

2. Material und Methoden

2.1 Verwendete Mikroorganismen und Zelllinien

In der vorliegenden Arbeit wurden folgende Pilze und Bakterien verwendet:

Tabelle 2.1: Verwendete Mikroorganismen.

Stamm	Genotyp	Referenz
<i>Candida albicans</i>		
SC5314	Wildtyp	(Gillum <i>et al.</i> , 1984)
ATCC10231	Wildtyp	(Kretschmar <i>et al.</i> , 1999a)
ATCC10261	Wildtyp	(Wright <i>et al.</i> , 1992)
C73	Wildtyp (orale Infektion)	J. Naglik, London
C76	Wildtyp (oralen Träger)	J. Naglik, London
C78	Wildtyp (vaginale Infektion)	J. Naglik, London
C81	Wildtyp (vaginale Trägerin)	J. Naglik, London
CAI-4	<i>ura3::imm434/ura3::imm434</i>	(Fonzi und Irwin, 1993)
CAI-4 + Clp10	<i>ura3::imm434/ura3::imm434</i> + Clp10	(Murad <i>et al.</i> , 2000)
$\Delta rim101$	<i>ura3::imm434/ura3::imm434</i> <i>arg4::hisG/arg4::hisG</i> <i>HIS1::his1::hisG/his1::hisG</i> <i>rim101::ARG4/rim101::URA3</i>	(Wilson <i>et al.</i> , 1999)
$\Delta dfg16/DFG16$ (M1129, M1130)	<i>ura3::imm434/ura3::imm434</i> <i>dfg16::hisG-URA3-hisG/DFG16</i>	vorliegende Arbeit
$\Delta dfg16/DFG16$ (M1131, M1132)	<i>ura3::imm434/ura3::imm434</i> <i>dfg16::hisG/DFG16</i>	vorliegende Arbeit
$\Delta dfg16$ (M1133, M1134)	<i>ura3::imm434/ura3::imm434</i> <i>dfg16::hisG/ dfg16::hisG-URA3-hisG</i>	vorliegende Arbeit
$\Delta dfg16$ (M1135, M1136)	<i>ura3::imm434/ura3::imm434</i> <i>dfg16::hisG/ dfg16::hisG</i>	vorliegende Arbeit
$\Delta dfg16$ + Clp10 (M1137, M1138)	<i>ura3::imm434/ura3::imm434</i> <i>dfg16::hisG/ dfg16::hisG</i> + Clp10	vorliegende Arbeit
$\Delta dfg16$ + <i>DFG16</i> (M1139-M1142)	<i>ura3::imm434/ura3::imm434</i> <i>dfg16::hisG/ dfg16::hisG</i> + Clp10- <i>DFG16</i>	vorliegende Arbeit
$\Delta axl1/AXL1$ (M1143, M1144)	<i>ura3::imm434/ura3::imm434</i> <i>axl1::hisG-URA3-hisG/AXL1</i>	vorliegende Arbeit
$\Delta axl1/AXL1$ (M1145, M1146)	<i>ura3::imm434/ura3::imm434</i> <i>axl1::hisG/AXL1</i>	vorliegende Arbeit
$\Delta axl1$ (M1147, M1148)	<i>ura3::imm434/ura3::imm434</i> <i>axl1::hisG/ axl1::hisG-URA3-hisG</i>	vorliegende Arbeit
$\Delta axl1$ (M1149, M1150)	<i>ura3::imm434/ura3::imm434</i> <i>axl1::hisG/ axl1::hisG</i>	vorliegende Arbeit
$\Delta axl1$ + Clp10 (M1151, M1152)	<i>ura3::imm434/ura3::imm434</i> <i>axl1::hisG/ axl1::hisG</i> + Clp10	vorliegende Arbeit
CAI-4 + pGFP	<i>ura3::imm434/ura3::imm434</i> + pGFP	(Fradin <i>et al.</i> , 2005)
CAI-4 + pACT1-GFP	<i>ura3::imm434/ura3::imm434</i> + pACT1-GFP	(Fradin <i>et al.</i> , 2005)
CAI-4 + pACT1- <i>DFG16</i> /GFP	<i>ura3::imm434/ura3::imm434</i> + pACT1- <i>DFG16</i> /GFP	vorliegende Arbeit

Saccharomyces cerevisiae

JS91.15-23 MAT α *ura3 trp1 his3 leu2 can1 MAL3 MAL2* (Schwank *et al.*, 1995)
SUC2

Escherichia coli

TOP10F' F'[*lacIq Tn 10* (TetR)] *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) Φ 80*lacZ* Δ M15 Δ *lacX74 recA1 araD139
 Δ (*ara-leu*)7697 *galJ galK rpsL endA1 nupG* Invitrogen*

Des Weiteren wurden folgende Zelllinien für Untersuchungen der Interaktion mit verschiedenen Pilzstämmen verwendet:

Tabelle 2.2: In dieser Arbeit verwendete Zelllinien.

Zelllinie	Beschreibung	Referenz
CCL-23	HEp-2; cervikale Epithelzellen (<i>Homo sapiens</i>)	American Type Culture Collection
CRL-1658	NIH/3T3; Fibroblasten (<i>Mus musculus</i>)	American Type Culture Collection
J-774A.1	Monozyten-Macrophagen (<i>Mus musculus</i>)	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen

2.2 Verwendete Plasmide und Oligonukleotide

Für Klonierungen, Sequenzierungen und Transformationen wurden folgende Plasmide verwendet:

Tabelle 2.3: In dieser Arbeit verwendete Plasmide.

Name	Rückgrat	Beschreibung	Referenz
pCR2.1-TOPO	pUC18	Vektor zur Klonierung und Sequenzierung von PCR-Fragmenten in <i>E. coli</i> ; kodiert Ampicillinresistenz	Invitrogen
pMB-7	pUC18	Grundvektor für Deletionen mit Hilfe des „URA-Blaster-Protokolls“; enthält <i>URA3</i> mit flankierenden <i>hisG</i> -Sequenzen; kodiert Ampicillinresistenz für Amplifikation in <i>E. coli</i>	(Fonzi und Irwin, 1993)
Clp10	pMB-7	Vektor zur Integration des <i>URA3</i> -Gens am <i>RPS1</i> -Lokus von <i>C. albicans</i>	(Fonzi und Irwin, 1993)
pGFP	Clp10	Enthält <i>GFP</i> aus <i>A. victoria</i> ohne Promotor; Negativkontrolle für <i>GFP</i> -Lokalisation in <i>C. albicans</i>	(Barelle <i>et al.</i> , 2004)
pACT1-GFP	Clp10	Enthält <i>GFP</i> hinter dem <i>C. albicans</i> Actin-Promotor; Positivkontrolle für <i>GFP</i> -Lokalisation in <i>C. albicans</i>	(Barelle <i>et al.</i> , 2004)
pKO-DFG16	pCR2.1-TOPO	Deletionsvektor für <i>DFG16</i> in <i>C. albicans</i>	vorliegende Arbeit
pKO-AXL1	pCR2.1-TOPO	Deletionsvektor für <i>AXL1</i> in <i>C. albicans</i>	vorliegende Arbeit
Clp10-DFG16	Clp10	Vektor für Reintegration von <i>DFG16</i> am <i>RPS1</i> -Lokus in <i>C. albicans</i>	vorliegende Arbeit
pACT1-DFG16/GFP	Clp10	Vektor zur Lokalisationsbestimmung des Fusionsproteins Dfg16/Gfp in <i>C. albicans</i>	vorliegende Arbeit

Für PCR-Amplifikationen und Sequenzierungen wurden folgende Oligonukleotide (Primer) verwendet:

Tabelle 2.4: In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide (Primer).

Name	Sequenz (5' - 3')	Anmerkungen / Referenz
DFG16-Deletion/Retransformation:		
IPF9013-fwd	TAACGAGCTCGGGTTTTGTTAGGACAGC	
IPF9013-rev	ATGTAGCATGCTTCAGGACCTATAATG	
9013-KO-2	TAAT AGATCT AGCATCCACATGGAAACAC	Enthält <i>Bgl</i> II-Restriktionsschnittstelle (fett)
9013-KO-5	AAACT GCAG AAGATGACGATGTGCGAG	Enthält <i>Pst</i> I-Restriktionsschnittstelle (fett)
9013-retrafo-fwd	TGATGACGGAAAAGCAGGAG	
9013-retrafo-rev	TGAGTTTGAAGGGAGAAGGG	
DFG16/GFP-Fusion:		
P-ACT1-fwd	ATCGCT CGAG CTATTAAGATCACCAGCCTC	Enthält <i>Xho</i> I-Restriktionsschnittstelle (fett)
P-ACT1-rev	ACCACCT CTAGA TTTGAATGATATATTTT	Enthält <i>Xba</i> I-Restriktionsschnittstelle (fett)
IPF9013-Fus1	AACCT CTAGA ATGGGCTGTTCTGTCTATATAC	Enthält <i>Xba</i> I-Restriktionsschnittstelle (fett)
IPF9013-Fus2	ACAAG CATGC GCCTTCCTTTCCGGTCGTTTC	Enthält <i>Sph</i> I-Restriktionsschnittstelle (fett)
GFP-1	GCATGCGGTGGTGGT ATGTCTAAAGGTGAA	Enthält <i>Sph</i> I-Restriktionsschnittstelle (fett) und einen 3-fachen Glycin-Linker (kursiv)
GFP-2	ACCAG CTAGC TTATTTGTACAATTC	Enthält <i>Nhe</i> I-Restriktionsschnittstelle (fett)
AXL1-Deletion:		
19813-fwd-SacI	TAAT GAGCTC CAGTATACATCTGTGTGC	Enthält <i>Sac</i> I-Restriktionsschnittstelle (fett)
19813-rev-HindIII	AATA AGCTT GTTGGAAATTAGGTTTCAGG	Enthält <i>Hind</i> III-Restriktionsschnittstelle (fett)
19813-KO-1	ATAT AGATCT TCATGGTTGGTTGTAGTGG	Enthält <i>Bgl</i> II-Restriktionsschnittstelle (fett)
19813-KO-2	ATAT CTGCAG ACCACCATCACCAAGTAC	Enthält <i>Pst</i> I-Restriktionsschnittstelle (fett)
DFG16-Sequenzierung:		
P-9013-3	TTGCATATAAGAGACACGCC	
P-9013-4	TAGGTGGTATATAGAACAGC	Sequenzierung Promotor
Seq1-f	ACCACCTAAATACTGGGGTC	
Seq1-r	TGCTGCCATCAAAACACCGG	Sequenzierung orf
Seq2-f	ATGTGGAGTATCGTGTGTTG	
Seq2-r	CTTAAAAACATCGTCAATGC	Sequenzierung orf
Seq3-f	TAACAACAGTTTGGGAATGG	
Seq3-r	ACAGTAGAACCTACCAAGTG	Sequenzierung orf
Northern- und Southern-Sonden:		
ENA22-fwd	TGGTGTTTGAAGGTAGATCC	
ENA22-rev	TTCATATTCGGGTTTTTGG	Northern-Sonde
PHR1-fwd	AAAGGTGAATATGGTGTGTC	
PHR1-rev	AGTTGCTTTAACTCCAGAGC	Northern-Sonde
PHR2-fwd	TGAATATGGTGCTTACTCCC	
PHR2-rev	CAAGTTGACAGAAACAATGC	Northern-Sonde
RBT2-fwd	ATTGCTAAGAGACTCGGTG	
RBT2-rev	ACAAGAAGCAAATGCAATAG	Northern-Sonde
caActin fwd2	ACCGAAGCTCCAATGAATCCA	
caActin rev	GGATGGACCAGATTCGTCGTA	Northern-Sonde

ICL1fwd	GAGGTGCTGCTGGTATCCAT	Northern-Sonde
ICL1rev	GCTCTACCTCTCATGACGGC	
MLS2fwd	CCTGATAGATCCCAAGTCAC	Northern-Sonde
MLS2rev	GCGGTGGCGGCATCTTCCAT	
MEP2-5'-fwd	CGACGCCCGCTGATACAATTGGGGTATCAGTTGGC	Northern-Sonde
MEP2-3'-rev	CAGGCCCTCGGTACTTTTAGCTTCTCCTGAGTCG	
RPS10-fwd3	ACAACATGGCTGTCGGTAAAAACAAGAGA	Southern-Sonde
RPS10-rev3	TCACCGTGCAAAGCCAATAATGAACC	
IPF9013-PCR-f	CAGAGAAATTCAAACAGCC	Southern-Sonde
IPF9013-PCR-r	TGCCTATTATTGCTAGACCC	

