

# **Molekularbiologische Untersuchungen zur Pigmentsynthese von humanpathogenen Hefen**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des  
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie  
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von  
**Sascha Brunke**  
aus Kiel

Jena, im Jahr 2009

1. Gutachter: Prof. Dr. Bernhard Hube

2. Gutachter: Prof. Dr. Rupert Mutzel

Disputation am 05.03.2010





## Inhaltsverzeichnis

---

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Pilze als Pathogene	1
1.1.1	Klassifizierung von Mykosen	2
1.2	<i>C. glabrata</i> und <i>C. albicans</i>	3
1.2.1	Pathogenitätsfaktoren von <i>C. glabrata</i> im Vergleich	4
1.2.1.1	Morphologie	4
1.2.1.2	Adhäsion	5
1.2.1.3	Sekretorische Hydrolasen	6
1.2.1.4	Resistenz gegen Antimykotika	8
1.2.1.5	Immunevasion	8
1.3	Pigmente als Pathogenitätsfaktor	10
1.3.1	Bildung von Melaninen	11
1.3.1.1	DHN-Melanine	11
1.3.1.2	DOPA-Melanine	12
1.3.2	Biologische Wirkung von pilzlichen Melaninen	12
1.3.2.1	Stabilisierung der Zellwand	13
1.3.2.2	Schutz vor reaktiven Sauerstoffspezies	13
1.3.2.3	Schutz vor UV-Strahlung	14
1.3.2.4	Weitere biologische Effekte	14
1.4	Das Pigment von <i>C. glabrata</i>	15
1.4.1	Bekannte Strukturen des Pigments von <i>M. furfur</i>	15
1.4.2	<i>C. glabrata</i> als Modellorganismus für die Pigmentsynthese	16
1.5	Stoffwechsel von aromatischen Aminosäuren bei <i>C. glabrata</i>	17
1.5.1	Vergleich mit dem Aminosäurestoffwechsel von <i>S. cerevisiae</i>	18
1.6	Zielsetzung dieser Arbeit	20
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>21</b>
2.1	Medien, Mikroorganismen und Zelllinien	21
2.1.1	Medien	21
2.1.2	Verwendete Mikroorganismen	22
2.1.3	Verwendete Zelllinien	23
2.2	Plasmide und Oligonukleotide	23
2.2.1	Verwendete Plasmide	23
2.2.2	Verwendete Primer	23
2.3	Mikrobiologische Methoden und Phänotypische Untersuchungen	24
2.3.1	Anzucht und Lagerung von Mikroorganismen	24
2.3.2	Isolierung des Pigments	24
2.3.3	Bestimmung der Pigmentkonzentration	24
2.3.4	Anzucht in sauerstofffreier Atmosphäre	24
2.3.5	Bestimmung der Wachstumskurven	25
2.3.6	UV-Bestrahlungstest	25
2.3.7	Wasserstoffperoxidresistenztest	25
2.3.8	Messung der Hyphenlängen von <i>C. albicans</i>	26
2.3.8.1	Messung der Hyphenlängen im Fluoreszenzmikroskop	26
2.3.9	Bestimmung des Überlebens mit Neutrophilen	27

2.3.9.1	Isolation von Neutrophilen und Koinkubation .....	27
2.3.9.2	XTT-Reaktion zur Messung der metabolischen Aktivität .....	28
2.3.10	Messung der Zellschädigung von Epithelzellen .....	28
2.3.11	Verwendung des Eier-Infektionsmodells .....	29
2.4	Molekularbiologische Methoden .....	29
2.4.1	Präparation von DNA .....	29
2.4.1.1	Plasmid-Isolation aus <i>E. coli</i> .....	29
2.4.1.2	Isolation von genomischer DNA aus <i>C. glabrata</i> .....	30
2.4.2	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	30
2.4.3	Aufreinigung von Nukleinsäuren .....	31
2.4.4	Ligation von DNA .....	31
2.4.5	Hybrisierung von DNA auf Membranen (Southern-Blot) .....	32
2.4.5.1	Transfer der DNA auf die Membran durch Kapillarkräfte .....	32
2.4.5.2	Markierungsreaktion zur Sondenherstellung.....	33
2.4.5.3	Hybridisierungsreaktion und Nachweis.....	33
2.4.6	Transformation von <i>E. coli</i> .....	34
2.4.7	Transformation von <i>C. glabrata</i> .....	34
2.4.8	Heterologe Expression von Aro8 in <i>E. coli</i> .....	35
2.5	Durchmusterung der Mutantenbibliothek.....	36
2.5.1	Sequenzierung der Transposon-Insertionsstellen .....	37
2.5.2	Transformation zur Kontrolle des gefundenen Gens .....	37
2.6	Genexpressionsanalyse .....	38
2.6.1	Microarrays .....	38
2.6.1.1	Gemeinsame Referenzen .....	38
2.6.1.2	Probennahme für RNA-Isolierung .....	38
2.6.1.3	Markierungsreaktion .....	39
2.6.1.4	Hybridisierungsreaktion .....	39
2.6.2	Datenerfassung .....	40
2.6.3	GO-Term-Analysen.....	40
2.7	Datenaufbereitung und Datenauswertung .....	41
2.7.1	Verwendete Programme .....	41
2.7.2	<i>In silico</i> -Analysen.....	41
2.7.3	Statistische Verfahren.....	41
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>42</b>
3.1	Parameter für die Bildung des Pigments.....	42
3.1.1	Zeitlicher Verlauf.....	42
3.1.2	Abhängigkeit von Sauerstoff.....	43
3.1.2.1	Analyse der Zwischenprodukte .....	44
3.1.3	Abhängigkeit von anderen Stickstoffquellen.....	46
3.1.4	Abhängigkeit von initialer Zelldichte .....	48
3.1.5	Unabhängigkeit vom Wachstum.....	49
3.1.6	Einfluß der Kohlenstoffquelle .....	50
3.1.7	Benötigte Tryptophankonzentration .....	51
3.1.8	Einfluß von cAMP auf die Pigmentierung.....	52
3.1.9	Zusammenfassung des Abschnitts 3.1.....	54
3.2	Molekularbiologische Ansätze zur Aufklärung des Pigmentsynthesewegs .....	54
3.2.1	Analyse einer Mutantenbibliothek .....	54
3.2.1.1	Klassen von Mutanten .....	55

3.2.2	Mutanten mit verringerter Pigmentierung .....	56
3.2.2.1	Mutanten mit erhöhter Pigmentierung.....	57
3.2.3	Transkriptionsanalyse der Pigmentsynthese.....	58
3.2.3.1	Experimentelle Parameter.....	58
3.2.3.2	In Tryptophanmedium heraufregulierte Gene.....	60
3.2.3.3	Gene Ontology-Analyse der Daten.....	61
3.2.4	Generierung von gezielten Mutanten des Synthesewegs.....	65
3.2.4.1	Herstellung und Analyse von <i>aro10Δ</i> .....	65
3.2.4.2	Herstellung und Analyse von <i>aro9Δ</i> .....	68
3.2.4.3	Herstellung und Analyse von <i>aro8Δ</i> .....	70
3.2.5	Vergleich des Wachstums.....	73
3.2.6	Heterologe Expression von Aro8.....	75
3.2.7	Zusammenfassung Abschnitt 3.2.....	78
3.3	Biologische Wirkung des Pigments für <i>C. glabrata</i> .....	79
3.3.1	Schutz vor Wasserstoffperoxid.....	79
3.3.1.1	Zeitlicher Verlauf des Schutzes.....	79
3.3.1.2	Erhöhter Schutz der pigmentierten Wildtypzellen.....	80
3.3.1.3	Verringerter Schutz der Mutante <i>aro8Δ</i> .....	81
3.3.2	Schutz vor UV-Strahlung.....	83
3.3.2.1	Erhöhter Schutz gegen UV-A-, UV-B- und UV-C-Licht.....	83
3.4	Biologische Wirkung auf <i>C. albicans</i> .....	84
3.4.1	Reduktion der Hyphenbildung.....	85
3.4.1.1	Nachweis von Tryptophol.....	87
3.4.1.2	Wirkung von Tryptophol auf <i>C. albicans</i> .....	89
3.4.2	Transkriptionsanalyse der Hyphenrepression.....	90
3.4.3	Vergleich mit der Transkriptionsantwort auf Pigment.....	97
3.4.4	Fraktionierung des pigmenthaltigen Überstandes.....	100
3.5	Biologische Wirkung auf Wirtszellinteraktion.....	101
3.5.1	Schädigung von Epithelzellen durch pigmentierte <i>C. glabrata</i> .....	101
3.5.2	Keine meßbare Wirkung im Eierinfektionsmodell.....	103
3.5.3	Schutz von pigmentierten <i>C. glabrata</i> bei Koinkubation mit Neutrophilen.....	104
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>105</b>
4.1	Bedingungen der Pigmentsynthese.....	106
4.2	Modell der Pigmentsynthese.....	107
4.2.1	Technische Aspekte.....	108
4.2.2	Die Rolle von Aro8.....	109
4.2.2.1	Vergleich mit <i>S. cerevisiae</i> – Nomenklatur.....	109
4.2.2.2	Katabolische Funktion für aromatische Aminosäuren.....	111
4.2.2.3	Histidin als mögliches Substrat für Aro8.....	111
4.2.2.4	Pigmentbildung durch Aro8.....	113
4.2.3	Die Rolle von Aro10.....	114
4.2.4	Weitere relevante Proteine.....	115
4.2.5	Regulation der Pigmentsynthese.....	117
4.2.5.1	Die Rolle der Kohlenstoffquelle.....	117
4.2.5.2	Die Rolle des Sauerstoffs.....	118
4.2.5.3	Die Rolle der Stickstoffquellen.....	119
4.2.5.4	Wahrnehmung und Signaltransduktion.....	120
4.3	Schutzfunktion des Pigments.....	123

4.3.1	Vergleich mit Melaninen.....	123
4.3.2	Schutz vor UV-Licht.....	124
4.3.3	Schutz vor oxidativem Stress.....	125
4.3.4	Möglichkeiten der Synthese <i>in vivo</i> .....	127
4.3.5	Schutz vor dem Immunsystem des Wirtes.....	128
4.4	Wirkung des Pigments auf andere Organismen.....	129
4.4.1	Schädigung von Epithelzellen.....	129
4.4.2	Wirkung auf <i>C. albicans</i> .....	130
4.4.2.1	Tryptophol als Repressor der Hyphenbildung von <i>C. albicans</i> .....	131
4.4.2.2	Weitere hyphenreprimierende Pigmentbestandteile.....	132
4.5	Ist das Pigment ein Pathogenitäts- oder Virulenzfaktor von <i>C. glabrata</i> ?.....	134
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>135</b>
5.1	Summary.....	137
5.2	Ausblick.....	138
<b>6</b>	<b>Danksagungen.....</b>	<b>140</b>
<b>7</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>I</b>
7.1	Erklärung.....	I
7.2	Lebenslauf.....	II
7.3	Bisherige Publikationen.....	III
7.4	Poster und Präsentationen.....	IV
7.5	Stipendien und Preise.....	V
7.6	Genlisten.....	VI
7.6.1	Differentiell in Tryptophan hochregulierte <i>C. glabrata</i> -Gene.....	VI
7.6.2	In 5 mM Tryptophol mindestens 3× hochregulierte <i>C. albicans</i> -Gene.....	VII
7.6.3	In 5 mM Tryptophol mindestens 3× runterregulierte <i>C. albicans</i> -Gene.....	VIII
7.7	Abkürzungen und Herstellerverzeichnis.....	IX
7.8	Abbildungsverzeichnis.....	X
<b>8</b>	<b>Literatur.....</b>	<b>XII</b>







## 1 Einleitung

---

### 1.1 Pilze als Pathogene

---

Der Mensch ist ständig einer großen Zahl von Mikroorganismen ausgesetzt, sowohl was die Anzahl der individuellen Organismen betrifft als auch hinsichtlich der Zahl der unterschiedlichen Arten. Die meisten dieser Mikroben sind an das Leben auf oder in dem Menschen nicht angepaßt und werden vom Immunsystem rasch beseitigt. Andere wiederum sind in der Lage, sich als Kommensale oder Symbiont zu etablieren und mit dem Wirt in neutraler oder sogar gegenseitig nützlicher Koexistenz zu leben. Einige wenige jedoch können leichte und auch schwerste Erkrankungen des Menschen hervorrufen, die dann bis zum Tod führen können.

Die häufigsten Krankheitserreger sind Bakterien oder Viren, aber auch Eukaryoten können den Menschen als Wirt nutzen. Eine neben den Bakterien scheinbar unterrepräsentierte Gruppe von Mikroorganismen, die mit dem Menschen assoziiert sind, sind die Pilze. Pilze werden hauptsächlich als Zersetzer organischer Stoffe wahrgenommen oder vom Menschen für die Ernährung genutzt. Direkt werden ihre Fruchtkörper verzehrt, indirekt werden Pilze zur Erzeugung von Nahrungs- und Genußmitteln wie Brot, Bier und Wein eingesetzt.

Wenn Pilze als Krankheitserreger auftreten, dann zumeist bei Pflanzen und ektothermen Tieren. Die meisten Krankheiten der Nutzpflanzen werden von Pilzen verursacht (Sitte *et al.*, 2002), die wirtschaftliche Bedeutung dieser Phytopathogene ist entsprechend hoch (Weber, 1993). Unter den Tieren sind Fische, Amphibien und Insekten die häufigsten Wirte. So wird zum Beispiel der weltweite Rückgang der Amphibienpopulation auf pathogene Pilze zurückgeführt (Daszak *et al.*, 1999), und selbst für das Aussterben der Dinosaurier wurde eine Beteiligung von pilzlichen Erregern postuliert (Casadevall, 2005). Auch die Entdeckung der bedeutenden Funktion von Toll-artigen Rezeptoren für das Immunsystem geht auf die Infektion eines Insekts durch einen Pilz zurück – in diesem Fall *Drosophila melanogaster* und *Aspergillus fumigatus* (Lemaitre *et al.*, 1996).

### 1.1.1 Klassifizierung von Mykosen

---

Seltener befallen Pilze Menschen und andere warmblütige Tiere. Von den etwa 1,5 Millionen Pilzarten (Hawksworth, 2001) ist nur für knapp 150 ein pathogenes Potential bei Säugetieren bekannt (Kwon-Chung & Bennett, 1992). Aber auch in dieser Gruppe gibt es große Unterschiede in der relativen Bedeutung als Krankheitserreger und dem Grad der Erkrankung, den sie verursachen.

Klinisch am harmlosesten sind dabei die oberflächlichen oder superfiziellen Mykosen. Der oft von *Trichophyton rubrum* verursachte Fußpilz gehört dazu, aber auch oberflächliche Infektionen der Schleimhäute durch *Candida albicans* und zunehmend auch *Candida glabrata* (Borg-von Zepelin *et al.*, 2007). Tiefer gehende Infektionen, die bis in die Dermis vordringen, werden als subkutane Mykosen klassifiziert. Ein typischer Erreger ist hier *Sporothrix schenckii*, der Erreger der Sporotrichose. Diese Infektionen sind hartnäckiger und meist schwieriger zu behandeln.

Wenn ein Pilz die Blutbahn erreicht und sich im Körper ausbreitet, liegt die schwerste Form der Infektion vor, die systemische Mykose. Hier wird nochmals unterschieden zwischen Pilzen, die einen immunkompetenten Wirt befallen können und solchen, bei denen eine Schwächung des Immunsystems oder eine Vorschädigung des Wirts Voraussetzung für die Infektion ist. Zur ersten Gruppe, den primären Pathogenen, gehört beispielsweise *Histoplasma capsulatum*. Dieser pigmentproduzierende, dimorphe Pilz kann besonders in seinen Endemiegebieten in Nord- und Südamerika beim Einatmen der Sporen lebensbedrohende systemische Infektionen verursachen (Kauffman, 2007).

Als opportunistische Erreger dagegen werden diejenigen Pilze bezeichnet, die keine ansonsten gesunden Wirte befallen können. Viele dieser Pilze existieren ohne menschlichen oder tierischen Wirt in der Umwelt und werden erst bei der Infektion aufgenommen. Zu dieser Gruppe zählen zum Beispiel die pigmentproduzierenden Pilze *Aspergillus fumigatus*, *A. flavus* und *Cryptococcus neoformans* (Latge, 1999, Chayakulkeeree & Perfect, 2006).

Die wichtigste Gruppe der opportunistischen Pathogene dagegen lebt als Kommensale schon vor der Infektion in enger Verbindung mit dem Wirt. Zu diesen Pilzen gehören hauptsächlich die Spezies der Gattungen *Malassezia* (Ashbee & Evans, 2002) und *Candida*, die bei mindestens 70% der Bevölkerung als Kommensale nachgewiesen werden können (Ruhnke & Maschmeyer, 2002).

## 1.2 *C. glabrata* und *C. albicans*

---

Zur Gattung *Candida* gehören derzeit über 150 Arten, von denen 13 bisher auch als Pathogene des Menschen in Erscheinung getreten sind (Odds, 1988, Calderone, 2002). Insgesamt erreichen pilzliche Erreger bei nosokomialen Infektionen der Blutbahn mittlerweile einen Anteil von etwa zehn Prozent (Sandven, 2000, Blumberg *et al.*, 2001), mit weiter steigender Tendenz (Perlroth *et al.*, 2007). Die klinisch wichtigste invasive Mykose ist die von *Candida*-Spezies hervorgerufene Candidämie (Rees *et al.*, 1998). Candidämien haben eine mit etwa 30-35% vergleichsweise hohe Mortalitätsrate (Hajjeh *et al.*, 2004, Tortorano *et al.*, 2006). Bei den verursachenden Organismen gibt es eine klare Abstufung nach Arten – deutlich am häufigsten isoliert wird *C. albicans*. Je nach Land, Patientengruppe und zugrundeliegender Erkrankung verursachen *C. albicans*-Infektionen etwa die Hälfte aller Candidämien (Tortorano *et al.*, 2006). Aber schon als zweitwichtigster Erreger tritt in den meisten epidemiologischen Studien *C. glabrata* in Erscheinung, der mit einer Häufigkeit von 14% bis 24% isoliert wird (Tortorano *et al.*, 2006, Borg-von Zepelin *et al.*, 2007), dabei aber eine überdurchschnittliche Mortalität von 50% und mehr verursacht (Krcmery, 1999).

Zu den weiteren wichtigen *Candida*-Spezies gehören *C. parapsilosis*, der nahezu so häufig wie *C. glabrata* isoliert wird, und *C. tropicalis*. Gerade bei oberflächlichen Infektionen sind aber oftmals verschiedene Arten gemeinsam an einer Infektion beteiligt (Redding, 2001), seltener kann das auch bei invasiven Candidämien der Fall sein (Klotz *et al.*, 2007).

Welche Faktoren spielen also eine Rolle in der Entstehung dieser opportunistischen Infektionen? Auf der einen Seite gibt es eine Reihe von bekannten Risikofaktoren auf der Patientenseite. Klassischerweise zählt man dazu die Immunsuppression, zum Beispiel durch fortgeschrittene HIV-Infektion oder Therapien bei Organtransplantationen. Eine *Candida*-Infektion der Mundschleimhäute – der Soor – gilt als wichtiger Hinweis auf ein zugrundeliegende HIV-Infektion (Campo *et al.*, 2002). Neuere Untersuchungen (Perlroth *et al.*, 2007) zeigen jedoch mehr und mehr, dass von dem Bild der *Candida*-Infektion als alleiniges Problem der Immungeschwächten abgerückt werden muß. Bis zu 80% aller Patienten sind nicht auf die beschriebenen Arten immunsupprimiert (Kao *et al.*, 1999), als Hauptrisiko müssen vielmehr iatrogene Faktoren wie eine Antibiotikabehandlung, langer Krankenhausaufenthalt oder das Vorhandensein eines intravenösen Katheters betrachtet werden.

Auch auf der Pilzseite gibt es eine Vielzahl von sogenannten Pathogenitätsfaktoren, die das Entstehen von Krankheiten erst ermöglichen. Diese Merkmale sind wichtige Determinanten im Verlauf und Ausgang einer Infektion. Aus diesem Grund soll im Folgenden näher auf die Ausstattung von *C. albicans* und *C. glabrata* mit Pathogenitätsfaktoren eingegangen werden.

### 1.2.1 Pathogenitätsfaktoren von *C. glabrata* im Vergleich

Die Ascomyzeten *C. albicans* und *C. glabrata* gehören zu den wichtigsten opportunistischen Humanpathogenen. Obwohl die Mortalität bei Menschen mit *C. glabrata*-Infektionen sehr hoch ist, ist dieser Pilz in der Maus als Tiermodell überraschend wenig virulent – im Gegensatz zu *C. albicans* (Brieland *et al.*, 2001). Der folgende Vergleich macht deutlich, dass es neben vielen grundlegenden Gemeinsamkeiten, wie der Fähigkeit bei der vergleichsweise hohen Körpertemperatur der Säugetiere zu wachsen, deutliche Unterschiede in den spezifischen Pathogenitätsfaktoren der beiden Pilze gibt. Wahrscheinlich hat sich auch die Fähigkeit zur Infektion von Menschen bei beiden Pilzen unabhängig voneinander entwickelt, wie die vergleichsweise große phylogenetische Entfernung nahe legt (vgl. Abschnitt 1.4.2).

#### 1.2.1.1 Morphologie

*C. albicans* kann in vier distinkten morphologischen Formen wachsen, als Hefe, Pseudohyphe, echte Hyphe und selten auch als Chlamydospore. Jede dieser Formen zeigt ein anderes Transkriptionsprofil, bei dem spezifische Pathogenitätsfaktoren exprimiert werden. Die drei erstgenannten Formen spielen wahrscheinlich jede für sich wichtige Rollen im Infektionsprozess. Dafür spricht, dass die meisten Mutanten, bei denen der Übergang zwischen den Formen nicht mehr möglich ist, in ihrer Virulenz attenuiert sind (Braun & Johnson, 1997, Fu *et al.*, 1997).

Die Hyphenbildung wird als Antwort auf verschiedene Stimuli von einem komplexen Netzwerk von Genprodukten gesteuert (Liu, 2001). Zu den hypheninduzierenden Faktoren zählen Temperaturen über 35°C, neutraler bis alkalischer pH-Wert, Kontakt mit Oberflächen und die Gegenwart von Serum (Feng *et al.*, 1999). Hypheninhibierend wirken ein saures Milieu, niedrige Temperaturen und das *Quorum sensing*-System von *C. albicans* über den Botenstoff Farnesol (Hornby *et al.*, 2001).

Interessanterweise fehlt bei *C. glabrata* die Fähigkeit zur Hyphenbildung völlig. Der Pilz wächst normalerweise ausschließlich als Hefe und kann nur unter bestimmten Bedingungen, wie Stickstoffmangel, Pseudohyphen ausbilden (Csank & Haynes, 2000). Für die Infektion scheint diese Wuchsform jedoch im Gegensatz zu *C. albicans* keine Rolle zu spielen.

Ein weiteres Phänomen ist das sogenannte "Phenotypic Switching", ein spontanes Umschalten zwischen unterschiedlichen Phänotypen der Hefeform. Bei *C. albicans* ist der Wechsel zwischen der *White*- und der *Opaque*-Form (Slutsky *et al.*, 1987) am besten untersucht. Beide Formen scheinen Relevanz für verschiedene Infektionsprozesse zu haben, denn *White*-Zellen sind in einem systemischen Mausinfektionsmodell virulenter, *Opaque*-Zellen dagegen in einem Modell für kutane Infektionen (Kvaal *et al.*, 1999).

Auch bei *C. glabrata* wurde ein solches *Switching* beobachtet. Es konnten bisher zwei unabhängige Systeme beschrieben werden – das sogenannte "Core Switching"-System, das zwischen den verschieden stark braun gefärbten Phänotypen *White*, *Light Brown*, *Dark Brown* und *Very Dark Brown* wechselt (Lachke *et al.*, 2000) und ein zweites System, das zwischen dem normalen Hefe- und einem "Irregular Wrinkle" genannten Pseudohyphenwachstum umschaltet (Lachke *et al.*, 2002).

Bei den Phänotypen des *Core Switching* handelt es sich trotz der Braunfärbung nicht um eine Pigmentproduktion, sondern um eine chemische Reaktion, die nur auf speziellen Kupfersulfatmedien zu beobachten ist. Auf diesen Medien wird das Sulfat durch die phänotypspezifische Aktivität von Metallothioneinproteinen zu braunem Kupfer(II)-sulfid reduziert (Srikantha *et al.*, 2005). Interessanterweise kommt es aber auch bei *C. glabrata* während der Infektion zu einer Anreicherung bestimmter *Switching*-Phänotypen an verschiedenen Infektionsorten (Brockert *et al.*, 2003). Außerdem wurde im Mausmodell eine erhöhte Virulenz des *Dark Brown*-Phänotyps gefunden (Srikantha *et al.*, 2008), deren genauen Ursachen jedoch noch unklar sind.

### 1.2.1.2 Adhäsion

---

Sowohl *C. albicans* als auch *C. glabrata* besitzen spezifische Proteine zur Adhäsion aneinander und an Wirtszellen. Der erstgenannte Prozess ist wichtig für die Ausbildung von Biofilmen, die besonders an Kathetern zu einer steten Infektionsquelle werden können

(Kojic & Darouiche, 2004), der zweite ist wichtig für die Initiation des Infektionsvorgangs von Wirtszellen (Cannon *et al.*, 1995).

Bei *C. albicans* gibt es eine Familie von acht Proteinen mit einer agglutininähnlichen Struktur, die Als-Proteinfamilie (Hoyer, 2001). Die einzelnen Mitglieder werden zumeist hefen- oder hyphenspezifisch exprimiert. Zusammen mit dem Protein Hwp1 (Staab *et al.*, 1999) können die Als-Adhäsine die Bindung an Epithel- und Endothelzellen vermitteln (Sundstrom, 1999, Zhao *et al.*, 2004) oder durch komplementäre Bindung das Wachstum als Biofilm ermöglichen (Nobile *et al.*, 2008). Außerdem ist Als3 in der Lage, wenigstens ein weiteres Wirtspoltein, das Eisenspeicherprotein Ferritin zu binden, und so zur Eisenversorgung während der Infektion beizutragen (Almeida *et al.*, 2008). Möglicherweise gibt es also für diese Adhäsine mehr Funktionen als derzeit bekannt sind.

