C gesehen wurde, einerseits von der *TEC1*-Expression, andererseits auch von Temperatur oder Nährstoffen abhängig ist.

Ähnlich stellte sich die Situation bei pH 7,0 dar (Abb. 3.2.23B). Gemäß der unter diesen Bedingungen stärkeren *TEC1*- und *BCR1*-Transkription wurden insgesamt auch höhere *ALS3*-Expressionen in CaAS20 und 16.13a gemessen. Dabei zeigte sich als Folge der höheren *TEC1*-Transkription ein früherer Expressionsanstieg von *ALS3* in CaAS20 als unter Inkubation bei pH 4,8. Dies entspricht der Hypothese, dass Tec1p primär an der Initialisierung hyphen-spezifischer Gene beteiligt ist. 16.13a wies eine gegenüber CaAS20 4- bis 10fach erhöhte *ALS3*-Expression auf, wie es bei einer Überexpression von *TEC1* erwartet wurde. Wie in den Vorversuchen in HE- und HY-Medium nahmen diese Expressionsunterschiede in den späten Inkubationsphasen (nach 120 min) ab, wobei ein Vergleich der Situation nach 300 min leider nicht möglich war.

Damit zeigte sich in allen bisher durchgeführten Versuchen, dass eine Erhöhung der *TEC1*-Transkription lediglich eine leichte Steigerung der *BCR1*-Expression in der frühen Inkubationsphase, aber wiederum einen deutlichen und früheren Anstieg der *ALS3*-Expression zur Folge hat. Dieser transkriptionssteigernde Effekt kann nach längeren Inkubationszeiten von mehr als 120 min kaum noch nachgewiesen werden, so dass ein direkter Zusammenhang

zwischen *TEC1*-Transkription und *BCR1*- bzw. *ALS3*-Expression unwahrscheinlich scheint und die Tec1p-abhängige Genregulation durch weitere möglicherweise posttranskriptionelle Faktoren moduliert wird.

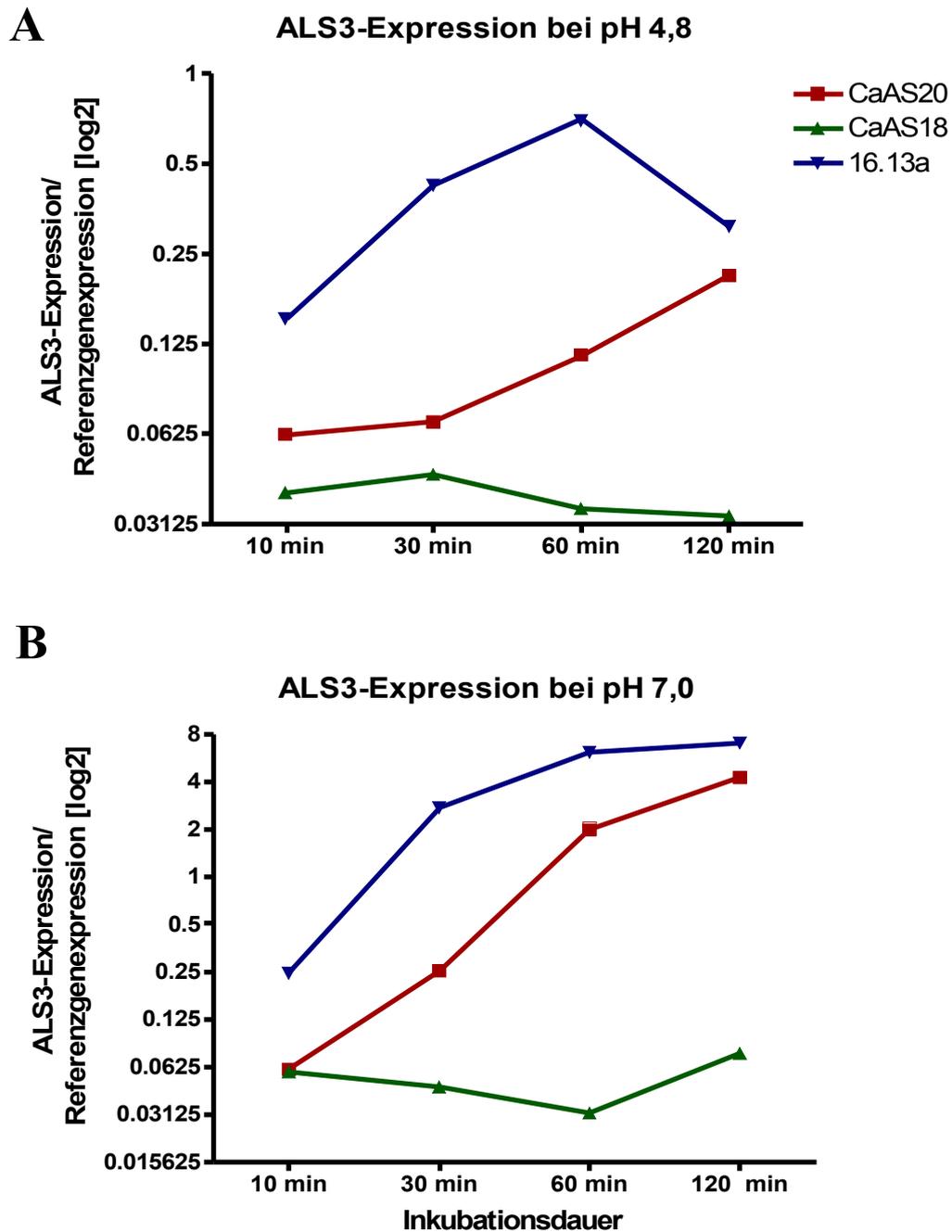


Abb. 3.2.23: *ALS3*-Expression in *CaAS20*, *CaAS18* und *16.13a* in *Lee-Medium* bei pH 4,8 (A) und pH 7,0 (B) bei 37°C; Darstellung als Vielfaches der Referenzgenexpression an einer log₂-Skala

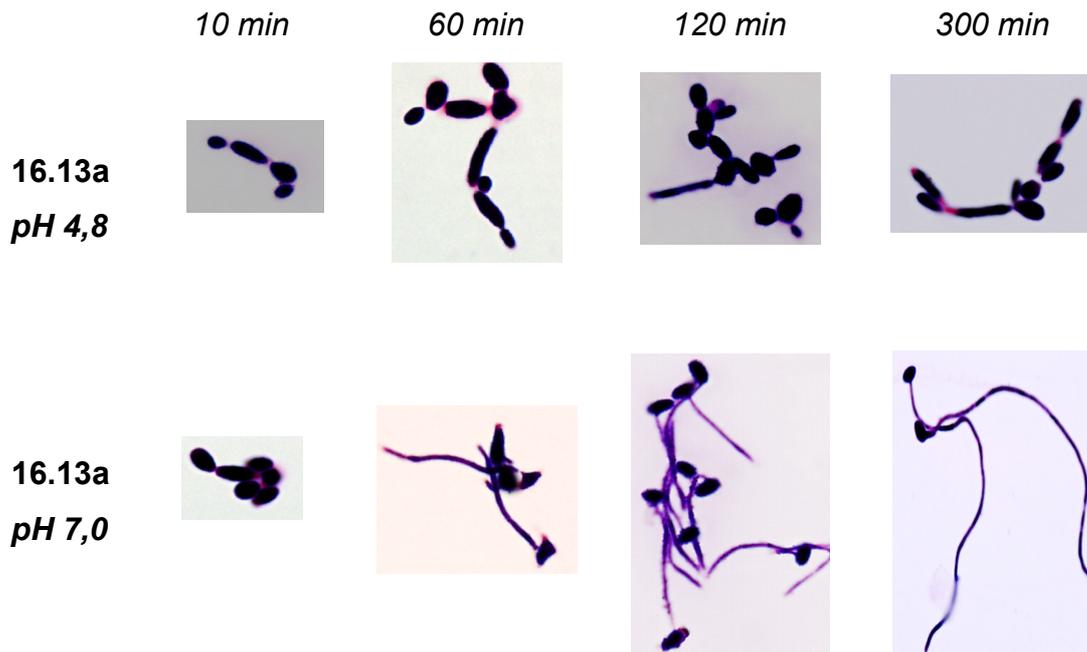


Abb.3.2.24: Morphologie von 16.13a unter Inkubation in Lee-Medium pH 4,8 und pH 7,0 bei 37 °C. Die Zellen wurden nach 10, 30, 60 und 120 min geerntet, gramgefärbt und bei 100facher mikroskopischer Vergrößerung photographisch dokumentiert.