Quantitative RT-PCR:

ACT1-TM-f	GACAATTTCTCTTTTCCAGCACTAGTAGTGA	J. Naglik, London, UK
ACT1-TM-r	GCTGGTAGAGACTTGACCAACCA	
ACT1-TM-P	6FAM - ACTGTAACCACGTTTCAGACAAAATCTTGGACAA- TAMRA	
orf19.6777-TM-f	TTTGATGTGTCTGGACCTGTTC	J. Naglik, London, UK
orf19.6777-TM-r	TTGGTAACTAAAGGCAGCACCT	
orf19.6777-TM-P	6FAM -ACCTGCTCAAGCAAATGTTTGTGTTCT- TAMRA	
DFG16-TM-f	TGATCCCAGTCAGAGAAATTCA	J. Naglik, London, UK
DFG16-TM-r	TATCTGGTCATTGTTTCGTTGC	
DFG16-TM-P	6FAM -CAGCCAATTACAGAATCAAACACAACA- TAMRA	
ECE1-TM-f	GCAACAAGATTAAGGCCAACAT	J. Naglik, London, UK
ECE1-TM-r	CACTGGTGTTCACAATCCATC	
ECE1-TM-P	6FAM -GAACGCCATCTCTCTTGGCATTTTC- TAMRA	
HWP1-TM-f	CTACCCACAACAACCACAAGAA	J. Naglik, London, UK
HWP1-TM-r	GAGGAGGATTGTCAACAAGGAAC	
HWP1-TM-P	6FAM -CTTGCGACAATCCACCTCAACCT- TAMRA	
SAP5-TM-f	CATTGTGCAAAGTAACTGCAACAG	J. Naglik, London, UK
SAP5-TM-r	CAGAATTTCCCGTCGATGAGA	
SAP5-TM-P	6FAM - TCCTCTTTTGTCCACATCACCATCTCTACCA- TAMRA	
PHR1 F	GTTCCAAGAAATTGGTACCTTG	J. Naglik, London, UK
PHR1 R	ACCAAACCGTATTTGTTAGCC	
PHR1 TM	6FAM -ATGACTGATGTTTGGTCCGGAGGTAT- TAMRA	
PHR2 S	CGCTAAGGCTTCTGCTGAATC	J. Naglik, London, UK
PHR2 A	GGTTGGTGGCAAGTTGTAGA	
PHR2 TM	6FAM -TCCTCCATTTCCAGAACCCTTGTCCA- TAMRA	
PMA1-TM-f	TTGAAGATGACCACCCAATCC	(Chau <i>et al.</i> , 2004)
PMA1-TM-r	GAAACCTCTGGAAGCAAATTCCG	
PMA1-TM-P	6FAM - AGATGTCCACGAAAACACTACAAAACACCGTT- TAMRA	
orf19.3428-TM-f	CATCGTCGTATTACGTTTGT	J. Naglik, London, UK
orf19.3428-TM-r	AGAACCAGAATCAAACCGAAA	
orf19.3428-TM-P	6FAM - CTTTTGGATCTAACAATTATTTTCTCCTTTTT- TAMRA	

Vergleichende Genomhybridisierung (CGH):

CA0037-fwd	GCTTATGAACCTGATTTGCC	IPF17652.3
CA0037-rev	TCACCAAACAACGATTTAGC	
CA0069-fwd	TCAAGGCTATTGTAATTCCG	IPF19295.5eoc
CA0069-rev	AATGATTTGACCGTAGTTGG	
CA0074-fwd	AGATGGTTTGGGTGAAGTCG	IFD7
CA0074-rev	CCTTTTCGACAACATCATT	
CA0286-fwd	ACCTGAAATAAAAGCTTCCC	IPF14618
CA0286-rev	AAGGACTTATGTCCAACACG	

CA0405-fwd	AAAGCTAAATTGGCTGAATG	<i>IPF19862.3f</i>
CA0405-rev	CACCTGGTACAAGTGGTTCT	
CA0414-fwd	ACAACACCATATTACCTCCG	<i>IPF4068</i>
CA0414-rev	GAAATTTGTTGTTCTCTGCC	
CA0632-fwd	GTTAGAATCGTCAAACACGC	<i>RPS5</i>
CA0632-rev	CATCCTTCTTCTTGATAGCG	
CA0675-fwd	CGAGTTTCTCGACTATACCG	<i>IPF13098</i>
CA0675-rev	ACCCAAACAAAGTATCCTCC	
CA0679-fwd	CCTGCTGCTAATAGATCTCG	identisch mit CA1852;
CA0679-rev	GTTGTGATCATTTGTATGCG	<i>IPF13885.repeat1.5eoc</i>
CA0780-fwd	AAGCTGAAAAGGATAGAGAG	<i>Cirt1a</i>
CA0780-rev	TTTCGTAATATCCCCTAGTGC	
CA0812-fwd	AGGCATTGATATTGGTATCG	<i>IPF3348</i>
CA0812-rev	GTATAGTATTCGACGCCACC	
CA0930-fwd	ACAAAGTCCAAAAACAGAGC	<i>Zorro1a</i>
CA0930-rev	ACGAGTACATTTGTTCCAGC	
CA1141-fwd	TGGTCAACGAATATTTAATG	<i>IPF17322.5f</i>
CA1141-rev	TTAAATTCATCGAAAGTGGG	
CA1142-fwd	CAATCTGCATTACAACAAGC	<i>IPF9459</i>
CA1142-rev	ATTCCAGGTACAAAACCTTCG	
CA1149-fwd	TGTGACTATTGGAGATTTTG	<i>MET223</i>
CA1149-rev	CGAGTTACCATAATCGATGC	
CA1153-fwd	GCTCTCGATTTATCCTTGAA	<i>IPF10455</i>
CA1153-rev	AGGCATACTCAAGAGCCTTA	
CA1154-fwd	TATTGGAGATTTTGCTCTGC	<i>MET221</i>
CA1154-rev	GTTCTTGTTCAGTCAATGTTT	
CA1195-fwd	TCTTGAAGCACTTGAATGAG	<i>KAR5</i>
CA1195-rev	TTTTGTGAACTGCGATTTTA	
CA1683-fwd	TGGATGATCGATTAGTGAGC	<i>Cirt</i>
CA1683-rev	TTGAACCAATTTTCTCTGG	identisch mit CA0679;
CA1852-fwd	CCTGCTGCTAATAGATCTCG	<i>IPF13885.repeat2.5eoc</i>
CA1852-rev	GTTGTGATCATTTGTATGCG	
CA2216-fwd	CGTTGAACATGAGTTAGTGG	<i>IPF6235</i>
CA2216-rev	GGAATGTCAACCAATCTAGC	
CA2217-fwd	TTTATGTGAATGGAATTTG	<i>POL0</i>
CA2217-rev	ACGAATGCTTTGAAATTTAGC	
CA2329-fwd	AAAATCAACAAAAGAAAACAG	<i>IPF4784</i>
CA2329-rev	TTGTTTGATTTTCAGATTATG	
CA2445-fwd	AGACAAAGATCACAACCTGGC	<i>IPF13885</i>
CA2445-rev	GTAGAATGGAAATAGTGGTG	
CA2546-fwd	TGAACATCCATATCAACCAG	<i>RPC31</i>
CA2546-rev	CATTGAATTTAATTTTGATT	
CA3258-fwd	TGGACTGGTTACTTACCAAT	<i>IFC2</i>
CA3258-rev	AACCGTCGTATGTTGACTTC	
CA3267-fwd	TTCCTAACAAATTTTCGACG	<i>RPS620a</i>
CA3267-rev	GGTGGCTACAGATTGATACC	
CA3268-fwd	TTCCTAACAAATTTTCGACG	<i>RPS620b</i>
CA3268-rev	GGTGGCTACAGATTGATACC	
CA3330-fwd	TTGAATGTTTCTCAGATGCC	<i>POL21.3</i>
CA3330-rev	TATCAATCGGTCTATGTGGG	
CA3331-fwd	TTGGTATATGATCTGGGAGC	<i>POL.3</i>
CA3331-rev	GTGAATATTTTCGCAATGACC	
CA3332-fwd	CGAAAAGATCCAATATACGC	<i>GAG</i>
CA3332-rev	AGAATAATATCATCGTGCTG	
CA3661-fwd	TTAAGCAATTCGAGATAGGG	<i>IPF17991</i>
CA3661-rev	CTCGTCAGAATTTAACTGGG	
CA3984-fwd	AAAATTTGGTCCTATTGACG	<i>HOM2</i>
CA3984-rev	TGACAGCCTAATTTACTGGC	
CA4293-fwd	GCTCCTAATTTAAAAATTCT	<i>IFA8</i>
CA4293-rev	AGGTCCACAAGTTCTAATCG	
CA4303-fwd	GGGACAGATTATGACTTTG	<i>IFB1</i>
CA4303-rev	CTAGATGTTTCAACTTGAAA	
CA4390-fwd	CATCAGGTCTCACTGAAGAA	<i>HOD1</i>

CA4390-rev	TGGATTGGTTTGATTGTTTT	
CA5385-fwd	ATCCAAATCCAAAATACACG	<i>Zorro2b.3f</i>
CA5385-rev	TGTGATGATACATGGAATCG	
CA5522-fwd	TATTGTCTTGGGGTTACTGG	<i>IPF708</i>
CA5522-rev	ACCAGATATCAACCCATACG	
CA5743-fwd	ATTATCAGTCAAAAAGTGGCG	<i>IPF2895</i>
CA5743-rev	GACTTGGATAGTTTAGGAGG	
CA5805-fwd	TTGTTTACCAGGAAAGATGG	<i>IPF4153</i>
CA5805-rev	AATCCTGAAACTCAAAATCG	
CA5810-fwd	GTGTTTTCCCAGTTTTTGGT	<i>IPF4137.3f</i>
CA5810-rev	GACTATAATGCACCACCTCC	
CA5821-fwd	ATTCGCATTCTACTCATCG	<i>PHO81</i>
CA5821-rev	ACATCATCAAATCTCAACCC	
CA5900-fwd	ATAGGGGTGCTAATGGTTTC	<i>IPF2379</i>
CA5900-rev	GCCGTAGAGTCAAACGTAAG	
Sonstige Oligonukleotide:		
M13	GTAAAACGACGGCCAGT	Sequenzierprimer
M13 reverse	GGAAACAGCTATGACCATG	
MTLa-fwd	ACCTGCATGAAGAAACAG	<i>mating type locus a</i>
MTLa-rev	GTGGCTAGGTTGAATTTG	
MTLalpha-fwd	GAATTCACATCTGGAGGC	<i>mating type locus a</i>
MTLalpha-rev	CAAAGCAGCCAACTCAGG	
CA-INT-R	CCTTGGCTGTGGTTTCGCTAGATAGTAGAT	25S Intron Analyse
CA-INT-L	ATAAGGGAAGTCGGCAAAATAGATCCGTAA	
EFB1-fwd	ATTGAACGAATTCCTGGCTGAC	DNA-Kontrolle RT-PCR
EFB1-rev	CATCTTCTTCAACAGCAGCTTG	

2.3 Chemikalien

In der vorliegenden Arbeit wurden Chemikalien von folgenden Anbietern verwendet:

Agilent Technologies:	<i>Low RNA Input Fluorescent Linear Amplification Kit, 6000 RNA Nano Kit</i>
Ambion:	RNase-Cocktail (RNaseA, RNaseT1)
Amersham:	<i>Cyanine 3-dUTP, Cyanine 5-dUTP</i>
BD Bioscience:	Agar, Bacto Pepton, Bacto Agar, Bacto <i>Yeast Extract</i> , Difco <i>Yeast Nitrogen Base</i> ohne Aminosäuren und Ammoniumsulfat (YNB), Difco <i>Yeast Carbon Base</i> (YCB), Difco <i>LB-Broth</i> , Difco LB-Agar, Difco <i>Nutrient Broth</i>
Biochrom:	Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), RPMI-1640 Medium
Braun Biotech:	Glasperlen (0,5 mm)

Fermentas:	dATP, dCTP, dGTP, dTTP, Restriktionsenzyme, <i>GeneRuler</i> DNA-Größenstandards, ProteinaseK, RNaseH, T4 DNA Ligase
Invitrogen:	Anti-Ratte IgM konjugiert mit Alexa Fluor 568, <i>RadPrime DNA Labeling System</i> , <i>TOPO TA Cloning Kit</i> , <i>RNaseOut</i> , Oligo-d(T)-Primer, <i>Superscript II</i> Reverse Transkriptase, <i>Taq</i> DNA-Polymerase
Macherey-Nagel:	<i>Nucleospin Extract II</i> , <i>Nucleo Bond Plasmid DNA Purification</i>
Millipore:	Microcon Zentrifugalfilter YM-30
Oxoid:	Eigelbkonzentrat
Peqlab:	Agarose, <i>peqGOLD RNAPure</i>
Perkin Elmer/NEN:	<i>Cyanine 3-CTP</i> , <i>Cyanine 5-CTP</i>
Promega:	RQ1 DNase
Q-Biogene:	dNTP-Mix
Qiagen:	<i>QuantiTect Probe RT-PCR Kit</i> , <i>RNeasy mini kit</i>
Roche:	Anti-Digoxigenin Antikörper, Blocking-Reagenz, CDP-Star, <i>DIG Easy Hyb</i> , <i>PCR DIG Probe Synthesis Kit</i> , Liquemin N (Heparin), <i>Lumi Film Chemiluminescent Detection Film</i> , Glykogen, Nylonmembranen (positiv geladen)
Schleicher & Schuell:	Sterilfilter (0,2 µm; 0,45 µm), Faltenfilter
TPP:	Zellkulturplatten (6-, 12-, 24-Loch)

Alle weiteren Chemikalien wurden - wenn nicht anders angegeben - von den Firmen Fluka, Merck, Roth oder Sigma bezogen.