*C. glabrata* bindet an Wirtszellen schwächer als *C. albicans* (Biasoli *et al.*, 2002, Nikawa *et al.*, 2003). Trotzdem verfügt auch *C. glabrata* über eine große Zahl von Adhäsinen, die hauptsächlich Mitglieder der lektinähnlichen Epa-Proteinfamilie sind (Epa für *Epithelial Adhesion*) (Cormack *et al.*, 1999). Die meisten EPA-Gene sind nahe den Telomeren angeordnet und unterliegen dort einem subtelomerischen Silencing (De Las Penas *et al.*, 2003), das ihre Expression reguliert. Bei der Harnwegsinfektion durch *C. glabrata* beispielsweise löst der Nikotinsäuremangel im Harn so die Expression der Epa-Adhäsine aus. Erst damit kommt es zu einer Adhäsion an die Wirtszellen (Domergue *et al.*, 2005). Jüngste Untersuchungen zeigen eine noch weitaus größere Zahl – 67 – von möglichen Adhäsinen, die in verschiedenen Kombinationen abhängig von den Umweltbedingungen in die Zellwand integriert werden können (de Groot *et al.*, 2008). Beiden hier beschriebenen Pilzen gemein ist also ein großes Arsenal an jeweils spezifisch regulierten Adhäsinen, die für die erfolgreiche Infektion unerlässlich zu sein scheinen.

### 1.2.1.3 Sekretorische Hydrolasen

---

Ein weiterer wichtiger Pathogenitätsfaktor von *C. albicans* ist die Produktion einer Vielzahl von hydrolytischen Enzymen, die das Wirtsgewebe zerstören können. So besitzt *C. albicans* mindestens zehn sekretorische Aspartatproteasen (Saps), die unter verschiedenen Wachstumsbedingungen exprimiert werden können (Naglik *et al.*, 2003). Eine Sonderrolle kommt dabei den Proteinen Sap9 und Sap10 zu, die zellwandständig sind und dort



möglicherweise pilzeigene Proteine prozessieren (Albrecht *et al.*, 2006). Generell wird die hohe extrazelluläre proteolytische Aktivität von *C. albicans* mit seiner Virulenz in Verbindung gebracht (Hube & Naglik, 2001).

Solche extrazellulären Proteasen sind bei *C. glabrata* nicht bekannt (Kaur *et al.*, 2005), und im Kulturüberstand ist keine bedeutende proteolytische Aktivität nachweisbar (Chakrabarti *et al.*, 1991). Jedoch konnten auch hier eine Gruppe von zellwandständigen Proteasen gezeigt werden, die eine wichtige Rolle im Umsatz von anderen Zellwandproteinen haben. Die den Yapsinen von *Saccharomyces cerevisiae* ähnlichen Proteasen sorgen für einen ständigen Umbau der Zellwand und spielen so eine wichtige Rolle für die Virulenz (Kaur *et al.*, 2007).

Lipasen sind eine weitere Gruppe wichtiger hydrolytischer Enzyme. Auch hier verfügt *C. albicans* über eine Genfamilie mit zehn Mitgliedern (Fu *et al.*, 1997, Hube *et al.*, 2000). Einige dieser Lipasen werden während intraperitonealen Infektionen exprimiert (Hube *et al.*, 2000) und eine Deletionsmutante des *LIP8*-Gens zeigt eine verminderte Virulenz im Mausmodell (Gacser *et al.*, 2007). Für *C. albicans* scheinen die Lipasen also eine wichtige Rolle in der Pathogenese zu spielen. Im Gegensatz dazu konnte für *C. glabrata* bisher keine extrazelluläre lipolytische Aktivität gefunden werden (Dolapci *et al.*, 2004), ebensowenig wie ein Gen, das für eine sekretierte Lipase kodieren könnte (Fu *et al.*, 1997).

Phospholipaseaktivität aller vier Hauptgruppen (A-D) kann im Überstand von *C. albicans* nachgewiesen werden (Niewerth & Kortling, 2001). Wenigstens für Proteine mit Phospholipase-B-Aktivität konnte auch eine Sezernierung gezeigt werden (Mavor *et al.*, 2005). Auch hier zeigt eine Mutante eine verminderte Virulenz im Mausmodell (Leidich *et al.*, 1998). Bei *C. glabrata* ist das Vorhandensein oder Nichtvorhandensein von Phospholipaseaktivität nicht endgültig geklärt. In einige Arbeiten konnten keine solche Aktivität gefunden werden (Samaranayake *et al.*, 1984, Gokce *et al.*, 2007), während andere bei etwa der Hälfte der untersuchten Isolate Phospholipase-B-Aktivität feststellen konnten (Ghannoum, 2000). Aber auch diese Aktivität war deutlich geringer als diejenige von *C. albicans*. Die Bedeutung einer möglichen Phospholipaseaktivität für die Virulenz von *C. glabrata* bleibt damit vorerst unklar.

#### 1.2.1.4 Resistenz gegen Antimykotika

---

Klinisch werden verschiedene Stoffklassen von Antimykotika bei *Candida*-Infektionen eingesetzt. Im allgemeinen beginnt die Therapie dabei mit einem Antimykotikum der Azolklasse, zum Beispiel Fluconazol (Guery *et al.*, 2008, Pappas *et al.*, 2009), das auch gegen viele andere pathogene Pilze wie *Cr. neoformans* oder *H. capsulatum* wirkt. Resistenzen gegen Azole sind bei *C. albicans* sehr selten, weniger als 1% der klinischen Isolate sind beispielsweise gegen Fluconazol resistent (Tortorano *et al.*, 2006).

Im Gegensatz dazu zeigt *C. glabrata* eine natürliche hohe Resistenz gegen Fluconazol und andere Azole (Tortorano *et al.*, 2006). Diese Resistenz kann unter Selektionsdruck durch Antimykotika *in vivo* (vanden Bossche *et al.*, 1992) und *in vitro* (Borst *et al.*, 2005) sogar noch erhöht werden. Die Resistenzentwicklung stellt unter klinischen Bedingungen ein großes Problem dar (Vermitsky *et al.*, 2006), und bei einem Nachweis von *C. glabrata* muß schnellstmöglich auf andere Stoffklassen ausgewichen werden (Pappas *et al.*, 2009).

Zwei hauptsächliche Mechanismen stehen hinter dieser Resistenz. Zum einen ist *C. glabrata* in der Lage, die Expression von Effluxpumpengene wie *CDR1* und *CDR2* in Gegenwart von Antimykotika hochzuregulieren (Sanglard *et al.*, 1999, Ferrari *et al.*, 2009). Durch diesen Mechanismus wird die Wirkstoffkonzentration in der Zelle gering gehalten. Zum anderen kann *C. glabrata* das Ziel der Azole, die Lanesterol-14 $\alpha$ -Demethylase Erg11, überexprimieren und so die Wirksamkeit der Antimykotika verringern (Marichal *et al.*, 1997). Eine weitere Möglichkeit des Pilzes besteht darin, die Funktion der Mitochondrien reversibel zu unterdrücken (Kaur *et al.*, 2004). Dies geschieht möglicherweise über eine epigenetische Steuerung. Zusammenfassend kann gesagt werden, daß *C. glabrata* eine hohe natürliche Resistenz gegen bestimmte Antimykotika hat, die auf verschiedenen Wegen noch weiter erhöht werden kann.

#### 1.2.1.5 Immunevasion

---

Die Interaktion mit dem Immunsystem des Wirts ist ein sehr wichtiger Schritt in der Etablierung einer Infektion. Bereits bei den ersten Schritten, der Cytokinantwort der Epithelzellen auf Kontakt mit dem möglichen Krankheitserreger, gibt es deutliche Unterschiede zwischen *C. albicans* und *C. glabrata*.

In einem *in vitro*-Modell der menschlichen oralen Mukosa löst *C. albicans* eine starke proinflammatorische Cytokinantwort aus – unter anderem werden von den Epithelzellen IL-1 $\alpha$ , IL-8, Tumornekrosefaktor TNF und *Granulocyte Monocyte Colony-Stimulating Factor* (GM-CSF) produziert (Schaller *et al.*, 2002). Im Gegensatz dazu ist die Reaktion der Epithelzellen auf eine Infektion mit *C. glabrata* geringer, die proinflammatorische Antwort bleibt größtenteils aus (Li & Dongari-Bagtzoglou, 2007). Als einzige Ausnahme wird GM-CSF induziert. Damit einher geht eine geringere Zellschädigung durch *C. glabrata*, die bei *C. albicans* durch die Invasion von Hyphen in das künstliche Gewebe verursacht wird (Schaller *et al.*, 2002).

Beide Pilze werden nach dem Eindringen in Gewebe von Zellen der angeborenen Immunabwehr angegriffen. *C. albicans* bildet unter diesen Umständen Hyphen aus und kann so unter anderem phagozytierenden Makrophagen wieder entkommen (Borg-von Zepelin *et al.*, 1998). Neutrophile dagegen unterdrücken diese Hyphenbildung effektiv und stellen eine sehr viel wirksamere Waffe gegen den eindringenden Pilz dar (Fradin *et al.*, 2005). Über die direkte Interaktion von *C. glabrata* mit Immunzellen ist dagegen bisher weniger bekannt. Während einer Infektion zeichnen sich die Infiltrate durch die weitgehende Abwesenheit von Neutrophilen aus, während Makrophagen regelmäßig zu finden sind (I. Jacobsen, persönliche Mitteilung). Interessanterweise kann *C. glabrata* in Makrophagen *in vitro* gut überleben und sogar wachsen (K. Seider, persönliche Mitteilung; (Kaur *et al.*, 2007)).

Das Abtöten von *Candida*-Zellen durch Makrophagen und Neutrophile erfolgt zu einem großen Teil über den oxidativen Burst (Vazquez-Torres & Balish, 1997). Gegen diesen Angriff setzen Pilze unter anderem eine Kombination von Superoxiddismutasen und Katalasen ein, die das schädliche Superoxid in zwei Schritten zu Wasser umsetzen. Für eine Superoxiddismutase von *C. albicans*, Sod5, konnte *in vitro* eine Rolle für das Überleben bei Interaktion mit Neutrophilen nachgewiesen werden (Fradin *et al.*, 2005). *In vivo* zeigt eine Mutante, der Sod5 fehlt, eine abgeschwächte Virulenz in der Maus (Martchenko *et al.*, 2004). Wird die einzige Katalase von *C. albicans* durch Mutation ausgeschaltet, dann sind die Zellen sensitiver gegen oxidativen Stress, Makrophagen und Neutrophile (Wysong *et al.*, 1998, Nakagawa *et al.*, 2003).

*C. glabrata* ist gegen oxidativen Stress deutlich resistenter als *C. albicans* oder *S. cerevisiae*. Diese Resistenz wird *in vitro* durch eine von zwei in diesem Pilz vorhandenen Katalasen,

Cta1, vermittelt (Cuellar-Cruz *et al.*, 2008). Trotzdem zeigt eine Mutante dieses Gens keine Abschwächung der Virulenz im Mausmodell (Cuellar-Cruz *et al.*, 2008). Welche möglichen anderen Systeme in der *in vivo*-Situation die Detoxifikation der reaktiven Sauerstoffspezies übernehmen können, ist derzeit noch unklar.

Zusammenfassend scheint *C. glabrata* eine passivere Strategie als *C. albicans* zu verfolgen. Die geringe Cytokinantwort, das Überleben in phagozytierenden Zellen und die hohe Toleranz gegen oxidativen Stress sprechen ebenso dafür wie die subklinisch verlaufenden Infektionen im Tierversuch. Im Gegensatz dazu stehen die vergleichsweise intensive Immunantwort bei Infektionen mit *C. albicans* und dessen aktive Evasionsmechanismen, die zum Teil auf dem Hefen-Hyphenübergang basieren. Tabelle 1-1 faßt einige der wichtigsten Unterschiede noch einmal zusammen und bietet einen Vergleich mit dem Modellorganismus *S. cerevisiae*.

Tabelle 1-1: Vergleich von *C. glabrata*, *C. albicans* und *S. cerevisiae*, verändert nach (Kaur *et al.*, 2005)

	<i>C. glabrata</i>	<i>C. albicans</i>	<i>S. cerevisiae</i>
<b>Ploidie</b>	Haploid	Diploid	Haploid/Diploid
<b>Pathogenität</b>	Opportunist	Opportunist	Meist apathogen
<b>Sexueller Zyklus</b>	Nicht bekannt	Unvollständig	Bekannt
<b>Phänotypen-Switching</b>	Vorhanden	Vorhanden	Nicht vorhanden
<b>Echte Hyphen</b>	Nicht vorhanden	Vorhanden	Nicht vorhanden
<b>Pseudohyphen</b>	Vorhanden (selten)	Vorhanden	Vorhanden
<b>Adhäsine</b>	Lektine (Epa)	Lektine Hwp1 Als-Proteine	Lektine (Flo) Agglutinine
<b>Sezernierte Hydrolasen</b>	Nicht bekannt	Proteasen (Sap1-8) Lipasen (Lip1-10) Phospholipasen	Protease (Bar1, nur im sexuellen Zyklus)
<b>Auxotrophien</b>	Niacin, Thiamin, Pyridoxin	Keine	Keine
<b>Wirkung von Azolen</b>	Resistent	Empfindlich	Empfindlich

### 1.3 Pigmente als Pathogenitätsfaktor

Ein weiterer für viele Pilze wichtiger Pathogenitätsfaktor ist die Bildung von Pigmenten. In den meisten Fällen handelt es sich dabei um Melanine, Stoffgemische verschiedener Polymere mit meist dunkelbrauner bis schwarzer Färbung. Die Melaninproduktion ist in der Natur weit verbreitet, sie tritt bei Insekten ebenso auf wie bei Wirbeltieren und Mollusken – die Tinte der Tintenfische erhält ihre Färbung ebenso wie die menschliche Haut durch

Melanine. Auch Pflanzen, Bakterien und eben Pilze können diese Verbindungen herstellen – in den meisten Fällen zum Schutz vor schädlichen Umwelteinflüssen. Im Folgenden soll die Rolle von Melaninen bei Pilzen genauer betrachtet werden.

### 1.3.1 Bildung von Melaninen

---

Eine genaue Definition von Melaninen ist schwierig bis unmöglich. Im allgemeinen werden hochmolekulare dunkelfarbige Substanzen, die in wässrigen und organischen Lösungsmitteln unlöslich sind und unter oxidierenden Bedingungen ausbleichen, aber gegen Säuren resistent sind, als Melanin bezeichnet (Nosanchuk & Casadevall, 2003). Eine andere Definitionsmöglichkeit beruht auf der Tatsache, dass Melanine stabile freie Radikale enthalten, die über Elektronenspinresonanz nachgewiesen werden können (Enochs *et al.*, 1993). Nach dem Syntheseweg werden zwei Hauptgruppen unterschieden, die DHN-Melanine und die DOPA-Melanine. Diese Unterscheidung wird auch im Folgenden verwendet. Eine andere mögliche Unterteilung basiert auf der chemischen Zusammensetzung des Endprodukts und unterscheidet zwischen braun-schwarzen Eumelaninen, rötlichen Phaeomelaninen (enthalten zusätzlich Schwefel) und Allomelaninen (enthalten meist keinen Stickstoff).

#### 1.3.1.1 DHN-Melanine

---

DHN-Melanine tragen ihren Namen nach dem Zwischenprodukt 1,8-Dihydroxynaphtalen. Biotechnologisch wichtige Pilze und Modellpilze, wie zum Beispiel *A. nidulans* und *A. niger*, Humanpathogene wie *A. fumigatus*, aber auch der pflanzenpathogene Pilz *Verticillium dahliae*, bei dem die Synthese von DHN-Melaninen erstmals beschrieben wurde (Wheeler, 1982), produzieren DHN-Melanine.

Der DHN-Melaninsyntheseweg beginnt mit der Verknüpfung von Malonyl-CoA-Einheiten zu 1,3,6,8-Tetrahydroxynaphthalen. Diese Reaktion wird – wie viele andere Reaktionen des Sekundärmetabolismus (Gokhale *et al.*, 2007) – von einer Polyketidsynthase katalysiert (Langfelder *et al.*, 1998, Watanabe *et al.*, 2000). Das entstehende Produkt wird danach von jeweils spezifischen Enzymen reduziert, dehydriert zu Trihydroxynaphtalen, nochmals reduziert und dann zum namensgebenden Dihydroxynaphtalen dehydriert. Dieses polymerisiert, katalysiert durch eine Laccase, zu Melanin (Langfelder *et al.*, 2003). Insgesamt

sind also bis zu sechs Genprodukte notwendig, um DHN-Melanin zu synthetisieren. Ungewöhnlicherweise sind diese Gene bei *A. fumigatus* als Cluster im Genom angelegt (Tsai *et al.*, 1999), eine bei Pilzen seltene Anordnung.

### 1.3.1.2 DOPA-Melanine

---

Die DOPA-Melanine wurden nach dem archetypischen Ausgangsstoff L-3,4-Dihydroxyphenylalanin benannt, aus dem in der Pigmentsynthese ein Polymer von Hydroxyindolderivaten entsteht. Zu den humanpathogenen Pilzen, die auf diesem Weg Melanin erzeugen, gehören unter anderem *Cryptococcus neoformans* (Staib, 1962, Chaskes & Tyndall, 1975), *Paracoccidioides brasiliensis* (Gomez *et al.*, 2001), *Histoplasma capsulatum* (Nosanchuk *et al.*, 2002) und *Penicillium marneffeii* (Youngchim *et al.*, 2005).

Der Reaktionsweg ist vergleichsweise einfach (Bell & Wheeler, 1986), er beginnt mit der Wirkung einer Phenoloxidase auf das Substrat, meist L-DOPA oder Tyrosin – entsprechend dem Substrat werden Phenoloxidasen in Laccasen und Tyrosinasen unterteilt. Das entstehende Dopachinon ist hochreaktiv und wird über Hydroxylierung und Decarboxylierung in Dihydroxyindol überführt, das seinerseits spontan zum DOPA-Melanin polymerisiert (Langfelder *et al.*, 2003). Im Gegensatz beispielsweise zur DOPA-Melanin-Synthese bei Säugetieren (Winder *et al.*, 1994) ist bei *Cr. neoformans* neben der Laccase kein weiteres Enzym für den gesamten Reaktionsweg notwendig (Williamson, 1994).

### 1.3.2 Biologische Wirkung von pilzlichen Melaninen

---

Die biologischen Effekte der Pigmente sind beinahe so vielfältig wie ihre Strukturen (Jacobson, 2000, Langfelder *et al.*, 2003). Die vergleichsweise aufwendige Synthese und die von der Wachstumsphase oder den Umweltbedingungen abhängige Regulation deuten auf eine wichtige Rolle für die produzierenden Pilze hin, die auf verschiedenen Ebenen *in vitro* und *in vivo* untersucht wird. Unter den humanpathogenen Pilzen ist die Wirkung von Melaninen bei *Cr. neoformans* bislang am besten erforscht, gefolgt von pigmentierten *Aspergillus*-Arten. Aber auch für andere Pilze liegen ähnliche Beobachtungen vor, wodurch eine grobe Klassifizierung der biologischen Effekte von Melaninen möglich ist.

### 1.3.2.1 Stabilisierung der Zellwand

---

Melanine werden oft als defensiver "Schild" der Pilze beschrieben. Tatsächlich sind viele der Effekte scheinbar defensiv und basieren auf der Abwehr von schädlichen Umwelteinflüssen. Für solche Funktionen ist von Bedeutung, dass Melanin in und auf der Zellwand abgelagert wird und dort seine Wirkung als erste Barriere gegen Schäden von außen entfalten kann. Durch Einlagerung von Melanin in die Zellwand erhält diese eine größere Stabilität gegen enzymatische Lyse (Kuo & Alexander, 1967) und mechanischen Stress (Brush & Money, 1999). Eine beeindruckende Bestätigung der erhöhten Stabilität stellt die Existenz sogenannter Melaningeister ("melanin ghosts") dar (Wang *et al.*, 1996). Diese leeren Zellwandhüllen bleiben bei melanisierten Zellen auch nach einer Behandlung mit chaotropen Salzen, kochender konzentrierter Salzsäure und lytischen Enzymen zurück. Nicht melanisierte Zellen werden bei dieser Methode dagegen vollständig zerstört. Auch die Größe der Poren innerhalb der Zellwand nimmt unter Melanisierung ab (Jacobson & Ikeda, 2005), was den Fluß von größeren Molekülen in das Cytoplasma und aus ihm heraus beschränkt. Zusätzlich zu der mechanischen Verstärkung wirkt die Melanisierung dadurch als osmotische Barriere.

### 1.3.2.2 Schutz vor reaktiven Sauerstoffspezies

---

Bei Arten der Gattung *Cryptococcus* konnte mit Mutanten der Melaninsynthese gezeigt werden, dass Melanin den Pilz gegen die Oxidationsmittel Hypochlorit und Permanganat schützen kann (Jacobson & Tinnell, 1993). Auch Mutanten von *Sporothrix schenckii* sind sensitiver gegenüber der oxidativen Wirkung von Wasserstoffperoxid (Romero-Martinez *et al.*, 2000). *In vivo* scheint dies für das Überleben im Phagolysosom wichtig zu sein, denn pigmentlose Mutanten von *S. schenckii* (Romero-Martinez *et al.*, 2000) und *Wangiella dermatitidis* (Schnitzler *et al.*, 1999) überleben in Makrophagen und Neutrophilen deutlich schlechter als der Wildtyp, obwohl der oxidative Burst in beiden Fällen gleich ist. Ein ähnlicher Effekt wurde bei *Cr. neoformans*-Mutanten beobachtet (Wang *et al.*, 1995). Indirekt kann Melanin auch vor den Immuneffektorzellen schützen, indem es die Phagozytose behindert (Wang *et al.*, 1995) oder die Produktion von proinflammatorischen Cytokinen wie TNF- $\alpha$  inhibiert (Huffnagle *et al.*, 1995). Beides wurde für *Cr. neoformans*

nachgewiesen und dürfte auch auf andere melanisierte Pilze zutreffen. Interessanterweise wurde bei *Cr. neoformans* eine reziproke Beziehung zwischen Melanin und der Expression von Superoxiddismutasen beobachtet. Die Anwesenheit von Melanin könnte also teilweise die Funktion des Enzyms beim Entgiften von Superoxiden übernehmen (Jacobson *et al.*, 1994).

### 1.3.2.3 Schutz vor UV-Strahlung

---

Häufig sind Konidien von Pilzen melanisiert, so zum Beispiel bei *Aspergillus*-Arten und *S. schenkii*. Diese Verbreitungsformen sind im Sonnenlicht schädlicher UV-Strahlung ausgesetzt, gegen die eine Melaninschicht auf den Konidien sehr effizient schützen kann (Romero-Martinez *et al.*, 2000, Singaravelan *et al.*, 2008). Auch die vegetativen Wachstumsformen anderer freilebender Pilze wie *Cr. neoformans* zeigen bei Melaninbildung *in vitro* einen erhöhten Schutz vor UV-Licht (Wang & Casadevall, 1994a). Die Schutzwirkung basiert dabei entweder auf der direkten Absorption des UV-Lichts durch das Pigment oder auf der Neutralisierung der entstandenen Radikale, möglicherweise auch durch beide Mechanismen gleichzeitig.

Auf ähnlichen Mechanismen scheint auch der bei einigen Pilzen beobachtete Schutz vor erhöhter Temperatur zu basieren (Rosas & Casadevall, 1997). Melanin könnte dabei die von der Zelle produzierten Sauerstoffradikale abfangen (Jacobson, 2000).

### 1.3.2.4 Weitere biologische Effekte

---

Zu den weiteren Wirkungen von Melaninen, auf die hier nicht näher eingegangen werden soll, zählt der Schutz vor Antimykotika bei *Cr. neoformans*, der möglicherweise durch die geringere Durchlässigkeit der melanisierten Zellwand hervorgerufen wird (Wang & Casadevall, 1994b). Auch wird Melanin von verschiedenen Pflanzenpathogenen genutzt, um in der so verschlossenen und verstärkten Zellwand Drücke von bis zu 80 bar zu erzeugen und so die pflanzliche Kutikula zu durchdringen (de Jong *et al.*, 1997).

Eine weitere interessante, nicht umstrittene Beobachtung wurde 2007 von der Arbeitsgruppe um Casadevall publiziert: Im 1986 zerstörten Reaktorblock 4 des Kernkraftwerks Tschernobyl wurden stark pigmentierte Pilze entdeckt, die dort trotz der



extrem hohen Radioaktivität wuchsen. Tatsächlich konnte später nachgewiesen werden, dass Melanin diese und andere pigmentierte Pilze nicht nur vor radioaktiver Strahlung schützen kann, sondern sogar zu einer erhöhten Stoffwechselrate und schnellerem Wachstum führt (Dadachova *et al.*, 2007). Ob Pilze aber tatsächlich die Energie der ionisierenden radioaktiven Strahlung nutzen können, ist unklar.