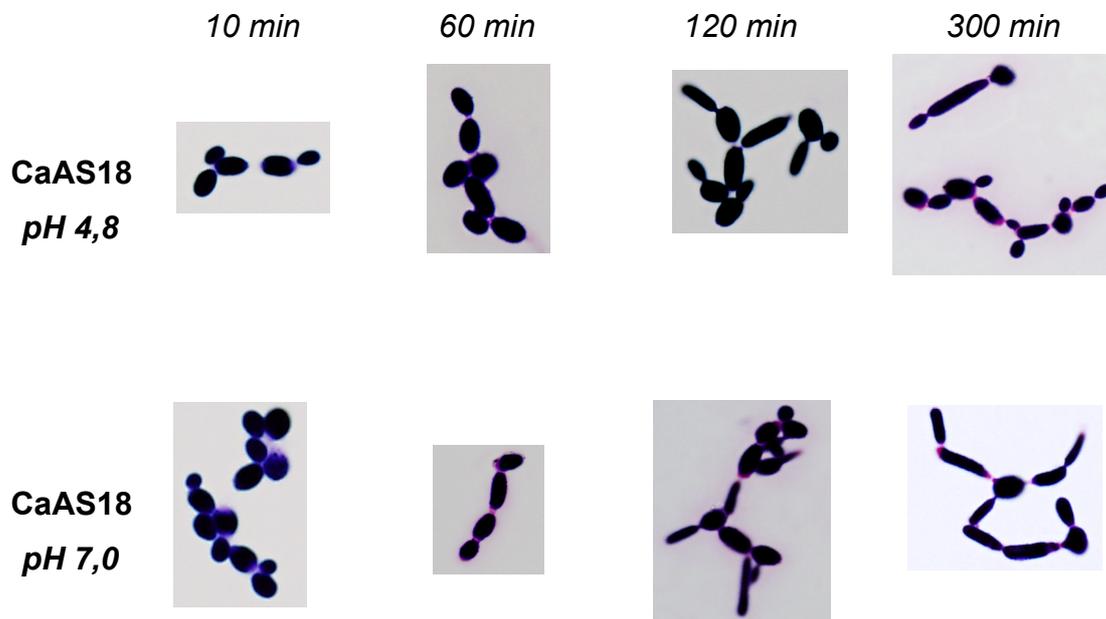


Abb.3.2.25: Morphologie von CaAS18 unter Inkubation in Lee-Medium pH 4,8 und pH 7,0 bei 37 °C. Die Zellen wurden nach 10, 30, 60 und 120 min geerntet, gramgefärbt und bei 100facher mikroskopischer Vergrößerung photographisch dokumentiert.

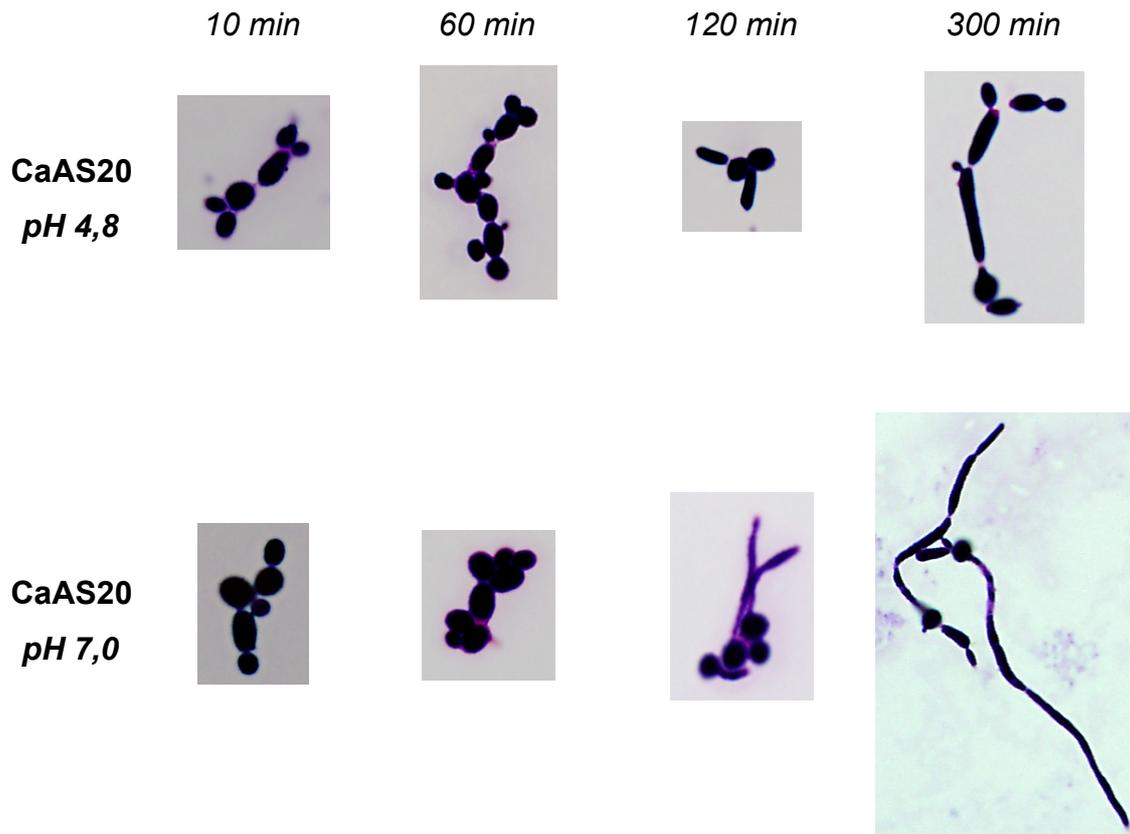


Abb.3.2.26: Morphologie von *CaAS20* unter Inkubation in Lee-Medium pH 4,8 und pH 7,0 bei 37 °C. Die Zellen wurden nach 10, 30, 60 und 120 min geerntet, gramgefärbt und bei 100facher mikroskopischer Vergrößerung photographisch dokumentiert.

Morphologisch zeigten alle drei Stämme in Lee-Medium pH 4,8 keine Hyphenbildung, trotz relativ erhöhter *ALS3*-Expression in 16.13a. Nach 30 min lagen über 80% der Zellen von 16.13a in Pseudohyphenform vor (Abb. 3.2.24). *CaAS20* und *CaAS18* zeigten diese Wachstumsform erst nach 120 min in ca. 85% ihrer Zellen. Somit scheint *Tec1p* auch Einfluß auf die phänotypische Ausbildung von Pseudohyphen zu haben. Da aber auch *CaAS18* zum Pseudohyphenwachstum befähigt ist (Abb. 3.2.25), scheint der Transkriptionsfaktor keine essentielle Rolle in diesem Prozess zu spielen. Bei pH 7 bewirkte die *TEC1*-Überexpression in 16.13a ein bereits nach 60 min sichtbares Hyphenwachstum in ca. 80% der Zellen (Abb. 3.2.24). In *CaAS20* lagen hingegen erst nach 120 min 80% der Zellen in Hyphenform vor (Abb. 3.2.26). *CaAS18* zeigte keinen pH-abhängigen Unterschied in der Morphologie (Abb. 3.2.25). Somit wiederholt sich die Beobachtung, dass eine Erhöhung der *TEC1*-

Expression bei hyphenwachstumbegünstigenden Bedingungen zu einer früheren morphologisch sichtbaren Hefe-Hyphen-Transition führt.

3.2.3. Genexpressionsanalyse in Übernachtskulturen

Um auch den Effekt der *TEC1*-abhängigen Genregulation von *BCR1* und *ALS3* nach Erreichen der stationären Zellwachstumsphase nach mehr als 300 min dauernder Inkubationsphasen beurteilen zu können, wurden CaAS20, CaAS18 und 16.13a an drei verschiedenen Tagen über Nacht (12-20 h) in YNB bei 24 °C und einer Schüttelfrequenz von 130 rpm inkubiert und die entsprechenden Genexpressionen nach der neu etablierten Methodik bestimmt.