2.4 Häufig verwendete Puffer und Lösungen

CitPO ₄ -Puffer (200mM):	200 mM Na ₂ HPO ₄ , 100 mM Zitronensäure
Detektionspuffer:	0,1 M Tris-HCl, 0,1 M NaCl, pH 9,5

Dialysat (Perfusion):	142,5 mM Na ⁺ , 2,9 mM K ⁺ , 109,9 mM Cl ⁻ , 1,5 mM Ca ²⁺ , 0,5 mM Mg ²⁺ , 37 mM HCO ₃ ⁻ , 2,5 mM CH ₃ COO ⁻ , 3,55 mM Glukose
DNA-Ladepuffer (6x):	6 % (w/v) Saccharose, 0,075 % (w/v) EDTA, 0,0025 % (w/v) Bromphenolblau (wahlweise zusätzlich 0,0025 % (w/v) Xylencyanol)
E1:	50 mM Tris, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNaseA
E2:	200 mM NaOH, 1 % (w/v) SDS
E3:	3,2 M K-Acetat, pH 5,5
RNA-Ladepuffer (2x):	40 % (v/v) Formamid, 13 % (v/v) Formaldehyd, 1x MOPS, 16 % (v/v) Stop-Mix (7 % (v/v) Glycerin, 0,1 % (w/v) Bromphenolblau, 0,1 % (w/v) Xylencyanol)
LiAc-Puffer:	100 mM Li-Acetat, 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA
LiCl-Puffer:	4 M LiCl, 20 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA
Lysis Mix:	2 % (v/v) Triton X-100, 1 % (w/v) SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA
Maleinsäurepuffer:	0,1 M Maleinsäure, 0,15 M NaCl, pH 7,5 mit NaOH (fest)
MOPS (10x):	200 mM MOPS, 50 mM Na-Acetat, 10 mM EDTA, pH 6,8
PBS:	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na ₂ HPO ₄ , 2 mM KH ₂ PO ₄
PEG/LiAc-Puffer:	50 % (v/v) PEG 4000 in LiAc-Puffer
ProteinaseK-Puffer:	30 mM Tris-HCl, 0,005 % (v/v) Triton X-100, 5 % (v/v) Tween 20, 1 M Guanidin-HCl
RF1:	30 mM K-Acetat, 100 mM RbCl ₂ , 10 mM CaCl ₂ , 50 mM MnCl ₂ , 15 % (v/v) Glycerin, pH 5,8 mit Essigsäure
RF2:	10 mM MOPS, 10 mM RbCl ₂ , 75 mM CaCl ₂ , 15 % (v/v) Glycerin, pH 5,8 mit NaOH
SSC (20x):	0,15 M NaCl, 15 mM Na-Acetat, pH 7,0
TAE (1x) :	40 mM Tris-Acetat, 1 mM EDTA
TBE (0,5x):	45 mM Tris-Borat, 1 mM EDTA
TE (10x):	10 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl, pH 7,4
TEN:	40 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl, pH 7,5
Waschpuffer:	0,1 M Maleinsäure, 0,15 M NaCl, pH 7,5; 0,3 % (v/v) Tween 20

2.5 Medien

Für Arbeiten mit *Candida albicans* wurden in dieser Arbeit die unten aufgeführten Medien verwendet. Für Festmedien wurden in der Regel 2 % Agar (Komplexmedien) bzw. 2 % Bacto-Agar (Definierte Medien) zugefügt. Wenn nicht anders angegeben handelt es sich bei den Prozentangaben um Gewichtsprozent vom Volumen (w/v). Die Hefe-Stickstoffbasis (YNB) wurde ohne Aminosäuren und Ammoniumsulfat verwendet.

BSA:	1,17 % YCB (enthält 1 % Glukose), 1 % Glukose, 0,5 % Rinderserumalbumin (BSA; aus 10 %iger filtersterilisierter Stammlösung nach dem Autoklavieren hinzugeben)
Eigelbagar:	4 % Glukose, 1 % Pepton, 5,85 % NaCl, 0,06 % CaCl ₂ , 10 % Eigelbkonzentrat (steril, nach Autoklavieren zugeben)
GlcNac:	0,5 % Ammoniumsulfat, 0,02 % Magnesiumsulfat-Heptahydrat, 0,5 % NaCl, 0,001 % Biotin, 4 mM N-Acetyl-D-Glukosamin (GlcNac)
Lee's:	1,27 % Salz-Mix (0,5 % (NH ₄) ₂ SO ₄ , 0,02 % MgSO ₄ ×7H ₂ O, 0,25 % K ₂ HPO ₄ , 0,5 % NaCl), 0,447 % L-Aminosäure-Mix (0,05 % Alanin, 0,13 % Leucin, 0,1 % Lysin, 0,01 % Methionin, 0,007 % Ornithin, 0,05 % Phenylalanin, 0,05 % Prolin, 0,05 % Threonin), 1,25 % Glukose, 0,1 Vol.-% Biotin-Stammlösung (0,001 %), 0,1 Vol.-% Arginin-Stammlösung (400 µM), 0,1 Vol.-% Spurenelemente I (1 M MgCl ₂ , 1 M CaCl ₂), 0,1 Vol.-% Spurenelemente II (0,2 mM ZnSO ₄ , 1 mM FeCl ₃ , 0,25 mM CuSO ₄), pH 4,5 bzw. pH 6,5
Low-P _i :	2 % Glukose, 0,735 % Natriumcitrat, 10 % (v/v) 10×P _i -reduzierte YNB-Lösung, 20 % (v/v) 0,1 M KCl-Lösung 0,075 % (v/v) 0,2 M KH ₂ PO ₄ -Lösung
Mpro:	0,1 % Prolin, 0,17 % YNB, 2 % Glukose
SD:	0,17 % YNB, 0,5 % Ammoniumsulfat, 2 % Glukose
SDA:	1 % Pepton, 4 % Glukose

SD-FOA:	0,17 % YNB, 0,5 % Ammoniumsulfat, 2 % Glukose; 0,1 % 5-Fluoroorotsäure (FOA), 0,168 Vol.-% Uridin-Stammlösung (15 mg/ml)
SD-Glutamat:	0,17 % YNB, 1,12 % L-Glutamat, 2 % Glukose
SD-Glutamin:	0,17 % YNB, 0,56 % L-Glutamin, 2 % Glukose
Serum:	5-20 % steriles fötales Kälberserum in H ₂ O
SLAD:	0,67 % YNB, 0,07 % Ammoniumsulfat, 2 % Glukose
Spider:	1 % Mannitol, 1 % <i>Nutrient Broth</i> , 0,2 % K ₂ HPO ₄ , 1,35 % Agar
YPD:	1 % Hefeextrakt, 1 % Pepton, 2 % Glukose
YPS-Agar:	1 % Hefeextrakt, 1 % Pepton, 2 % Saccharose, 1 % Agar

Für Tropftests wurde das SD- bzw. YPD-Medium entsprechend den Angaben im Ergebnisteil supplementiert oder es wurden die entsprechenden Komponenten wie z.B. die Kohlenstoffquelle ausgetauscht.

Zur Untersuchung des Einfluss des pH-Werts wurden die entsprechenden Medien mit 150 mM HEPES gepuffert und auf den gewünschten pH-Wert eingestellt.

2.6 Mikrobiologische Arbeitsmethoden

2.6.1 Lagerung von Mikroorganismen

Die Lagerung von Mikroorganismen (*C. albicans*, *S. cerevisiae*, *E. coli*) erfolgte für kurze Zeiträume auf Festmedien bei 4 °C. Eine Langzeitlagerung erfolgte in Flüssigmedium mit 50 % (v/v) Glycerin bei -70 °C.

2.6.2 Anzucht von *E. coli*

Die Anzucht von *E. coli* erfolgte bei 37 °C auf LB-Agar bzw. in LB-Flüssigmedium (LB-Broth) bei 180 U/min. Zur Selektion von plasmidtragenden Stämmen wurde dem Medium 100 µg/ml Ampicillin zugesetzt (LB_{Amp}). Sollte gleichzeitig das Blau/Weiß-Selektionssystem des pCR2.1-TOPO-Vektors genutzt werden, so wurde dem Medium zusätzlich Isopropylthiogalactosid (IPTG) in einer Konzentration von 0,2 mM

und X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactopyranosid) in einer Konzentration von 0,1 mM zugegeben (LB_{Amp/X-Gal}).

2.6.3 Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen für Transformationen

Die Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen zur Transformation erfolgte nach der Methode von Hanahan (Hanahan, 1983). Dazu wurde eine Einzelkolonie über Nacht in 1 ml LB-Broth bei 37 °C und 180 U/min angezogen. Mit 500 μ l dieser Vorkultur wurden 50 ml frisches LB-Medium angeimpft und bei 37 °C und 180 U/min bis zu einer OD₅₇₈ von 0,2-0,4 inkubiert. Die Kultur wurde für 10-15 min auf Eis gekühlt und anschließend für 15 min bei 4 °C und 4.000 U/min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 18 ml RF1 resuspendiert und für weitere 30 min auf Eis gekühlt. Nach erneuter Zentrifugation bei 4 °C und 4.000 U/min wurde das Pellet in 4 ml RF2 resuspendiert, aliquotiert (100 μ l Aliquots) und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung der kompetenten Zellen erfolgte bei -70 °C.

2.6.4 Anzucht von *C. albicans* und *S. cerevisiae*

C. albicans-Stämme wurden auf den diversen Festmedien bei 30 °C oder 37 °C inkubiert. Die Anzucht in Flüssigmedien erfolgte bei 30 °C oder 37 °C bei 180 U/min. Die Anzucht von *S. cerevisiae* erfolgte bei 30 °C auf YPD-Agar bzw. in YPD-Flüssigmedium bei 180 U/min.

Für eine Semisynchronisation und in Lee's-Medium (pH 4,5) erfolgte zunächst eine Anzucht bei 25 °C und 180 U/min gefolgt von einer Inkubation bei 37 °C (in Lee's-Medium bei pH 6,5).

2.7 Phänotypische Untersuchung von *C. albicans*-Stämmen

Neben der Untersuchung der Interaktion von verschiedenen *C. albicans*-Stämmen mit Wirtsgewebe bzw. Wirtskomponenten (s.u.) wurden auch weitere phänotypische Unterschiede untersucht.

2.7.1 Wachstumstests (Tropftests) und Agarinvasion

Um das Wachstum verschiedener *C. albicans*-Stämme auf verschiedenen Medien zu untersuchen wurden die Stämme über Nacht bei 37 °C und 180 U/min in entsprechendem Medium (SD oder YPD) angezogen, mit PBS (bei Low-P_i-Medium H₂O) gewaschen und mit Hilfe eines Neubauer Hämocytometers gezählt. Die Zellzahl wurde auf 2×10⁶/ml eingestellt und verdünnt (1:10, 1:100, 1:1.000). Je 5 µl der unverdünnten und der drei verdünnten Zellsuspensionen wurden auf die entsprechenden Platten appliziert. Daraus ergab sich ein 4-stufiges Wachstumsprofil beginnend mit Einzelkolonien (aus ~10 Zellen entstanden) bis hin zu einem konfluenten Wachstum (Inokulum ~10.000 Zellen). Zusätzlich zum Wachstum wurden nach Beendigung der Inkubationszeit die Platten mit Hilfe von Wasser und einem Drigalskispatel oberflächlich von adhärennten Zellen befreit und das darunter befindliche Medium auf Invasion von Pilzhyphen untersucht.