## 1.4 Das Pigment von *C. glabrata*

---

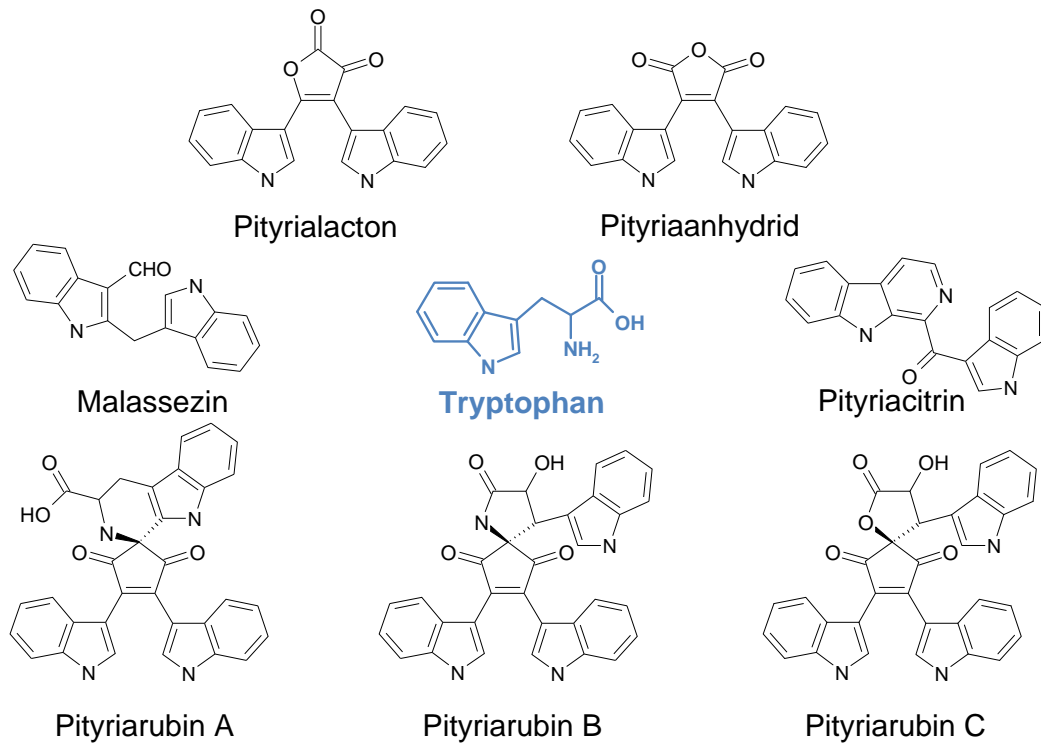
Auch für *C. glabrata* wurde kürzlich die Bildung eines braunen Pigments beschrieben, wenn als einzige Stickstoffquelle Tryptophan zur Verfügung gestellt wird (Mayser *et al.*, 2007). Darin gleicht es dem Basidiomyceten *Malassezia furfur*, einem auf der Haut lebenden opportunistischen Pathogen, bei dem ein solches Pigment erstmals entdeckt und näher untersucht wurde (Mayser *et al.*, 1998, Mayser *et al.*, 2004, Hort *et al.*, 2008a).

Tatsächlich ähneln sich die Chromatogramme der beiden Pigmente derart, dass davon ausgegangen werden kann, dass sich die meisten Verbindungen von *M. furfur* auch in dem Pigment von *C. glabrata* wiederfinden lassen können (Mayser *et al.*, 2007). Beobachtungen zur Funktion des Pigments bei einem Pilz lassen sich also wahrscheinlich auch auf den jeweils anderen übertragen.

### 1.4.1 Bekannte Strukturen des Pigments von *M. furfur*

---

Bei *M. furfur* wird das Pigment in Gegenwart von Tryptophan als einziger Stickstoffquelle in das Medium abgegeben. Es erscheint dabei rötlich-braun, mit einer grün-gelben Fluoreszenz im UV-Licht (Mayser *et al.*, 1998). Chromatographische Analysen lassen eine Vielzahl von unterschiedlich gefärbten Verbindungen unterscheiden (Abbildung 1-1), die zum größten Teil sowohl bei *M. furfur* als auch bei *C. glabrata* nachgewiesen werden konnten (Mayser *et al.*, 2007). Zu den bekannten Verbindungen gehören unter anderem Pityriacitrin, eine gelbes Indolderivat mit UV-Absorptionseigenschaften (Mayser *et al.*, 2002, Machowinski *et al.*, 2006), die roten Bisindolverbindungen Pityriarubin A, B und C, die in aktivierten Granulozyten die Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies unterdrücken können (Kramer *et al.*, 2005a) und Malassezin, eine farblose Verbindung, die als Agonist des



**Abbildung 1-1:** Bekannte Strukturen aus dem Pigment von *M. furfur*. Die im Text erwähnten Verbindungen sind hier im Vergleich mit der Ausgangsaminosäure Tryptophan gezeigt. Strukturen nach (Mayser et al., 2002, Kramer et al., 2005a, Kramer et al., 2005b)

Arylhydrocarbonrezeptors wirken (Wille *et al.*, 2001a) und zur Apoptose von menschlichen Melanozyten führen kann (Kramer *et al.*, 2005b).

Viele weitere Verbindungen sind bereits beschrieben (Mayser *et al.*, 2003), aber nicht alle auf ihre Wirkung hin untersucht. Viele weitere im Chromatogramm sichtbare Stoffe sind überhaupt noch nicht analysiert worden. Die Bandbreite der möglichen Effekte des Pigments dürfte also noch größer sein als bisher bekannt.

Neben diesen Verbindungen sind die *Malassezia*-Spezies auch in der Lage, aus L-DOPA und Tyrosin Melanine zu bilden (Gaitanis *et al.*, 2005). Allerdings erfolgt die Melaninsynthese scheinbar unabhängig von der Produktion des tryptophanabhängigen Pigments. So bildet *M. furfur* nur sehr wenig Melanin, aber große Mengen des hier beschriebenen Pigments (Mayser *et al.*, 2004).

#### 1.4.2 *C. glabrata* als Modellorganismus für die Pigmentsynthese

Der Syntheseweg für das Pigment bei *M. furfur* konnte bislang nicht aufgeschlüsselt werden. Einer der Hauptgründe dafür ist, dass kaum molekularbiologische Werkzeuge für diesen Pilz zur Verfügung stehen. Lediglich durch die Herstellung einer partiellen Genbank (Brunke &

Hube, 2006) und den Einsatz einer cDNA-Subtraktionstechnologie konnten bereits differentiell regulierte Gene identifiziert werden, die verstärkt unter pigmentinduzierenden Bedingungen transkribiert werden (Hort *et al.*, 2008b). Es fehlen jedoch grundlegende Methoden wie Transformationssysteme für Ansätze der reversen Genetik.

Die große Ähnlichkeit zwischen dem Pigment von *M. furfur* und dem von *C. glabrata* läßt vermuten, dass beide auf einem sehr ähnlichen Syntheseweg basieren. Im Gegensatz zu *M. furfur* sind bei *C. glabrata* aber alle wichtigen Methoden für molekularbiologische Arbeiten etabliert. Transformationssysteme mit entsprechenden Markern sind lange bekannt (Kitada *et al.*, 1995, Cormack & Falkow, 1999), wenn auch die Rate an illegitimen Rekombinationen hoch ist. Das haploide Genom erlaubt eine im Vergleich zu *C. albicans* einfache Mutation von Genen, und erste genomweite Mutantenbibliotheken wurden bereits erzeugt (Castaño *et al.*, 2003). Außerdem ist seit einigen Jahren das gesamte Genom von 12,3 Megabasen sequenziert und somit für Vergleiche verfügbar (Dujon *et al.*, 2004).

Einer der größten Vorteile bei den Arbeiten mit *C. glabrata* ist die enge Verwandtschaft zur Bäckerhefe *S. cerevisiae*. Tatsächlich sind diese beiden Pilze sehr viel enger miteinander verwandt als etwa *C. glabrata* mit *C. albicans*. Auch haben sich *C. glabrata* und *S. cerevisiae* in der Evolution erst nach der Duplizierung des kompletten Genoms voneinander getrennt, wodurch die Syntenie der Gene und ihre Ähnlichkeit auf Aminosäureebene sehr groß ist (Dujon *et al.*, 2004). Das erleichtert Rückschlüsse der Funktion von Genen bei *S. cerevisiae* auf die mögliche Funktion bei *C. glabrata* sehr.

Natürlich dürfen die Unterschiede nicht ignoriert werden – so hat *C. glabrata* einige Abweichungen im Stoffwechsel aufzuweisen, die möglicherweise mit der Rolle des Pilzes als Kommensale und Pathogen zusammenhängen. Beispielsweise fehlen fünf Gene des Galaktosemetabolismus, vier des Phosphatmetabolismus und mindestens drei im Stoffwechsel von Stickstoff und Schwefel (Dujon *et al.*, 2004). Trotz dieser Unterschiede kann besonders bei den konservierten Stoffwechselwegen ein Vergleich mit *S. cerevisiae* lohnen.

## 1.5 Stoffwechsel von aromatischen Aminosäuren bei *C. glabrata*

---

Das Pigment von *C. glabrata* wird nur in Gegenwart von Tryptophan synthetisiert. Unter diesen Bedingungen kann der Pilz sowohl die Indolverbindungen herstellen als auch den Stickstoff des Tryptophan zum Wachstum nutzen. Damit steht fest, dass der

Tryptophankatabolismus während der Pigmentsynthese zumindest aktiv sein muß. Die darin beteiligten Gene sind also ein mögliches Bindeglied zur Pigmentsynthese. Da aber über die spezifischen Stoffwechselwege bei *C. glabrata* relativ wenig bekannt ist, wird im Folgenden der Metabolismus von *S. cerevisiae* beschrieben, der bei *C. glabrata* sehr ähnlich sein dürfte.

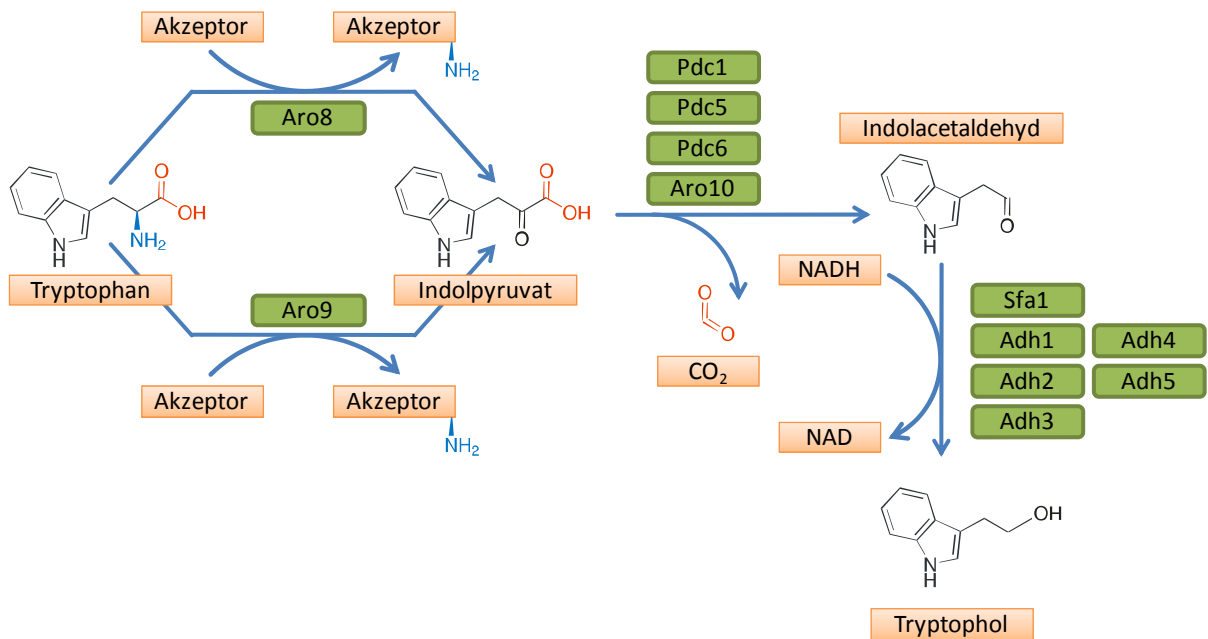
### 1.5.1 Vergleich mit dem Aminosäurestoffwechsel von *S. cerevisiae*

Der Katabolismus von Aminosäuren ist beim Modellorganismus *S. cerevisiae* gut erforscht. Die Bäckerhefe kann die meisten Aminosäuren als alleinige Stickstoffquelle verstoffwechseln, im Gegensatz zu manchen Pilzen und den meisten anderen Eukaryoten jedoch nur wenige davon auch als Kohlenstoffquelle nutzen (Large, 1986).

Eine besondere Rolle kommt dabei den aromatischen Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin, dem Methionin und den verzweigtkettigen Aminosäuren Leucin, Isoleucin und Valin zu. Sie werden in der sogenannten Aminosäuregärung zu ihren korrespondierenden Alkoholen metabolisiert und wieder ausgeschieden, ohne dass ihr Kohlenstoffskelett nutzbar gemacht wird. Die dabei entstehenden "Fuselalkohole" sind als Nebenprodukte der Gärung in geringen Konzentrationen wichtige Geschmacksträger von alkoholischen Getränken (Meilgaard, 1975) und anderen Lebensmitteln. In hohen Konzentrationen dagegen sorgen sie für einen unangenehmen Geschmack, der auch namensgebend für diese (Fusel-)Verbindungen war.

Der erste, der einen Stoffwechselweg für die Aminosäuregärung vorschlug, war Felix Ehrlich (Ehrlich, 1907). Daher ist der Weg heute mit einigen Modifikationen (Neubauer & Fromherz, 1911) im englischen Sprachraum als *Ehrlich pathway* bekannt (Abbildung 1-2). In diesem Reaktionsweg wird in einem ersten Schritt über eine Transaminasereaktion die Aminogruppe abgespalten und auf einen Akzeptor übertragen (Sentheshanmuganathan, 1960). Über diesen Akzeptor – meist 2-Oxoglutarat – gelangt der Stickstoff als Glutamat in den zentralen Metabolismus. Übrig bleibt eine  $\alpha$ -Ketonsäure, die in einem zweiten Schritt zu einem Aldehyd decarboxyliert wird. Im dritten und letzten Schritt wird dieses Fuselaldehyd entweder zu einer Fuselsäure oxidiert oder über eine Alkoholdehydrogenase zu einem Fuselalkohol reduziert und als Endprodukte ausgeschieden (Hazelwood *et al.*, 2008).

Für diese Reaktionen besitzt die Bäckerhefe mindestens vier Transaminasen, vier Decarboxylasen, sechs Aldehyddehydrogenasen und sechzehn Alkoholdehydrogenasen. Die



**Abbildung 1-2: Tryptophanabbau bei *S. cerevisiae* über die Aminosäuregärung.** Verändert nach (SGD project). Grün: Namen der beteiligte Enzyme nach der *Saccharomyces* Genome Database (SGD). Erläuterungen im Text.

genaue Kombination dieser Enzyme für die jeweilige Reaktion hängt dabei hauptsächlich von dem Substrat und der verwendeten Kohlenstoffquelle ab (Hazelwood et al., 2008).

Im Fall von Tryptophan sind dies die Transaminasen Aro8 und Aro9 (Kradolfer et al., 1982, Iraqui et al., 1998) und die Decarboxylase Aro10, in geringerem Maße auch Pdc1, Pdc5 und Pdc6 (Dickinson et al., 2003). Dabei ist Expression von Aro8 nur von der generellen Transkriptionsregulation des Aminosäuremetabolismus abhängig (Kradolfer et al., 1982), während die Transkription von Aro9 und Aro10 erst in Anwesenheit von aromatischen Aminosäuren über den Transkriptionsfaktor Aro80 aktiviert wird (Iraqui et al., 1999). Der Abbauweg (Abbildung 1-2) führt damit vom Tryptophan über das desaminierte Indol-3-pyruvat weiter über das decarboxylierte 3-Indolacetaldehyd zum Fuselalkohol Tryptophol oder zur Fuselsäure 2-(Indol-3-yl)ethanoat (Indolessigsäure). Unter normalen aeroben Anzuchtbedingungen mit Glucose als Kohlenstoffquelle ist das weit überwiegende Endprodukt das Tryptophol (Dickinson et al., 2003).

Für Tryptophan ist bei der Bäckerhefe noch ein alternativer Abbauweg über Kyrunenin zu NAD beschrieben (Kucharczyk et al., 1998, Panozzo et al., 2002). Allerdings fehlen bei *C. glabrata* sämtliche Gene dieses *de novo*-Synthesewegs des NAD (Li et al., 2007). Die Aminosäuregärung zu Tryptophol ist bei *C. glabrata* also der einzig mögliche Weg, Tryptophan als Stickstoffquelle zu nutzen.

## 1.6 Zielsetzung dieser Arbeit

---

Mit Hilfe von *C. glabrata* als pathogenem Modellorganismus sollten folgende Aspekte der Pigmentproduktion aus Tryptophan untersucht werden:

1. Wie wird das Pigment synthetisiert?
2. Unter welchen Umständen wird das Pigment synthetisiert?
3. Welche biologische Bedeutung hat das Pigment?

Die erste Frage nach dem Syntheseweg sollte durch den Einsatz einer Sammlung von Transposonmutanten und durch Transkriptionsanalysen von *C. glabrata* unter pigmentinduzierenden Bedingungen beantwortet werden. Hierzu sollte *in vitro* systematisch die Fähigkeit zur Pigmentbildung verschiedenster Zufallsmutanten untersucht werden und diese Erkenntnisse gemeinsam mit den Ergebnissen zur Genregulation bei der Pigmentierung für ein Modell zum Syntheseweg verwendet werden. Dieses Modell sollte gegebenenfalls durch weitere, diesmal gezielte Mutanten bestätigt oder widerlegt werden.

Für die Beantwortung der zweiten Frage sollte der Ausgangsstamm und mögliche Mutanten unter verschiedenen, definierten Bedingungen auf ihre Pigmentierung hin untersucht werden. Daraus sollten Aussagen über die möglichen Bedingungen gewonnen werden, unter denen das Pigment auch *in vivo* während einer Infektion gebildet werden könnte.

Die dritte Frage sollte durch Experimente beantwortet werden, die auf den bisherigen Erkenntnissen zur Pigmentbildung bei Pilzen beruhen. Wegen der bekannten Eigenschaften des Melanins beim Schutz gegen verschiedene Stresse und gegen Aktivitäten des Immunsystems sollten besonders die möglichen defensiven Eigenschaften des Pigments untersucht werden. Dazu sollten Versuche *in vitro* und Bedingungen durchgeführt werden, die einer Infektionssituation nahe kommen.

Zusammengefaßt sollte so ein erstes Bild von der Synthese und dem möglichen Nutzen des Pigments für den humanpathogenen Pilz *C. glabrata* gewonnen werden – und damit auch Rückschlüsse für andere, dieses Pigment synthetisierende Pilze wie *M. furfur* ermöglicht werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Medien, Mikroorganismen und Zelllinien

#### 2.1.1 Medien

Für die Verwendung als Festmedium wurde 2% Agar (Kobe I, Roth, für Komplexmedien) oder 2% reiner Agar (Oxoid, für definierte Medien) zugefügt. Prozentangaben sind als Gewichtsprozent pro Volumen (w/v) zu verstehen.

##### YPD-Vollmedium für *C. glabrata* und *C. albicans*

Hefeextrakt	1 %	Roth
Pepton	1 %	BD Biosciences
Glukose	2 %	Roth

*Autoklaviert*

##### Pigment-Induktionsmedium/Kontrollmedium (SD-Trp/SD-Arg)

YNB ohne NH <sub>4</sub> SO <sub>4</sub>	0,17 %	BD Biosciences
Glukose	2 %	Roth
Phosphatpuffer pH 5,8	100 mM	Merck
L-Tryptophan (SD-Trp)	15 mM	Roth
oder L-Arginin (SD-Arg)	15 mM	Roth

*Sterilfiltriert*

##### SD-Medium für Wachstumstests

YNB ohne NH <sub>4</sub> SO <sub>4</sub>	0,17 %	BD Biosciences
Glukose	2 %	Roth
Phosphatpuffer pH 5,8	100 mM	Merck
L-Aminosäure	10 mM	Roth (His: Sigma, Arg: Merck)
oder NH <sub>4</sub> SO <sub>4</sub>	0,5 %	Roth

*Sterilfiltriert*

##### Serum-Medium für Hypheninduktion

YNB ohne NH <sub>4</sub> SO <sub>4</sub>	0,17 %	BD Biosciences
Glukose	2 %	Roth
Phosphatpuffer pH 5,8	100 mM	Merck
Serum (FBS)	10 %	PAA

*Sterilfiltriert*

##### LB-Vollmedium für *E. coli*

Hefeextrakt	0,5 %	Roth
Trypton	1 %	BD Biosciences
NaCl	0,5 %	Roth

*Autoklaviert*

## 2.1.2 Verwendete Mikroorganismen

Stamm	Genotyp	Parentalstamm	Referenz
<i>Candida glabrata</i>			
ATCC 2001	Wildtyp	-	-
C5	Wildtyp	-	-
<i>his3</i> Δ	<i>his3</i> Δ::FRT	ATCC 2001	Karl Kuchler, nicht publiziert
<i>leu2</i> Δ	<i>leu2</i> Δ::FRT	ATCC 2001	Karl Kuchler, nicht publiziert
<i>trp1</i> Δ	<i>trp1</i> Δ::FRT	ATCC 2001	Karl Kuchler, nicht publiziert
ΔΔΔ	<i>his3</i> Δ::FRT <i>leu2</i> Δ::FRT <i>trp1</i> Δ::FRT	ATCC 2001	Karl Kuchler, nicht publiziert
II7A9	(CAGL0K03949g::Tn7)	ATCC 2001	(Castaño et al., 2003), Vorliegende Arbeit
II7A9Δ	CAGL0K03949g::Tn7	C5	Vorliegende Arbeit
V4B4	(P <sub>CAGL0A03102g</sub> ::Tn7)	ATCC 2001	(Castaño et al., 2003), Vorliegende Arbeit
V4B4Δ	P <sub>CAGL0A03102g</sub> ::Tn7	C5	Vorliegende Arbeit
<i>aro10</i> Δ	<i>his3</i> Δ::FRT CAGL0A03102g::HIS3	ATCC 2001	Vorliegende Arbeit
<i>aro9</i> Δ	<i>leu2</i> Δ::FRT CAGL0G06028g::LEU2	ATCC 2001	Vorliegende Arbeit
<i>aro8</i> Δ	<i>leu2</i> Δ::FRT CAGL0G01254g::LEU2	ATCC 2001	Vorliegende Arbeit
<i>grp1</i> Δ	<i>gpr1</i> Δ:: NAT1 <i>his3</i> Δ::FRT <i>leu2</i> Δ::FRT <i>trp1</i> Δ::FRT	ATCC 2001	Karl Kuchler, nicht publiziert
<i>pde2</i> Δ	<i>pde2</i> Δ:: NAT1 <i>his3</i> Δ::FRT <i>leu2</i> Δ::FRT <i>trp1</i> Δ::FRT	ATCC 2001	Karl Kuchler, nicht publiziert
<i>cdc25</i> Δ	<i>cdc25</i> Δ:: NAT1 <i>his3</i> Δ::FRT <i>leu2</i> Δ::FRT <i>trp1</i> Δ::FRT	ATCC 2001	Karl Kuchler, nicht publiziert
<i>gln3</i> Δ	<i>gln3</i> Δ:: NAT1 <i>his3</i> Δ::FRT <i>leu2</i> Δ::FRT <i>trp1</i> Δ::FRT	ATCC 2001	Karl Kuchler, nicht publiziert
<i>gpa1</i> Δ	<i>gpa1</i> Δ:: NAT1 <i>his3</i> Δ::FRT <i>leu2</i> Δ::FRT <i>trp1</i> Δ::FRT	ATCC 2001	Karl Kuchler, nicht publiziert
<i>Candida albicans</i>			
SC 5314	Wildtyp	-	(Gillum <i>et al.</i> , 1984)
<i>tup1</i> Δ	<i>tup1</i> Δ::hisG/ <i>tup1</i> Δ::hisG <i>ura3</i> ::tm434 RP10::URA3	CAI-4	(Braun & Johnson, 1997) Ronny Martin, nicht publ.
<i>nrg1</i> Δ	<i>nrg1</i> Δ::hisG/ <i>nrg1</i> Δ::hisG <i>ura3</i> ::tm434 RP10::URA3	CAI-4	(Murad <i>et al.</i> , 2001b) Ronny Martin, nicht publ.
<i>mig1</i> Δ	<i>his1</i> Δ::hisG / <i>his1</i> Δ::hisG <i>mig1</i> Δ:: hisG/ <i>mig1</i> Δ::hisG-URA3- <i>hisG</i> <i>ura3</i> ::tm434	CAI-4	(Zaragoza <i>et al.</i> , 2000)
<i>Escherichia coli</i>			
TOP10F'	F'[lacIq Tn10(tet <sup>R</sup> )] mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 deoR nupG recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL(Str <sup>R</sup> ) endA1 λ <sup>-</sup>	-	Invitrogen
BW23473	F <sup>-</sup> , Δ(lacIZYA argF)U169 rph-1 rpoS396(Am) robA1 creC510 hsdR514 ΔendA9 uidA(ΔMlul)::pir(wt) recA1	K12	(Haldimann & Wanner, 2001)
Rosetta (De3) pLysS	F <sup>-</sup> ompT hsdS <sub>B</sub> (RB <sup>-</sup> mB <sup>-</sup> ) gal dcm λ(DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5]) pLysSRARE (Cam <sup>R</sup> , argU, argW, ileX, glyT, leuW, proL, metT, thrT, tyrU, and thrU)	BL21	Novagen (Merck)



### 2.1.3 Verwendete Zelllinien

Für die Messung der Zellschädigung wurde die von einem Plattenzellkarzinom abgeleitete humane Epithelzelllinie TR146 (Rupniak *et al.*, 1985) genutzt (Cancer Research Technology, UK). Die Kultivierung erfolgte in RPMI 1640-Medium mit 10% Fötalem Rinderserum (PAA) bei 37°C mit 5% CO<sub>2</sub>. Verwendet wurden die Zellen jeweils in den Passagen 10-20.

## 2.2 Plasmide und Oligonukleotide

### 2.2.1 Verwendete Plasmide

Für Subklonierungen wurden die jeweiligen PCR-Produkte (Abschnitt 2.4.2) mit dem TOPO-TA-Kit (Invitrogen) nach Herstellerangaben in den Vektor pCR2.1 eingebracht und *E. coli* TOP10F' damit transformiert (Abschnitt 2.4.6).