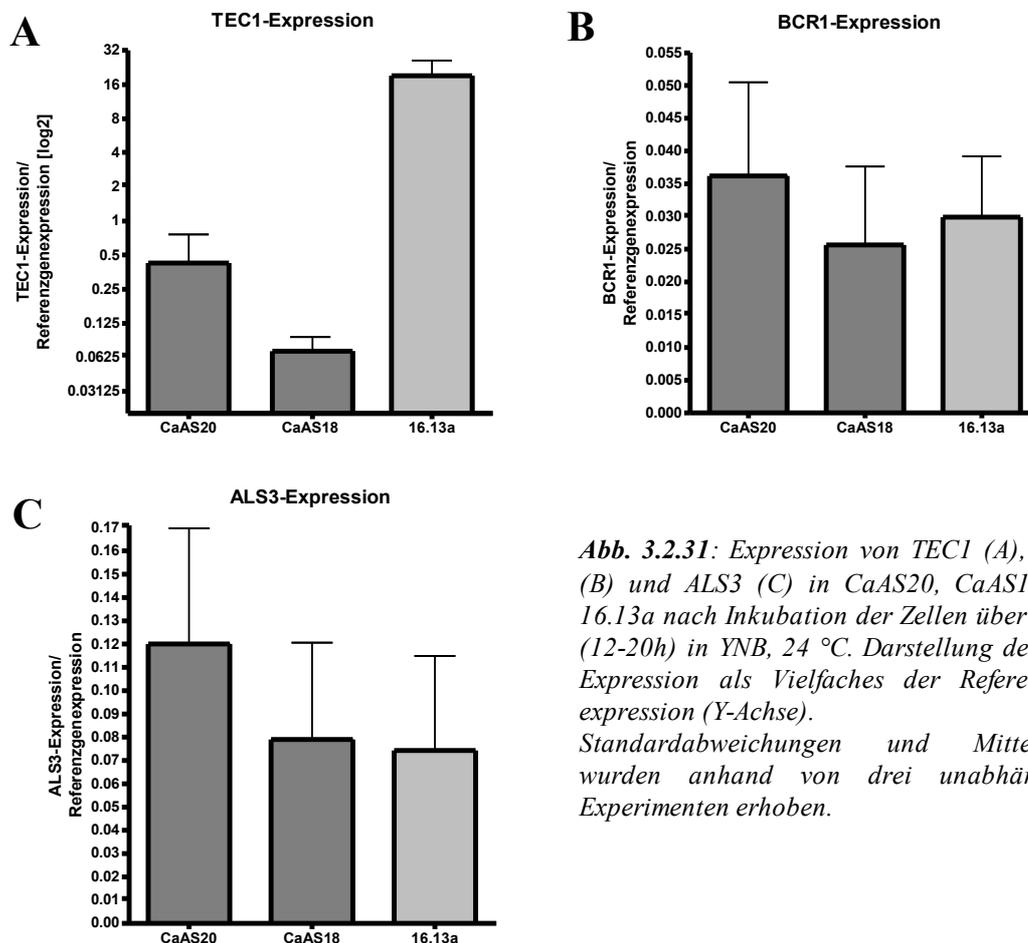


Abb. 3.2.31: Expression von *TEC1* (A), *BCR1* (B) und *ALS3* (C) in CaAS20, CaAS18 und 16.13a nach Inkubation der Zellen über Nacht (12-20h) in YNB, 24 °C. Darstellung der GOI-Expression als Vielfaches der Referenzgenexpression (Y-Achse). Standardabweichungen und Mittelwerte wurden anhand von drei unabhängigen Experimenten erhoben.

Wie in Abb. 3.2.31 dargestellt, zeigte 16.13a auf Grund der konstitutiven *TEC1*-Expression auch unter diesen Bedingungen eine mehr als 30x höhere *TEC1*-Transkription als die beiden anderen Stämme. Auch in CaAS20 fand noch eine gegenüber CaAS18 deutlich stärkere Transkription von *TEC1* statt. Überraschenderweise spiegelten sich diese Expressionsunterschiede weder in der *BCR1*- noch in der *ALS3*-Expression in entsprechender Weise wider, welche in allen drei Stämmen nahezu gleiches Niveau erreichte. Somit scheint in Bezug auf die Genregulation von *BCR1* und *ALS3* nach Erreichen hoher Zelldichten keine relevante Regulation auf der Ebene der *TEC1*-Transkription zu erfolgen.

3.2.4. Expressionsdynamik in CaAS20

Zum besseren Verständnis der Signalwirkungskette zwischen *TEC1*, *BCR1* und *ALS3* sollte nun der zeitliche Verlauf der Expression der drei Gene im wildtypäquivalenten Stamm CaAS20 unter hefe- und hypheninduzierenden Bedingungen engmaschiger analysiert werden.

Den ersten Expressionsanalysen in HE-Medium, 27 °C (Abb. 3.2.12A, Abb. 3.2.13A, Abb. 3.2.14A) und HY-Medium, 37 °C (Abb. 3.2.12B, Abb. 3.2.13B, Abb. 3.2.14B) zufolge wurden die größten dynamischen Änderungen der Expression von *TEC1*, *BCR1* und *ALS3* innerhalb der ersten 60 min vermutet. Zur weiteren Beurteilung dieses kritischen Zeitraumes wurde CaAS20 erneut parallel in HE-Medium, 27 °C und in HY-Medium, 37 °C inkubiert und die Genexpressionen der drei Zielgene nach 10, 20, 30, 45, 60, 90 und 120 min ermittelt. Die Mittelwerte und Standardabweichungen wurden anhand biologischer Duplikate berechnet. Eine Korrelation der Expressionsdynamiken aus beiden Experimenten von *TEC1*, *BCR1* und *ALS3* ergab jeweils Korrelationskoeffizienten von 0,93 bis 0,99, womit eine gute Reproduzierbarkeit gewährleistet war.

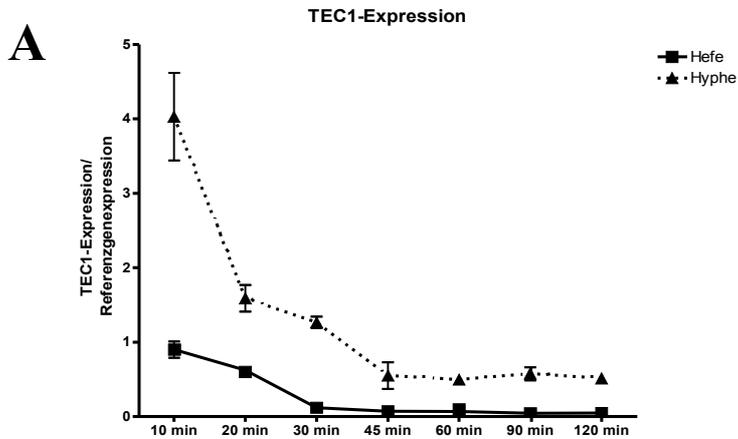
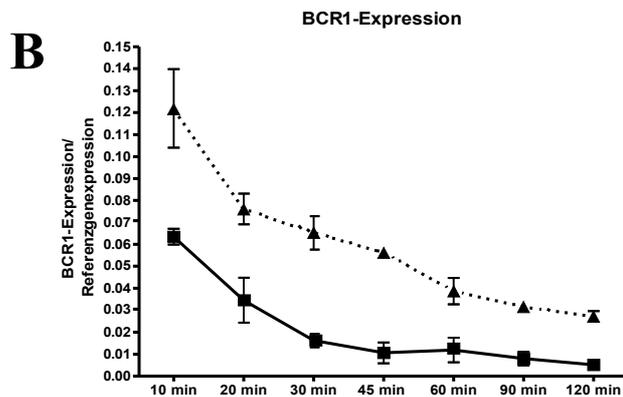
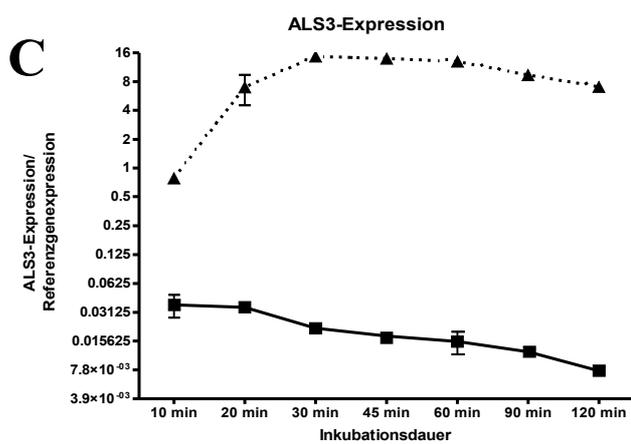


Abb. 3.2.41:
 Genexpression von *TEC1* (A), *BCR1* (B) und *ALS3* (C) in *CaAS20* in HE-Medium bei 27°C (=Hefe) und in HY-Medium bei 37°C (Hyphe); Darstellung als Vielfaches der Referenzgenexpression an linearer (A,B) bzw. log₂-Skala (C) (Y-Achse);



Mittelwerte und Standardabweichungen wurden anhand von zwei unabhängigen Experimenten erhoben.



Unter hyphenwachstuminduzierenden Bedingungen zeigte *TEC1* ein Maximum der Expression innerhalb der ersten 10 min, welche sich nach 30 min bereits 2x niedriger und nach 45 min ohne weitere auffallende dynamische Änderungen manifestierte (Abb. 3.2.41A). Im Vergleich zur *TEC1*-Expression unter Hefebedingungen war der größte quantitative Unterschied während der Frühphase nach 10 min Inkubation zu sehen, wie es für früh induzierte Transkriptionsfaktoren typisch ist und der Rolle von Tec1p als früher Induktor der hyphenspezifischen Gene entspricht. Da auch unter Hefebedingungen eine geringe Erhöhung der *TEC1*-Expression zu Beginn der Inkubation gemessen wurde, kann vermutet werden, dass bereits die Inokulation der Zellen in frischem Medium und in geringer Dichte eine leichte Induktion von *TEC1* bewirken.

Auch *BCR1* wurde am stärksten in der frühen Inkubationsphase nach 10 min unter hyphenwachstuminduzierenden Bedingungen exprimiert, zeigte aber im weiteren Zeitverlauf einen weniger drastischen Rückgang der Expression als *TEC1* (Abb. 3.2.41B). Verglichen mit der Expression unter Hefebedingungen fiel ein konstant erhöhtes Expressionsniveau während der ersten 45 min Inkubation auf, welches erst nach 60 min abnahm. Dies deutet auf eine Tec1p-abhängige Induktion von *BCR1* hin, im Sinne einer der *TEC1*-Transkription zeitlich versetzt folgenden Expressionsdynamik. Ähnlich wie für *TEC1* konnte auch hier unter Hefebedingungen eine initial erhöhte *BCR1*-Transkription gemessen werden, was zum einen als Tec1p-induzierte Wirkung bei gleichzeitig geringfügig erhöhter *TEC1*-Expression, zum anderen als eigenständiger Animpfeffekt im Rahmen einer generellen Transkriptionssteigerung ausgelegt werden kann.