Um das Wachstum und die Hyphenbildung der Stämme unter eingebetteten Bedingungen zu untersuchen, wurden ca. 400 Hefezellen in 50 °C warmen YPS-Agar resuspendiert und in Petrischalen gegossen. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C und für die Auswertung wurden nur Zellen betrachtet, die sich im Agar befanden.

2.7.2 Toleranz gegenüber oxidativem Stress

Die Toleranz gegenüber oxidativem Stress wurde nach einer Methode von Huh *et al.* getestet (Huh *et al.*, 2001). Dazu wurden *C. albicans*-Stämme bis zur mittleren logarithmischen Phase in SD-Medium angezogen, zentrifugiert und in 0,1 M Kaliumphosphatpuffer (pH 7,0) bis zu einer OD₆₀₀ von 0,1 resuspendiert (ca. 10⁶ Zellen/ml). Anschließend wurde H₂O₂ in Konzentrationen von 0-10 mM hinzugegeben und der Versuchsansatz wurde für 1 h bei 30 °C inkubiert. Aliquots wurden verdünnt und auf SD-Agar ausplattiert. Nach 1-2 Tagen bei 37 °C wurden die koloniebildenden Einheiten (*colony forming units*, cfu) gezählt.

2.7.3 Bestimmung der Ammonium-Aufnahme

Zur Bestimmung der Ammonium-Aufnahme wurden *C. albicans*-Stämme über Nacht in Mpro-Medium angezogen und am nächsten Tag in frischem Mpro-Medium bis zu

einer OD_{600} von 1,0 verdünnt. Nach Zugabe einer 100 mM Ammoniumsulfat-Lösung bis zu einer Endkonzentration von 1 mM wurden die Kulturen bei 37 °C weiter inkubiert und es wurden nach 0, 30, 60, 90, 120, 150 und 180 Minuten Aliquots entnommen, zentrifugiert und mit Hilfe des L-Glutamat-Dehydrogenase Enzymtests (Sigma) wurde die Ammoniumkonzentration im Überstand bestimmt.

2.7.4 Bestimmung der Hyphenlänge

Die Hyphenlänge von verschiedenen *C. albicans* Stämmen wurde nach Kontakt mit einer hydrophoben Plastikoberfläche bei verschiedenen pH-Werten gemessen.

Dazu wurden die Stämme in YPD über Nacht bei 37 °C angezogen und in M199-Medium (gepuffert bei pH 5 bzw. pH 8) bis zu einer Konzentration von 2×10^4 Zellen/ml verdünnt. Die Zellen wurden für 4 h bei 37 °C in 24-Loch Platten inkubiert und die Hyphenlänge wurde mikroskopisch mit einem Axiovert 200 Mikroskop und der AxioVision 3.1 Software (beide Zeiss) gemessen.

2.8 Infektionsmodelle und Probennahme

2.8.1 Intraperitoneale Infektion der Maus

Für die *in vivo* Transkriptionsprofile wurden Mäuse intraperitoneal mit den *C. albicans* Stämmen SC5314 und ATCC10231 infiziert. Die Infektion und Organentnahme erfolgte nach dem deutschen Tierschutzgesetz in Zusammenarbeit mit M. Kretschmar und T. Nichterlein am Institut für Mikrobiologie und Hygiene in Mannheim (Universität Heidelberg)(Kretschmar *et al.*, 1999a; Kretschmar *et al.*, 1999b).

Es wurden 8-12 Wochen alte weibliche BALB/c-Mäuse (Harlan) mit einer sublethalen Dosis von 5×10^7 *C. albicans* Hefezellen (über Nacht bei 37 °C in SDA angezogen und 3x mit PBS gewaschen) in 0,5 ml PBS intraperitoneal infiziert. Bei dieser Dosis wurden beide Stämme innerhalb von 10 Tagen nach der Infektion von den Mäusen eliminiert. Für die Probennahme wurden die Mäuse durch eine Äthernarkose getötet. Die Probennahme erfolgte nach 30 min durch Waschen der Bauchhöhle mit 10 ml PBS bzw. nach 3 h und 5 h durch eine aseptische Leberentnahme. Die Pilzzellen

aus der Waschflüssigkeit wurden pelletiert und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Infizierte Organstücke wurden direkt in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung der Proben erfolgte bis zur weiteren Verwendung bei -70 °C.

2.8.2 Ex vivo hämoperfundierte Leber

Die Infektion der *ex vivo* hämoperfundierten Leber erfolgte in Zusammenarbeit mit der Tierexperimentellen Einrichtung der Charité, Campus Virchow Klinikum (Berlin) unter der Leitung von C. Grosse-Siestrup (Thewes *et al.*, 2007). Alle Tiere (n = 8; Gewicht 42 ± 13 kg) erhielten die nach dem deutschen Tierschutzgesetz vorgeschriebene Behandlung und Pflege.

2.8.2.1 Leberentnahme und Perfusion

Die Leberentnahme erfolgte unter genereller Anästhesie (Nagel *et al.*, 2005). Nach der Präparation der Gefäße und nach der Blutentnahme, welche durch Punktion der cervikalen Gefäße unter Zusatz von einem Bolus (10.000 U) Heparin erfolgte, wurde die Leber mit 4 l vorgewärmter (37 °C) Elektrolyt- Infusions-Lösung 153 (Berlin-Chemie) von verbliebenem Blut gesäubert und die Leberarterie, die Pfortader, die Vena cava und der Gallengang wurden kanüliert. Das kanülierte Organ wurde auf einem temperierten Wasserbett gelagert und direkt an das Perfusionssystem angeschlossen, welches zuvor mit dem tiereigenen Blut (1,5 l) gefüllt wurde. Das Blut wurde für die Perfusion mit 10.000 U/l Heparin und 1,2 g/l Augmentan (GlaxoSmithKline) versetzt.

Die Perfusion erfolgte nach einem modifizierten Protokoll von Grosse-Siestrup *et al.* (Grosse-Siestrup *et al.*, 2002b; Grosse-Siestrup *et al.*, 2004)(siehe Abb. 3.17). Dazu wurde Sauerstoff-reiches Blut direkt von den Dialysemodulen (*Hemoflow F7 Fresenius Polysulfone UF 6.4*, Fresenius Medical Care) in die Leberarterie gepumpt. In die Pfortader wurde gleichzeitig ein Gemisch aus Sauerstoff-reichem Blut von den Dialysemodulen und Sauerstoff-armem Blut aus der Vena cava gepumpt. Die Mischung erfolgte dabei in dem verwendeten Blutreservoir. Als Pumpen für den Blut- und Dialysatkreislauf wurden Einzel- oder Doppelkopf Rollpumpen (Stöckert) verwendet. Der Blutdruck in der Leberarterie wurde mit Hilfe eines Druckmessgeräts (66S, Hewlett Packard) zwischen 80 und 100 mmHg eingestellt. Der Blutfluss wurde

mit einer *Transsonic Flowprobe* (Transsonic Systems) gemessen. Die Wärme- und Sauerstoffregulation erfolgte über den Dialysatkreislauf. Dazu wurde das Dialysat auf 37 °C durch einen Wärmetauscher (Stöckert) temperiert und ständig mit 97,5 % O₂ und 2,5 % CO₂ angereichert.

Neben den hämodynamischen Funktionsparametern, welche permanent verfolgt werden konnten, wurden weitere Variablen im Blut und Dialysat analysiert. Dazu wurden in 30minütigen Abständen Blut- und Dialysat-Proben dem System entnommen und im zentralen Analyselabor des Virchow Klinikums nach klinischen Standardprotokollen untersucht. Dazu gehörten die Albumin-, die Glukose- und die Sauerstoffkonzentration sowie der Hämatokrit-Wert und die Konzentration an freiem Hämoglobin. Weiterhin wurden die Konzentrationen der Leberenzyme Alaninaminotransferase (ALT) und Aspartataminotransferase (AST) bestimmt. Die Galleproduktion wurde ebenfalls alle 30 min gemessen.

Für die Etablierung des Systems wurden drei männliche und ein weibliches Schwein verwendet. Die Dauer der Perfusion lag bei 3 h.

2.8.2.2 Infektion mit *C. albicans* und Probennahme

Nach der Etablierung des Systems erfolgten vier Perfusionen (2 männliche und 2 weibliche Schweinelebern) über einen Zeitraum von 12 h nach einer Infektion mit *C. albicans*. Dazu wurden die beiden Stämme SC5314 und ATCC10231 über Nacht in SDA bei 37 °C und 180 U/min inkubiert, mit PBS gewaschen und in Anlehnung an ein Protokoll von Kvaal *et al.* (Kvaal *et al.*, 1999) wurden sterile Baumwollplättchen (0,5 cm²) mit 10 µl (2×10^7 Zellen) *Candida*-Suspension getränkt und auf die Leberoberfläche appliziert. Die Baumwollplättchen wurden mit einem Stück steriler Plastikfolie (1 cm²) abgedeckt, um einen freien Sauerstoffaustausch einzuschränken. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Plastik- und Baumwollplättchen entfernt und das darunter liegende Leberstück mit adhären und invasiven *Candida*-Zellen wurde mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten. Für die Histologie wurden die Leberstücke sofort in 2,5 % Glutaraldehyd mit 2 % para-Formaldehyd in PBS (pH 7,4) fixiert und bis zur weiteren Behandlung bei Raumtemperatur gelagert. Für die Erstellung von Transkriptionsprofilen wurden die Leberstücke direkt in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -70 °C gelagert.

2.8.3 Intravenöse Infektion der Maus

Um eine systemische Candidose zu erreichen wurden männliche BALB/c-Mäuse mit 5×10^5 *Candida*-Zellen über die laterale Schwanzvene infiziert (Sanchez *et al.*, 2004). Die Arbeiten fanden in Kooperation mit H. Park und S. Filler am Los Angeles Biomedical Research Institute at Harbor-UCLA Medical Center in Torrance, Kalifornien, USA, nach den in den USA geltenden Bestimmungen für Tierversuche statt.

Für die Bestimmung der Überlebensrate wurden 11-12 Mäuse pro Stamm infiziert und über einen Zeitraum von 21 Tagen täglich beobachtet. Um die Organbelastung mit *Candida*-Zellen zu bestimmen wurden je 12 Mäuse infiziert. Sechs Mäuse wurden nach dem ersten Tag und sechs Mäuse nach dem zweiten Tag getötet. Die Nieren und Lebern wurden entfernt, gewogen, homogenisiert und in Aliquots auf YPD-Medium ausplattiert. Nach einer Inkubation bei 37 °C über Nacht wurden die cfu bestimmt.

2.9 Molekularbiologische Arbeitsmethoden

2.9.1 Präparation von Nukleinsäuren

2.9.1.1 Plasmid-Isolation aus *E. coli*

Die Isolation von Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte nach einer Inkubation über Nacht bei 37 °C und 180 U/min in 50 ml LB_{Amp} durch alkalische Lyse mit anschließender Säulenchromatographie mit Hilfe des *Nucleo Bond Plasmid DNA Purification Kit* nach Angaben des Herstellers.

Die Isolation im Eppendorf-Maßstab erfolgte ebenfalls durch alkalische Lyse nach einer Vorschrift von Sambrook *et al.* (Sambrook *et al.*, 1989). Dazu wurden plasmidtragende *E. coli*-Stämme in 2 ml LB_{Amp} über Nacht bei 37 °C und 180 U/min inkubiert und für 5 min bei 14.000 U/min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 150 µl E1 resuspendiert und es wurden 150 µl E2 hinzugegeben. Nach einer Inkubation für 5 min bei Raumtemperatur (RT) wurden 150 µl E3 hinzugegeben, gemischt und für

10 min bei 14.000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein sauberes Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und die Plasmid-DNA wurde durch Zugabe von 400 µl Isopropanol für 10 min bei 14.000 U/min gefällt. Das Pellet wurde mit 70%igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in 20-50 µl H₂O resuspendiert.