### 2.2.2 Verwendete Primer

Name	Sequenz	T <sub>m</sub> [°C]	Bemerkungen
<b>Prototrophie-Marker</b>			
His3-fwd	GGATCCAATTATGGATCCAGTTGAA	54,9	BamHI
His3-rev	CTCGAGGAAATACTCTGTTTGTGTGA	53,0	XhoI
Leu2-fwd	ACTGGATCCTACCAATAGATAGCGGTTTAA	56,2	BamHI
Leu2-rev	ACTGCTCGAGGTTTCGTTTCCCGATACATGC	64,5	XhoI
Trp1-fwd	ACGTGGATCCTCGGTGCTCTACAGGAATCC	64,6	BamHI
Trp1-rev	ACTCTCGAGTCATTGTTTCTTTGCATTTTG	60,6	XhoI
<b>aro8Δ-Mutante</b>			
Aro8-Bam-I	GGATCCTGTAGGCTTGCTTTGTATTTG	59,9	BamHI
Aro8-Bam-r	GGATCCGATTTATGCTAGTGCTTGATG	57,1	BamHI
Aro8-Xho-I	CTCGAGTCGATGTATTGGTAAGAAGTT	56,0	XhoI
Aro8-Xho-r	CTCGAGATCAACATTTTACGCCAAA	58,5	XhoI
<b>aro9Δ-Mutante</b>			
Aro9-I	TCTTCTTGCGGCGTATCAT	63,7	
Aro9-Bam-r	ACTGGGATCCAGATGACACAATTTCCAGC	58,1	BamHI
Aro9-Xho-I	ACTCTCGAGTGTCTTGCATTTTACATATGG	58,1	XhoI
Aro9-r	TTATTGGTGTGACGTTGCTGG	66,0	
<b>aro10Δ-Mutante</b>			
Aro10-I	TGTGTGCCTGGGATAATATA	57,9	
Aro10-Bam-r	ACGGCTGGATCCTTCAGCTCGTTACAGTTG	55,3	BamHI
Aro10-Xho-I	ACGGCTCTCGAGAGATGTTTCAAGCATTTCG	59,4	XhoI
Aro10-r	CCTGGTTTCTTTCAATAAGCA	61,1	
<b>Ansequenzierung von Klonen aus der Mutantenbibliothek</b>			
Tn7-Readout	GGCCTTCTTGCTTTGGAAGTAC	58,5	--- Sequenzierung
<b>Aro8*-Expression</b>			
Aro8-Ex-I	ATGACTCTGCCAGAATCTAAA	58,5	
Aro8-Ex-r	TTATGCCAATTGAAATTCCTC	58,7	

## 2.3 Mikrobiologische Methoden und Phänotypische Untersuchungen

---

### 2.3.1 Anzucht und Lagerung von Mikroorganismen

---

Wenn in der Beschreibung der Experimente nicht anders beschrieben, wurden *C. glabrata*-Hefen auf YPD-Festmedium oder in YPD-Flüssigmedium bei 37°C angezogen. *C. albicans* und *S. cerevisiae* wurden mit dem gleichen Medium bei 30°C, *E. coli* mit LB-Medium bei 37°C inkubiert. Die Inkubation in Flüssigmedien erfolgte schüttelnd bei 150-180 rpm.

Für die kurzfristige Lagerung wurden die Organismen auf dem jeweiligen Festmedium bei 4°C gehalten. Für die langfristige Lagerung wurden die Organismen im passenden Vollmedium unter Zusatz von 50% (v/v) Glycerin bei -70°C eingefroren.

### 2.3.2 Isolierung des Pigments

---

Zur Herstellung von isoliertem Pigment wurde *C. glabrata* vier Tage bei 37°C schüttelnd in SD-Trp (Abschnitt 2.1.1) angezogen. Der braungefärbte Überstand wurde durch Zentrifugation bei 4500 g für 10 Minuten von den Zellen getrennt und dann sterilfiltriert (0,45 µm, tensidfreies Celluloseacetat; Nalgene). Die Lagerung erfolgte bei 4°C. Für Kontrollversuche wurde mit den entsprechenden nicht-pigmenthaltigen Überständen identisch verfahren.

### 2.3.3 Bestimmung der Pigmentkonzentration

---

Die Menge an Pigment im Überstand wurde als Absorption bei 400 nm in einem Amersham "Ultrospec 3100 pro"-Photometer bestimmt (Brunke, 2004).

### 2.3.4 Anzucht in sauerstofffreier Atmosphäre

---

Sofern erforderlich, wurde *C. glabrata* in pigmentinduzierender Flüssigkultur (SD-Trp) in einem Anaerobentopf (nach Zugabe von Merck Anaerocult A-Reagenz zur Erzeugung eines anaeroben Milieus) bei 37°C und 180 rpm angezogen, um die Pigmentbildung unter Sauerstoffausschluß zu messen.

### 2.3.5 Bestimmung der Wachstumskurven

---

Für die Wachstumskurven mit verschiedenen Stickstoffquellen wurde eine dicht gewachsene *C. glabrata*-Übernachtskultur (37°C) in SD-Medium gewaschen und dann 1:100 in 24-Lochplatten in jeweils 1 ml SD-Medium mit zugesetzten Aminosäuren (je 10 mM) angeimpft. Das Wachstum wurde halbstündlich über die optische Dichte bei 600 nm ( $OD_{600}$ ) automatisiert in einem Infinite M 200 Mikrotiterplattenleser gemessen. Das Programm bestand aus einer kontinuierlichen Inkubation bei 37°C, unterbrochen von Schüttelschritten (6 mm Radius für 10 Sekunden) und einer sofort folgenden Messung der  $OD_{600}$ .

### 2.3.6 UV-Bestrahlungstest

---

Um die Resistenz von *C. glabrata*-Zellen gegen UV-Licht zu testen, wurden die Stämme auf dem entsprechenden Festmedium (bspw. auf SD-Trp für Pigmentbildung, Abschnitt 2.1.1) für die im Ergebnisteil genannte Zeit bei 37°C angezogen und eine Mischung von verschiedenen Kolonien einer Platte in SD-Minimalmedium (Abschnitt 2.1.1) gelöst, gewaschen und wieder resuspendiert. Die Zelldichte wurde mit Hilfe eines Neubauer-Hämocytometers (Neubauer improved, Roth) unter dem Mikroskop bestimmt und auf  $10^7$  Zellen/ml eingestellt. Von dieser Lösung wurde eine Reihe von 1:10-Verdünnungsschritten bis zu  $10^3$  Zellen/ml hergestellt. Von diesen Zellsuspensionen wurden jeweils 10  $\mu$ l (entspricht  $10^5$  bis  $10^1$  Zellen) auf vorgewärmte YPD-Agarplatten nebeneinander getropft. Nach dem Eintrocknen der Suspensionen wurden die Platten in einem UV-Crosslinker (Bio-Link, Vilber-Lourmat) nach den Angaben im Ergebnisteil bestrahlt. Für die verschiedenen Wellenlängen wurden die UV-Leuchtmittel jeweils ausgetauscht. Nach der Bestrahlung wurden die Platten für 24 Stunden bei 37°C inkubiert und das Wachstum dokumentiert und ausgewertet.

### 2.3.7 Wasserstoffperoxidresistenztest

---

Die Resistenz gegen Wasserstoffperoxid wurde getestet, indem die Stämme entsprechend den experimentellen Bedingungen auf pigmentinduzierendem oder nichtinduzierendem Festmedium für drei Tage angezogen wurden (Abweichungen ggf. im Ergebnisteil genannt). Eine Mischung von Kolonien wurde in SD-Minimalmedium (Abschnitt 2.1.1) gelöst, gewaschen, resuspendiert und die Zelldichte mit einem Neubauer-Hämocytometer

(Neubauer improved, Roth) bestimmt. Die Zellsuspensionen wurden auf  $10^7$  Zellen/ml eingestellt und 1:1 mit einer Lösung von Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ , Applichem) in SD-Minimalmedium (400 mM oder 200 mM für je 200 mM oder 100 mM Endkonzentration) gemischt. Die Hefen wurden daraufhin für 1 Stunde bei  $37^\circ C$  schüttelnd (180 rpm) inkubiert und danach sofort 1:1000 in SD-Minimalmedium verdünnt (Endzelldichte  $5 \cdot 10^3$  Zellen/ml). Von dieser Suspension wurden 100  $\mu$ l auf YPD-Vollmedium ausplattiert und nach einem Tag Inkubation bei  $37^\circ C$  die gewachsenen Kolonien ausgezählt. Der Prozentsatz der Überlebenden Zellen wurde anhand einer  $H_2O_2$ -freien Kontrolle ermittelt, alle Versuche wurden jeweils mindestens dreimal mit jeweils mindestens drei parallelen Ansätzen durchgeführt.

### 2.3.8 Messung der Hyphenlängen von *C. albicans*

Die Hyphenbildung von *C. albicans* wurden in Gegenwart von verschiedenen Stoffen (Pigment, Überstand von *C. glabrata*-Kulturen, Tryptophol in SD-Minimalmedium) getestet. Hierzu wurde ein semisynchrone Kultur von *C. albicans*-Zellen (dreifache Passage in YPD bei  $30^\circ C$  jeweils über Nacht) pelletiert, mit SD-Minimalmedium gewaschen und dann mit Hilfe eines Neubauer-Hämocytometers (Neubauer improved, Roth) auf eine Zelldichte von weniger als  $10^6$  Zellen/ml eingestellt. Von dieser Zellsuspension wurden jeweils 10  $\mu$ l zu 1 ml der vorbereiteten Testlösungen in eine 24-Loch-Platte (TPP) gegeben (Endzelldichte kleiner  $10^4$ /ml) und 10% Serum (FBS, PAA) zugefügt. Die Zellen wurden die jeweils angegebene Zeit inkubiert und die relativen Hyphenlängen entweder direkt mit einem Leica DMIL-Inversmikroskop und der Software *Leica Application Suite* (LAS, Version 2.7.0) gemessen, oder mit nach folgendem Protokoll verfahren.

#### 2.3.8.1 Messung der Hyphenlängen im Fluoreszenzmikroskop

Alternativ wurden in die 24-Loch-Platten vor dem Test säurebehandelte Deckgläser gegeben, auf denen die *C. albicans*-Zellen adhäreren konnten. Für die Säurebehandlung wurden die Deckgläser zuvor mit 1:50 in Wasser verdünnter Salzsäure (37%, Roth) über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert, dann zweifach mit Wasser und einmal mit Ethanol (95%, Roth) gewaschen, wiederum über Nacht bei  $37^\circ C$  getrocknet und autoklaviert.

Die *C. albicans*-Zellen wurden in diesem Fall zu den Deckgläsern gegeben und nach der Inkubation mit 4% Formaldehydlösung (Roti-Histofix, Roth) 30 Minuten bei 37°C fixiert und danach gefärbt. Dazu wurden die Zellen dreimal mit je 1 ml PBS und danach einmal mit H<sub>2</sub>O gewaschen und in einer 1:100-Verdünnung einer Calcofluor-Weiß-Stammlösung (1 mg/ml in 0,1 M Tris-HCl, pH 9,0; Sigma) für 30 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Nach drei Waschschritten mit H<sub>2</sub>O wurden die Deckgläser mit "ProLong Gold"-Einbettmedium (Invitrogen) versehen, auf Objektträger gegeben und mit einem Leica DM 5500B Fluoreszenzmikroskop und der Software *Leica Application Suite* ausgewertet (und gegebenenfalls dokumentiert). Mit dieser Methode war die Bestimmung der absoluten Hyphenlänge möglich.

### 2.3.9 Bestimmung des Überlebens mit Neutrophilen

---

#### 2.3.9.1 Isolation von Neutrophilen und Koinkubation

---

Neutrophile wurden aus gespendetem menschlichem Vollblut gewonnen. Die Trennung der Zelltypen erfolgte per Gradienten-Dichte-Zentrifugation (Boyum, 1968, English & Andersen, 1974) nach Anweisung des Herstellers (Sigma). Hierzu wurden gleiche Volumina Histopaque-1077 und Histopaque-1119 (beide Sigma) übereinander geschichtet, das Vollblut darauf gegeben und danach bei 700 g 30 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Die Fraktion zwischen den beiden Histopaque-Sorten bestand nach dieser Behandlung nahezu ausschließlich aus polymorphkernigen Granulozyten (PMNs), die ihrerseits zu beinahe 90% aus Neutrophilen bestehen (Fradin et al., 2005). In dieser Fraktion verbliebene Erythrocyten wurden in einem Lyseschritt (0,83% NH<sub>4</sub>Cl, 10 mM HEPES, pH 7.0) entfernt, die PMNs in PBS gewaschen und in HBSS-Puffer (Gibco) gelöst.

Die *C. glabrata*-Hefen wurden wie zuvor beschrieben (Abschnitt 2.3.7) auf Festmedium angezogen, in PBS gewaschen und ebenfalls in HBSS-Puffer gelöst. Je 10<sup>5</sup> Hefen und Neutrophile wurden im Verhältnis 1:1 in insgesamt 200 µl HBSS-Puffer gemischt und für eine Stunde bei 37°C koinkubiert.

### 2.3.9.2 XTT-Reaktion zur Messung der metabolischen Aktivität

---

Zellschädigungen von *C. glabrata* wurden nach einer modifizierten Methode von Meshulam über die metabolische Umwandlung des Tetrazoliumsalses XTT in den Farbstoff Formazan gemessen (Meshulam *et al.*, 1995). Dafür wurden nach der Koinkubation von Hefen und Neutrophilen 400 µl einer XTT-Lösung (0,5 mg/ml XTT, 50 µg/ml Coenzym Q) zugegeben und die Mischung bei 37°C nochmals 1 h inkubiert. Nach einem Zentrifugationsschritt (14.000 g für 1 min) wurde die Absorption bei 451 nm mit einem Tecan Infinite M 200 Mikrotiterplattenleser gemessen. Zusätzlich zur Koinkubationsreaktion ( $A_{KO}$ ) wurden Neutrophile in HBSS-Puffer ( $C_N$ ) und Hefen in HBSS-Puffer ( $C_{CG}$ ) als Kontrollen verwendet. Die Reduktion der metabolischen Aktivität konnte dann nach folgender Formel berechnet werden:

$$\text{Reduktion d. met. Aktivität} = 1 - \frac{A_{KO} - C_N}{C_{CG}}$$

### 2.3.10 Messung der Zellschädigung von Epithelzellen

---

Die Schädigung von Epithelzellen in Infektionsmodellen mit *C. glabrata* wurde über die Freisetzung des Enzyms Laktat-Dehydrogenase (LDH) aus den Wirtszellen gemessen. Dazu wurde das "Cytotoxicity Detection Kit (LDH)" von Roche entsprechend den Herstellerangaben verwendet. Die Epithelzelllinie TR146 wurde wie in Abschnitt 2.1.3 beschrieben kultriviert. Für die Versuche wurden Zellen der Passagen 10-20 verwendet, die in 24-Loch-Platten (TPP) eingesät und zu konfluenten Monolayern ausgewachsen waren. Diese Monolayer wurden zweimal mit calcium- und magnesiumfreien PBS gewaschen und mit frischem, serumfreien RPMI-1640-Medium versorgt.

Die Hefezellen wurden wie zuvor beschrieben (Abschnitt 2.3.7) auf Platten angezogen, mit PBS gewaschen und in serumfreien RPMI-1640-Medium resuspendiert. Die Monolayer wurden mit je  $5 \cdot 10^6$  *C. glabrata*-Zellen infiziert und für 24 Stunden bei 37°C mit 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Danach wurde der Kulturüberstand vorsichtig entfernt, bei 250 g für 10 Minuten abzentrifugiert und dieser Überstand für die LDH-Messung nach Herstellerangaben verwendet. Die Berechnung der Zellschädigung erfolgte nach der Formel

$$\text{Relative Cytotoxizität} = \frac{E_{CG} - C_1 - C_2}{E_{Lyse} - C_1}$$

Alle Werte wurden als  $OD_{490} - OD_{600}$  berechnet (also Meßwert abzüglich Kontrollwert),  $E_{Cg}$  steht dabei für die *C. glabrata*-infizierten Epithelzellen,  $C_1$  für uninfizierte Epithelzellen (Kontrolle 1),  $C_2$  für *C. glabrata* ohne Wirtszellen (Kontrolle 2) und  $E_{Lyse}$  für vollständig lysierte Epithelzellen (100%, Lyse in 0,2% Triton-X 100, Serva). Die Kontrollen wurden für jedes Experiment unabhängig bestimmt.

### 2.3.11 Verwendung des Eier-Infektionsmodells

---

Hühnereier wurden nach einem weiterentwickelten Modell nach (Härtl *et al.*, 1995) für die Infektionsversuche verwendet (I. Jacobsen, unveröffentlichte Daten). *C. glabrata* wurden auf induzierendem oder nichtinduzierendem Medium (SD-Arg oder SD-Trp) für vier Tage angezogen. Die Eier wurden unterschiedlich lang bebrütet (siehe Abschnitt 3.5.2) und mit  $10^7$  *C. glabrata*-Zellen infiziert, wie bei (Härtl *et al.*, 1995) beschrieben. Die Eier wurden nach der Infektion täglich auf Absterben überprüft.

## 2.4 Molekularbiologische Methoden

---

### 2.4.1 Präparation von DNA

---

#### 2.4.1.1 Plasmid-Isolation aus *E. coli*

---

Die Isolation von Plasmiden aus Übernacht-Kulturen von *E. coli* in LB-Medium (mit passenden Antibiotika) erfolgte durch alkalische Lyse der Bakterienzellen nach einem modifizierten Protokoll aus Sambrook *et al.* (Sambrook & Russell, 2001). Zwei Milliliter der Kultur wurden bei 12.000 g abzentrifugiert, das Pellet in Puffer P1 (50 mM Tris, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNase A) resuspendiert und die Zellen durch den alkalischen Puffer P2 (200 mM NaOH, 1% [w/v] SDS) für 5 Minuten bei RT lysiert. Nach Zugabe des Puffers P3 (3,2 M Kaliumacetat, pH 5.5) zur Neutralisation wurde das Gemisch für 10 Minuten bei 12.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 540 µl Isopropanol versetzt und zum Fällen der Plasmide für 15 Minuten bei 12.000 g zentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde in 1 ml 70% Ethanol gewaschen, der Überstand entfernt und das Pellet nach dem Trocknen in 50 µl H<sub>2</sub>O resuspendiert.

### 2.4.1.2 Isolation von genomischer DNA aus *C. glabrata*

---

Für die Verwendung in PCR-Reaktionen (Abschnitt 2.4.2) und Southern-Blots (Abschnitt 2.4.5) wurde DNA aus *C. glabrata*-Hefen nach einem modifizierten Protokoll für *S. cerevisiae* mittels einer mechanischen Lyse gewonnen (Hoffman & Winston, 1987). Die Hefen wurden hierzu über Nacht in YPD-Vollmedium bei 37°C angezogen, 2 ml dieser Kultur für 2 Minuten bei 12.000 g abzentrifugiert, das Pellet in 500 µl H<sub>2</sub>O resuspendiert und nochmals bei 12.000 g für 2 Minuten pelletiert. Das Pellet wurde in 200 µl Lyse-Puffer (2% [v/v] Triton-X 100, 1% [w/v] SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA) gelöst, ein Pelletvolumen Glasperlen (0,5 mm, säurebehandelt, Roth) und 200 µl Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1, Roth) zugegeben und der Ansatz dann in einem Precellys 24-Homogenisator (PeqLab) bei einer Einstellung von zweimal 5500 rpm, 15 Sekunden mit 30 Sekunden Pause behandelt.

Nach Zugabe von 200 µl TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7,4) wurde der Ansatz für 10 Minuten bei 12.000 g zentrifugiert und die wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 1 ml 95% Ethanol (Roth) wurden die Nukleinsäuren bei 12.000 g in 20 Minuten gefällt, das Pellet in 400 µl TE (pH 7,4) gelöst und 3 µl einer RNase-A-Lösung (10 mg/ml, Sigma) zugegeben. Der Ansatz wurde 30 Minuten bei 37°C inkubiert und dann zum Fällen der DNA 10 µl 4 M Ammoniumacetat (Merck) und 1 ml 95% Ethanol (Roth) zugegeben. Optional wurde der Ansatz bei -20°C gekühlt. Nach einer Zentrifugation bei 12.000 g für 20 Minuten wurde das Pellet getrocknet und in 80-100 µl H<sub>2</sub>O gelöst. Die DNA-Konzentration wurde mit einem Nanodrop ND-1000 Spektrophotometer (PeqLab) bestimmt und der Grad der mechanischen Zerstörung gegebenenfalls mittels eines Agarosegels überprüft.

### 2.4.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

---

Für die Amplifikation spezifischer Sequenzen aus DNA wurde die Polymerasekettenreaktion (PCR) nach Standardvorschriften durchgeführt. Typischerweise wurden für einen 20 µl-Ansatz 2 µl 10× Puffer mit 15 mM MgCl<sub>2</sub> (NEB), 0,4 µl 10 mM dNTPs (NEB), zweimal je 0,5 µl 10 µM spezifische Primer (Abschnitt 2.2.2), 1 µl DNA-Template (ca. 100 ng) und 0,1 µl Taq-Polymerase (NEB, entspricht 0,5 U) eingesetzt. Die Reaktion wurde dann in einem Biometra T-Personal PCR-Block durchgeführt, typischerweise mit einem initialen



Denaturierungsschritt von 5 Minuten bei 94°C und 30-35 Zyklen von 30 Sekunden bei 94°C, 30 Sekunden Annealing bei primerspezifischen Temperaturen und Elongation bei 72°C für 1-5 Minuten (nach Amplifikatlänge). Nach einer finalen Elongationsphase von 5 Minuten bei 72°C wurde das Produkt bei 4°C bis zur Verwendung gelagert.

Bei PCR-Reaktionen, die eine erhöhte Genauigkeit verlangten, wie bei der Herstellung von Auxotrophiekassetten für die Transformation von *C. glabrata* (Abschnitt 2.4.7), wurde eine Polymerase mit *Proofreading*-Aktivität eingesetzt, im allgemeinen die Pfu-Polymerase "Pfuusion High Fidelity DNA Polymerase" von NEB. Die Reaktion erfolgte nach Herstellerangaben analog zu den Beschreibungen zur Taq-Polymerase.

### 2.4.3 Aufreinigung von Nukleinsäuren

---

DNA aus PCR-Reaktionen (Abschnitt 2.4.2) wurde mit dem "QIAquick PCR Purification Kit" (Qiagen) nach Herstellerangaben aufgereinigt und gegebenenfalls konzentriert. Für Elutionen aus Agarosegelen wurden die Ethidiumbromid-gefärbten Banden mit einem Skalpell unter UV-Licht ausgeschnitten und die DNA mit dem "QIAquick Gel Elution Kit" (Qiagen) ebenfalls nach Herstellerangaben aufgereinigt.

RNA wurde gegebenenfalls (siehe Abschnitte 2.6.1.2 und 2.6.1.3) mit dem "RNeasy Mini Kit" von Qiagen nach Herstellerangaben gereinigt oder aufkonzentriert.

### 2.4.4 Ligation von DNA

---

Für das Einbringen von kurzen DNA-Fragmenten in Plasmide wurde das "TOPO-TA Cloning Kit" von Invitrogen mit dem Plasmid pCR2.1 nach Herstellerangaben verwendet.

Weitere Ligationen wurden mit T4 DNA-Ligase von NEB durchgeführt, ebenfalls nach Herstellerangaben, gegebenenfalls mit einem zusätzlichen Dephosphorylierungsschritt nach Herstellerangaben (*Calf Intestinal Phosphatase* (CIP), NEB). Das Insert:Vektor-Verhältnis betrug bei den Ligationen im allgemeinen 3:1.

## 2.4.5 Hybrisierung von DNA auf Membranen (Southern-Blot)

---

Zum Nachweis der korrekten Integration von Disruptionskassetten wurden alle in dieser Arbeit erstellten Mutanten mittels eines Southern-Blots (Southern, 1975) überprüft. Hierzu wurde die DNA isoliert (Abschnitt 2.4.1.2), mit den entsprechenden Restriktionsenzymen (NEB) im vom Hersteller genannten Puffer über Nacht verdaut und in einem 1%-igen Agarosegel in TBE-Puffer (90 mM Tris, 90 mM Borsäure, 2 mM EDTA) aufgetrennt.

### 2.4.5.1 Transfer der DNA auf die Membran durch Kapillarkräfte

---

DNA im Agarosegel wurde dann für 20 Minuten schüttelnd in 250 mM HCl (Roth) depuriniert, mit H<sub>2</sub>O gewaschen, durch zweimal 15 Minuten Schütteln in einem Puffer aus 0,5 M NaOH und 1,5 M NaCl denaturiert, wieder mit H<sub>2</sub>O gewaschen und zum Neutralisieren zweimal 15 Minuten in einem Puffer aus 0,5 M Tris-HCl, 1,5 M NaCl (pH 7,5) geschüttelt. Danach wurde das Gel in 20×SSC für mindestens zehn Minuten equilibriert und zum Übertragen der DNA auf eine Membran verwendet. Hierfür wurde ein Aufbau nach Herstelleranweisung des "PCR DIG Probe Synthesis Kit" (Roche) verwendet. Auf ein mit 20× SSC (3 M NaCl, 0,3 M Natriumcitrat, pH 7,0) getränktes Whatman 3MM-Papier, das als Brücke zwischen zwei Reservoirs von 20× SSC fungierte, wurde ein weiteres Whatman 3MM-Papier in Größe des Gels gelegt. Darauf wurde das Agarosegel platziert, auf dieses eine zurechtgeschnittene, positiv geladene Nylonmembran (Roche), und auf diese wiederum ein passendes Whatman 3MM-Papier, gefolgt von einem Stapel passend gefalteter Papierhandtücher in circa 50-80 Lagen. Abschließend wurde eine herkömmliche Fotowanne mit einem Gewicht (200-500 g) darauf gestellt. Der Transfer durch Kapillarkräfte erfolgte über Nacht, die Membran wurde danach auf ein mit 2×SSC getränktes Whatman 3MM-Papier gelegt, und durch Bestrahlung in einem "Bio-Link" UV-Crosslinker (Vilber-Lourmat) bei zweimal 120 mJ/cm<sup>2</sup> UV-C-Licht wurde die DNA auf der Membran fixiert. Nach einem Waschschrift in H<sub>2</sub>O und anschließender Trocknung konnte die Membran für die Hybridisierungsreaktion verwendet werden.