Die *ALS3*-Expression wurde unter hyphenwachstuminduzierenden Bedingungen innerhalb der ersten 30 Minuten um das ca. 17fache gesteigert und zeigte in den folgenden 90 min nahezu ein konstantes Niveau (Abb. 3.2.41C). Dies spricht für eine gegenüber *TEC1* und *BCR1* verzögert folgende Induktion und entspricht der Rolle von *ALS3* als Zielgen von Tec1p bzw. Bcr1p. Da in HY-Medium bei 37 °C bereits nach 10 min deutlich höhere *ALS3*-Expressionen als

in HE-Medium bei 27 °C gemessen wurden, scheint die Wirkung der Transkriptionsfaktoren bereits in dieser Frühphase einzusetzen, um nach ca. 30 min ihr Maximum zu erreichen.

Insgesamt zeigte sich damit in allen durchgeführten Versuchen eine zeitlich eng korrelierende *TEC1*- und *BCR1*-Expression mit einem frühen Expressionsmaximum und einer zeitlich verzögert folgenden Transkriptionssteigerung von *ALS3*. Die höhere *TEC1*-Transkription in der Überexpressionsmutante 16.13a bewirkte initial eine Expressionssteigerung von *BCR1* und *ALS3*, welche im weiteren Zeitverlauf aber nicht konstant blieb. Tec1p scheint folglich primär an der Initialisierung der Expression von hyphenspezifischen Genen, aber weniger an deren Aufrechterhaltung beteiligt zu sein. Da der kurz dauernde transkriptionssteigernde Effekt auf *ALS3* in unmittelbarem zeitlichem Zusammenhang mit der erhöhten *TEC1*-Transkription gesehen wurde, ist diesbezüglich eine direkte Tec1p-Wirkung auf den *ALS3*-Promotor sicherlich nicht auszuschließen. Im weiteren Verlauf der Genexpression zeigt sich dann insbesondere in späten Inkubationsphasen nach mehr als 300 min eher eine Korrelation von *BCR1*- und *ALS3*-Transkription, so dass die Regulation hier vermutlich Bcr1p-abhängig erfolgt. Neben der Regulation auf Transkriptionsebene scheinen noch weitere temperatur- und mediumabhängige Faktoren posttranskriptionell an der Tec1p-abhängigen Genregulation mitzuwirken.

4. Diskussion

Zielsetzung dieser Arbeit war die Etablierung einer validen Messmethodik, um Unterschiede in der Expression von *TEC1*, *BCR1* und *ALS3* in *C. albicans* zuverlässig erfassen zu können. Im zweiten Schritt sollte nach entsprechender Anwendung dieser Methodik durch den Vergleich der Expressionsdynamik der drei Gene zwei Hypothesen evaluiert werden, wonach Tec1p zum einen einen direkten, zum anderen nur einen über die Hochregulation von *BCR1* vermittelten indirekten transkriptionssteigernden Effekt auf *ALS3* hat. Insgesamt war somit eine nähere Charakterisierung der Rolle von *TEC1* als Transkriptionsfaktor möglich.

4.1. Aufbau der Messmethodik

4.1.1. Normalisierung der Expressionsmesswerte

Als zuverlässige und exakte Methode zur relativen Quantifizierung der Genexpression bot sich die quantitative realtime-PCR an. Da hierbei die gemessene Zielgenexpression vom ursprünglichen Gesamt-mRNA-Gehalt der betreffenden Kinetikproben abhängt, wurde eine Normalisierung der Messwerte anhand von HKG-Expressionsmessungen vorgenommen. Allerdings kann auch die Normalisierung mit Hilfe eines solchen internen Kalibrators, der meist auch geringen Regulationsmechanismen unterliegt, zu relativ großen Fehlern in der Expressionsanalyse führen, die sich besonders bei der Bestimmung kleiner Expressionsunterschiede nachteilig auswirken. Eine nachweislich höhere Reliabilität kann durch die Verwendung mehrerer Kalibratoren erreicht werden. 2002 wurde hierzu eine robuste Strategie entwickelt, die zum einen die Auswahl spezifischer Haushaltsgene mit der stabilsten Expression erlaubt, zum anderen die minimale Anzahl interner Kalibratoren für eine akkurate Expressionsanalyse ermittelt (Vandesompele et al, 2002). Dabei wird die Expressionsstabilität eines Gens an Hand eines M-Wertes angegeben. Im Rahmen meiner Arbeit wurden mit dieser Verfahrensweise die für *C. albicans* oft als interne Kalibratoren ange-

wendeten HKG *PMA1*, *RPP2B* und *ACT1* (Nailis et al, 2006) auf ihre Expressionsstabilität getestet. Für die Normalisation der Expressionsmessungen wurden schließlich die zwei HKG *PMA1* und *RPP2B*, welche trotz Variation der Inkubationsbedingungen die geringste Regulation zeigten, verwendet. Bei *Pma1p* handelt es sich um eine membranständige H⁺-ATPase, während *Rpp2bp* ein saures ribosomales Protein der 60S-Ribosomen-Untereinheit darstellt, welches essentiell an translationellen Vorgängen beteiligt ist. *ACT1*, welches das zytoskelettale Protein Beta-Aktin codiert, zeigte ein unterschiedliches Expressionsverhalten in den drei Stämmen CaAS20, CaAS18 und 16.13a. Da *TEC1* eine wichtige Rolle in der Morphogenese von *C. albicans* spielt und Aktin in Hefe- und Hyphenform eine unterschiedliche intrazelluläre Anordnung sowie einen zeitlich veränderten *turn-over* erfährt, war *ACT1* als interner Kalibrator für einen Vergleich der Genexpression zwischen den einzelnen Stämmen ungeeignet.

4.1.2. Reproduzierbarkeit, Validität und Reliabilität

Reproduzierbarkeit, Validität und Reliabilität der neuen Methodik wurden durch Vergleich der Messergebnisse mit denen eines Goldstandards, in diesem Falle des Northern Blots, getestet. Dabei fiel ein positiver Nachweis von *TEC1*-Transkript in Zellen der *TEC1*-Deletionsmutante CaAS18 auf. Da der Stamm dem morphologischen Erwartungsbild entsprach, also auch unter hyphen-induzierenden Bedingungen nicht in der Lage war, Hyphen auszubilden, wurden die falsch positiven Messergebnisse am ehesten auf eine Kontamination zurückgeführt. Trotz zahlreicher Bemühungen, die Prozessierungswege der RNA zur cDNA kontaminationsfrei zu gestalten, konnte das Problem nicht behoben werden. Die *TEC1*-Expressionslevel von CaAS18 stellen folglich das Grundrauschen der Messung dar und dienen dadurch als negativer Referenzwert für die Expressionslevel von CaAS20 und 16.13a. Die scheinbare Dynamik der *TEC1*-Expression in CaAS18 kommt dabei durch die Normalisierung an den HKG-Messwerten zustande.

4.1.3. Evaluieren von Methoden zur RNA-Extraktion und -prozessierung zur cDNA

Um eine prozessbedingte Verminderung von Reliabilität und Reproduzierbarkeit der Ergebnisse möglichst ausschließen zu können, wurden potenzielle Störvariablen wie RNA-Qualität, sowie die Effizienz von DNase- und Reverse Transkriptase-Enzym mit Hilfe der neu etablierten Methode rückwirkend evaluiert. Der Einsatz gleicher Konzentrationen an RNA in die Reverse Transkription besagt wenig über den zu erwartenden cDNA-Gehalt, da die photometrische Konzentrationsmessung von RNA keinerlei Aussagen über deren Qualität noch über den mRNA-Gehalt, welcher gegenüber dem Anteil der rRNA meist verschwindend gering ist, erlaubt. Umgekehrt ermöglicht die Bestimmung der Transkriptmenge der HKG einen Rückschluß auf mRNA-Gehalt und -qualität der betreffenden Probe. Je besser die Qualität der extrahierten RNA, desto größer auch die cDNA-Ausbeute, da mehr intakte mRNA-Stränge vorliegen, die transkribiert werden können. Starke Degradation der RNA führt möglicherweise zu verfälschten Expressionsmessungen und stellt deswegen auch einen wichtigen Qualitätsfaktor in der Anwendung der neuen Messmethode dar. Ein Vergleich von RNA-Proben, welche nach der Methode von Chomczynski (Chomczynski et al, 1993) gewonnen wurden, zeigten im Vergleich zu solchen Proben, deren Extraktion mittels eines Qiagen-Kits erfolgt war, eine bessere Qualität. Hierbei nicht berücksichtigt wurden allerdings die unterschiedlich langen Lagerungszeiten der RNA-Proben, welche möglicherweise auch zu der unterschiedlich starken Degradation beigetragen haben könnten. Dennoch kann durch diese Anwendung erstmals auch das Ausmaß der Degradation näher bestimmt werden, was bei Testung weiterer Extraktionsmethoden im Rahmen zukünftiger Experimente durchaus hilfreich sein würde. Die Effizienz von DNase und Reverser Transkriptase erwiesen sich als ausreichend, wobei durch Verringerung der Konzentrationen an RNA-Template eine weitere Steigerung der Effizienz der Reversen Transkriptase möglich war. Aus diesem Grund wurde bei weiteren Anwendungen der

Methodik maximal 500 ng RNA als Template eingesetzt.