2.9.1.2 Isolierung von genomischer DNA aus *C. albicans*

Genomische DNA aus *C. albicans* für Southern-Blots und PCR wurde nach einer modifizierten Methode von Hoffman und Winston isoliert (Hoffman und Winston, 1987). Dazu wurde *C. albicans* über Nacht in 5 ml YPD bei 37 °C und 180 U/min inkubiert und anschließend für 5 min und 5.000 U/min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 0,5 ml H₂O aufgenommen und in ein sauberes Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Nach erneuter Zentrifugation für 2 min bei 14.000 U/min wurde das Pellet in 0,2 ml Lysis Mix und 0,2 ml Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1) aufgenommen. Nach Zugabe von Glasperlen wurde der Ansatz für 2x30 s und 5.5 m/s in einer FastPrep Maschine gevortext. Nach Zugabe von 0,2 ml TE wurde der Ansatz für 5 min und 14.000 U/min zentrifugiert und die obere wässrige Phase wurde in ein sauberes Eppendorf-Gefäß überführt. Die DNA wurde durch Zugabe von 1 ml Ethanol bei -20 °C für 1 h gefällt. Nach Zentrifugation für 5 min bei 14.000 U/min wurde das getrocknete Pellet in 0,4 ml TE inklusive 3 µl RNase A (10mg/ml) aufgenommen und für 30 min bei 37 °C auf einem Rotationsschüttler inkubiert. Die DNA wurde erneut durch Zugabe von 10 µl 4 M Ammoniumacetat und 1 ml Ethanol für 30 min bei -20 °C gefällt. Nach einer Zentrifugation für 5 min bei 14.000 U/min wurde das Pellet mit 70%igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in 50-100 µl TE oder H₂O resuspendiert.

Für vergleichende Genomhybridisierungen (*comparative genome hybridisation*, CGH) wurden die *C. albicans* Stämme in 50 ml YPD über Nacht bei 37 °C und 180 U/min angezogen und anschließend 5 min bei 3.000 U/min pelletiert. Das Zellpellet wurde in einem Erlenmeyerkolben in 5 ml 20 mM CitPO₄-Puffer, 40 mM EDTA und 1,2 M Sorbitol (pH 5,6) resuspendiert, es wurden 15 mg Zymolyase 20T hinzugefügt und die Zellen wurden für 30-90 min bei 37 °C auf einem Rotationsschüttler protoplastiert. Die Protoplasten wurden für 5 min bei 3.000 U/min pelletiert und durch Zugabe von 7,5 ml 10x TE, 0,75 ml 10 % SDS und 2,5 ml 5 M Kaliumacetat für 30 min auf Eis lysiert. Das Lysat wurde in ein neues Zentrifugenröhrchen dekantiert

und durch Zentrifugation für 10 min bei 5.000 U/min geklärt. Der Überstand wurde in einem neuen Zentrifugenröhrchen mit 10 ml eiskaltem Isopropanol versetzt und die DNA wurde durch fünfminütige Inkubation auf Eis mit anschließender Zentrifugation für 5 min bei 5.000 U/min gefällt. Das Pellet wurde in 1 ml TE aufgenommen und nach Zugabe von 100 µl RNase A (10 mg/ml) wurde die RNA für 1 h bei 37 °C verdaut. Die Proteine wurden anschließend durch Zugabe von 100 µl Proteinase K (10 mg/ml) für 1-2 h bei 37 °C abgebaut. Der Reaktionsansatz wurde drei Mal mit einem Volumen Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1) extrahiert und die DNA wurde durch Zugabe von zwei Volumen Ethanol und Zentrifugation für 10 min bei 14.000 U/min gefällt. Nach dem Waschen mit 70%igem Ethanol wurde das Pellet getrocknet und in 50-150 µl TE oder H₂O aufgenommen.

2.9.1.3 Isolierung von totaler RNA aus *C. albicans*

Die Isolierung von totaler RNA aus *C. albicans* erfolgte mit Hilfe von *peqGOLD RNAPure* basierend auf einer sauren Guanidinium-Thiocyanat-Phenol-Chloroform Extraktion (Chomczynski und Sacchi, 1987).

Dazu wurden Zellpellets oder infizierte Organproben mit *RNAPure* versetzt (1 ml/10⁶ Zellen) und nach Zugabe von Glasperlen für 30 min bei RT auf einem Vortexer bzw. für 30 s und 5,5 m/s in einer FastPrep Maschine lysiert. Die Proben wurden anschließend für 10 min bei RT inkubiert und nach Zugabe von 0,2 Volumen Chloroform und erneuter 10minütiger Inkubation bei RT für 15 min bei 14.000 U/min (4 °C) zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde in ein neues RNase-freies Eppendorfgefäß überführt und die RNA wurde durch Zugabe von 0,8 Volumen Isopropanol und 40-60 µg Glykogen nach 10minütiger Inkubation bei RT durch Zentrifugation für 10 min bei 14.000 U/min und 4 °C gefällt. Die RNA wurde mit 70%igem Ethanol gewaschen (1 ml Ethanol/1 ml *RNAPure*), getrocknet und in einem geeigneten Volumen RNase-freiem H₂O aufgenommen.

Sollte zusätzlich noch die eventuell vorhandenen DNA-Kontaminationen entfernt werden, so wurde die gelöste RNA mit 1 Volumen LiCl-Puffer versetzt und nach Mischen für mind. 1 h bei -20 °C inkubiert. Die RNA wurde anschließend für 45 min bei 14.000 U/min und 4 °C gefällt, 2x mit 70%igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in einem geeigneten Volumen RNase-freiem H₂O resuspendiert.

Die Lagerung von RNA erfolgte bis zu ihrer weiteren Verwendung bei -70 °C.

2.9.1.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren erfolgte mit Hilfe einer Quarzküvette bei einer Wellenlänge von 260 nm in einem UV/Vis Spektrophotometer (Ultrospec 3000pro, Amersham Pharmacia Biotech) oder mit Hilfe des *NanoDrop* (NanoDrop Technologies).

Für die Berechnung der DNA-Konzentration wurde dabei ein Umrechnungsfaktor von 50, für die Berechnung der RNA-Konzentrationen ein Umrechnungsfaktor von 40 eingesetzt. Zusätzlich wurde die Reinheit der Nukleinsäuren durch Berechnung des 260/280 nm Quotienten bestimmt. Für DNA sollte dieser Quotient bei ca. 1,8 liegen, RNA sollte einen Quotienten zwischen 1,8 und 2,0 aufweisen.

2.9.1.5 Qualitätskontrolle von RNA

Die Qualität der isolierten RNA wurde mit Hilfe des *Bioanalyzer*-Geräts (Agilent Technologies) und dem *Agilent RNA 6000 Nano Kit* nach den Angaben des Herstellers überprüft.

2.9.2 Restriktion und Gelelektrophorese von Nukleinsäuren

2.9.2.1 Restriktion von DNA

Die Restriktion von DNA erfolgte nach einer Methode von Sambrook *et al.* (Sambrook *et al.*, 1989). Es wurden dabei die vom Hersteller des Restriktionsenzym angegebenen Reaktionspuffer und -bedingungen verwendet. In der Regel wurden 3 U Enzym pro µg Plasmid-DNA bzw. 5 U Enzym pro µg genomischer DNA eingesetzt.

2.9.2.2 DNA-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von DNA wurden 0,8-3%ige TAE- oder TBE-haltige Agarosegele verwendet. Die DNA wurde nach Zugabe von $\frac{1}{6}$ Volumen DNA-Ladepuffer aufgetragen und die Auftrennung erfolgte in einer Horizontalgelelektrophoresekammer (Peqlab) in TAE- bzw. TBE-Puffer bei 30-180 V. Als Größenstandard dienten die *GeneRuler* 1-kb- bzw. 100-bp-Leitern. Die aufgetrennte

DNA wurde nach Anfärbung in einem Ethidiumbromidbad (0,5 µg/ml) unter UV-Licht bei 254 nm sichtbar gemacht (*Multiimage Light Cabinet*, AlphaInnotech Corporation).

2.9.2.3 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Nach der Auftrennung der DNA wurde das gewünschte Fragment unter UV-Licht mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und mit Hilfe des *Nucleospin Extract II* Kits nach Angaben des Herstellers eluiert.

2.9.2.4 RNA-Gelelektrophorese

Für RNA-DNA Hybridisierungen (Northern-Blot) wurde die RNA in 1,2%igen Formaldehydagarosegelen nach der Methode von Sambrook *et al.* aufgetrennt (Sambrook *et al.*, 1989). Dazu wurden 1,8 g Agarose in 125 ml RNase-freiem H₂O und 15 ml 10× MOPS-Puffer aufgekocht, nach Abkühlung auf ca. 60 °C mit 8 ml Formaldehyd (37 Vol.-%) unter einem Abzug gemischt und in die Gelapparatur gegossen. Nach der Aushärtung wurden die RNA-Proben, welche zunächst 1:1 mit RNA-Ladepuffer gemischt und bei 65 °C für 5 min denaturiert worden sind, aufgetragen und die Elektrophorese erfolgte in 1× MOPS-Puffer bei 30-80 V bis die Bromphenolblau-Bande ca. im letzten Drittel des Gels angekommen war. Die RNA wurde unter UV-Licht bei 254 nm sichtbar gemacht.

2.9.3 Transfer von Nukleinsäuren auf Membranen

2.9.3.1 Transfer von DNA auf Membranen

Die durch Gelelektrophorese aufgetrennte DNA wurde mit Hilfe eines *Downward-Blots* (Ausubel *et al.*, 1987) in 10 mM NaOH auf positiv geladene Nylonmembranen in 6-12 h übertragen. Nach Bedarf wurde die DNA zuvor für 10-20 min in 0,2 N HCl depuriniert. Nach erfolgreichem Transfer wurde die Membran kurz in 0,5 M Tris-HCl (pH 7,2) und 1 M NaCl neutralisiert und die DNA wurde mit einem Crosslinker (UV Stratalinker 2400, Stratagene) durch UV-Licht kovalent an die Membran gebunden (Autocrosslink).

2.9.3.2 Transfer von RNA auf Membranen

Der Transfer von RNA auf positiv geladene Nylonmembranen erfolgte auch durch einen *Downward-Blot* (Ausubel *et al.*, 1987) in 5x SSC und 20 mM NaOH für 1-2 h. Die Fixierung der RNA erfolgte durch UV-Licht mit einem Crosslinker (Autocrosslink).

2.9.4 Hybridisierungen

2.9.4.1 Nicht-radioaktive Markierung von DNA

Nicht-radioaktive DNA-Sonden wurden mit Hilfe des *PCR DIG Probe Synthesis Kit* markiert. Dazu wurde folgender Reaktionsansatz verwendet:

2,5 µl	10x DIG-PCR-Puffer
1-2,5 µl	10x DIG-Mix
0-1 µl	10 mM dNTPs
1 µl	fwd-Primer (10 µM)
1 µl	rev-Primer (10µM)
0,4 µl	Enzym-Mix
50 ng	DNA
Ad 25 µl	H ₂ O

Die Menge des DIG-Mix richtete sich dabei nach der Länge der zu markierenden Sonde und des AT-Gehalts der Sondensequenz. Bei einem hohen AT-Gehalt wurde entsprechend weniger DIG-Mix eingesetzt, um eine sterische Hinderung benachbarter DIG-Moleküle beim Einbau zu verhindern. Das PCR-Programm zur Amplifikation der Sonde über 15-25 Zyklen sah wie folgt aus:

Denaturierung	30 s	94 °C
Annealing	30 s	55-68 °C (je nach Primer-Paar)
Elongation	90 s	72 °C

Die Markierung der Sonde wurde mittels Gelelektrophorese überprüft. Dazu wurde die gleiche PCR ohne DIG-Mix durchgeführt und die markierte und unmarkierte

Sonde konnten über den Größenunterschied miteinander verglichen werden, da die Markierung mit DIG durch die damit verbundene Retention im Gel das DNA-Fragment größer erscheinen lässt.

2.9.4.2 DNA-DNA-Hybridisierungen (Southern Blot)

Nach einer mind. einstündigen Prähybridisierung bei 42 °C mit *DIG Easy Hyb* erfolgten homologe DNA-DNA-Hybridisierungen über Nacht in 10-20 ml *DIG Easy Hyb* mit 5-10 µl denaturierter Sonde bei 42 °C in einem Rollofen. Die Hybridisierungslösung inklusive Sonde konnte bei -20 °C gelagert und für eine Wiederverwendung bei 68 °C für 10 min erneut denaturiert werden.