### *2.4.5.2 Markierungsreaktion zur Sondenherstellung*

---

Für den Nachweis der Zielsequenzen wurde eine Digoxigenin-markierte DNA-Sonde im PCR-Verfahren hergestellt. Hierzu wurde eine passende Sondensequenz entsprechend den Angaben im Ergebnisteil ausgewählt und eine PCR (Abschnitt 2.4.2) durchgeführt, bei der ein Teil der Nukleotide durch eine Mischung von dNTPs und Digoxigenin-markierten dUTPs (Roche) ersetzt wurde (effektives Verhältnis  $dUTP_{DIG}:dTTP$  1:6). Der Erfolg der Markierung wurde für jede Sonde durch einen Vergleich der Laufeigenschaften in einem Agarosegel überprüft, in dem eine markierte Sonde langsamer läuft als das unmarkierte Amplifikat.

### *2.4.5.3 Hybridisierungsreaktion und Nachweis*

---

Für die Hybridisierung der Sonde mit der Zielsequenz wurden die vorbereiteten Membranen (Abschnitt 2.4.5.1) in einem Hybridisierungssofen (Biometra OV-1) mit DIG EasyHyb (Roche) für mindestens zwei Stunden bei 42°C prähybridisiert. Von der vorbereiteten Sonde (Abschnitt 2.4.5.2) wurden je nach ungefähre Konzentration (nach Agarosegelbild) 10-20 µl bei 99°C für 5 Minuten denaturiert und in 20 ml DIG EasyHyb zu der Membran gegeben. Die Hybridisierung erfolgte dann über Nacht im Hybridisierungssofen bei 42°C.

Die Membranen wurden am nächsten Tag zweimal 5 Minuten bei Raumtemperatur in Niedrigstringenzpuffer (2×SSC, 0,1% [w/v] SDS) gewaschen, danach noch zweimal 15 Minuten bei 68°C in vorgewärmten Hochstringenzpuffer (0,1×SSC, 0,1% [w/v] SDS). Für den Nachweis der Sonde wurden die Membranen bei Raumtemperatur zweimal 5 Minuten in Waschpuffer (Maleinsäurepuffer [100 mM Maleinsäure, 150 mM NaCl, pH 7,5] mit 0,3% [w/v] Tween 20) gewaschen. Mit einer Blockierungslösung (1% Blockierungsreagenz [Roche] in Maleinsäurepuffer) wurde die Membran 30 Minuten abgesättigt und dann 0,75 µl einer Lösung von Alkalische-Phosphatase-gekoppelten Fab-Antikörperfragmenten gegen Digoxigenin (Roche, effektive Verdünnung 1:20.000) in Blockierungslösung zugegeben. Nach weiteren 30 Minuten Bindungszeit wurden die Membranen dreimal 10 Minuten in Waschpuffer gewaschen und danach mindestens 5 Minuten in Alkalische-Phosphatase-Puffer (0,1 M Tris-HCl, 0,1 M NaCl, pH 9,5) inkubiert. Die Membran wurde dann aus dem Hybridisierungsgefäß entfernt, und (nur noch feucht) mit einem Alkalische-Phosphatase-Substrat für Chemolumineszenz (CDP-Star, Roche, 1:100 in Alkalische-Phosphatase-Puffer) bedeckt. Nach 5 Minuten Inkubation wurde die

überschüssige Substratlösung entfernt und die Lumineszenz mit einem "Chemi Smart 5000" Chemolumineszenzsystem (Vilber Lourmat, Software ChemiCapt V12.8) nachgewiesen und dokumentiert. Zur Bestimmung der Fragmentgrößen wurden bei allen Southern-Blots von Anfang an die beiden DIG-markierten DNA-Größenmarker "DNA Molecular Weight Marker" II und III (Roche) mitgeführt.

#### 2.4.6 Transformation von *E. coli*

---

Chemisch kompetente *E. coli*-Zellen wurden hergestellt, indem eine Übernachtskultur (LB) 1:1000 in frisches LB-Medium überführt wurden. Die Kulturen wurden bei 37°C, 180 rpm inkubiert, bis eine OD<sub>578</sub> von 0,2 bis 0,4 erreicht war. Nach 10 Minuten Kühlung auf Eis wurden diese Zellen bei 4000 rpm in 15 Minuten in einer gekühlten (4°C) Zentrifuge pelletiert. Das Pellet wurde in 18 ml kaltem Puffer RF1 (30 mM Kaliumacetat, 100 mM RbCl<sub>2</sub>, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 50 mM MnCl<sub>2</sub>, 15% [v/v] Glycerin, pH 5,8 mit Essigsäure) gelöst, 30 Minuten auf Eis inkubiert und wieder zentrifugiert wie zuvor. Dieses Pellet wurde dann in 4 ml Puffer RF2 (10 mM MOPS, 75 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM RbCl<sub>2</sub>, 15% Glycerin, pH 6,5 mit KOH) resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in Aliquots zu 50 µl auf vorgekühlte Reaktionsgefäße verteilt und diese sofort in flüssigem Stickstoff gefroren. Die Lagerung der kompetenten Zellen erfolgte bei -80°C, für Transformationen wurden diese auf Eis wieder aufgetaut. Zur eigentlichen Transformation wurden maximal 100 ng DNA in maximal 10% Volumen (5 µl) zu den Zellen gegeben und vorsichtig mit diesen gemischt. Nach 20 Minuten Inkubation auf Eis wurden die Zellen für 30 Sekunden bei 42°C im Wasserbad erhitzt, wieder auf Eis gegeben und kurz danach mit 500 µl LB-Medium versetzt. Nach einer Stunde Inkubation bei 37°C wurden die Zellen auf LB-Platten mit den entsprechenden Antibiotika ausgestrichen.

#### 2.4.7 Transformation von *C. glabrata*

---

Die Transformation von intakten *C. glabrata*-Zellen wurde nach einer modifizierten Methode von Gietz *et al.* durchgeführt (Gietz *et al.*, 1992). Von einer Übernachtskultur (37°C) in YPD-Flüssigmedium wurde 1 ml in 100 ml frisches YPD-Flüssigmedium überführt. Bei einer OD<sub>600</sub> von 0,8 (typischerweise nach etwa 4 Stunden Wachstum) wurde die gesamte Kultur 5 Minuten bei 2700 g, 4°C abzentrifugiert und das Pellet in 10 ml TE-Puffer

(1×TE, pH7.4) gelöst. Nach einem weiteren, identischen Zentrifugationsschritt wurde das Pellet in 10 ml TELiAc-Puffer (1×TE, pH7.4; 0.1M LiAc; autoklaviert) resuspendiert, ein weiteres mal mit den gleichen Parametern abzentrifugiert und das Pellet dann in 1 ml TELiAc-Puffer resuspendiert. Die Hefensuspension wurde in Aliquots zu je 50 µl aufgeteilt und diese für die eigentliche Transformation verwendet.

Dafür wurde zu den Aliquots 1 µg der linearisierten DNA (die Transformationskassette) gegeben, zusätzlich noch 5 µl denaturierter (5 Minuten bei 98°C) Heringssperma-DNA (Ambion) und 300 µl PLATE-Puffer (40% w/v PEG 3350 in TELiAc-Puffer; autoklaviert). Die Suspension wurde kurz mit einem Vortex gemischt und dann für 30 Minuten bei 30°C inkubiert. Nach einem Hitzeschock für 15 Minuten bei 45°C wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 4500 g für 3 Minuten pelletiert, der Überstand entfernt und die Hefen in 1 ml YPD-Vollmedium gelöst. Für Auxotrophie-Marker wurden die Zellen nach einer Stunde schüttelnder Inkubation bei 37°C wieder wie zuvor pelletiert, in Minimalmedium (SD) aufgenommen und auf den entsprechenden Selektionsmediumagarplatten (SD/NH<sub>4</sub>SO<sub>4</sub>) ausplattiert. Für Resistenzmarker wie *hph* wurde die Inkubationszeit bei 37°C über Nacht verlängert und die Hefen auf YPD-Platten mit 500 µg/ml Hygromycin ausgestrichen.

Nach 2-3 Tagen bei 37°C wurden die transformierten Stämme aus den gewachsenen Kolonien vereinzelt und anschließend per PCR (Abschnitt 2.4.2) und Southern-Blot (Abschnitt 2.4.5) auf die korrekte Integration der Kassette hin getestet.

#### 2.4.8 Heterologe Expression von *Aro8* in *E. coli*

---

Mit den Primern *Aro8-Ex-l* und *Aro-8-Ex-r* wurde das komplette Gen *ARO8* aus genomischer DNA des Wildtypstamms ATCC2001 amplifiziert. Das Produkt wurde in den Vektor pCR2.1 (Invitrogen) kloniert und sequenziert. Ein *EcoRI*-Fragment mit dem kompletten *ARO8*-Gen wurde isoliert und in den *EcoRI*-linearisierten Expressionsvektor pRSET-B (Invitrogen) übertragen. Mit diesem Konstrukt wurden "Rosetta" *E. coli*-Zellen (Novagen) transformiert. Von einer Vorkultur dieser Zellen wurden 200 ml LB-Medium angeimpft und bei 30°C schüttelnd (300 rpm) bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5-0,8 angezogen. Durch Zugabe von 1 mM IPTG wurde die Proteinsynthese induziert und die Zellen nach 5 Stunden durch Zentrifugation geerntet. Das Pellet wurde in 50 mM HEPES-Puffer (pH 7,5) gelöst und die Zellen durch Ultraschallbehandlung aufgebrochen. Nach Abtrennung der unlöslichen Fraktion durch Zentrifugation wurde der Überstand mit dem histidinmarkierten

rekombinanten Protein in einer ÄKTA Explorer (Amersham) aufgereinigt. Dazu wurde eine 14 ml-Nickel-Sepharose-Säule mit 50 mM HEPES (pH 7,5) äquilibriert und mit der löslichen Fraktion des Zellysats beladen. Nach einem Schritt mit 3 Säulenvolumen 50 mM HEPES (pH 7,5) wurde die Säule mit 5 Volumen 50 mM HEPES (pH 7,5) mit 40 mM Imidazol gewaschen. Danach wurde das markierte Protein mit 5 Säulenvolumen 50 mM HEPES (pH 7,5) mit 200 mM Imidazol eluiert und anschließend in einer Filtereinheit mit 30 kDa Ausschlußgröße (Amicon, Millipore) aufkonzentriert und in 50 mM HEPES (pH 7,5) gelöst. Proben wurden bei jedem Schritt genommen und im Anschluß auf einem SDS-Polyacrylamidgel überprüft.

Die Transaminaseaktivität wurde standardmäßig in einem Ansatz bestehend aus 3 mM L-Tryptophan, 2 mM  $\alpha$ -Ketoglutarat, 100 mM HEPES (pH 7,5), 10  $\mu$ M Pyridoxalphosphat und dem aufgereinigten Enzym bestimmt. Für die spezifische Aktivität wurde die Proteinkonzentration über einen Bradford-Test (BioRad) nach Standardverfahren gemessen. Für die Pigmentproduktion wurde der beschriebene Test mit 10 mM L-Tryptophan, 10 mM  $\alpha$ -Ketoglutarat, 100 mM HEPES (pH 7,5), 10  $\mu$ M Pyridoxalphosphat und dem Enzym durchgeführt. Die Messungen der optischen Dichte erfolgten dabei entweder mit einem Amersham "Ultrospec 3100 pro"-Photometer oder einem Tecan Infinite M 200 Mikrotiterplattenleser.

## 2.5 Durchmusterung der Mutantenbibliothek

Die Sammlung von Transposon-Insertionsmutanten wurde durch B. Cormack in Form von zwanzig Pools mit zufälligen Mutanten zur Verfügung gestellt (Castaño et al., 2003). Für die Durchmusterung (*Screening*) der Bibliothek wurden von jedem Pool Aliquots auf YPD-Agarplatten ( $\emptyset$  130 mm) ausplattiert und die Platten bei 37°C inkubiert, bis große und kleine Kolonien gut erkennbar waren. Diese Einzelkolonien wurden in 96-Lochplatten mit YPD-Medium übertragen und nochmals über Nacht bei 37°C angezogen. Von jedem Pool wurden so mindestens 1000 Kolonien isoliert und mit 50% sterilem Glycerin für spätere Verwendung bei -70°C gelagert.

Zur Bewertung der Pigmentbildung wurden die Mutanten aus den YPD-Vorkulturen auf 96-Lochplatten, die mit pigmentinduzierendem Festmedium gefüllt waren (SD-Agar mit Glukose und Tryptophan: SD-Trp, s. Abschnitt 2.1.1), übertragen. Nach drei Tagen Inkubation bei 37°C wurden Wachstum und Pigmentbildung visuell bewertet und Mutanten mit auffälliger Abweichung von der Wildtyppigmentierung ausgewählt. In einer zweiten

Testrunden wurden von diesen Mutanten 5 µl einer Übernachtskultur auf frisches Induktionsmedium gegeben (24-Lochplattenformat) und die Pigmentierung nochmals bewertet. Bei Mutanten, die in beiden Testrunden Auffälligkeiten zeigten, wurden die Insertionsstellen des Transposons ansequenziert.

### 2.5.1 Sequenzierung der Transposon-Insertionsstellen

Von Mutanten mit abweichender Pigmentbildung auf Induktionsmedium wurde gDNA aus einer Übernachtskultur isoliert (Abschnitt 2.4.1.2), mit dem Restriktionsenzym *MfeI* (NEB) verdaut und mit T4-Ligase (NEB) religiert. Das von dem Transposon T7 abgeleitete Disruptionskonstrukt enthält eine Kanamycin-Resistenzkassette (KanR) und den Replikationsursprung R6Ky, der das  $\Pi$ -Protein für seine Funktion benötigt. Der *E. coli*-Stamm BW23473 enthält das für  $\Pi$  kodierende *pir*-Gen (Metcalf *et al.*, 1996). Dieser Stamm wurde mit der religierten DNA transformiert (Abschnitt 2.4.6) und auf LB mit Kanamycin (30 µg/ml; Sigma) selektiert. Die wachsenden, das zirkularisierte Tn7-Konstrukt samt flankierender *C. glabrata*-DNA enthaltenden *E. coli*-Klone wurden vereinzelt, die Plasmid-DNA isoliert (Abschnitt 2.4.1.1) und mit einem aus dem Transposonkonstrukt herausgerichteten Primer (Tn7-Read out; Abschnitt 2.2.2) ansequenziert. Die Sequenzierung erfolgte dabei durch Service-Einheiten im Robert-Koch-Institut oder im Hans-Knöll-Institut mit dem BigDye® Terminator-System (Applied Biosystems). Die erhaltenen Sequenzen wurden mit dem BLAST-Algorithmus mit dem bekannten *C. glabrata*-Genom abgeglichen und so die ursprüngliche Position des Tn7-Konstrukts im Genom ermittelt.

### 2.5.2 Transformation zur Kontrolle des gefundenen Gens

Gegebenenfalls wurde das in Abschnitt 2.5.1 erhaltene Plasmid verwendet, um eine Kontrolltransformation von *C. glabrata* durchzuführen. Dafür wurde das Plasmid mit *MfeI* wieder linearisiert und der *C. glabrata*-Wildtyp mit diesem Konstrukt transformiert. Das Tn7-Konstrukt enthält zusätzlich zur Kan<sup>R</sup>-Sequenz noch eine Hygromycin-Resistenzkassette (*hph*), die zur Selektion der Transformanten auf YPD-Vollmedium mit 500 µg/ml Hygromycin (Sigma) ausgenutzt wurde (Castaño *et al.*, 2003). Über die flankierenden Gensequenzen kam es zu homologen Rekombinationen mit dem ursprünglich disruptierten Gen, wodurch eine

isogene Mutante in einem unabhängigen Wildtypstamm erzeugt werden konnte. Die korrekte Insertion wurde per PCR überprüft und der Phänotyp der neuen Mutante mit der in der Bibliothek gefundenen verglichen. So konnten Fehlinterpretationen, wie sie durch Mehrfachinsertionen des Tn7-Konstrukts in einem Isolat hätten auftreten können, verhindert werden.

## 2.6 Genexpressionsanalyse

---

### 2.6.1 Microarrays

---

Die *C. glabrata*-Microarrays wurden freundlicherweise von Steffen Rupp (Stuttgart) zur Verfügung gestellt. Es handelt sich um Glas-Arrays mit in Duplikaten aufgebrauchten cDNAs, die mit 5908 69- oder 70-mer-Oligonukleotiden 5053 der bekannten ORFs von *C. glabrata* repräsentieren. Bei den *C. albicans*-Microarrays handelte es sich um kommerziell erhältliche Oligonukleotid-Glas-Arrays (Eurogentec). Sie enthalten für 6606 bekannte ORFs Oligonukleotide jeweils in Duplikaten.

#### 2.6.1.1 Gemeinsame Referenzen

---

Für die Microarray-Experimente wurden alle Proben in Zweifarboxperimenten zusammen jeweils mit der gemeinsamen Referenz für *C. albicans* oder der für *C. glabrata* hybridisiert. In beiden Fällen handelt es sich um RNA, die aus einer exponentiell wachsenden Kultur des Pilzes in YPD-Vollmedium isoliert wurde. Eine dichte Übernachtskultur des Pilzes wurde dafür in frisches Medium überimpft, bei 37°C und 180 rpm inkubiert und bei einer OD<sub>600</sub> von 5,0 isoliert. Die gemeinsamen Referenz-RNAs wurden nach den folgenden Protokollen mit Cy3-Nukleotiden markiert und dann jeweils für alle Experimente eingesetzt.

#### 2.6.1.2 Probennahme für RNA-Isolierung

---

Kulturen von *C. glabrata* oder *C. albicans* wurden den experimentellen Bedingungen entsprechend behandelt, abzentrifugiert und die RNA mit dem RNeasy Mini-Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben isoliert. Für die mechanische Lyse der Zellen mit Glasperlen



(0,4-0,6 mm, Sartorius) wurde ein Precellys 24-Homogenisator (PeqLab) eingesetzt, eingestellt auf zweimal 6500 rpm für je 30 Sekunden, dazwischen 30 Sekunden Pause.

Die aufgereinigte RNA wurde in einem BioAnalyzer 2100 (Agilent) mit dem RNA Nano Chip (Agilent) auf ihre Integrität überprüft. Qualitativ hochwertige RNA wurde nach einer zusätzlichen Quantifizierung in einem Nanodrop-1000-Spektrometer (PeqLab) für die Markierungsreaktion eingesetzt. Die Lagerung von RNA erfolgte gelöst in Wasser bei -70°C.

### *2.6.1.3 Markierungsreaktion*

---

Die RNA wurde mit dem Low RNA Input Linear Amplification Kit (Agilent) nach Herstellerangaben mit fluoreszierenden Nukleotiden amplifiziert und dabei markiert. Dazu wurde je 1 µg RNA mit Oligo-dT/T7-Promotor-Primern revers transkribiert und die erhaltene cDNA in Gegenwart von Cy-markierten Nukleotiden (Cy3- bzw. Cy5-CTP, GE Healthcare) *in vitro* transkribiert. Die erhaltene cRNA wurde mit dem RNeasy Mini-Kit (Qiagen) aufgereinigt und die Menge und spezifische Aktivität (Inkorporationsrate) mit dem Nanodrop-1000-Spektrometer bestimmt. Markierte cRNA mit einer Aktivität von mehr als 5 pmol/µg (gewöhnlich: 10-12 pmol/µg) Cy-markierten Nukleotiden wurde für die Hybridisierung verwendet. Die Lagerung von markierter cRNA erfolgte in Wasser bei -80°C.

### *2.6.1.4 Hybridisierungsreaktion*

---

Jeweils 1 µg cRNA von Probe (Cy5) und gemeinsamer Referenz (Cy3) wurden in 50 µl DIG EasyHyb (Roche) verdünnt und für 10 Minuten bei 65°C denaturiert. Die Microarrays wurden mit einem LifterSlip-Deckglas (Erie Scientific) bedeckt und die cRNA-Lösung darunter pipettiert. Danach wurden die Arrays in einer Hybridisierungskammer (Corning) wasserdicht verschlossen und 16-20 h bei 42°C im Wasserbad hybridisiert. Die hybridisierten Arrays wurden in drei Schritten gewaschen (15 min in 2× SSC, 1 % SDS; 8 min in 1× SSC, 0,2 % SDS; 5 min in 0,1× SSC, 0,2% SDS) und zum Trocknen in einem 50-ml-Plastikgefäß abzentrifugiert (450 g, 5 min). Hybridisierungen auf den Arrays wurden in einem GenePix 4000B-Zweifarbscanner in einer Auflösung von 10 µm mit der GenePix-Software, Version 4.1 (Molecular Devices) erfasst und ausgewertet.

### 2.6.2 Datenerfassung

---

Die automatische Erfassung der einzelnen hybridisierten Punkte durch die GenePix-Software wurde gegebenenfalls manuell korrigiert und die Daten in das Programm GeneSpring GX (Version 10, Agilent) zur weiteren Auswertung importiert. Nach einer Normalisierung der Rohdaten über den LOWESS-Algorithmus und der Annotierung der Daten nach dem MIAME-Standard (Brazma *et al.*, 2001) wurden die Filter- und Auswertungswerkzeuge des Programms entsprechend der Angaben im Ergebnisteil eingesetzt. Die erhaltenen Daten wurden in elektronischen Datenbanken hinterlegt.

### 2.6.3 GO-Term-Analysen

---

Die GO-Term-Anreicherungsanalyse für *C. glabrata* wurde mit dem Programm GeneSpring GX 10 anhand der Annotation in der Génolevures-Datenbank durchgeführt. Zusätzlich wurden die Annotationen nach eigenen Kriterien mit den GO-Termen der *S. cerevisiae*-Homologe aus der Saccharomyces Genome Database erweitert (siehe Abschnitt 3.2.3.3). Die zugrundeliegenden Annotationsdaten stammen jeweils aus dem März 2009. Die Signifikanz der Anreicherung von GO-Termen wurde dabei durch GeneSpring GX 10 über eine hypergeometrische Verteilung berechnet.

Bei *C. albicans* wurde für die Analysen nach GO-Termen auf die umfangreiche Annotation der Candida Genome Database (Arnaud *et al.*, 2005) zurückgegriffen und die von dieser Datenbank bereitgestellte GO-Slim-Analyse durchgeführt, die einen an *C. albicans* angepaßtes, reduzierten Umfang an GO-Kategorien verwendet. Die Ergebnisse wurden zuletzt mit dem Stand der Annotationen im Juli 2009 abgeglichen.

## 2.7 Datenaufbereitung und Datenauswertung

### 2.7.1 Verwendete Programme

Folgende Programme wurden in dieser Arbeit verwendet und teilweise im Rahmen der Arbeit selbst entwickelt:

Programmname	Version	Hersteller/Autor	Verwendung
BioPaxer	1.0b	Eigenes Programm	Genexpression, Konvertierung
Genespring GX	10.0.1	Agilent Technologies	Genexpressionsanalyse
GenePix	4.1	Molecular Devives	Genexpression, Datenerfassung
GO-Termer	1.0b	Eigenes Programm	Genexpression, Konvertierung
GraphPad Prism	5.02	GraphPad Software	Datenaufbereitung, Statistik
Lasergene	7.2.1	DNASStar Inc.	DNA-Sequenz-Arbeiten
Mapper	1.0b	Eigenes Programm	Genexpression, Darstellung
Office 2007	12.0	Microsoft Corporation	Datenaufbereitung, -darstellung

### 2.7.2 In silico-Analysen

Folgende Datenbanken wurden für Sequenzvergleiche und Analysen der Microarray-Daten verwendet:

Datenbank	Internetadresse	Referenz
Candida Genome Database (CGD)	<a href="http://www.candidagenome.org">www.candidagenome.org</a>	(Arnaud <i>et al.</i> , 2005)
Saccharomyces Genome Database (SGD)	<a href="http://www.yeastgenome.org">www.yeastgenome.org</a>	(Christie <i>et al.</i> , 2004)
National Center for Biotechnology Information (NCBI)	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov">www.ncbi.nlm.nih.gov</a>	
Génolevures	<a href="http://www.genolevures.org">www.genolevures.org</a>	(Sherman <i>et al.</i> , 2009)
Gene Ontology (GO)	<a href="http://www.geneontology.org">www.geneontology.org</a>	(Ashburner <i>et al.</i> , 2000)
L2L <i>C. albicans</i> Database	<a href="http://candida.bri.nrc.ca/L2L/">candida.bri.nrc.ca/L2L/</a>	(Newman & Weiner, 2005)

### 2.7.3 Statistische Verfahren

Sofern nicht explizit anders erwähnt, wurde das Signifikanzniveau der Meßergebnisse über einen zweiseitigen t-Test bestimmt (gegebenenfalls nach zusätzlichem F-Test), unter Verwendung von Microsoft Excel oder GraphPad Prism (Abschnitt 2.7.1). Für die Ergebnisse des Versuchs zum Überleben mit Neutrophilen (Abschnitt 3.5.3) wurde der Wilcoxon-Vorzeichenrangtest verwendet, um den Unterschieden in den Neutrophilen-Chargen Rechnung zu tragen. Signifikanzniveaus wurden in den Abbildungen mit \* ( $p < 0,05$ ), \*\* ( $p < 0,01$ ) und \*\*\* ( $p < 0,001$ ) gekennzeichnet.