4.1.4. Vorbehandlung der Vorkulturzellen

Als weitere Möglichkeit, Validität, Reliabilität und Reproduzierbarkeit der Methodik zu steigern, wurde versucht, eine Synchronisation der Vorkulturzellen vor Animpfen der Kinetikproben zu erreichen. Ein einmaliges Waschen dieser Zellen mit PBS zeigte diesbezüglich keinen Erfolg, allerdings war in den betreffenden Kinetikproben eine deutlich höhere *TEC1*-Expression innerhalb der ersten 10 min messbar. Dies deutet darauf hin, daß die Zellen der Übernachtskulturen durch einen vermutlich von ihnen selbst sezernierten Faktor in ihrer *TEC1*-Expression gehemmt werden. Durch den Waschgang wird die Konzentration dieses Faktors vermindert, wodurch die Zellen auf die anschließende Hypheninduktion besser ansprechen. Hierfür käme beispielsweise das bekanntermaßen hyphenwachstumshemmende Farnesol in Frage (Sato et al, 2004), welches bei höheren Zelldichten, wie sie auch in den Vorkulturen erreicht werden, verstärkt von den Zellen gebildet wird. Für diese Erklärung würden auch die zu allen Zeitpunkten höhere *ALS3*-Expression in den Kulturen mit den vorbehandelten Zellen sprechen, die auf ein vermehrtes Hyphenwachstum hindeuten. Damit ergeben sich Hinweise, dass durch mehrmaliges Waschen der Vorkulturzellen eine weitere Standardisierung der Genexpressionsbestimmung möglich wäre. Als nächster Schritt zur Synchronisation der Vorkulturzellen könnte auch eine Inkubation bis zum Erreichen einer festgelegten Zelldichte bzw. OD-Wertes getestet werden.

4.2. Anwendung der neuen Messmethodik

4.2.1. *TEC1*-abhängige Genregulation von *BCR1* und *ALS3*

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Zusammenhang zwischen *TEC1*-, *BCR1*- und *ALS3*-Expression in *C. albicans* näher untersucht werden. Hierzu wurden zwei Alternativhypothesen überprüft. Die erste geht von einer allein indirekten,

über Bcr1p vermittelten Tec1p-Wirkung auf *ALS3* aus, nach welcher Tec1p zunächst zur Induktion von *BCR1* und Bcr1p dann zur Induktion von *ALS3* führt. Diesem Modell liegt eine Studie von Argimón et al 2007 zu Grunde, in welcher durch Inaktivierung aller fünf *TEC1*-spezifischen Bindesequenzen im *ALS3*-Promotor keine signifikante Auswirkung auf die *TEC1*-induzierte *ALS3*-Expression gezeigt werden konnte (Argimón et al, 2007). Wie sich jedoch in früheren Forschungsarbeiten unserer Arbeitsgruppe herausstellte, findet eine Tec1p-Bindung auch außerhalb der bekannten *TEC1*-Konsensusbindesequenzen statt, so dass auch eine Bindung an gewisse Variationen dieser Sequenz möglich sind (Sehnal, 2008). Deshalb wird in der zweiten Hypothese neben der Bcr1p-vermittelten auch eine direkte Wirkung von Tec1p auf *ALS3* angenommen.

Der dynamische Verlauf der *TEC1*-, *BCR1*- und *ALS3*-Expression in der *tec1/tec1*-Mutante CaAS18, dem *TEC1*-Wildtypäquivalent CaAS20 und der *TEC1*-Überexpressionsmutante 16.13a wurde deshalb unter verschiedenen Zellkulturbedingungen verglichen. Dabei zeigte die *tec1/tec1*-Mutante gegenüber den anderen beiden Stämmen stets deutlich erniedrigte *BCR1*- und *ALS3*-Expressionslevel. Tec1p ist somit essentiell für die Expression dieser Gene, wie es auch in anderen Studien beobachtet wurde (Argimón et al, 2007). Unter Hypheninduktion waren innerhalb der ersten 10 min in CaAS20 eine hohe *TEC1*-Expression messbar, welche aber innerhalb der ersten 30 min rasch abfiel. Einen ähnlichen, wenngleich abgeschwächten Verlauf zeigte die *BCR1*-Expression, entsprechend eines Tec1p-abhängigen Regulationseffektes. Die *ALS3*-Expression wurde hingegen innerhalb der ersten 30 min im Sinne einer verzögerten Induktion weiter gesteigert und scheint damit erwartungsgemäß am Ende der Tec1p-abhängigen Signalkette zu stehen. Da unter hefewachstum-induzierenden Bedingungen ein Expressionsmaximum aller drei Zielgene innerhalb der ersten 10 min gesehen wurde, ist die Beteiligung eines Animpfeffektes im Sinne eines plötzlichen Konzentrationsabfalls hyphenhemmender Faktoren wie Farnesol durch Überführen der Zellen in frisches Medium bei geringer

Zelldichte nicht auszuschließen. Insgesamt wurde dieser Effekt aber bei deutlichen Unterschieden der Expressionsniveaus und -dynamiken in Hefe- und Hyphenphase eher gering eingeschätzt. Eine Steigerung der *ALS3*-Expression unter erhöhter *TEC1*-Transkription, wie sie in der *TEC1*-Überexpressionsmutante oder unter hypheninduzierenden Bedingungen im *TEC1*-Wildtypstamm stattfand, war stets mit einer ebenfalls erhöhten *BCR1*-Expression assoziiert. Eine endgültige Bestätigung bzw. Ablehnung der Hypothesen ist somit nicht möglich. Da bei deutlich erhöhter *TEC1*-Expression aber bereits in der frühen Inkubationsphase innerhalb der ersten 10 min eine parallele Steigerung der *BCR1*- und *ALS3*-Transkription gesehen wurde, kann eine direkte Tec1p-Bindung im Promotorbereich von *ALS3* mit konsekutiver Geninduktion nicht ausgeschlossen und als wahrscheinlich angenommen werden. Die unter hyphenwachstums-induzierenden Bedingungen beobachtete weitere Steigerung der *ALS3*-Expression, welche zeitlich versetzt zur maximalen *TEC1*- und *BCR1*-Expression innerhalb der ersten 60 min erfolgte, entspricht eher dem Bild einer verzögerten Induktion, wie sie im Rahmen einer Signalwirkungskette *TEC1-BCR1-ALS3* denkbar wäre. Damit würde dieser zweite Anstieg der *ALS3*-Expression auf die transkriptionssteigernde Wirkung von Bcr1p im Sinne eines indirekten Tec1p-Effektes zurückgeführt. Dazu passt auch der Befund, dass in Übernachtskulturen trotz konstitutiver *TEC1*-Überexpression in 16.13a bei gegenüber dem *TEC1*-Wildtypäquivalent nahezu gleich starker Expression von *BCR1* auch keine Unterschiede bezüglich der *ALS3*-Transkription nachweisbar waren. Es zeigte sich in allen durchgeführten Versuchen, dass sich die *BCR1*-Expression nach einer Inkubationsdauer von mehr als 30 min nicht mehr proportional zur Konzentration an *TEC1*-Transkript verhält. So ergab ein Vergleich der Expressionsniveaus des *TEC1*-Wildtypäquivalents unter Hyphenbedingungen und der *TEC1*-Überexpressionsmutante unter Hefebedingungen, dass trotz nahezu gleich starker *TEC1*-Transkription nur in der frühen Inkubationsphase innerhalb der ersten 10 min ein annähernd äquivalenter Effekt auf die *BCR1*- und *ALS3*-Expression erzielt wird. Da allein durch äußere Hypheninduktion in der *tec1/tec1*-Mutante zu keinem Zeitpunkt eine vergleich-