Nach erfolgter Hybridisierung wurde die Membran zunächst für 2x5 min bei RT mit 2x SSC / 0,1 % SDS, dann für 2x15 min bei 68 °C mit 0,1x SSC / 0,1 % SDS gewaschen. Zur Detektion wurde die Membran für 2 min in Waschpuffer äquilibriert und unspezifische Bindestellen wurden für mind. 30 min bei RT mit 50 ml 1x Blocking-Lösung (in Maleinsäurepuffer) abgesättigt. Anschließend wurde die Membran für 30 min bei RT mit 10 ml Anti-Digoxigenin-Antikörper-Lösung (Antikörper 1:20.000 in Blocking-Lösung verdünnt) inkubiert, 2x15 min bei RT mit Waschpuffer gewaschen und 3 min bei RT in Detektionspuffer äquilibriert. Die Membran wurde in eine Klarsichthülle gelegt und mit einer entsprechenden Menge CDP-Star (1:100 in Detektionspuffer verdünnt) beträufelt. Die Membran wurde auf einen *Lumi Film Chemiluminescent Detection Film* gelegt und bei RT inkubiert. Die Inkubationszeit betrug je nach der Stärke des Sondensignals und des Hintergrunds 1 min bis mehrere Stunden.

2.9.4.3 RNA-DNA-Hybridisierungen (Northern Blot)

RNA-DNA-Hybridisierungen erfolgten in Anlehnung an DNA-DNA-Hybridisierungen. Die Prähybridisierung und Hybridisierung erfolgte jedoch bei 50 °C. Ebenso wurde die Membran nach der Hybridisierung in 0,1x SSC / 0,1 % SDS bei 50 °C gewaschen. Alle weiteren Schritte erfolgten entsprechend der DNA-DNA-Hybridisierung.

2.9.5 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion wurde zur Amplifikation spezifischer DNA Fragmente angewandt. Benötigte Puffer, Enzyme und Lösungen wurden für die Standard PCR den Angaben der Hersteller entsprechend eingesetzt.

Der Reaktionsansatz einer Standard PCR setzte sich aus den folgenden Komponenten zusammen:

<u>Stammlösung:</u>	<u>Endkonzentration:</u>
10x PCR-Puffer ohne MgCl ₂	1x
50 mM MgCl ₂	1,5-3 mM
10 mM dNTP-Mix	je 0,2 mM
100 pmol/µl Primer	je 50 pmol
Template DNA	100 ng
Taq-Polymerase (5 U/µl)	1,25 U

Der Ablauf einer Standard-PCR im zyklischen Thermoblock (*T Personal, T Gradient*; Biometra) setzte sich wie folgt zusammen, wobei die Temperatur und die Zeit den spezifischen Anforderungen der Primer und des PCR-Fragments angepasst wurden:

Denaturierung	2 min	95 °C	} 20-35 Zyklen
Denaturierung	30 s	95 °C	
Annealing	30-45 s	55-68 °C	
Elongation	30-90 s	72 °C	
Auffüllen	5-10 min	72 °C	
Lagerung	-	4 °C	

2.9.6 Reverse Transkription mit anschließender PCR (RT-PCR)

Für die reverse Transkription mit anschließender PCR (RT-PCR) musste die RNA DNA-frei sein. Dazu wurden 0,5-2 µg totale RNA in einem 10 µl-Ansatz mit DNase für 15 min bei RT nach Angaben des Herstellers inkubiert. Nach Zugabe von 1 µl STOP-Puffer (Promega) wurde die DNase für 15 min bei 65 °C inaktiviert. Zu der DNA-freien RNA wurde anschließend 1 µl oligo-d(T)-Primer gegeben und der Ansatz wurde bei 70 °C für 10 min denaturiert. Nach Zugabe von 4 µl 5x Erstrangpuffer, 2 µl

Dithiothreitol (DTT), 1 µl 10 mM dNTP-Mix, 1 µl *RNase Out* (40 U/µl) und 1 µl *Superscript II* Reverse Transcriptase wurde für 60 min bei 42 °C die cDNA synthetisiert. Die Reaktion wurde durch eine 15minütige Inkubation bei 70 °C gestoppt. Die anschließende PCR erfolgte wie oben beschrieben mit 2-4 µl cDNA als Template.

2.9.6.1 Quantitative RT-PCR

Die quantitative RT-PCR erfolgte mit Hilfe des *QuantiTect Probe RT-PCR Kits* nach den Angaben des Herstellers in einem 7500 Real-Time PCR-Gerät (Applied Biosystems).

Die Bestimmung der relativen Expression der ausgewählten Gene erfolgte mit der SDS-Software (Applied Biosystems), wobei als Kalibrator die Referenz-RNA und als endogene Kontrolle die Transkriptmenge von *ACT1* gewählt wurde.

2.9.7 Klonierung von DNA-Fragmenten

Die Klonierung von aufgereinigten DNA-Fragmenten erfolgte direkt nach einer PCR in den Vektor pCR2.1-TOPO nach Angaben des Herstellers. Restringierte DNA-Fragmente wurden in passend verdaute Vektoren mit Hilfe der T4 DNA Ligase nach Angaben des Herstellers kloniert. Dabei wurde ein Fragment:Vektor-Verhältnis von 1:1 bis 2:1 gewählt.

2.9.8 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung von DNA erfolgte nach der Kettenabbruch-Methode (Sanger, 1981) mit Hilfe der ABI BigDye 3.1 Terminator Chemie (Applied Biosystems GmbH). Dazu wurde der folgende Reaktionsansatz hergestellt:

DNA	Plasmide	150-300 ng
	PCR-Produkte	1-20 ng
Primer		5 pmol
BigDye 3.1		1 µl
5x Puffer		1,5 µl

H₂O ad 10 µl

Die lineare Amplifikation erfolgte wie folgt:

Denaturierung	2 min	95 °C	} 25 Zyklen
Denaturierung	30 s	95 °C	
Annealing	10 s	55 °C (M13 Primer)	
Elongation	4 min	60 °C	
Lagerung	-	4 °C	

Die Aufreinigung mittels Gelfiltration erfolgte in der Service-Einheit des Robert Koch-Instituts in einem 3100 Avant Genetic Analyzer (ABI PRISM, Applied Biosystems GmbH).

Die Analyse der Nukleotidsequenzen erfolgte mit Hilfe der Computerprogramme Chromas 1.45 und Lasergene 6 (DNASTAR Inc.) und des Internet-gestützten *basic local alignment search tools* (BLAST)(Altschul *et al.*, 1990).

2.9.9 Transformation von *E. coli*

Für die Transformation von *E. coli* wurden kompetente TOP10F'-Zellen auf Eis aufgetaut und zusammen mit 100 ng Plamid-DNA auf Eis für 20-30 min inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock für 90 s bei 42 °C gefolgt von sofortigem Abkühlen für 3 min auf Eis. Nach Zugabe von 1 ml LB-Medium wurden die transformierten *E. coli*-Zellen zur Regeneration für 1 h bei 37 °C und 180 U/min inkubiert. 100 µl des Ansatzes wurden anschließend auf LB_{Amp}⁻ oder LB_{Amp/X-Gal}⁻ Medium ausplattiert und bei 37 °C über Nacht inkubiert. Einzelkolonien wurden am nächsten Tag für weitere Analysen auf frisches Selektionsmedium überimpft.

2.9.10 Transformation von *C. albicans*

Die Transformation von *C. albicans* erfolgte nach dem *URA*-Blaster Protokoll (Fonzi und Irwin, 1993) nach einer modifizierten Vorschrift von Walther und Wendland (Walther und Wendland, 2003).

Dazu wurde ein *URA*-negativer *C. albicans*-Stamm über Nacht bei 30 °C und 180 U/min in YPD angezogen und mit dieser Vorkultur eine frische 50 ml YPD-Kultur

bis zu einer OD_{600} von 0,2-0,3 angeimpft. Nach einer Inkubationszeit von 4 h bei 30 °C und 180 U/min wurden die Zellen bei 3.000 U/m in für 5 min pelletiert, das Pellet wurde mit sterilem H_2O gewaschen und in 1,5 ml LiAc-Puffer aufgenommen. Ein Transformationsansatz setzte sich anschließend wie folgt zusammen:

1-5 µg	linearisierte Plasmid-DNA
100 µg	denaturierte Heringssperma-DNA (Clontech)
100 µl	<i>C. albicans</i> in LiAc-Puffer
600 µl	PEG/LiAc-Puffer

Dieser Ansatz wurde für 20-24 h bei 30 °C unter schwacher Bewegung inkubiert. Der Ansatz wurde danach für 15 min bei 44 °C einem Hitzeschock unterzogen. Die Zellen wurden abzentrifugiert und in 300 µl SD-Medium aufgenommen. Je 150 µl wurden auf SD-Medium ausplattiert und für 2-4 Tage bei 30 °C inkubiert. Putative Transformanten wurden durch einen Southern-Blot analysiert.

2.9.11 FOA-Behandlung

Die Verwendung von 5-FOA (5-Fluoroorotsäure)-enthaltenden Medien ermöglicht die Selektion von *URA3* negativen *C. albicans* Stämmen, da diese Substanz nur für Stämme toxisch ist, die das *URA3* Gen enthalten. Nach einer Transformation mit dem *URA*-Blaster kann durch eine *cis*-Rekombination zwischen den beiden *hisG* Genen das *URA3* Gen sowie eine Kopie der *hisG* Gene deletiert werden.

Eine Kolonie der entsprechenden Stämme, welche den *Ura*-Blaster enthielten wurde in 1 ml H_2O resuspendiert. 10 µl dieser Zellsuspension wurden mit 90 µl H_2O vermischt und auf SD-FOA Agarplatten gegeben. Nach 3 bis 4 Tagen Inkubation bei 30°C wurden die gewachsenen Klone auf YPD-Platten überimpft und anschließend die genomische DNA isoliert und mit Hilfe eines Southern-Blots überprüft.

2.10 Microarray-Analysen

2.10.1 Microarrays

Die *C. albicans* Microarrays (Eurogentec) enthalten 6.039 offene Leserahmen und 27 Kontrollgene, welche alle als Duplikate auf die Glasoberfläche appliziert wurden. Die Entwicklung der Microarrays erfolgte in Kooperation mit dem europäischen Galar Fungail Konsortium (http://www.pasteur.fr/recherche/unites/Galar_Fungail/). Die Informationen über die kodierenden Sequenzen und Proteine stammen aus der CandidaDB-Datenbank (d'Enfert *et al.*, 2005). Die Microarrays wurden entwickelt und hergestellt wie unter http://www.pasteur.fr/recherche/unites/Galar_Fungail/arrays.html beschrieben. Alle Hybridisierungen und Auswertungen unterlagen den MIAME-Standards (Brazma *et al.*, 2001). Alle Rohdaten der Hybridisierungen wurden auf der *Galar Fungail 2 Network Homepage* unter <http://www.galarfungail.org/data.htm> hinterlegt.

2.10.2 Vergleichende Genomhybridisierung

Um das Fehlen und die Divergenz von einzelnen Genen aus dem Genom von verschiedenen *C. albicans*-Stämmen im Vergleich zum Stamm SC5314 nachzuweisen, wurden vergleichende Genomhybridisierungen (*comparative genome hybridisation*, CGH) mit Hilfe von Microarrays durchgeführt.

2.10.2.1 Markierung von genomischer DNA mit Cy-Farbstoffen

Für die Markierung genomischer DNA mit Cy-Farbstoffen wurden zunächst je 2 µg gDNA mit den Restriktionsenzymen *RsaI* bzw. *TruI* (*MseI*) für 2 h nach Angaben des Herstellers verdaut. Die beiden Ansätze wurden anschließend kombiniert, mit Hilfe des *Nucleospin Extract II Kit* aufgereinigt und 1 µg verdaute DNA wurde auf einem Agarosegel analysiert.

Die restlichen 3 µg DNA wurden mit Hilfe des *RadPrime DNA Labeling Kit* unter Verwendung von Cy3-dUTP bzw. Cy5-dUTP nach Angaben des Herstellers für 2 h bei 37 °C markiert. Die markierte DNA wurde erneut mit dem *Nucleospin Extract II Kit* gereinigt und mit Microcon Zentrifugalfiltern (YM-30) auf 2-5 µl aufkonzentriert. Bevor

die DNA in den Hybridisierungspuffer gegeben wurde, erfolgte eine Denaturierung für 3 min bei 95 °C.

2.10.2.2 Hybridisierung

Vor der vergleichenden Genomhybridisierung erfolgte eine Prähybridisierung der Microarrays für 45 min bei 42 °C in 5× SSC, 1 % SDS, 1 % BSA. Die prähybridisierten Arrays wurden 5× mit H₂O gewaschen, kurz in Isopropanol getaucht und an der Luft getrocknet.