### 3 Ergebnisse

---

#### 3.1 Parameter für die Bildung des Pigments

---

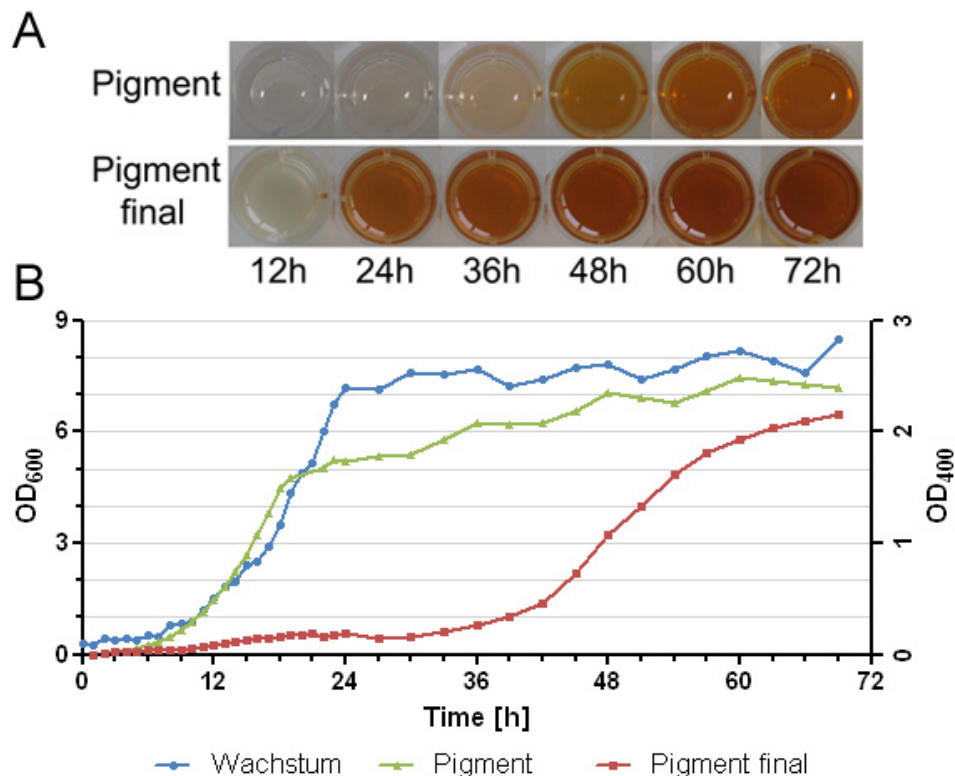
Für die Untersuchung der Pigmentsynthese sollten zuerst diejenigen Parameter bestimmt werden, die die Pigmentbildung beeinflussen können. Darum wurde die Pigmentierung von *C. glabrata*-Hefen unter verschiedenen Anzuchtbedingungen in Gegenwart von Tryptophan gemessen. Aus diesen Daten sollten erste Erkenntnisse darüber gewonnen werden, auf welchem Syntheseweg das Pigment gebildet wird und wie diese Synthese reguliert wird. Zusammen mit Untersuchungen des Transkriptionsprofils während der Pigmentbildung (Abschnitt 3.2.3) und von Zufallsmutanten mit veränderter Pigmentierung (Abschnitt 3.2.1) sollten so mögliche Ziele für spätere definierte Deletionsmutanten bestimmt werden.

##### 3.1.1 Zeitlicher Verlauf

---

Die sichtbare Pigmentbildung setzt in induzierendem Kulturmedium (Minimalmedium mit Tryptophan als einziger Stickstoffquelle) bei 37°C nach etwa zwei Tagen ein und erreicht nach etwa drei Tagen das Maximum (Abbildung 3-1A/B, *Pigment*). Die Kultur befindet sich zu diesen Zeitpunkten schon in der stationären Phase, die in diesem Medium nach etwa 24 bis 36 Stunden erreicht wird (Abbildung 3-1B, *Wachstum*). Um zu ermitteln, ob die Pigmentbildung von diesem Eintritt in die späten Wachstumsphasen abhängig ist oder ob schon vorher ein Pigmentvorläufer gebildet wird, der seinerseits langsam zum sichtbaren Pigment reagiert, wurden von induzierten Kulturen Proben des Überstands genommen und sterilfiltriert. In diesen zellfreien Proben wurde der Pigmentgehalt als Absorption bei 400 nm gemessen, und zwar einmal sofort bei Probennahme und noch einmal nach drei Tagen zusätzlicher Lagerung im Dunkeln.

Alle Proben dunkelten während der zusätzlichen Lagerung deutlich nach. Während die sofort gemessenen Proben erst lange nach dem Eintritt in die stationäre Phase eine starke Zunahme der OD<sub>400</sub> zeigten (Abbildung 3-1B B, *Pigment*), war mit denselben Proben nach zusätzlicher Lagerung schon während des logarithmischen Wachstums eine starke Pigmentierung erkennbar, die sich während der stationären Phase nur noch wenig verstärkte (Abbildung 3-1A/B, *Pigment final*). Die initiale Pigmentbildung findet also nicht



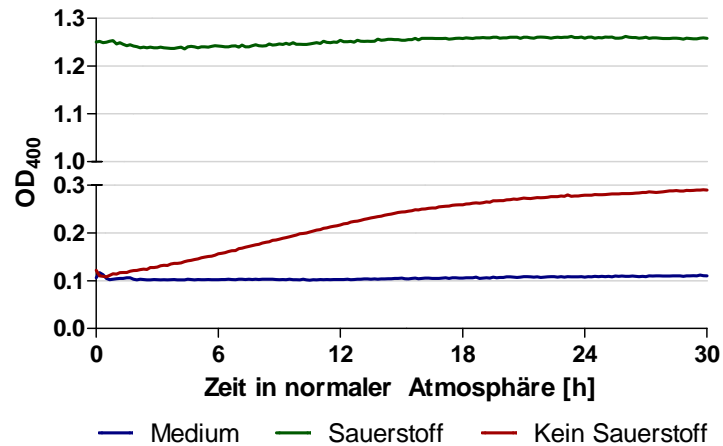
**Abbildung 3-1: Zeitlicher Verlauf der Pigmentbildung.** (A) Färbung des Überstands vor (Pigment) und nach einer zusätzlichen Inkubation (Pigment final) (B) Messung der Pigmentmenge als OD<sub>400</sub>. Das Wachstum (blau) ist langsamer als in Vollmedium, erreicht aber nach der logarithmischen Phase nach etwa 24 Stunden die stationäre Phase. Sichtbares Pigment (rot) tritt erst nach etwa 40 Stunden auf. Zellfreier Überstand dunkelt nach (grün) und zeigt, dass die Pigmentproduktion schon nach wenigen Stunden Wachstum meßbar einsetzt.

erst während der stationären Phase statt, sondern schon während des Wachstums, und in dieser Phase wird ein Pigmentvorläufer oder ein pigmentbildendes Enzym von *C. glabrata* in den Überstand abgegeben, in dem sich das Pigment dann bildet.

### 3.1.2 Abhängigkeit von Sauerstoff

Die Kultivierung und Pigmentbildung erfolgte unter aeroben Bedingungen. Um eine mögliche Abhängigkeit der Pigmentierung von Sauerstoff zu untersuchen, wurde *C. glabrata* unter sauerstofffreier Atmosphäre in pigmentinduzierendem Medium angezogen. Auch nach mehreren Tagen Wachstum blieb das Kulturmedium hell, während sich in der Anzucht mit Luftsauerstoff Pigment gebildet hat.

Der sterilfiltrierte Überstand der sauerstofffreien Kultur zeigte eine langsame Verfärbung, sobald er der normalen Atmosphäre ausgesetzt wurde (Abbildung 3-2, *Kein Sauerstoff*). Die Intensität der Färbung erreichte dabei nicht das Niveau der sauerstoffhaltigen Kulturbedingung, auch nicht nach Anpassung an die geringere Zellzahl bei sauerstofffreiem Wachstum (OD<sub>600</sub> 3,5 zu 8,5 bei normaler Atmosphäre). Als Kontrolle unter



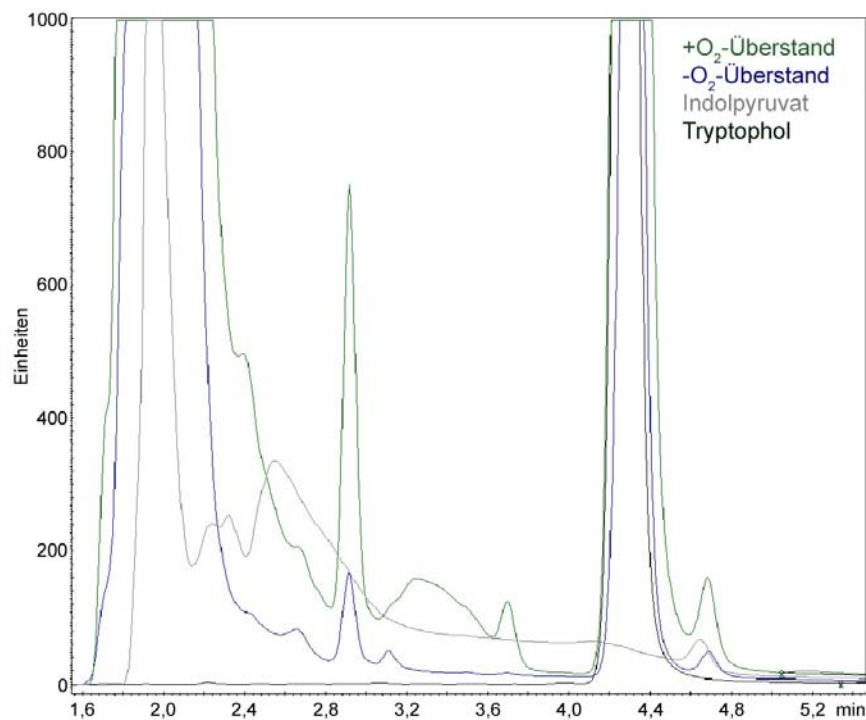
**Abbildung 3-2: Nachdunklung nach Anzucht in sauerstofffreier Atmosphäre.** OD<sub>400</sub>-Entwicklung vom Zeitpunkt der Probennahme (nach vier Tagen Wachstum) an als Maß der Pigmentbildung. Die Sekundärreaktion setzt ein, sobald der Kulturüberstand dem Luftsauerstoff ausgesetzt wird und dauert etwa 24 Stunden an (rot, rechte Achse). Zum Vergleich Pigment, das in sauerstoffhaltiger Atmosphäre gebildet wurde und keine Änderung der OD<sub>400</sub> mehr zeigt (grün, linke Achse). Induktionsmedium ohne Hefen (Medium, blau, rechte Achse) zeigt keine Nachdunklung.

Sauerstoffabschluß gehaltenes Induktionsmedium ohne *C. glabrata* hatte anfangs die gleiche OD<sub>400</sub> (Abbildung 3-2, *Medium*), zeigte aber keine meßbare Nachdunklung.

Für die Bildung des Pigments ist also Sauerstoff nötig, wobei die Reaktion in einen sauerstoffunabhängigen und einen sauerstoffabhängigen Schritt unterteilt werden kann. Der zweite Schritt kann offensichtlich auch in zellfreiem Medium erfolgen. Möglicherweise sezerniert *C. glabrata* also ein Zwischenprodukt, das spontan oder vermittelt von extrazellulären Enzymen zu dem endgültigen Produkt weiterreagiert, wofür Sauerstoff benötigt wird. Um dieses oder diese Zwischenprodukte zu ermitteln, wurde im nächsten Schritt der Überstand einer sauerstofffrei angezogenen Kultur mittels HPLC mit dem einer unter Sauerstoff gewachsenen verglichen und die zeitliche Entwicklung verfolgt.

### 3.1.2.1 Analyse der Zwischenprodukte

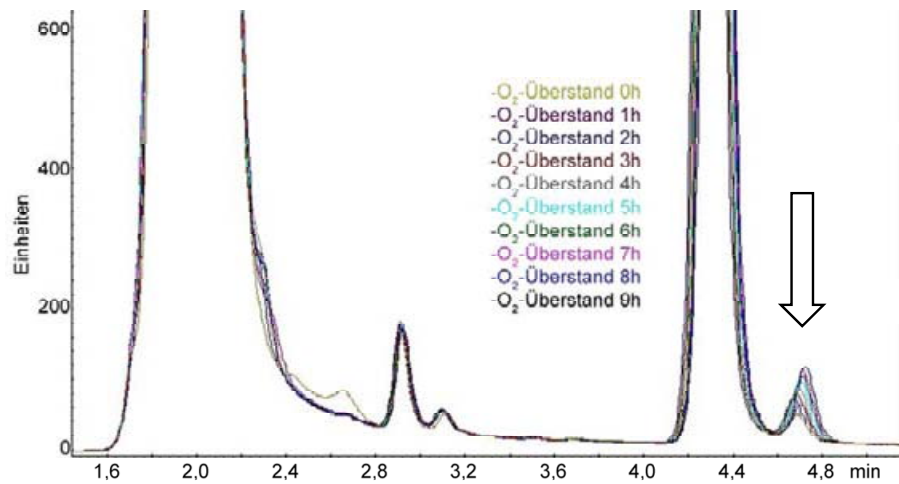
Das erste Abbauprodukt des Tryptophans in *S. cerevisiae* ist Indolpyruvat ((Kradolfer et al., 1982); vgl Abschnitt 1.5.1). Sollte es sich dabei um das Zwischenprodukt handeln, das in der sauerstoffabhängigen Reaktion umgesetzt wird, müßte es im Überstand der sauerstofffrei gewachsenen Kulturen noch nachweisbar sein. Die Analyse über HPLC zeigt jedoch, dass sowohl in den sauerstofffrei als auch in den unter normaler Atmosphäre gewachsenen Kulturen Indolpyruvat nicht nachweisbar ist (Abbildung 3-3; beispielsweise ist der Peak bei Minute 2,5 in den Proben nicht vorhanden). Das Endprodukt des Tryptophanabbaus,



**Abbildung 3-3: HPLC-Chromatogramm der Überstände von pigmentinduzierten Kulturen in sauerstoffhaltiger (+O<sub>2</sub>-Überstand) und -freier (-O<sub>2</sub>-Überstand) Atmosphäre.** Zum Vergleich sind die Kurven von Indolpyruvat und Tryptophol eingefügt. Während Tryptophol unter beiden Bedingungen gebildet wird, wird kein meßbares Indolpyruvat in den Überstand abgegeben. Die sauerstoffabhängige Reaktion geht somit nicht direkt vom Abbauzwischenprodukt Indolpyruvat aus.

Tryptophol, ist unter beiden Bedingungen nachweisbar (Peak bei Minute 4,3), das Tryptophan wurde also erwartungsgemäß umgesetzt (vgl. Abschnitt 1.5). Der pigmenthaltige Überstand aus der sauerstoffhaltigen Atmosphäre enthält außerdem insgesamt mehr Inhaltsstoffe als der Überstand der sauerstofffrei gewachsenen Kultur. Beiden gemeinsam ist ein Peak nahe des Hauptsignals des Indolpyruvats (etwa Minute 2,0), der aber nicht mit diesem identisch ist. Indolpyruvat ist also nicht in größeren Mengen im Überstand der sauerstofffrei angezogenen Kultur aufzufinden.

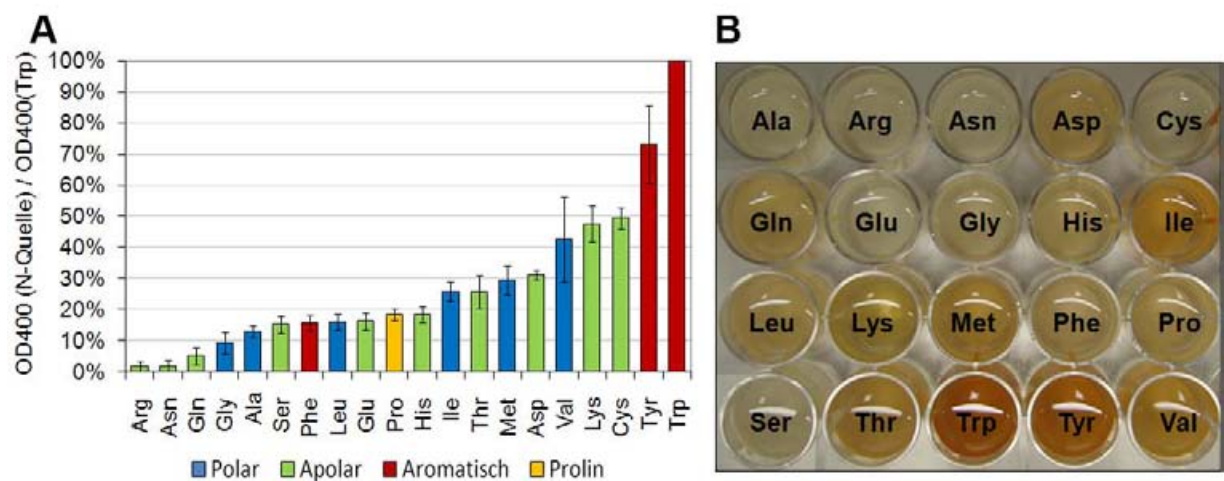
Gleichzeitig wird über den Zeitverlauf der Nachdunklung ein Peak im Chromatogramm sichtbar, der noch keiner Substanz zugeordnet werden kann (Abbildung 3-5). Dasselbe Signal läßt sich auch in der Kultur finden, die mit Sauerstoff angezogen wurde (Abbildung 3-3; Minute 4,7). Ein mit dem Erscheinen der unbekanntenen Substanz einhergehender Abbau einer anderen Substanz – also des möglichen Vorläufers – läßt sich aber nicht erkennen. Sowohl mit als auch ohne Sauerstoff bildet *C. glabrata* also Tryptophol aus Tryptophan, und in einer sauerstoffunabhängigen Sekundärreaktion entsteht über die Zeit eine über HPLC meßbare Verbindung. Das Zwischenprodukt konnte so aber nicht identifiziert werden.



**Abbildung 3-5: HPLC-Chromatogramm der Nachdunklungsreaktion.** Nach der Anzucht in sauerstofffreier Atmosphäre wurde der Überstand in Abständen von je einer Stunde über HPLC vermessen. Die sichtbare Nachdunklung geht einher mit der Zunahme eines Peaks bei 4,7 Minuten (Pfeil), verursacht durch eine unbekannte Substanz.

### 3.1.3 Abhängigkeit von anderen Stickstoffquellen

Die Pigmentbildung wurde bei *M. furfur* und *C. glabrata* mit Tryptophan als einziger Stickstoffquelle nachgewiesen (Mayser et al., 1998, Mayser et al., 2007). Um zu untersuchen, welchen Einfluß die Verfügbarkeit alternativer Stickstoffquellen auf die Pigmentierung von *C. albicans* hat, wurde deshalb Tryptophan mit allen anderen Standardaminosäuren jeweils in Konzentrationen von 5 mM gemischt und die Pigmentbildung gemessen (Abbildung 3-4A,B). Die Pigmentbildung wird von allen anderen Aminosäuren gehemmt, aber in unterschiedlichen Maßen. Wird die Absorption bei 400 nm als Maß für die Pigmentierung genommen, so ist die geringste Menge Pigment im Überstand bei Medien mit Arginin und Asparagin mit etwa 2% nachweisbar. Am wenigsten



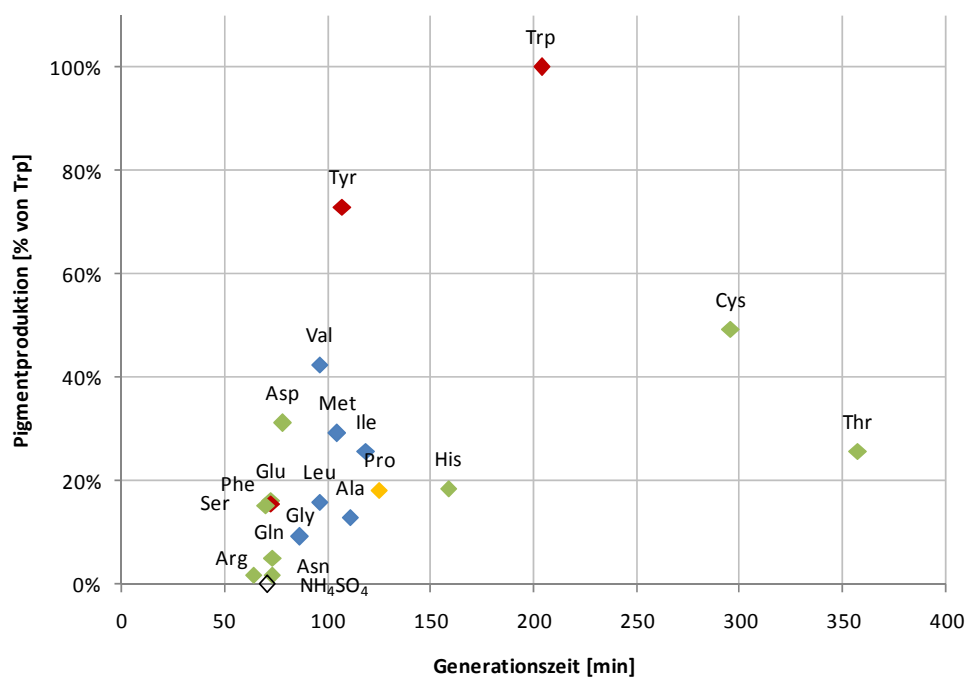
**Abbildung 3-4: Einfluß von weiteren Aminosäuren auf die Pigmentbildung.** Mischung von Tryptophan mit alternativen Stickstoffquellen jeweils 5 mM. (A) OD<sub>400</sub> des Kulturüberstands nach vier Tagen im Vergleich zu Tryptophan (in Prozent). Grün – polare Aminosäuren; Blau – apolare Aminosäuren; Rot – aromatische Aminosäuren; Orange – Prolin. (B) Farbe der Tryptophan-Aminosäure-Mischkulturen.



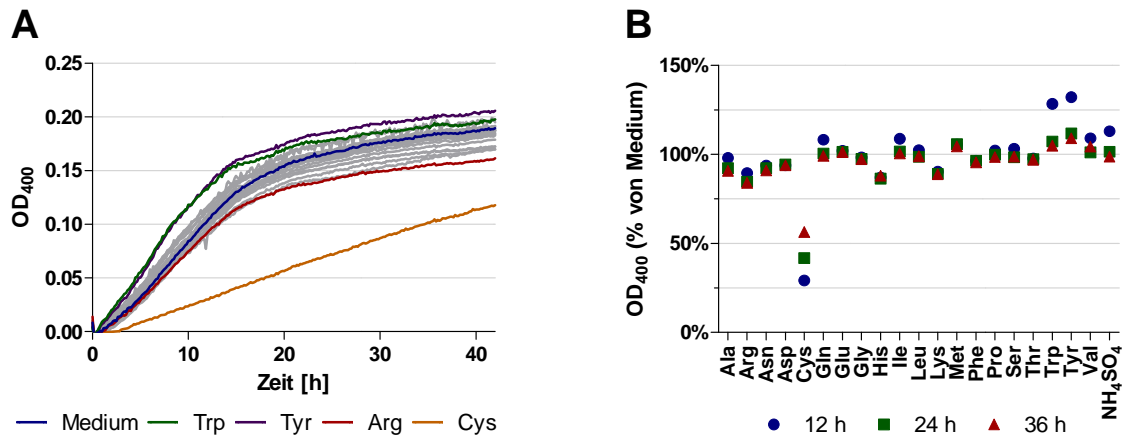
negativen Einfluß hat Tyrosin. Bei Zugabe dieser Aminosäure wurde über 70% der Pigmentmenge gebildet (Abbildung 3-4A).

Eine Abhängigkeit der Inhibition der Pigmentbildung von der Art der zugesetzten Aminosäure – polar, unpolar oder aromatisch – ist nicht erkennbar. Im Gegensatz zu Tyrosin verringert beispielsweise die ebenfalls aromatische Aminosäure Phenylalanin die Pigmentierung auf etwa 15%. Auch die Wachstumsgeschwindigkeit von *C. glabrata* mit der jeweiligen Aminosäure als Stickstoffquelle (als Maß für die "Güte") hat keine erkennbare Relevanz für die Hemmung der Pigmentierung (Abbildung 3-6; vgl. Abschnitte 3.1.5 und 3.2.4).

Eine mögliche Ursache für die Reduzierung der Pigmentproduktion wäre die Anwesenheit der Aminosäure selbst, die die eigentliche Bildungsreaktion hemmen könnte. Um dies auszuschließen, wurde wie in Abschnitt 3.1.2 beschrieben eine *C. glabrata*- Kultur unter Sauerstoffausschluß angezogen und der farblose Überstand mit den jeweiligen Aminosäuren gemischt. Die Bildung des Pigments in der Sekundärreaktion wurde wiederum als Absorptionszunahme bei 400 nm verfolgt. In Abbildung 3-7 ist das Ergebnis zusammengefaßt. Mit Ausnahme von Cystein hatte keine der getesteten Aminosäuren einen signifikanten Einfluß auf die Bildung des Pigments in der Sekundärreaktion (Abbildung 3-7A,B). Bei Tryptophan und Tyrosin zeigte sich eine etwas schnellere Bildung und eine



**Abbildung 3-6: Hemmung der Pigmentproduktion durch zusätzliche Stickstoffquellen und Wachstumsgeschwindigkeit in den entsprechenden Medien.** Die Qualität der Stickstoffquelle (Verwertbarkeit für Wachstum) hat keinen erkennbaren Einfluß auf die Hemmung der Pigmentproduktion. Dargestellt ist die Generationszeit in Kulturen mit den jeweiligen Stickstoffquellen und die Pigmentproduktion im Vergleich zu Kulturen mit Tryptophan als einziger Stickstoffquelle. Farbe der Datenpunkte wie in Abbildung 3-4.