bar hohe *BCR1*-Expression oder *ALS3*-Expression erreicht werden konnte, muß Tec1p dennoch essentiell an der Regulation beider Gene beteiligt sein. Am naheliegendsten ist somit eine auf der Ebene der Posttranskription modulierte Regulation, durch welche Tec1p vor allem in der frühen Inkubationsphase seine transkriptionssteigernde Wirkung gemäß einer Initialisierung der hyphen-spezifischen Genexpression entfaltet. Auch äußere Bedingungen wie Temperatur oder Medium scheinen entscheidend darüber zu sein, wieviel *TEC1*-Transkript tatsächlich in aktives Tec1p überführt wird. Es wird angenommen, dass der Transkriptionsfaktor auf Proteinebene in mehreren Formen vorliegt, welche sich in ihrem Aktivitätsniveau oder in ihrer Bindungsaffinität unterscheiden. Unterstützt wird diese Hypothese durch Ergebnisse früherer Doktorarbeiten unserer Arbeitsgruppe. Hierbei zeigte sich im Rahmen von Analysen der Tec1p-Struktur im Immunoblot stets eine Doppelbande der molekularen Massen 105 kDa und 116 kDa anstelle der errechneten Masse von 81 kDa (Sehna, 2008). Wurde dagegen ein rekombinant in *E. coli* synthetisierte Tec1p in den Immunoblot eingesetzt, so stimmten errechnete und experimentell bestimmte Molekülmasse miteinander überein. Auch *TEC1*-mRNA stellte sich im Northernblot nur als Einzelbande dar. Denkbar sind damit sowohl eine frühe zeitlich begrenzte Aktivierung von Tec1p durch Phosphorylierung oder Glykosylierung, als auch eine frühe Inaktivierung bzw. Abbau von aktivem Tec1p durch Proteasen oder Ubiquitinasen. So weist der Transkriptionsfaktor viele Konsensussequenzen möglicher Phosphorylierungsstellen bekannter Kinasen auf, auch im Bereich der DNA-Binde-Domäne. Besonderer Bedeutung kommt hierbei Yak1p, einer vermutlich durch die Proteinkinase A regulierte Kinase, zu, die nachweislich an der Expressionsregulation hyphenspezifischer Gene beteiligt ist (Goyard et al, 2008). Eine Deletion ihres Genlocus zeigte unter anderem signifikante Auswirkungen auf die *ALS3*-Expression und scheint auch eine zumindest leichte Verminderung der *BCR1*-Expression unter hypheninduzierenden Bedingungen hervorzurufen. Die *TEC1*-Expression dagegen blieb unbeeinflusst, was eine direkte oder indirekte Yak1p-abhängige posttranskriptionelle Modifikation von Tec1p nahe legt. Auch die Protease Cdc4p könnte

eine regulative Funktion bezüglich der Verfügbarkeit von aktivem Tec1p spielen. So konnte Tec1p bereits nachweislich durch von *S. cerevisiae* exprimiertem Cdc4p degradiert werden (Biswas et al, 2007), auch wurden vor allem in Hefezellen von *C. albicans* hohe Aktivitätsraten von Cdc4p beobachtet. Die großen Unterschiede zwischen berechneter und experimentell bestimmter Molekülmasse von Tec1p aus *C. albicans* im Immunoblot weisen jedoch eher auf größere Modifikationen wie Glykosylierung oder Ubiquitinierung hin. Diese schaffen in der Regel die Voraussetzung zur Bildung multimerer Komplexe von Proteinen, wie es z.B. in *S. cerevisiae* der Fall ist: hier wirkt das homologe Tec1p erst nach Dimerisierung mit dem Cph1p-Äquivalent als Aktivator hyphenspezifischer Gene. Während die Dimerbildung mit Cph1p in *C. albicans* mittlerweile als unwahrscheinlich gilt, ist sie dennoch weiterhin für andere Proteine wie Cph2p oder Bcr1p denkbar.

4.2.2. Regulation der ALS3-Expression

Eine von den Inkubationsbedingungen abhängige posttranskriptionelle oder posttranslationelle Modifikation von Tec1p würde auch die großen Unterschiede der Expressionsdynamik von *ALS3* in Hefe- und Hyphenform erklären. Dabei fiel in den Stämmen CaAS20 und 16.13a unter Hyphenbedingungen eine weitere Steigerung der Expression innerhalb der ersten 30 min auf, welche unter Hefebedingungen nicht zu beobachten war.

Gemäß Argimón et al 2007 besitzt der *ALS3*-Promotor zwei essentielle Regionen, über welche die Expression des Gens reguliert wird. Während über die erstere die Induktion vermittelt wird, bewirkt eine Stimulierung der letzteren eine deutliche Steigerung der Expression, wie sie in den Genexpressionsanalysen auch unter Hyphenbedingungen beobachtet werden konnte. Die ersten induzierenden Promotorregion wird im Bereich -471 bis -306 bp, die zweite aktivierende Promotorregion dagegen im Bereich -1438 bis -1049 bp vermutet (Argimón et al, 2007) (Abb. 4.2.21).

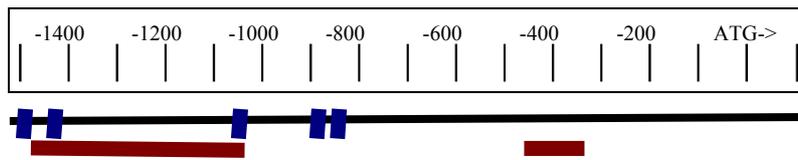


Abb. 4.2.21: ALS3-Promotor mit TCS-Motiven ■ und essentiellen regulativen Regionen ■
 Abgebildet ist die Flankensequenz von 1500 bp oberhalb („upstream“) des ALS3-Gens, dessen Beginn durch das Triplet *ATG* gekennzeichnet wurde. Die essentiellen regulativen Regionen befinden sich im Bereich -471 bis -321 bp und -1438 bis -1049 bp, die Position der TCS-Motive wird auf Höhe von -1499, -1438, -1049, -885 und -842 bp angegeben (Argimón et al, 2007)

TCS-Motive, an denen eine direkte Bindung von Tec1p möglich wäre finden sich nur in der zweiten Region, was eine Tec1p-Bindung innerhalb der ersten Region, z.B. an eine Variation des Bindemotivs aber nicht ausschließt. Die Stimulation der beiden regulierenden ALS3-Promotorregionen könnte durch zwei verschiedene posttranslationell modifizierte Tec1p-Formen, oder aber in unterschiedlicher Weise zum einen durch Tec1p, zum anderen durch Bcr1p vermittelt werden. Dabei scheint der aktive Transkriptionsfaktor, welcher zu einer weiteren Steigerung der ALS3-Expression führt, nur unter hyphen-induzierenden Bedingungen bzw. auch in Lee-Medium bei 37°C vorzuliegen. Die Genexpressionsanalysen von *TEC1*, *BCR1* und *ALS3*, welche im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, weisen dabei eher auf eine initiale ALS3-Induktion durch eine direkte Tec1p-Bindung und eine sekundäre Steigerung der ALS3-Expression durch Bcr1p hin (Abb. 4.2.22).

Diese Konstellation spricht gegen eine Tec1p-vermittelte Transkriptionsaktivierung von *ALS3* über die TCS-Motive, da deren Lokalisation keine Bindung innerhalb der Promotorregion zulassen würde, welche die primäre ALS3-Induktion reguliert. Damit hätten diese Bindesequenzen keine Relevanz bezüglich der Tec1p-Wirkung auf die ALS3-Expression, wie es auch schon *Reporter assays* des ALS3-Gens (Argimón et al., 2007) gezeigt haben. Für Bcr1p wird eine entsprechende Bindesequenz innerhalb der Promotorregion angenommen, welche nach Aktivierung zu einer weiteren Expressionssteigerung von ALS3 führt. Es bleibt weiterhin fraglich, inwieweit Tec1p neben

Bcr1p auch an diesem zweiten Effekt beteiligt ist. So ist nach wie vor eine kooperative bzw. synergistische Wirkung beider Transkriptionsfaktoren möglich. Dabei kommen als potentielle Einflussfaktoren auf die Tec1p-abhängige Wirkung zum einen die Inkubationstemperatur als auch die Nährstoffversorgung mit verschiedenen Aminosäuren in Betracht. Sie beeinflussen möglicherweise über Regulation spezifischer Enzyme die posttranslationelle Modifikation und damit die Menge an aktivem Tec1p- und damit auch Bcr1p-Transkriptionsfaktor. Auch weitere Transkriptionsfaktoren wie Cph1p, die über eine Bindung an die zweite genregulierende Promotorregion zur vollen Expression von *ALS3* beitragen, könnten als mögliche Interaktionspartner von Tec1p eine Rolle spielen.

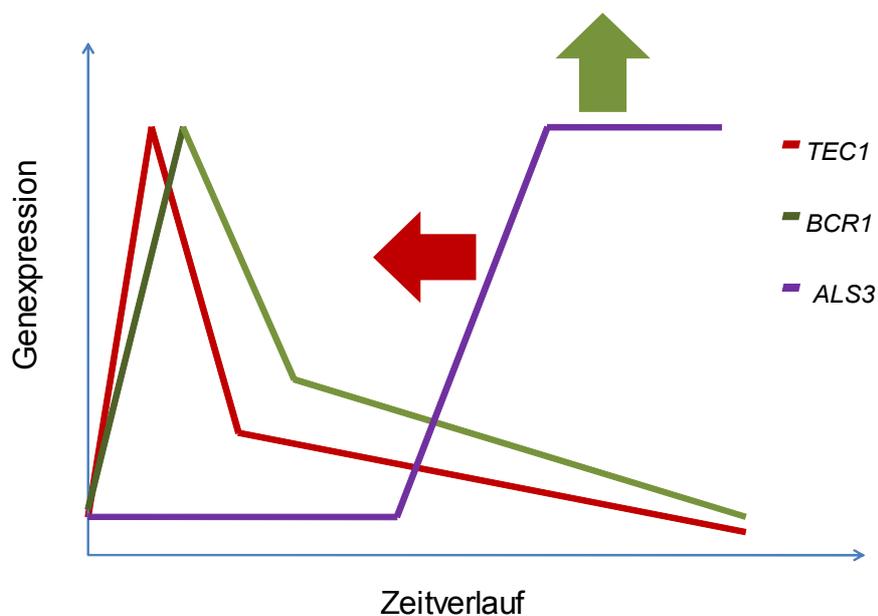


Abb. 4.2.22: Hypothesenmodell zur Regulation der *ALS3*-Expression durch *Tec1p* und *Bcr1p*. Dargestellt wird die Expression von *TEC1*, *BCR1* und *ALS3* während der Hypheninduktion im zeitlichen Verlauf. Es wird vermutet, dass die Initialisierung der *ALS3*-Expression eher *Tec1p*-abhängig (roter Pfeil), die sekundäre Steigerung dieser Expression jedoch eher *Bcr1p*-abhängig (grüner Pfeil) ist.