Die Cy3- und Cy5-markierten und denaturierten DNA-Proben wurden auf 25 µl mit H₂O aufgefüllt und es wurden 25 µl Hybridisierungspuffer (50 % Formamid, 10× SSC, 0,2 % SDS) hinzugegeben. Das Gemisch wurde vorsichtig auf den Microarray appliziert und mit einem Deckglas (LifterSlip, 25x44 inch, Erie Scientific Company) bedeckt. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht (16-20 h) bei 42 °C in einem Wasserbad in einer Hybridisierungskammer (Corning). Anschließend wurde der Array für 15 min in 2× SSC, 1 % SDS, für 8 min in 1× SSC, 0,2 % SDS und für 5 min in 0,1× SSC, 0,2 % SDS bei RT gewaschen, durch Zentrifugation bei niedriger Geschwindigkeit getrocknet und gescannt. Für den Vergleich der Stämme SC5314 und ATCC10231 wurden Duplikate inklusive einem Farbtasch eingesetzt. Für die Analyse von Patientenisolaten wurden jeweils zwei Arrays in einem Kreis-Design verwendet (siehe Abb. 3.15).

2.10.2.3 Auswertung der Hybridisierung

Die Microarrays wurden mit einem Axon 4000B-Scanner mit einer Auflösung von 10 µm gescannt und die Daten wurden mit Hilfe von GenePix 4.1 (Axon) extrahiert.

Die Auswertung erfolgte mit Hilfe von GeneSpring 7.2 (Silicon Genetics). Dazu wurden die Rohdaten vom Scanner für die Normalisierung einer lokal-gewichteten Regressionsanalyse (*local weighted regression analysis*, LOWESS) unterzogen. Anschließend wurden die Gene herausgesucht, die in beiden Hybridisierungen ein mindestens 2-fach schwächeres Signal mit DNA von ATCC10231 als mit DNA von SC5314 zeigten. Die für die Hybridisierung verantwortlichen Genabschnitte aus dem Stamm ATCC10231 wurden amplifiziert und durch Sequenzierung mit den entsprechenden Genabschnitten aus SC5314 verglichen. Zur Kontrolle wurden auch

fünf Genabschnitte analysiert, die ein stärkeres Signal mit DNA aus ATCC10231 als mit DNA aus SC5314 zeigten.

2.10.3 Vergleichende Transkriptomanalysen

Für die vergleichenden Transkriptomanalysen wurden die Transkriptome der zwei *C. albicans* Stämme SC5314 und ATCC10231 *in vivo* nach einer intraperitonealen Infektion der Maus bzw. *ex vivo* nach einer Infektion einer isolierten Schweineleber untersucht. Weiterhin wurden die Transkriptome *in vivo* mit den Transkriptomen *ex vivo* verglichen.

2.10.3.1 Ermittlung des Wirt-Pathogen RNA-Verhältnisses

Da die *Candida*-RNA aus den Organproben ohne differentielle Lyse gewonnen wurde, musste das Verhältnis von Wirt- zu Pathogen-RNA bestimmt werden. Dazu wurde 1 µl totale RNA aus der Organaufarbeitung für eine RT-PCR mit den *EFB1*- oder *ACT1*-Primern eingesetzt. Als Mengenstandard dienten jeweils 1 µl totaler *Candida*-RNA der Konzentrationen 500 ng/µl, 50 ng/µl und 5 ng/µl. Nach der RT-PCR wurden je 5 µl eines Ansatzes auf einem Agarosegel aufgetrennt und die Bandenintensität der zu untersuchenden Probe wurde mit der Eichreihe verglichen. So konnte die Menge an *Candida*-RNA in dem Organ-*Candida*-Gemisch abgeschätzt werden. Es wurden nur RNA-Proben für Transkriptionsanalysen verwendet deren Verhältnis Wirts-RNA:*Candida*-RNA $\leq 10:1$ war.

2.10.3.2 Amplifikation und Markierung von totaler RNA

Eine lineare Amplifikation bei gleichzeitiger Markierung von RNA erfolgte mit Hilfe des *Agilent Low RNA Input Fluorescent Linear Amplification Kits* nach den Angaben des Herstellers.

Die cRNA wurde anschließend mit dem *RNeasy Mini Kit* aufgereinigt und mit Hilfe von Microcon Zentrifugalfiltern auf 2-5 µl aufkonzentriert. Die Qualität der amplifizierten RNA und die Inkorporation des Farbstoffs wurden nach der Auftrennung in einem 1%igen Agarosegel mit Hilfe eines Phosphorimagers (FLA-2000, FUJIFILM) ermittelt.

2.10.3.3 Hybridisierung

Die Hybridisierung für die Transkriptomanalysen erfolgte bei 42 °C wie in 2.10.2.2 beschrieben in *DIG Easy Hyb* nach Zugabe von 2 µg cRNA und 2 µg Referenz-RNA (cRNA aus *C. albicans* SC5314 angezogen in YPD bei 37 °C bis zur mittleren logarithmischen Phase).

Nach der Hybridisierung wurden die Arrays für jeweils 5 min in 2× SSC mit 0,03 % SDS, 0,4× SSC und 0,1× SSC gewaschen, durch Zentrifugation bei langsamer Geschwindigkeit getrocknet und sofort gescannt. Für jeden Zeitpunkt wurden biologisch unabhängige Duplikate verwendet.

2.10.3.4 Auswertung der Hybridisierung

Die Microarrays wurden mit einem Axon 4000B-Scanner mit einer Auflösung von 10 µm gescannt und die Daten wurden mit Hilfe von GenePix 4.1 (Axon) extrahiert. Einzelne Hybridisierungspunkte (*Spots*) wurden als „präsent“ (*present*) markiert wenn der Median der Spot-Intensität mindestens eine Standardabweichung über dem Median des Hintergrunds in beiden Scankanälen des betreffenden Spots lag. Ein Spot wurde als „grenzwertig“ (*marginal*) gekennzeichnet, wenn diese Bedingung nur für einen Scankanal erfüllt wurde. Schließlich wurden Spots als „fehlend“ (*absent*) markiert, wenn in beiden Scankanälen der Median der Intensität des Spots unter einer Standardabweichung des Medianes des Hintergrunds lag.

Die so vorbereiteten Daten wurden in GeneSpring 7.2 nach einer LOWESS-Normalisierung analysiert. Dazu wurde zunächst die Zuverlässigkeit der Hybridisierungen durch ein Herausfiltern der Gene sichergestellt, die eine höhere Standardabweichung in den normalisierten Intensitäten innerhalb der Replikate als 1,5 aufwiesen. In Anlehnung an die Transkriptomanalysen von Murillo *et al.* (Murillo *et al.*, 2005) wurden auch die vorliegenden *in vivo* und *ex vivo* Transkriptome analysiert. Dazu wurden in einer horizontalen Analyse die Gene, die eine 2-fach stärkere Expression während eines Infektionszeitpunktes im Vergleich zur Vorkultur aufwiesen, in jedem der beiden Stämme separat betrachtet. In einem vertikalen Analyseansatz wurden die beiden Stämme direkt miteinander zu den verschiedenen Zeitpunkten verglichen. Auch hier wurden Gene als differentiell exprimiert angesehen, die zu einem gegebenen Zeitpunkt in einem Stamm eine 2-fach höhere

Expression aufwiesen als zum gleichen Zeitpunkt in dem anderen Stamm. Zusätzlich zu diesen Analysen wurde für den Vergleich der *in vivo*- und *ex vivo*-Transkriptionsprofile die Gene verglichen, deren Expression zu einem gegebenen Zeitpunkt 2-fach stärker als die der Referenz war.

Clusteranalysen wurden auch in GeneSpring 7.2 vorgenommen. Die Analysen basierten dabei auf der Standard-Korrelation und wurden mit Hilfe eines hierarchischen Cluster-Algorithmus durchgeführt (Eisen *et al.*, 1998).

2.10.3.5 Rehybridisierung von Microarrays

Microarrays, die mit cRNA hybridisiert wurden, wurden für eine einmalige Rehybridisierung für 10 min in 0,05 N NaOH bei RT gewaschen. Anschließend erfolgte eine RNase-Behandlung für 1 h bei 37 °C in einer Hybridisierungskammer (Clontech) unter Zugabe von 7,5 µl RNaseH (10 U/µl) in 1,5 ml TE. Anschließend wurden 75 µl RNase-Cocktail (500 U/ml RNaseA, 20.000 U/ml RNaseT1) zugesetzt und für eine weitere Stunde bei 37 °C inkubiert. Die Flüssigkeit wurde aus der Kammer entfernt und es wurden 100 µl ProteinaseK in 2 ml ProteinaseK-Puffer in die Hybridisierungskammer gegeben und der Array wurde für 1 h bei 37 °C inkubiert. Der Array wurde für 3 min bei 60 °C in 6× SSC und 0,005 % Triton X-100 und für 5 min bei RT in 0,1× SSC und 0,005 % Triton X-100 gewaschen, getrocknet und durch Scannen auf fluoreszierende Rückstände überprüft. Eine erneute Hybridisierung erfolgte wie oben beschrieben.

2.10.4 In vitro Transkriptomanalysen

Die *in vitro* Transkriptomanalysen wurden mit den beiden *C. albicans* Stämmen SC5314 und ATCC10231 nach einer Anzucht in SD-Medium bzw. mit den Stämmen CAI-4 + Clp10 und der $\Delta dfg16$ -Mutante nach einer Anzucht in YPD-Medium (gepuffert bei pH 7,4) durchgeführt.

2.10.4.1 Synthese und Markierung von cDNA

Für die Transkriptome aus SD-Medium wurde von beiden Stämmen totale RNA isoliert und daraus cDNA synthetisiert und markiert.

Dazu wurden 30 µg totale RNA in 22 µl H₂O nach Zugabe von 2 µl Oligo-d(T)-Primer für 10 min bei 70 °C denaturiert. Zu dem Ansatz wurden 30 µl Markierungsstammlösung bestehend aus 1× Reverse-Transkriptase-Puffer, 1 mM Dithiotreitol (DTT), 500 µM dATP, 500 µM dCTP, 500 µM dGTP und 100 µM dTTP gegeben. Nach Zugabe von 3 µl Cy3-dUTP bzw. Cy5-dUTP, 1 µl *RNaseOut* und 2 µl Reverser Transkriptase wurde die cDNA für 2 h bei 42 °C synthetisiert. Dabei wurde nach 1 h Inkubation 1 µl frische Reverse Transkriptase hinzugegeben. Die Reaktion wurde anschließend durch Zugabe von 3 µl 20 µM EDTA gestoppt und die RNA wurde durch Zugabe von 3 µl 500 mM NaOH für 10 min bei 70 °C degradiert. Durch Zugabe von 3 µl 500 mM HCl wurde der Ansatz neutralisiert und die Aufreinigung und Aufkonzentration erfolgte wie oben beschrieben mit Hilfe des *Nucleospin Extract II Kits* und Microcon Zentrifugalfiltern.

2.10.4.2 Hybridisierung und Auswertung

Die Hybridisierung der cDNA erfolgte wie unter Punkt 2.10.2.2 beschrieben. Für die Auswertung der Triplikate in GeneSpring 7.2 (inkl. einem Farbstofftausch) wurden nach einer LOWESS-Normalisierung alle Gene als differentiell exprimiert betrachtet, die eine mind. 2-fach stärkere Expression in einem Stamm gegenüber dem anderen Stamm aufwiesen. Dabei wurde gleichzeitig der Student *t*-Test angewandt und ein Grenzwert von $P \leq 0,05$ festgelegt.

2.10.4.3 Transkriptionsanalyse der Δ dfg16 Mutante

Die Amplifikation, Markierung und Hybridisierung der RNA erfolgte wie unter Punkt 2.10.3 beschrieben. Die Analyse der Triplikate (inkl. einem Farbaustausch) erfolgte in GeneSpring 7.2 wie unter Punkt 2.10.4.2 beschrieben.

2.11 Analyse von Wirt-Pathogen-Interaktionen

2.11.1 Blut-Pathogen-Interaktion

Um die Interaktion von *C. albicans* mit Blutbestandteilen zu testen, wurde heparinisiertes Vollblut von freiwilligen gesunden Spendern über eine Dichtegradientenzentrifugation durch Histopaque 1077 und Histopaque 1119 (Sigma) in die vier Bestandteile Plasma, Mononukleäre Zellen, Granulozyten und rote Blutkörperchen aufgetrennt. Es folgte eine Inkubation von *C. albicans* Zellen in einer geeigneten Verdünnung in Plasma, Vollblut oder einer der beiden Zellfraktionen (Monozyten, Granulozyten) für 30 min bei 37 °C. Anschließend wurden die Ansätze auf M199-Medium (pH 7,4) getropft und bis zum Erscheinen von Pilzkolonien bei 37 °C inkubiert.