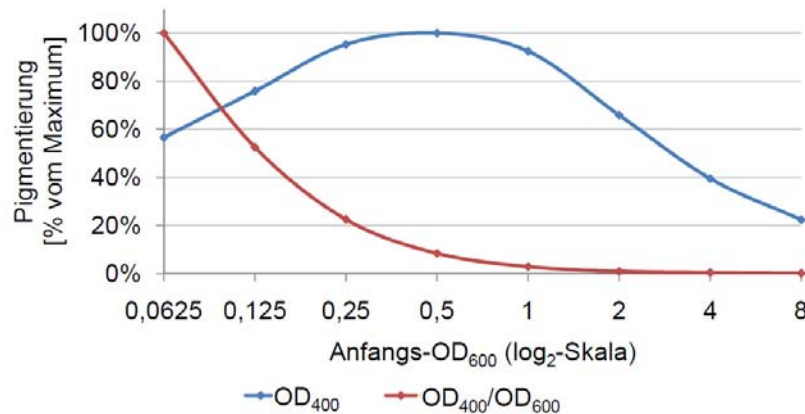


**Abbildung 3-7: Wirkung von verschiedenen Aminosäuren auf die Sekundärreaktion der Pigmentbildung.** (A) Zellfreier Überstand einer unter sauerstofffreier Atmosphäre in Induktionsmedium angezogenen *C. glabrata*-Kultur wurde mit Aminosäuren versetzt (je 5 mM). Die Entwicklung des Pigments wird durch die Anwesenheit der meisten Aminosäuren (graue Linien) nicht gehemmt. Ausgewählte Aminosäuren sind farbig dargestellt, ebenso die Vergleichsreaktion ohne zusätzliche Stickstoffquelle (Medium). Nur Cystein hemmt die Bildung des Pigments im zellfreien Überstand. (B) Dieselben Daten als Vergleich der  $OD_{400}$  mit dem Medium nach verschiedenen Zeitpunkten für alle Aminosäuren. Mit Threonin und Tryptophan erfolgt die Reaktion etwas schneller, und nur Cystein wirkt hemmend.

größere Gesamtabsorption (Abbildung 3-7B), die bei Tryptophan aber auch auf die höhere Eigenfärbung des Medium zurückführbar ist. Cystein verlangsamt die Pigmentbildung deutlich, so ist beispielsweise nach 24 Stunden erst 70% der Absorption des Überstands ohne Aminosäuren erreicht (Abbildung 3-7B). Die Inhibition der Pigmentbildung erfolgt also – mit Ausnahme von Cystein – nicht über eine Behinderung der Sekundärreaktion durch die Anwesenheit alternativer Aminosäuren.

### 3.1.4 Abhängigkeit von initialer Zelldichte

Die Zelldichte spielt bei Mikroorganismen – über das *Quorum-sensing*-Phänomen – in vielen Fällen eine wichtige Rolle bei morphologischen Veränderungen. Hier wurde die Rolle der initialen Zelldichte für die Pigmentierung untersucht, indem eine *C. glabrata*-Kultur in verschiedenen Verdünnungen in tryptophanhaltiges Medium überführt wurde. Die Pigmentmenge nach zwei Tagen zeigte dabei eine deutliche Abhängigkeit von der Dichte beim Animpfen. Die größte Menge Pigment findet sich bei einer initialen  $OD_{600}$  von 0,5 im Überstand, niedrigere und höhere Dichten führen zu weniger Pigmentakkumulation (Abbildung 3-8). Die höchste getestete Anfangs- $OD_{600}$  (8,0) zeigt mit etwa 20% der maximalen Pigmentmenge die geringste Produktion. Wird die Pigmentproduktion auf die angeimpfte Zellmenge bezogen ( $OD_{400}/OD_{600}$ ), so zeigt sich eine deutliche Inhibition der

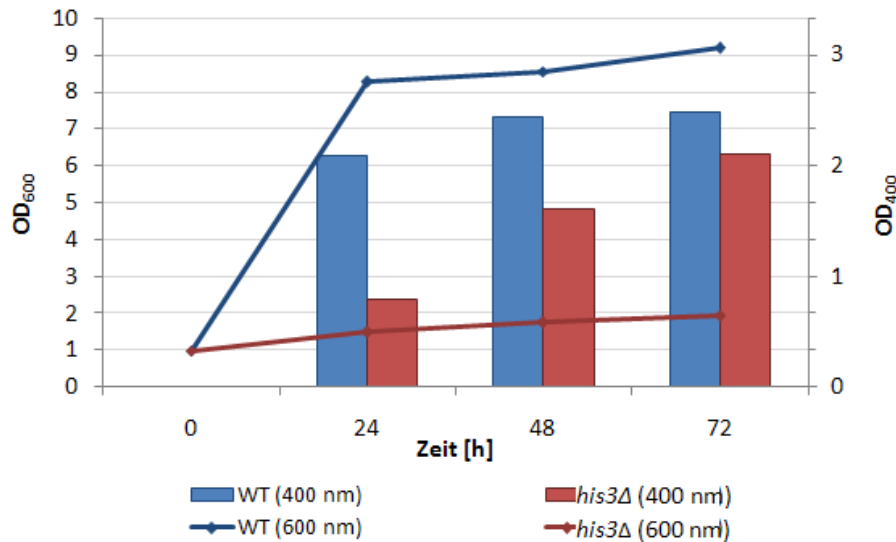


**Abbildung 3-8: Pigmentbildung in Abhängigkeit von der initialen Zelldichte.** Induzierendes Medium wurde mit verschiedenen Mengen *C. glabrata* angeimpft (Anfangs-OD<sub>600</sub>, Achse logarithmisch zur Basis 2) und nach zwei Tagen die Pigmentmenge im Überstand gemessen (OD<sub>400</sub>). Die absolute Pigmentmenge nimmt mit steigender Zellzahl erst an und nimmt dann wieder deutlich ab (blaue Linie). Relativ zur initialen Zellzahl (Quotient Pigment/Zelldichte, rote Linie) reduziert sich die Pigmentierung stark mit zunehmender Dichte.

Pigmentbildung mit steigender Zelldichte (Abbildung 3-8). Die Pigmentierung von *C. glabrata* ist auch von der Zelldichte abhängig, und eine hohe Animpfdosis inhibiert die Synthese des Pigments. Für die weiteren Versuche wurde deshalb im Normalfall das Induktionsmedium mit einer OD<sub>600</sub> von 0,2 angeimpft.

### 3.1.5 Unabhängigkeit vom Wachstum

Um zu bestimmen, ob für die Pigmentbildung Wachstum in Induktionsmedium nötig ist oder ob das Pigment unabhängig vom eigentlichen Wachstum gebildet wird, wurde der Wildtypstamm ATCC2001 und eine histidinauxotrophe Mutante desselben in pigment-induzierendem Medium mit Tryptophan als alleiniger Stickstoffquelle angezogen. Wildtyp und Mutante wurden mit einer initialen OD<sub>600</sub> von 1,0 angeimpft. Unter diesen Bedingungen wächst der Wildtyp innerhalb von 24 Stunden zur maximalen Dichte heran, während die Mutante nahezu kein Wachstum zeigt (Abbildung 3-9). Nach der zusätzlichen Inkubation zur vollständigen Ausbildung des Pigments (vgl. Abschnitt 3.1.1) wurde die Pigmentmenge im Überstand gemessen. Der Wildtyp erreichte schon nach 24 Stunden nahezu die maximale Pigmentierung (vgl. Abschnitt 3.1.1), während bei der auxotrophen Mutante etwa 30% dieses Werts gemessen wurde. Nach drei Tagen Inkubation hat auch die Mutante beinahe den Maximalwert erreicht (Abbildung 3-9). Die Bildung des Pigments und das Wachstum

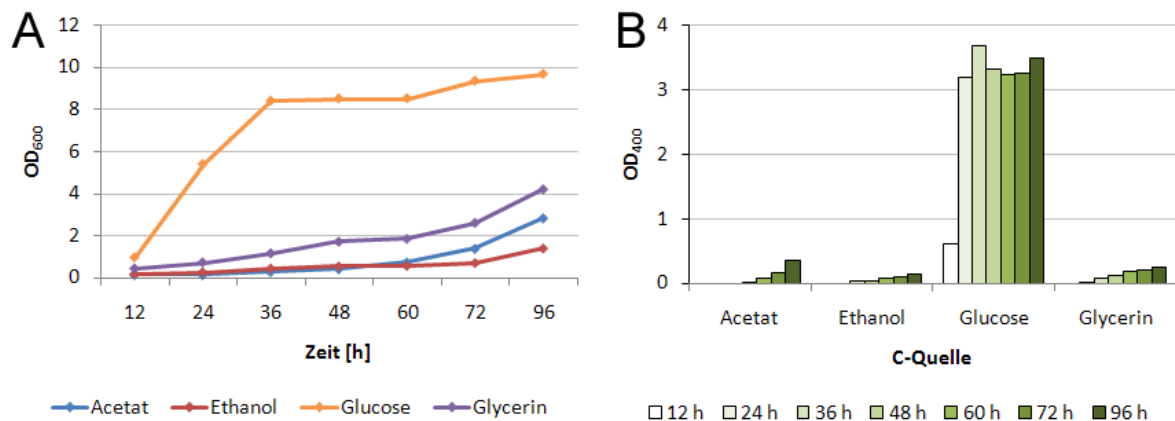


**Abbildung 3-9: Wachstum und Pigmentbildung von *C. glabrata*-Wildtyp und einer histidinauxotrophen Mutante in tryptophanhaltigem Medium.** Die Mutante zeigte erwartungsgemäß nahezu kein Wachstum in dem Medium, bildete aber Pigment. Trotz der geringeren Zellzahl erreichte die Pigmentmenge nach drei Tagen fast Wildtypniveau. Linke Skala Wachstum (OD<sub>600</sub>), rechte Skala Pigmentmenge im Überstand (OD<sub>400</sub>)

sind also prinzipiell unabhängig, es kommt nur zu einer Verlangsamung der Pigmentierung. Für die weiteren Experimente wurden daher Proben nach drei Tagen genommen.

### 3.1.6 Einfluß der Kohlenstoffquelle

Bei *S. cerevisiae* ist die Regulation verschiedener Gene in Antwort auf die Stickstoffquelle von der globalen Stickstoffkatabolitrepression abhängig. Besonders der Transkriptionsfaktor Gln3 wird in Abwesenheit von gut verwertbaren Stickstoffquellen dephosphoryliert, gelangt so in den Nucleus und aktiviert dort die Transkription von Genen der Stickstoffaufnahme und -verwertung (Beck & Hall, 1999). Es konnte aber gezeigt werden, dass auch die Kohlenstoffquelle die Lokalisation von Gln3 und damit die Transkription dieser Gene



**Abbildung 3-10: Einfluß der Kohlenstoffquelle auf die Pigmentbildung.** (A) Mit den alternativen Kohlenstoffquellen Acetat, Ethanol oder Glycerin wächst *C. glabrata* deutlich langsamer als mit Glucose. (B) Die Pigmentbildung ist mit den alternativen Kohlenstoffquelle sehr stark reduziert. Messung des Pigments als OD<sub>400</sub> nach vier Tagen Inkubation des zellfreien Überstands. Hier beispielhaft gezeigt an einem typischen Experiment.

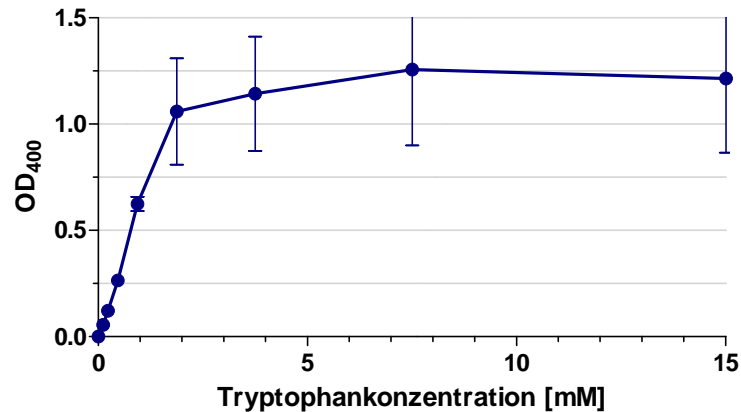
beeinflussen kann (Bertram *et al.*, 2002). Stickstoff- und Kohlenstoffnutzung sind also bei diesem Pilz teilweise eng miteinander verzahnt. Deshalb sollte bei *C. glabrata* der mögliche Einfluß der Kohlenstoffquelle auf die Pigmentbildung aus Tryptophan untersucht werden. Dafür wurden *C. glabrata*-Hefen in Minimalmedium mit Tryptophan und jeweils 2% Glucose oder alternativ Acetat, Ethanol oder Glycerin angezogen. Mit den nichtfermentierbaren Kohlenstoffquellen kam es erwartungsgemäß zu einem langsameren Wachstum (Abbildung 3-10A). Auch die Pigmentsynthese war deutlich reduziert im Vergleich mit der glucosehaltigen Kulturbedingung. Abbildung 3-10B zeigt ein typisches Experiment: Während mit Glucose wie zuvor nach etwa 24 Stunden die maximale Pigmentierung erreicht wurde ( $OD_{400} \approx 3,5$ ), blieb die Pigmentmenge im Überstand mit den anderen Kohlenstoffquellen auch nach 96 Stunden sehr gering. Mit Acetat erreichte die Kultur nach dieser Zeit 10% der Menge mit Glucose ( $OD_{400} = 0,35$ ), mit Ethanol nur 4% ( $OD_{400} = 0,15$ ) und mit Glycerin 7% ( $OD_{400} = 0,25$ ). Da die Pigmentsynthese auch mit der geringeren Zellzahl nach dieser Zeit das Maximum hätte erreichen können (Abschnitt 3.1.5), kann gefolgert werden, dass die Synthese des Pigments mit den schwerer verwertbaren Kohlenstoffquellen Acetat, Ethanol und Glycerin stark reduziert ist.

### 3.1.7 Benötigte Tryptophankonzentration

---

Das Standardmedium für die Induktion des Pigments bei *M. furfur* enthielt 15 mM Tryptophan (Mayser *et al.*, 1998, Hort *et al.*, 2008a). Beschrieben wurde die Pigmentbildung bei diesem Pilz aber auch noch bei einer minimalen Konzentration von etwa 0,5 mM (Mayser *et al.*, 1998). Um zu ermitteln, welche Tryptophankonzentration bei *C. glabrata* für die Pigmentbildung benötigt wird, wurde eine in diesem Medium nicht wachsende tripelauxotrophe Mutante (*his3Δ*, *leu2Δ*, *trp1Δ*) in Minimalmedium mit verschiedenen Tryptophankonzentrationen induziert. Die Kulturen wurden dazu mit einer optischen Dichte ( $OD_{600}$ ) von 1,0 angeimpft.

Die Pigmentbildung nach drei Tagen zeigte, dass schon mit weniger als 0,5 mM Tryptophan eine meßbare Pigmentierung eintritt, die bei etwa 1 mM die halbmaximale Stärke erreicht und zwischen 3,9 und 7,5 mM ihr Maximum erreicht (Abbildung 3-11).

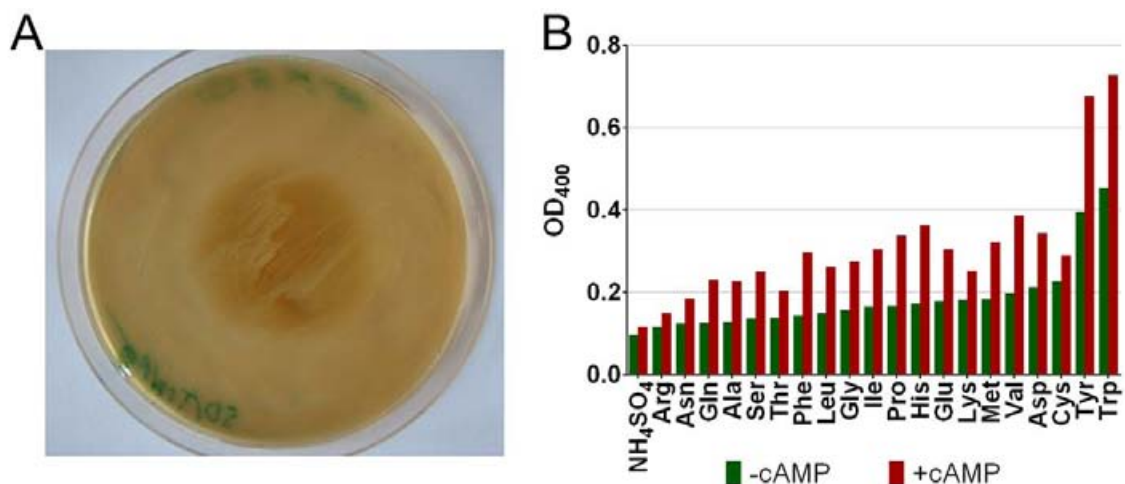


**Abbildung 3-11: Minimale Tryptophankonzentration für sichtbare Pigmentierung.** Eine tripelauxotrophe Mutante wurde in Minimalmedium mit Tryptophan in verschiedenen Konzentrationen angezogen und die Pigmentbildung im Überstand nach drei Tagen gemessen. Eine meßbare Pigmentbildung setzt schon unter 0,5 mM Tryptophan ein und erreicht ihre halbmaximale Menge bei etwa 1 mM. Etwa bei 2 mM wird das Maximum der Pigmentierung erreicht. n=3.

### 3.1.8 Einfluß von cAMP auf die Pigmentierung

Die Anpassung an verschiedene Kohlenstoff- und Stickstoffquellen erfolgt bei *S. cerevisiae* hauptsächlich über den cAMP-PKA-, den MAPK- und den TOR-Signaltransduktionsweg (Gagiano *et al.*, 2002). Unter anderem wird die Anwesenheit von Glucose über das G-Protein-System Gpr1/Gpa2 wahrgenommen (Lorenz *et al.*, 2000), das gleichzeitig auch als Rezeptor für Stickstoffmangel dient (Lorenz *et al.*, 2000). Die Anwesenheit von Glucose und der Mangel an gut verwertbaren Stickstoffquellen führt so zu einem Anstieg der cAMP-Konzentration und damit zur Initiation zum Beispiel von Pseudohyphenwachstum.

Um festzustellen, ob die cAMP-Signaltransduktion auch bei der Induktion des Pigments eine Rolle spielt, wurden 10 µl des cAMP-Analogons Dibutyryl-cAMP (100 mM) zu *C. glabrata*-



**Abbildung 3-12: Wirkung von cAMP auf die Pigmentierung.** (A) cAMP induziert Pigmentbildung auf Platten mit Tryptophan und Arginin. 10 µl einer mittig aufgetropften cAMP-Lösung (100 mM) lösen Pigmentierung aus. (B) cAMP induziert verstärkte Pigmentbildung unter beinahe allen getesteten Bedingungen. Nach einem Tag Inkubation mit 10 mM DBcAMP bildet sich bis zu doppelt soviel Pigment, abhängig von der Stickstoffquelle.

Zellen gegeben, die auf einer Platte mit Minimalmedium mit Glucose und einer Mischung aus Tryptophan und Arginin wuchsen. Dieses Medium inhibiert normalerweise die Pigmentbildung (Abschnitt 3.1.3), in Gegenwart von Dibutyryl-cAMP (DBcAMP) zeigt sich jedoch eine deutliche Pigmentierung (Abbildung 3-12A).

Auch in Flüssigmedium konnte durch die Zugabe von DBcAMP unter fast allen Bedingungen eine erhöhte Pigmentproduktion gemessen werden. DBcAMP wurde zu dicht angeimpften Hefen ( $OD_{600}$  1,0) in Medium mit einer Mischung von Tryptophan und verschiedenen Aminosäuren gegeben (vgl. Abschnitt 3.1.3). Nach 24 h Inkubation wurde die  $OD_{400}$  direkt gemessen. Mit DBcAMP bildeten die Hefen bis zu doppelt so viel Pigment, mit einer weiterhin bestehenden Abhängigkeit von der zusätzlichen Stickstoffquelle (Abbildung 3-12B).

Zuletzt wurden Mutanten von *C. glabrata* auf ihre Pigmentbildung getestet, die an der möglichen Signaltransduktion beteiligt sind. Tabelle 3-1 faßt die verwendeten Mutanten zusammen (freundlicherweise überlassen von K. Kuchler, Wien). Da alle Mutanten auf einem *his3 $\Delta$ leu2 $\Delta$ trp1 $\Delta$* -Ausgangsstamm basieren, wurde dieser als Kontrolle mitgeführt. Alle Stämme wurden in pigmentinduzierendem Medium mit einer  $OD_{600}$  von 1,0 angeimpft und die Pigmententwicklung als  $OD_{400}$  gemessen. Wachstum konnte wegen der Auxotrophien in dem Induktionsmedium nicht stattfinden (vgl. Abschnitt 3.1.5), wodurch ein Effekt durch unterschiedliche Wachstumsraten ausgeschlossen werden konnte.

**Tabelle 3-1: Gene der möglichen Signaltransduktionswege bei der Pigmentsynthese.** Ausgewählte Mutanten wurden drei Tage in induzierendem Medium angezogen und die finale Pigmentbildung mit der Referenzmutante (siehe Text) verglichen. Jeweils  $n \geq 3$ .

<i>C. glabrata</i> -Gen	<i>S.c.</i> -Homolog	Kurzbeschreibung	Pigmentprod.
CAGLOK01507g	<i>GPR1</i>	G-Protein-gekoppelter Rezeptor	52% $\pm$ 7%
CAGLOK09944g	<i>PDE2</i>	Phosphodiesterase	112% $\pm$ 11%
CAGLOE03476g	<i>CDC25</i>	Nukleotidaustauschfaktor	103% $\pm$ 7%
CAGLOC02277g	<i>GLN3</i>	Transkriptionsaktivator; stickstoffreguliert	88 $\pm$ 2 %
CAGLOF06677g	<i>GPA1</i>	G $\alpha$ -Untereinheit; Pheromonwahrnehmung	94% $\pm$ 18%

In Übereinstimmung mit den vorherigen Daten zeigte sich eine deutlich reduzierte Pigmentsynthese bei einer Mutante, die ein Gen mit Homologie zu *GPR1* aus dem Gpr1/Gpa2-cAMP-Signaltransduktionsweg der Nährstoffwahrnehmung bei *S. cerevisiae* fehlt. Die *C. glabrata*-Mutante, die das zu *GPA1* homologe Gen fehlt, das bei *S. cerevisiae* als G-Protein- $\alpha$ -Untereinheit der Pheromonwahrnehmung dient, zeigt dagegen keine Reduktion, ebensowenig wie die anderen getesteten Mutanten aus Tabelle 3-1.

### 3.1.9 Zusammenfassung des Abschnitts 3.1

Die tryptophanabhängige Pigmentsynthese von *C. glabrata* erfolgt in einem mindestens zweistufigen Prozess, dessen zweiter Schritt ohne Pilzzellen, aber nur in Gegenwart von Sauerstoff stattfinden kann. Der Zusatz von alternativen Stickstoffquellen inhibiert die Pigmentierung in unterschiedlichem Maße, aber nicht durch eine Reaktion mit dem gebildeten Pigmentvorläufer, sondern auf Ebene der induzierten Hefezellen. Die Regulation der Pigmentbildung ist von cAMP beeinflusst. Weitere Faktoren, die die Pigmentierung verringern können, sind hohe Zelldichte und nichtfermentierbare Kohlenstoffquellen.

### 3.2 Molekularbiologische Ansätze zur Aufklärung des Pigmentsynthesewegs

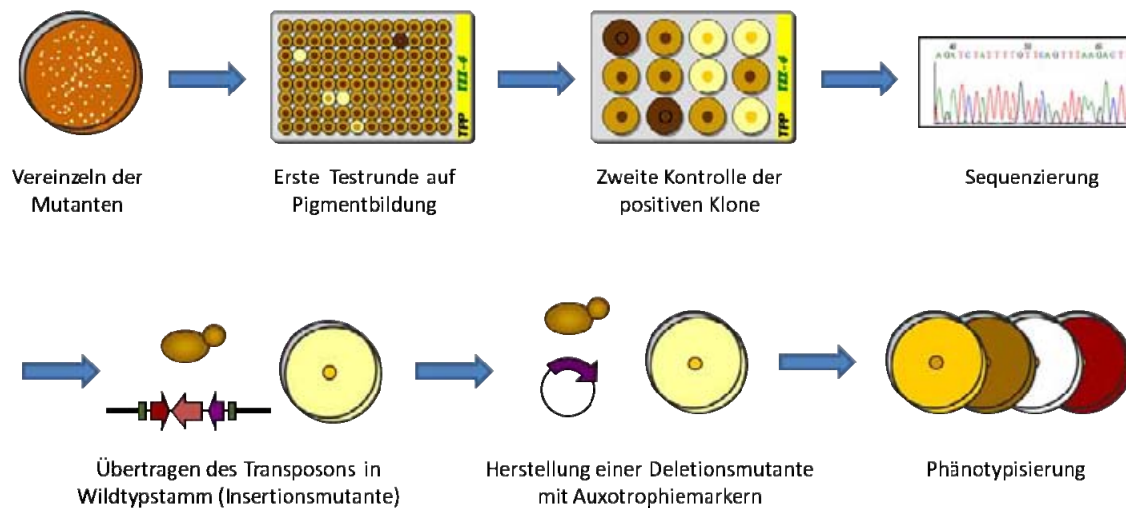
Der Syntheseweg des Pigments war zu Beginn der Untersuchungen völlig unbekannt. Klar war nur, dass es sich offensichtlich um eine Umsetzung von Tryptophan handelte, da der Indolkörper bei allen bekannten Strukturen im Pigment von *Malassezia furfur* wieder auftrat (Wille *et al.*, 2001b, Mayser *et al.*, 2002, Mayser *et al.*, 2003, Irlinger *et al.*, 2004, Mayser *et al.*, 2007). Für eine genetische Untersuchung des Pigmentsynthesewegs bot sich eine Verfahren an, bei dem ohne Vorwissen eine große Zahl von möglichen Kandidatengenen untersucht werden kann.