Inwieweit die verschiedenen Tec1p-Formen eine direkte Wirkung auf die *ALS3*-Expression entfalten, kann allein durch qRT-PCR-Messungen nicht abschließend beurteilt werden. Erschwerend kommt hinzu, dass neben Tec1p vermutlich weitere Faktoren an der Regulation der *ALS3*-Expression beteiligt sind. So enthält die Promotorregion nicht nur expressionsaktivierende, sondern auch expressionsreprimierende Sequenzen, welche durch Nrg1p, Rfg1p und Tup1p stimuliert werden können (Argimón 2007). Damit sind auch komplexe Wechselwirkungen zwischen aktivierenden und reprimierenden Effekten möglich, deren einzelner Beitrag zur Genexpression allein durch Messung des Expressionslevels nicht entschlüsselbar ist. Zur weiteren Hypothesenabklärung wären die Einbeziehung einer *bcr1/bcr1*-Mutante sowie weitere Proteinanalysen von Tec1p in Hefe- und Hyphenform von 16.13a mittels Western Blot nötig.

5. Zusammenfassung

C. albicans ist der häufigste humanpathogene Pilz. Dabei ermöglicht ihm insbesondere seine Fähigkeit zur Ausprägung zweier unterschiedlicher morphologischer Wachstumsformen (Hyphen- und Hefeform) eine spezifische Anpassung an die jeweiligen Umgebungsverhältnisse im Wirt. Zum einen wird durch die Ausbildung von Hyphen eine bessere Adhärenz und auch eine erleichterte Invasion der äußeren Zellbarriere erreicht, zum anderen erfolgt in der Hefeform eine effizientere Dissemination im menschlichen Blutkreislauf. Der Übergang zwischen den verschiedenen Wachstumsformen wird durch ein komplexes Netzwerk verschiedener Signaltransduktionswege reguliert. Eine tragende Rolle kommt hierbei dem Transkriptionsfaktor Tec1p, einem Mitglied der TEA/ATTS-Transkriptionsfaktoren-Familie, zu. Dieser übt einen regulativen Effekt auf zahlreiche hyphenspezifische Gene aus, unter anderem auf *BCR1* und *ALS3*. Dabei ist nach wie vor unklar, durch welche Wechselwirkung auf DNA-Ebene Tec1p diesen Effekt entfaltet. Es sind sowohl eine direkte Bindung über spezifische TCS-Motive als auch indirekte Wirkungen über Induktion anderer Transkriptionsfaktoren denkbar. So geht man zwar davon aus, dass Bcr1p einen direkten Effekt auf die *ALS3*-Expression hat (Argimón et al, 2007), ob dies aber auch für Tec1p zutrifft, oder dessen Wirkung lediglich über Induktion von *BCR1* erfolgt, wird weiterhin kontrovers spekuliert.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde durch Expressionsanalysen der drei genannten Gene unter hefe- und hypheninduzierenden Bedingungen sowie in drei *Candida*-Stämmen mit wildtypischer, fehlender und konstitutiver *TEC1*-Expression eine nähere Charakterisierung dieser Wirkungskette durchgeführt. Hierzu war zunächst die Etablierung einer geeigneten Messmethodik notwendig. Dabei fiel die Entscheidung auf die quantitative realtime-PCR unter Verwendung von Taqman-Sonden. Es wurden verschiedene interne Kalibratoren zur akkuraten Normalisierung der Expressionsmesswerte ausgetestet und zwei davon als fester Standard etabliert. Reproduzierbarkeit,

Reliabilität und Validität der Messergebnisse wurden überprüft und der Einfluß möglicher prozess-bedingter Störfaktoren wie Enzymeffizienzen und RNA-Qualität evaluiert.

Die durchgeführten Expressionsanalysen zeigten, dass eine konstitutive *TEC1*-Expression nur unmittelbar initial innerhalb der ersten 10-30 min zu einer Expressionssteigerung von *BCR1*- und *ALS3*-Expression führte, weswegen eine posttranskriptionelle Modifikation des *TEC1*-Transkripts vermutet wird. Die enge zeitliche Kopplung der erhöhten *TEC1*- und *ALS3*-Expressionen in dieser Initialphase lassen primär auf eine direkte Tec1p-Wirkung auf den *ALS3*-Promotor schließen. Dabei wird auf Grund früherer Proteinanalysen eine Tec1p-Bindung an Sequenzen außerhalb der bisher bekannten *TEC1*-Consensussequenz vermutet. Eine im weiteren Verlauf folgende Steigerung der *ALS3*-Transkription, wie sie insbesondere unter Hyphenbedingungen zu beobachten war, wird dagegen auf Grund der typischen zeitversetzten Dynamik von *TEC1*-, *BCR1*- und *ALS3*-Expression eher als Effekt von Bcr1p und damit indirekter Wirkung von Tec1p angesehen.

6. Literaturquellen

- Andrianopoulos, A., and Timberlake, W.E. (1994) The *Aspergillus nidulans* *abaA* gene encodes a transcriptional activator that acts as a genetic switch to control development. *Mol Cell Biol*, 14, 2503-2515.
- Argimón, S., Wishart, J.A., Leng, R., Macaskill, S., Mavor, A., Alexandris, T., Nicholls, S., Knight, A.W., Enjalbert, B., Walmsley, R., Odds, F.C., Gow, N.A. And Brown, A.J. (2007) Developmental regulation of an Adhesin Gene during cellular morphogenesis in the fungal pathogen *Candida albicans*. *Eukaryotic Cell*, 6, 682-692.
- Basilana, M., Hopkins, J. and Arkowitz, R.A. (2005) Regulation of the Cdc42/Cdc24 GTPase module during *Candida albicans* hyphal growth. *Eukaryot Cell*, 4, 588-603
- Bastidas, R.J., Heitman, J., Cardenas, M.E. (2009) The protein kinase Tor1 regulates adhesin gene expression in *Candida albicans*. *PLoS Pathog*, 5, e1000294.
- Biswas S., Van Dijck, P., Datta, A. (2007) Environmental sensing and signal transduction pathways regulating morphopathogenic determinants of *Candida albicans*, *MMBR*, 71, 348-376.
- Brown, V., Sexton, J.A., and Johnston, M. (2006) A glucose sensor in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell*, 5, 1726-1737.
- Burglin, T.R. (1991) The TEA domain: a novel, highly conserved DNA-binding motif. *Cell*, 66, 11-12.
- Cao, F., Lane, S., Raniga, P.P., Lu, Y., Zhou, Z., Ramon, K., Chen, J. and Liu, H. (2006) The Flo8 transcription factor is essential for hyphal development and virulence in *Candida albicans*. *Mol Biol Cell*, 17, 295-307.
- Chomczynski, P., Sacchi, N. (1993) Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, 162, 156-159
- Davis, D., Wilson, R.B. and Mitchell, A.P. (2000) RIM101-dependant and -independant pathways govern pH responses in *Candida albicans*. *Mol Cell Biol*, 20, 971-978.

- Doedt, T., Krishnamurthy, S., Bockmühl, D.P., Tebarth, B., Stempel, C., Russell, C.L., Brown, A.J.P., and Ernst, J.F. (2004) APSES proteins regulate morphogenesis and metabolism in *Candida albicans*. *Mol Biol Cell*, 15, 3167-3180.
- Ernst, J.F. (2000) Transcription factors in *Candida albicans* – environmental control of morphogenesis. *Microbiology*, 146, 1763-1774
- Feng, Q., Summers, E., Guo, B. and Fink, G. (1999) Ras signaling is required for serum-induced hyphal differentiation in *Candida albicans*. *J Bacteriol*, 181, 6339-6346.
- Fonzi, W.A. and Irwin, M.Y. (1993) Isogenic strain construction and gene mapping in *Candida albicans*. *Genetics*, 134, 717-728.
- Goyard, S., Knechtle, P., Chauvel, M., Mallet, A., Prévost, M.C., Proux, C., Coppée, J.Y., Schwartz, P., Dromer, F., Park, H., Filler, S.G., Janbon, G., and d'Enfert, C. (2008) The Yak1 Kinase is involved in the initiation and maintenance of hyphal growth in *Candida albicans*. *Mol Biol Cell*, 19, 2251-2266.
- Hahn, H., Kaufmann, S. (2004), *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*, Springer Medizin Verlag Heidelberg, 5. Auflage
- Holzapfel, B., Wickert, L. (2007) Die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR). *Biologie in unserer Zeit*, 37, 120-126
- Hudson, D.A., Sciascia, Q.L., Sanders, R.J., Norris, G.E., Edwards, P.J., Sullivan, P.A., Farley, P.C. (2004) Identification of the dialysable serum inducer of germ-tube formation in *Candida albicans*. *Microbiology*, 150, 3041-3049.
- Jahnson, M. (2006) *Gentechnische Methoden: Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor*, Spektrum Akademischer Verlag, 4. Auflage.
- Kadosh, D., Johnson, A.D. (2005) Induction of the *Candida albicans* filamentous growth program by relief of transcriptional repression: a genome-wide analysis. *Mol Biol Cell*. 16, 2903-12.
- Lan, C.Y., Newport, G., Murillo, L.A., Jones, T., Scherer, S., Davis, R.W. and Agabian, N. (2002) Metabolic specialization associated with phenotypic switching in *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99, 14907-14912.