2.11.2 Matrigel-Invasions-Assay

Für den Matrigel-Invasions-Assay nach Crowe *et al.* (Crowe *et al.*, 2003) wurde das Matrigel über Nacht im Kühlschrank aufgetaut. Die zu testenden *C. albicans* Stämme wurden über Nacht bei 37 °C in YPD angezogen. Am nächsten Tag wurden Transwell-Platten (Ø 12 mm, 3 µm Porengröße; Corning) mit 56 µl Matrigel, welches zuvor 1:1 mit eiskaltem DMEM verdünnt wurde, überzogen. Nach der Polymerisation des Gels für 30 min bei 37 °C wurden pro Membran $2,4 \times 10^5$ *Candida*-Zellen (mit PBS gewaschen) in 0,5 ml DMEM appliziert. In das untere Kompartiment wurden 1,5 ml DMEM gegeben. Die Platten wurden für 24 h bei 37 °C inkubiert und die *Candida*-Zellen, die in das untere Kompartiment gelangt sind wurden nach Ausplattieren auf YPD-Agar und Inkubation für 24 h bei 37 °C gezählt.

2.11.3 Arbeiten mit Zellkulturen

Eine Langzeitlagerung von Maus- und humanen Zellen erfolgte in 90 % Medium + 10 % DMSO in flüssigem Stickstoff. Für die einzelnen Versuche wurden die Zellen aufgetaut, in vorgewärmtes Medium überführt und bis zur Konfluenz wachsen gelassen.

HEp-2 Zellen wurden routinemäßig in RPMI-1640 mit 10 % FCS bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Kurz vor der Konfluenz wurden die Zellen mit PBS gewaschen und für 5 min bei 37 °C mit 1× Trypsin/EDTA (Sigma) behandelt. Die abgelösten Zellen wurden in frischem Medium aufgenommen und entsprechend verdünnt. Es wurden bis zu 20 Passagen durchgeführt.

Fibroblasten (NIH/3T3) wurden in DMEM + 15 % FCS bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Auch hier erfolgte eine Passagierung kurz vor Erreichen der Konfluenz nach einer Trypsinbehandlung. Für die 3T3-Zellen wurden maximal 20 Passagierungen durchgeführt.

Makrophagen der Maus wurden in DMEM + 10 % FCS bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Ein Ablösen der Zellen vor Erreichen der Konfluenz erfolgte hier jedoch durch 5minütige Inkubation der Zellen bei 37 °C in TEN-Puffer. Nach der Überführung und Verdünnung in frischem Medium wurden auch diese Zellen höchstens 20 Passagen unterzogen.

2.11.4 Adhäsionsassay

Für den Adhäsionsassay wurden ca. 10⁵ HEp-2 bzw. 3T3 Zellen in 24-Loch Platten in 1 ml Medium ausgesät und über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Das Medium wurde am nächsten Tag abgesaugt, die Zellen wurden mit PBS gewaschen und mit frischem Medium ohne FCS überschichtet. Die Inokulation erfolgte mit 5 µl *Candida*-Suspension (5×10⁵ Zellen) aus einer mittellogarithmischen Kultur. Um den Zell-Zell-Kontakt zu erleichtern wurden die Platten für 1min bei 800 g zentrifugiert und anschließend für 1 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Nicht-adhärenente *Candida*-Zellen wurden durch 6maliges Waschen mit PBS entfernt. Adhärenente *Candida*-Zellen wurden durch Zugabe von 200 µl 0,1% Triton X-100 von den HEp-2 Zellen gelöst, verdünnt und auf YPD-Agar ausplattiert. Nach einer Inkubation über Nacht bei 37 °C wurden die cfu bestimmt.

2.11.5 Interaktion mit Makrophagen

Die Analyse der Interaktion mit Makrophagen erfolgte nach einem Protokoll von Mille *et al.* (Mille *et al.*, 2004). Dazu wurden die Makrophagen in einer 24-Loch Platte ausgesät (ca. 10⁶ Zellen/Loch in 1 ml Medium) und über Nacht bei 37 °C und 5 %

CO₂ inkubiert. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und mit 1ml frischem DMEM ohne FCS überschichtet. Es wurden 30 µl *Candida*-Suspension (10⁹ Zellen/ml aus mittlerer logarithmischer Phase in YPD, PBS-gewaschen) hinzugegeben (Verhältnis Makrophage:*Candida* = 1:20) und nach einer Zentrifugation für 1 min bei 800 g wurden die Platten für 30 min bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Nicht-adhärenente Zellen wurden durch Waschen mit DMEM entfernt und die Platten wurden für weitere 90 min inkubiert. Durch Zugabe von 200 µl 0,1 % Triton X-100 wurden die Makrophagen lysiert und die *Candida*-Zellen wurden direkt mit einer Neubauer-Kammer gezählt. Zur Kontrolle der Überlebensrate wurden Aliquots auf YPD ausplattiert und am nächsten Tag die cfu bestimmt.

2.11.6 Bestimmung der Endocytose-/Invasionsrate von *C. albicans*

Die Bestimmung der Endocytose-/Invasionsrate von *C. albicans* erfolgte nach einem modifizierten Protokoll von Jacquinet *et al.* (Jacquinet *et al.*, 1998). Dazu wurden 10⁶ 3T3 Fibroblasten auf einem 12 mm Deckglas, welches zuvor mit Fibronectin beschichtet wurde, ausgesät. Die fast konfluenten Zellen wurden mit 10⁵ *Candida*-Zellen (mittlere logarithmische Phase YPD) in 1 ml DMEM ohne FCS infiziert, so dass sich ein Verhältnis Fibroblasten:*Candida* von 10:1 ergab. Nach einer Inkubation von 4 h bei 37 °C und 5 % CO₂ wurden das Medium aspiriert und nicht-adhärenente *Candida*-Zellen durch Waschen mit PBS entfernt. Die Zellen wurden für 15-30 min mit 200 µl 3 % para-Formaldehyd (Histofix) fixiert, mit PBS gewaschen und *Candida*-Zellen wurden für 1 h bei 37 °C mit 100 µl Ratten-Anti-*C. albicans* monoklonalem Antikörper CA-1 (1:2.000 verdünnt) gefärbt. Die Zellen wurden anschließend mit 250 µl Anti-Ratte IgM konjugiert mit Alexa Fluor 568 (1:500 verdünnt) gegengefärbt. Nach Waschen mit PBS wurden die Fibroblasten durch Zugabe von 200 µl 0,2 % Triton X-100 für 10 min permeabilisiert. Die *Candida*-Zellen wurden wiederum mit 500 µl Calcofluor (1:200) und Phalloidin (1:300) in Tris-HCl pH 9 für 20 min gefärbt. Nach abschließendem Waschen mit PBS wurden die Deckgläser invers mit Hilfe einer Fluoreszenz-Stabilisierungslösung unter Epifluoreszenz mit einem Eclipse E600-Mikroskop (Nikon) betrachtet. Dazu wurden Filtersätze zur Detektion von Alexa Fluor 568, Calcofluor und Phalloidin verwendet. Bilder wurden digital mit einer DXM1200-Kamera und der ACT1 2.63 Software (beides Nikon) aufgenommen.

2.11.7 Infektion von rekonstituiertem humanen Epithel (RHE)

Rekonstituierte humane orale Epithelien (RHE, 0,5 cm²; Skinethics) wurden nach der Lieferung in 1 ml frisches Versorgungs-Medium (Skinethics) gegeben und bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Bis zur weiteren Verwendung erfolgte ein täglicher Mediumswechsel.

Für eine Infektion von RHE wurden 50 µl einer semisynchronisierten *Candida*-Suspension (in PBS) auf die Epithelien appliziert und bei 37 °C und 5 % CO₂ bis zu 48 h inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde das Versorgungsmedium abgenommen und bei -20 °C bis zur Messung der Lactat-Dehydrogenase Aktivität gelagert. Die Messung der LDH-Aktivität erfolgte in Kooperation mit E. Januschke und M. Schaller an der LMU München bzw. der Universität Tübingen. Die infizierten Epithelien wurden mit einem sterilen Skalpell herausgeschnitten, in 2,5 % Glutaraldehyd mit 2 % para-Formaldehyd (in PBS) fixiert und bis zur weiteren Verwendung bei RT gelagert.

2.12 Mikroskopie

2.12.1 Lichtmikroskopie

Die Lichtmikroskopische Untersuchung der Leberbiopsien und der RHE-Proben erfolgte ebenfalls in Zusammenarbeit mit E. Januschke und M. Schaller von der LMU München bzw. der Universität Tübingen wie beschrieben (Schaller *et al.*, 1999).

Die fixierten Proben wurden in Dalton's Chrom-Osmium Fixativ nachfixiert und nach einigen Waschschritten für 1 h bei RT dehydriert. Die Proben wurden in Glycid-Ether eingebettet und mit einem Ultramikrotom (Ultracut) geschnitten. Semi-dünne Schnitte (1 µm) wurden lichtmikroskopisch nach Anfärbung mit 1 % Toluidin Blau und 1 % Pyronin G untersucht.

2.12.2 Immunoelektronenmikroskopie

Immunoelektronenmikroskopie zur ultrastrukturellen Lokalisation von Dfg16 wurde in Zusammenarbeit mit E. Januschke und M. Schaller von der LMU München bzw. der Universität Tübingen wie beschrieben durchgeführt (Fradin *et al.*, 2005).

Fixierte Zellen wurden zentrifugiert und das Sediment wurde in 3 % Agarose bei 37 °C eingebettet und auf Eis abgekühlt. Kleine Stücke der Agaroseblöcke wurden in Lowicryl (Polysciences) eingebettet. Ultradünne Schnitte (50 nm) wurden auf Formvar-beschichtete Nickel-Gitter gebracht und mit Kaninchen anti-Gfp Antikörper (Abcam) inkubiert. Anschließend folgte eine Inkubation mit Gold-konjugiertem anti-Kaninchen IgG (Auroprobe EM). Die Gitter wurden mit Uranyl-Acetat und Bleicitrat gegengefärbt und mit einem Zeiss 109 Transmissions Elektronenmikroskop untersucht.

2.13 *In silico* Analysen

Die Analyse von Gensequenzen wurde mit verschiedenen lokalen und Internet-basierten Programmen durchgeführt. Sequenzabgleiche von Gen- oder Proteinsequenzen und die Erstellung von Stammbäumen erfolgte mit der Lasergene 6 Software (DNASTAR Inc.). Für Annotationen und weitere Sequenzuntersuchungen wurden folgende Internet-gestützte Datenbanken verwendet:

Tabelle 2.5: In dieser Arbeit verwendete Datenbanken.

Datenbank	URL	Referenz
CandidaDB	http://genolist.pasteur.fr/CandidaDB/	(d'Enfert <i>et al.</i> , 2005)
Candida Genome Database	http://www.candidagenome.org/	(Arnaud <i>et al.</i> , 2005)
Saccharomyces Genome Database	http://www.yeastgenome.org/	(Christie <i>et al.</i> , 2004)
Comprehensive Yeast Genome Database	http://mips.gsf.de/genre/proj/yeast/index.jsp	(Guldener <i>et al.</i> , 2005)
NCBI Datenbanken	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/	
Resources for Fungal Comparative Genomics	http://fungal.genome.duke.edu/	
SignalP 3.0 Server	http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/	(Bendtsen <i>et al.</i> , 2004)
MAPPER	http://mapper.chip.org/	(Marinescu <i>et al.</i> , 2005)
TMpred	http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html	

Die Gensequenzen der verschiedenen untersuchten Pilze wurden von der Washington University (St.Louis, USA), dem Broad Institute (Cambridge, USA), dem Sanger Institute (Cambridge, Großbritannien), dem Genolevure Projekt, dem Stanford Genome Technology Center (Stanford, USA), dem Institute for Genomic Research (TIGR; Rockville, USA) und dem National Institute of Technology and Evaluation (NITE; Tokyo, Japan) bezogen.

2.14 Statistische Analysen

Das Überleben der Mäuse nach einer Infektion mit unterschiedlichen *C. albicans* Stämmen wurde über einen Log-Rang-Test verglichen. Unterschiede in der Organbelastung wurden mit Hilfe des Wilcoxon Rangsummentests bestimmt. Bei beiden Tests wurde ein *P*-Wert von $P \leq 0,05$ als signifikant angesehen.

Alle anderen Daten sind - wenn nicht anders angegeben - als Mittelwerte mit zugehöriger Standardabweichung dargestellt. Unterschiede wurden mit Hilfe des Student *t*-Tests ermittelt. Auch hier wurde *P*-Werte $\leq 0,05$ als signifikant betrachtet.