- Lane, S., Zhou, S., Pan, T., Dai, Q. and Liu, H. (2001a) The basic helix-loop-helix transcription factor Cph2 regulates hyphal development in *Candida albicans* partly via TEC1. *Mol Cell Biol*, 21, 6418-6428.
- Lane, S., Birse, C., Zhou, S., Matson, R. and Liu, H. (2001b) DNA array studies demonstrate convergent regulation of virulence factors by Cph1, Cph2 and Efg1 in *Candida albicans*. *J Biol Chem*, 276, 48988-48996.
- Liu, H. (2001) Transcriptional control of dimorphism in *Candida albicans*. *Curr Opin Microbiol*, 4, 728-735.
- Monge, R.A., Roman, E., Nombela, C., and Pla, J. (2006) The MAP kinase signal transduction network in *Candida albicans*. *Microbiology*, 152, 905-912.
- Nailis H, Coenye T, Van Nieuwerburgh F, Deforce D, Nelis HJ. (2006) Development and evaluation of different normalization strategies for gene expression studies in *Candida albicans* biofilms by real-time PCR. *BMC Mol Biol.* , 4; 7-25.
- Nobile, C.J. and 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, F., Phan, Q.T., Edwards, J.E., Filler, S.G. and Mitchell, A.P. (2006) Critical role of Bcr1-dependant adhesins in *C.albicans* biofilm formation in vitro and in vivo. *PLoS Pathog*, 2, e63.
- Pfaffl, Michael Walter (2004) Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung. *Biospektrum*, 10, 92-95.
- Pfaller, M.A., Jones, R.N., Messer, S.A., Edmond, M.B. And Wenzel, R.P. (1998) National surveillance of nosocomial blood stream infection due to *Candida albicans*: frequency of occurrence and antifungal susceptibility in the SCOPE Program. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 31, 327-332.
- Phan, Q.T., Myers, C.L., Fu, Y., Sheppard, D.C., Yeaman, M.R., Welch, W.H., Ibrahim, A.S., Edwards, J.E. jr., Filler, S.G. (2007) Als3 is a *Candida albicans* Invasin that binds to cadherins and induces endocytosis by host cells, *PLoS Biol*, 5, e64.
- Sato, T., Watanabe, T., Mikami, T., and Matsumoto, T. (2004) Farnesol, a morphogenetic autoregulatory substance in the dimorphic fungus *Candida albicans*, inhibits growth through suppression of a mitogen-activated protein kinase cascade. *Biol Pharm Bull*, 27, 751-752.

- Schweizer, A., Rupp, S., Taylor, B.N., Rollinghoff, M. and Schroppel, K. (2000) The TEA/ATTS transcription factor CaTec1p regulates hyphal development and virulence in *Candida albicans*. *Mol Microbiol*, 38, 435-445.
- Schweizer, A. (2003) Die Rolle des TEA/ATTS-Transkriptionsfaktors CaTec1p bei der Hyphenbildung und Virulenz von *Candida albicans*. Dissertation, *Klinische Mikrobiologie, Infektiologie und Immunologie*, FAU Erlangen.
- Schweizer, A. (2000) Expressionsanalyse hyphenspezifischer Gene von *Candida albicans*, Diplomarbeit, Mikrobiologisches Institut, FAU Erlangen
- Sehnal, M. (2008) Struktur und Funktion des TEA/ATTS Transkriptionsfaktors Tec1p von *Candida albicans*, Dissertation, Naturwissenschaftliche Fakultät für Biologie, Chemie und Pharmazie, FAU Erlangen
- Stoldt, V.R., Sonneborn, A., Leuker, C.E. and Ernst, J.F. (1997) Efg1p, an essential regulator of morphogenesis of the human pathogen *Candida albicans*, is a member of a conserved class of bHLH proteins regulating morphogenetic processes in fungi. *Embo J*, 16, 1982-1991.
- Sundstrom, P. (2002) Adhesion in *Candida* spp. *Cell Microbiol*, 4, 461-469.
- Tsong, A.E., Miller, M.G., Raisner, R.M. and Johnson, A.D. (2003) Evolution of a combinatorial transcriptional circuit: a case study in yeasts. *Cell*, 115, 389-399.
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.*, 18, research0034

Internetadressen:

www.candidagenome.org

7. Abkürzungen:

bp	Basenpaare
cAMP	cyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	<i>complementary DNA</i> , DNA-Korrelat der mRNA
Ct	Cycle threshold
DEPC	Diethyl-Pyrocbonat
dNTP	Desoxyribonucleotidtriphosphat 2-Desoxynukleosid-5-Triphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FCS	<i>fetal calf serum</i> (fötales Kälberserum)
GlcNAc	N-Acetylglucosamin
GOI	Gene of interest oder Zielgene, deren Expression analysiert werden soll: <i>TEC1</i> , <i>BCR1</i> und <i>ALS3</i>
HE-Medium	Medium zur Induktion von Hefewachstum (YPD)
HKG	<i>Housekeeping genes</i> = Haushaltsgene
HSG	hyphenspezifische Gene
HY-Medium	Medium zur Induktion von Hyphenwachstum (RPMI+10%FCS)
MAPK	Mitogenaktivierte Proteinkinase
mRNA	<i>messenger RNA</i> (= Boten-RNA)
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> (Pufferlösung)
qRT-PCR	quantitative realtime-PCR
rpm	<i>rounds per minute</i> (Umdrehung pro Minute)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute (Ursprungsort des RPMI-Mediums)
rRNA	ribosomale RNA
u	Units (Einheiten)
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen
YPD	Yeast Extract, Peptone, Dextrose (Vollmedium)

8. Danksagungen:

Als herzliches Dankeschön an alle tapferen Unterstützer hier ein kleiner kreativer Ausbruch als Beweis dafür, dass mich (dank euch!) trotz rezidivierendem Forscherfrust nie der Humor verlassen hat:

Ein Pilz wuchs im Labor
und war dabei nicht fröhlich.
Er kam sich komisch vor-
ganz anders als ein Pilz gewöhnlich.

Auch Zucker und Aminosäuren,
die man ihm zur Verfügung gestellt,
konnten nicht den Gedanken betäuben:
„Mir fehlt doch was in dieser Welt.

Wieso sind meine Zellen alle so rund
und keine länglich und schlank?
Das ist doch gewiss sehr ungesund-
bin ich gar hyphenwachstumskrank?“

Des Pilzens rätselhaften Phänomene
haben einen komplexen Hintergrund:
Man manipulierte unverfroren seine Gene-
jetzt leidet er unter Transkriptionsfaktorenschwund!

Diese künstlerische Anwendung widme ich insbesondere:

- meinen Eltern und meinem Bruder, die mich auch in dieser manchmal schwierigen Zeit klaglos ertragen und immer wieder aufgerichtet haben
- Herrn Dr. med. Klaus Schröppel für endlos große Geduld, konstruktive Kritik, Motivation und treue Betreuung
- Frau Dr. Ulrike Schumacher für Ihre stetige Hilfsbereitschaft und nicht zuletzt für Ihre Funktion als Doktormutter
- Heike Michels, die stets ein offenes Ohr für meine Sorgen und Nöte sowie so manchen weiterführenden Tipp bezüglich der verschiedenen Labortechniken hatte.
- Walid und Anourag für die entspannte und nette Atmosphäre in unserem doch recht engem Laboratorium
- Martin Köberle für das Lösen der vielen hoffnungslos scheinenden computertechnischen Schwierigkeiten
- Helmut Rausch für die oftmals spontane Organisation einer ausreichend großer Anzahl sauberer 50ml-Erlenmeyer-Kolben
- Nadine, Alexandra, Christiane, Moni, Philipp, Magnus, Ulli, Tanja, Susanne, Birgit... ach, eben allen Mitarbeitern der Mikrobiologie, die mich kennen, für ihre Freundlichkeit und Hilfsbereitschaft. Die Zusammenarbeit mit euch hat mir stets Freude bereitet und wird mir in bester Erinnerung bleiben!!

9. Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Claudia Ley
Geburtsdatum: 26.3.1986
Geburtsort: Lahr
Eltern: Michael und Barbara Ley

Schulbildung:

1992 – 1996 Grund- und Hauptschule Ettenheim
1996 – 2005 Städtisches Gymnasium Ettenheim

Studium:

12.10.2005 Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Universität
Tübingen
31.08.2007 Ablegen des 1. Abschnitts der Ärztliche Prüfung
08.05.2012 Ablegen des 2. Abschnitts der Ärztlichen Prüfung

Promotionsarbeit:

Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Thema: „Kausale Zusammenhänge der *TEC1*-, *BCR1*- und *ALS3*-Expression in *Candida albicans*“