#### 3.2.1 Analyse einer Mutantenbibliothek

Für die Untersuchung einer großen Zahl von möglichen Genen der Pigmentsynthese wurde eine Bank mit zufälligen Transposonmutanten von *C. glabrata* genutzt, die freundlicherweise von Prof. Cormack, Baltimore, zur Verfügung gestellt wurde (Castaño *et al.*, 2003). Es handelte sich dabei um zwanzig Pools von Insertionsmutanten, bei denen das Transposon Tn7 an zufälligen Stellen im Genom integriert vorliegt. Für die weiteren Untersuchungen wurden aus diesen Pools jeweils etwa 1000 Kolonien vereinzelt und auf induzierendem Medium nach ihrer Fähigkeit zur Pigmentsynthese bewertet.

In Abbildung 3-13 ist schematisch der Ablauf der gesamten Analyse dargestellt. Die vereinzelt Mutanten wurden in zwei Runden auf ihre Pigmentbildung getestet, und das Transposon samt benachbarter genomischer DNA isoliert, um über Sequenzierung den Ort



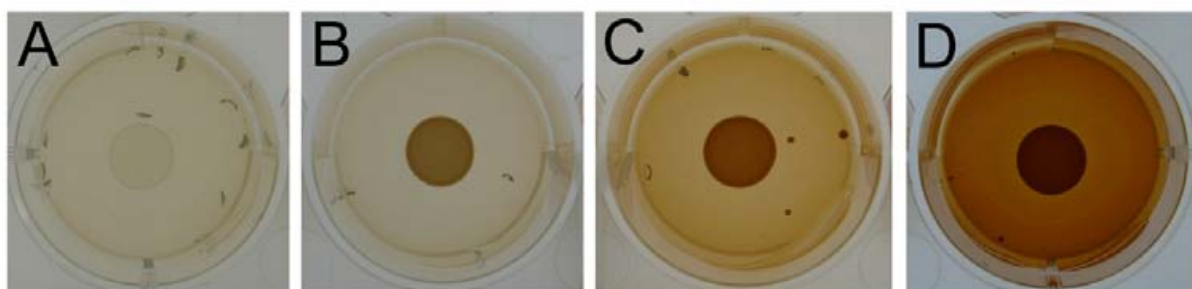


**Abbildung 3-13: Schema zum Screening der Mutantenbibliothek.** Nach der Vereinzeln erfolgte ein zweistufiger Test auf Pigmentbildung auf Minimalmedium mit Tryptophan. Die Transposons wurden dann isoliert, in *E. coli* als Plasmide amplifiziert und aus dem Transposon heraus sequenziert. Parallel dazu wurde das isolierte Transposon noch einmal in den Wildtypstamm übertragen, um sicherzustellen, daß die beobachteten Phänotypen nicht auf Artefakte durch Doppelinsertionen in der Bank zurückzuführen sind. Aufgrund der Sequenzdaten wurde dann eine Deletionsmutante des Gens in einer auxotrophen *C. glabrata*-Mutante unter Verwendung der entsprechenden Marker hergestellt. Die Phänotypisierung nach der Kontrolle durch PCR und Southern-Blot erfolgte dann mit den letztgenannten definierten Mutanten.

der Insertion festzustellen. Um auszuschließen, dass die Phänotypen auf Artefakte beispielsweise durch mehrere inserierte Transposons in einem Stamm zurückzuführen sind, wurde das isolierte Transposon danach in einen neuen Wildtypstamm übertragen. Für die endgültige Phänotypisierung schließlich wurden gezielte Deletionsmutanten hergestellt.

### 3.2.1.1 Klassen von Mutanten

Insgesamt wurden etwa 17.000 Einzelkolonien auf ihre Fähigkeit zur Pigmentbildung untersucht. Die weit überwiegende Mehrzahl (99,0%) zeigte dabei keine sichtbare Veränderung der Pigmentierung (Tabelle 3-2). Die restlichen Mutanten wurden in drei



**Abbildung 3-14: Verschiedene Klassen von Mutanten.** (A) Kein Wachstum. (B) Verringerte Pigmentbildung. (C) Normale Pigmentbildung. (D) Erhöhte Pigmentbildung. Alle hier gezeigten Mutanten sind auf Minimalmedium mit Tryptophan für drei Tage gewachsen.

Kategorien unterteilt: kein Wachstum, verringerte oder ausbleibende Pigmentierung und erhöhte Pigmentierung (Abbildung 3-14). Für weiterführende Untersuchung wurden Vertreter der letzten beiden Klassen verwendet.

**Tabelle 3-2: Ergebnis des Mutantenscreenings**

Klassifizierung	Anzahl	In Prozent
Keine Änderung in Wachstum und Pigmentierung (Abbildung 3-14C)	17101	98,96%
Kein Wachstum auf SD-Medium mit Tryptophan (Abbildung 3-14A)	140	0,81%
Verringerte oder keine Pigmentbildung (Abbildung 3-14B)	29	0,17%
Erhöhte Pigmentbildung (Abbildung 3-14D)	10	0,06%
<b>Gesamt</b>	<b>17280</b>	<b>100%</b>

### 3.2.2 Mutanten mit verringerter Pigmentierung

Insgesamt wurden 29 verschiedene Mutanten gefunden, bei denen die Insertion eines Transposons zu einer verringerten Pigmentbildung geführt hat. Bei 25 konnte durch Sequenzierung das getroffene Gen bestimmt werden. Insgesamt waren sieben verschiedene Gene betroffen, die in Tabelle 3-3 zusammengefaßt sind.

**Tabelle 3-3: Gene mit Transposoninsertionen bei hypopigmentierten Mutanten.**

Name und Funktion der <i>S. cerevisiae</i> -Homologen	Anzahl
<i>FIG1</i> Membranprotein, möglicherweise involviert in Ca <sup>2+</sup> -Influx und Mating (Factor-Induced Gene 1)	1
<i>GID8</i> Funktion unbekannt. Beteiligt an der proteasomabhängigen Katabolit-inaktivierung von Fructose-1,6-Bisphosphatase (Glucose Induced Degradation deficient 8)	18
<i>YTA12</i> Teil einer Protease der inneren Mitochondrienmembran, benötigt für korrekte Faltung mitochondrialer Proteine (Yeast Tat binding Analog 12)	3
<i>MSP1</i> Mitochondriales Protein. Beteiligt an Sortierung der mitochondrialen Proteine. Wahrscheinliche ATPase (Mitochondrial Sorting of Proteins 1)	1
<i>FYV10</i> Funktion unbekannt. Nötig für Überleben bei K1-Killertoxinbehandlung. Beteiligt an der proteasomabhängigen Katabolit-inaktivierung von Fructose-1,6-Bisphosphatase (Function required for Yeast Viability 10)	1
<i>VID24</i> Peripheres Membranprotein der Vid-Vesikel. Fördert die proteasomabhängigen Katabolit-inaktivierung von Fructose-1,6-Bisphosphatase (Vacuolar Import and Degradation 24)	1
<i>VID30</i> Beteiligt an der proteasomabhängigen Katabolit-inaktivierung von Fructose-1,6-Bisphosphatase (FBPase). Bindet FBPase. Verschiebt den Stickstoffstoffwechsel zu Glutamat (Vacuolar Import and Degradation 30)	1
<b>Gesamt</b>	<b>25</b>

Zwei deutliche Gruppen zeichneten sich innerhalb der Funktionen der zerstörten Gene ab, die Beteiligung an der proteasomabhängigen Katabolitinaktivierung von Fructose-1,6-Bisphosphatase (vier Gene mit 21 Mutanten) und die Beteiligung an der korrekten Faltung und Sortierung mitochondrialer Proteine (zwei Gene mit vier Mutanten). Besonders häufig war das Homolog zu dem *S. cerevisiae*-Gen *GID8* (CAGL0K03949g) getroffen, mit insgesamt 18 Insertionen in zwölf Pools. Diese Insertionen waren größtenteils unabhängig voneinander und über die gesamte Länge des Gens verteilt (Abbildung 3-15). Für die weiteren Untersuchungen zu den hypopigmentierten Mutanten wurde deshalb zuerst eine dieser Mutanten verwendet, die nach der Position in der Sammlung mit dem Kürzel *I17A9* bezeichnet war.



**Abbildung 3-15: Unabhängige Insertionsstellen von Tn7 im *GID8*-Homolog.** Farbliche Unterscheidung der Insertionen nach den zwölf Mutantenpools, in denen die unabhängigen Insertionen gefunden wurden.

### 3.2.2.1 Mutanten mit erhöhter Pigmentierung

Von den zehn Mutanten mit erhöhter Pigmentierung konnte bei fünf die DNA-Sequenz neben dem Transposon bestimmt werden. In allen Fällen handelte es sich um einen intergenischen Bereich zwischen CAGL0A03080g und CAGL0A03102g, in Ableserichtung vor dem zweiten Gen gelegen. Die *S. cerevisiae*-Homologe der beiden Gene sind *YDR379C-A* (kodiert für ein mitochondriales Protein unbekannter Funktion) und *ARO10* (kodiert für eine Phenylpyruvat-Decarboxylase, die an der Aminosäuregärung beteiligt ist). Auch hier waren alle gefundenen Insertionsstellen unabhängig voneinander. Da die Insertionen alle in einer möglichen Promotorregion des Homologs von *ARO10* stattfanden, wurde dieses Gen als wahrscheinlich betroffenes für die Untersuchung der hyperpigmentierten Mutanten herangezogen (Tabelle 3-4). Die ausgewählte Mutante trägt das Kürzel *V4B4*.

**Tabelle 3-4: Gene mit Transposoninsertionen bei hyperpigmentierten Mutanten.**

Name und Funktion der <i>S. cerevisiae</i> -Homologen		Anzahl
<i>ARO10</i>	Phenylpyruvate-Decarboxylase, katalysiert die Decarboxylierung von Phenylpyruvat zu Phenylacetaldehyd. Beteiligt an der Aminosäuregärung. ( <u>ARO</u> matic amino acid requiring 10)	5
<b>Gesamt</b>		<b>5</b>

### 3.2.3 Transkriptionsanalyse der Pigmentsynthese

---

Eine alternative Methode, die für die Pigmentsynthese relevanten Gene zu identifizieren, ist die Transkriptionsanalyse. Hierfür wurden speziell angefertigte Microarrays mit insgesamt 5063 der 5202 bekannten offenen Leserahmen von *C. glabrata* nach der Génolevures-Datenbank, Genomversion 3 (Sherman et al., 2009), verwendet.

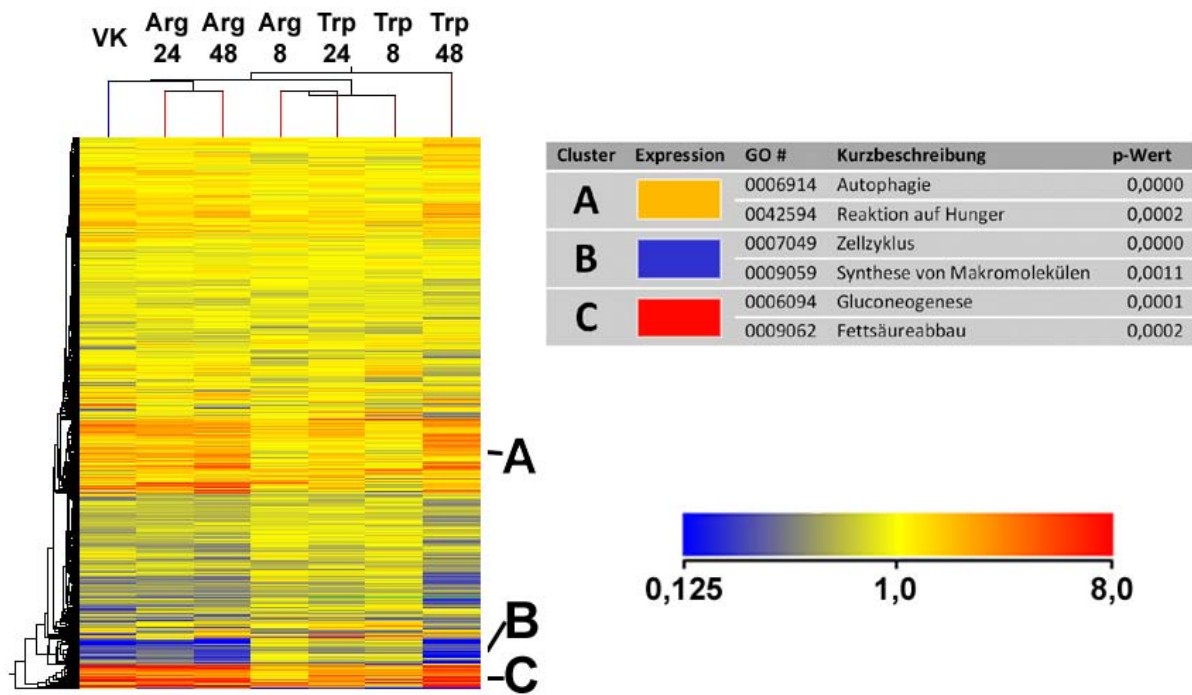
#### 3.2.3.1 Experimentelle Parameter

---

Der *C. glabrata*-Wildtypstamm ATCC2001 wurde für die Transkriptionsanalyse aus einer Vorkultur in YPD-Vollmedium in Minimalmedium mit Glucose und Tryptophan oder Arginin als einziger Stickstoffquelle übertragen. Nach 8, 24 und 48 Stunden wurden RNA-Proben genommen und die markierte cRNA zusammen mit einer gemeinsamen Referenz (cRNA einer exponentiell wachsenden Kultur in YPD-Vollmedium) auf Microarrays hybridisiert. Die Zeitpunkte waren dabei so gewählt, dass eine mittlere Wachstumsphase mit noch keinem sichtbaren Pigment im Überstand (8 Stunden), eine späte Wachstumsphase mit beginnender Pigmentierung (24 Stunden) und eine stationäre Phase mit deutlich erkennbarer Pigmentierung (48 Stunden) vertreten sind. Der Vergleich mit in Arginin gewachsenen Kulturen sollte das Herausfiltern von Genen ermöglichen, die allein durch das Wachstum in Minimalmedium reguliert werden.

Um die Bedingung zu ermitteln, unter der die beiden Wachstumsbedingungen die deutlichsten Unterschiede zeigen, wurden alle Proben gemeinsam mit den Daten der stationären Vorkultur in einem hierarchischen Cluster zusammengefaßt (Abbildung 3-16). Das Expressionsmuster zu den Zeitpunkten 24 und 48 Stunden in Arginin ist dem der Vorkultur am ähnlichsten, während bei Wachstum in Tryptophan diese Zeitpunkte näher an den Bedingungen nach 8 Stunden Wachstum in Arginin liegen. Der Zeitpunkt 48 Stunden in Tryptophan liegt trotz einiger Ähnlichkeiten zu dem Cluster mit Vorkultur und späten Argininkulturen noch weiter außerhalb (Abbildung 3-16).

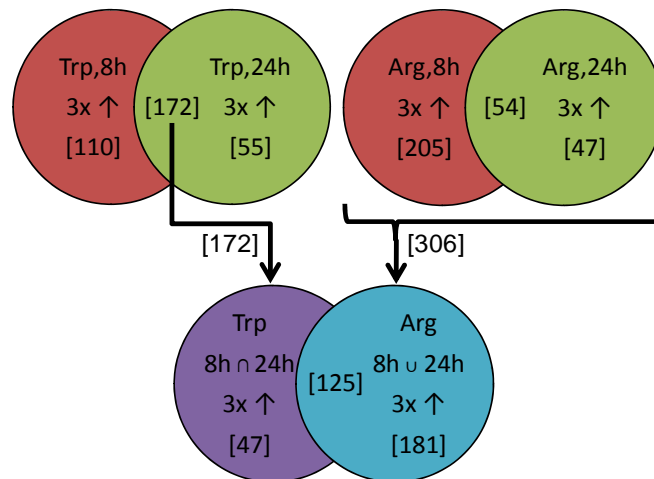
Um zu ermitteln, welche Faktoren diese Ähnlichkeit bestimmen, wurden ausgewählte Gencluster mit ähnlicher Expression in Vorkultur, späten Argininzeitpunkten und 48 Stunden Tryptophan näher untersucht (Abbildung 3-16, A-C). Über eine GO-Analyse (Abschnitt 3.2.3.3) konnten die signifikanten biologischen Prozesse, die durch diese Cluster repräsentiert werden, ermittelt werden. Die hochregulierten Gene in den Clustern A und C



**Abbildung 3-16: Hierarchische Clusteranalyse der Kulturbedingungen.** VK – Vorkultur, Arg – Arginin, Trp – Tryptophan. Expression zu verschiedenen Zeitpunkten im Vergleich zur gemeinsamen Referenz. Drei Gencluster (A-C) wurden ausgewählt und auf GO-Term-Anreicherung untersucht (rechts). Die zwei GO-Terme hoher Ordnung mit der größten Signifikanz sind angegeben.

stehen für die Antwort auf Hungerbedingungen und die Mobilisierung von Reserven, während die herunterregulierten in Cluster B Wachstum und Zellteilung repräsentieren. Nach 24 Stunden zeichnet sich also in Argininmedium der Eintritt in die stationäre Phase auf Transkriptionsebene bereits ab, in Tryptophanmedium jedoch noch nicht. Nach 48 Stunden war die stationäre Phase deutlich erkennbar und dominierte das Transkriptionsprofil.

Aus diesen Daten konnte eine Strategie zur Bestimmung der differentiell exprimierten Gene gewonnen werden. Zuerst wurden diejenigen Gene herausgefiltert, die im Vergleich zur Vorkultur in Tryptophanmedium nach 8 oder 24 Stunden heraufreguliert sind (mindestens dreifach höhere Expression). Um die Gene zu eliminieren, die durch das Wachstum in Minimalmedium alleine verstärkt exprimiert werden, wurde der gleiche Filter auf die in Arginin exprimierten Genen angewendet. Über die Differenzmengen konnten so diejenigen Gene isoliert werden, die in Tryptophan nach 8 oder 24 Stunden heraufreguliert sind, nicht aber in Arginin. In Abbildung 3-17 ist die Strategie in Form von Venn-Diagrammen zusammengefaßt. Insgesamt konnten so 47 Gene (Anhang 7.6.1) identifiziert werden, die allein in Tryptophan hochreguliert wurden.



**Abbildung 3-17: Strategie bei der Auswertung der *C. glabrata*-Microarraydaten zur Pigmentierung.** Die Durchschnittsmenge der hochregulierten Gene in Tryptophan zu beiden Zeitpunkten (172 Gene) und die Vereinigungsmenge der in Arginin hochregulierten Gene (306 Gene) wurden ermittelt. Die Differenzmenge ergibt die Gene, die in Tryptophan, aber nicht in Arginin hochreguliert sind (47 Gene, lila).

### 3.2.3.2 In Tryptophanmedium heraufregulierte Gene

In Tabelle 3-5 sind die in tryptophanhaltigem Medium differentiell am stärksten hochregulierten Gene aufgelistet. Zu diesen Genen gehören besonders solche, die für Proteine des Argininbiosynthesewegs kodieren (*ARG3*, *CPA2*, *ARG4*, *ARG1*), und solche für Proteine der Aminosäuregärung (*ARO10*, *ARO8*). Auch Gene der glucoseabhängigen Katabolitinaktivierung (*VID24*) sind bei Wachstum mit Tryptophan als einziger Stickstoffquelle stärker exprimiert als mit Arginin, ebenso wie das Gen für eine GTPase (*RHO5*). Das Gen für einen Transporter, der gegen schwache organische Säuren schützt, ist besonders nach 24 Stunden Wachstum mit Tryptophan als alleiniger Stickstoffquelle sehr stark hochreguliert (*PDR12*), während es in Medium mit Arginin keine verstärkte Expression zeigt. Das Homolog zu *YER130C* zeigt nach BLAST-Suche nur in Teilen seiner Sequenz Ähnlichkeiten zu Transkriptionsfaktoren anderer Pilze.

Die am höchsten exprimierten Gene betreffen also hauptsächlich den Stickstoffmetabolismus und seine Regulation (8/16 Genen), die Signaltransduktion (2/16) und die Resistenz gegen Salze und Säuren (2/16). Die Gesamtübersicht über die differentiell exprimierten Gene unter den verschiedenen Bedingungen findet sich im Anhang (Abschnitt 7.6.1).

**Tabelle 3-5: Differentiell hochregulierte Gene in Tryptophanmedium.** Expression angegeben als Vielfaches des Vorkulturniveaus. Auswahl aus der Gesamtmenge mit mindestens fünffacher Hochregulierung in Tryptophan nach acht Stunden. Homologe bei *S. cerevisiae* nach Génolevures-Datenbank, Beschreibung nach SGD.

Name	Arg		Trp		S.c.-	Beschreibung
	8h	24h	8h	24h	Homolog	
CAGLOA03102G	0,8	0,8	12,8	10,4	<i>ARO10</i>	Phenylpyruvat-Decarboxylase; Aminosäuregärung
CAGLOI10791G	0,6	0,7	8,8	6,3	<i>ARG3</i>	Ornithin-Carbamoyltransferase; Arginin-Synthese
CAGLOH06017G	1,9	2,2	7,6	5,1	<i>FLR1</i>	Multidrug-Transporter; Arzneimittelresistenz
CAGLOJ11242G	1,9	1,4	7,5	6,6	<i>RHO5</i>	GTPase der Ras-Familie; Proteinkinase-C-Signalweg
CAGLOG01254G	2,6	2,1	7,2	3,9	<i>ARO8</i>	Aromatische Aminotransferase I; Aminosäuregärung
CAGLOK02145G	2,9	1,2	6,9	5,9	<i>YER130C</i>	Protein unbekannter Funktion
CAGLOC04917G	0,7	0,9	6,6	4,3	<i>CPA2</i>	Untereinheit der Carbamoylphosphat- Synthetase; Arginin-Synthese
CAGLOG04389G	1,3	1,1	6,0	4,3	<i>GZF3</i>	Zinkfingerprotein; reguliert Stickstoffkatabolismus herunter
<i>CAGLOM11660G</i>	2,5	0,9	5,9	4,6	<i>RHR2</i>	DL-Glycerin-3-Phosphatase; Glycerinbiosynthese
CAGLOK10780G	2,3	2,3	5,9	3,5	<i>IMD4</i>	Inosinmonophosphat-Dehydrogenase; Purinsynthese
<i>CAGLOM07293G</i>	1,1	1,0	5,7	25,0	<i>PDR12</i>	ABC-Transporter; Resistenz gegen schwache Säuren
<i>CAGLOM05775G</i>	2,3	2,2	5,7	3,2	<i>NIP7</i>	Nucleosomales Protein; Synthese von Ribosomen
CAGLOI06248G	2,7	1,5	5,7	3,8	<i>HAL5</i>	Proteinkinase; mögliche Rolle in Halotoleranz
CAGLOK12254G	1,7	1,4	5,6	6,4	<i>VID24</i>	Vakuoläres Protein; Degradation von Fructose-1,6-Bisphosphatase
CAGLOI08987G	1,3	0,6	5,3	3,8	<i>ARG4</i>	Argininosuccinatyase; Arginin-Synthese
CAGLOC05115G	1,3	1,1	5,2	4,1	<i>ARG1</i>	Arginosuccinatsynthetase; Arginin- Synthese

### 3.2.3.3 Gene Ontology-Analyse der Daten

Die Anreicherung von herauf- oder herunterregulierten Genen mit einer bestimmten *Gene Ontology* (GO)-Annotation unter ausgewählten Bedingungen kann Hinweise auf die in der Zelle stattfindenden biochemischen Reaktionen geben (Beissbarth, 2006). Mit Hilfe dieser Technik können also nicht nur einzelne Gene, sondern ganze biologische Prozesse als differentiell reguliert erkannt werden. Die GO-Anreicherungsanalyse wurde deshalb verwendet, um die während der Pigmentierung stattfindenden Reaktionswege zu ermitteln. Allerdings ist die Annotation des *C. glabrata*-Genoms mit GO-Termen noch nicht sehr weit

fortgeschritten. Derzeit tragen nur 1852 von 5239 offenen Leserahmen (35,4%) einen GO-Term zur biologischen Funktion.

Aus diesem Grund wurde für die GO-Analyse um die homologen Gene von *S. cerevisiae* erweitert. Dafür wurden zuerst diejenigen Gene von *C. glabrata* ausgewählt, die nach der Génolevures-Datenbank (Sherman et al., 2009) mit "highly similar" oder "similar" zu einem Gen der Bäckerhefe annotiert sind. Für diese Gene wurden nun die GO-Annotationen ihrer jeweiligen Homologen aus der "*Saccharomyces Genome Database*" (SGD) (Hong et al., 2008) übernommen. So konnte die Annotation mit GO-Termen auf 4166 offene Leserahmen (79,5% des Genoms) ausgeweitet werden.

Für die Untersuchung wurden die 47 Gene herangezogen, die in tryptophanhaltigem Medium nach 8 und 24 Stunden im Vergleich zur Vorkultur hochreguliert sind, nicht jedoch in argininhaltigem (vgl. Abschnitt 3.2.3.2). Die Analyse wurde dabei auf die GO-Terme zur biologischen Funktion beschränkt. So sollten biologischen Prozesse bestimmt werden, die unter pigmentinduzierenden Bedingungen stattfinden. In Tabelle 3-6 sind die Ergebnisse dieser Analyse zusammengefaßt.

Die Gene-Ontology-Analyse spiegelte zum einen die Wachstumsbedingungen wider. So war die Argininbiosynthese in der Tryptophankultur erwartungsgemäß stark angereichert (fünf von zehn Genen,  $p < 0,001$ ), ebenso der Abbau von aromatischen Aminosäuren ( $p = 0,026$ ). Verschiedene Gene für Transportaktivitäten waren ebenfalls erhöht exprimiert, unter anderem für die Aufnahme von Aminosäuren (hier besonders die Homologen der Permeasen *BAP3* und *GNP1*) und von Ammonium (*MEP3*-Homolog). Ebenso gab es Hinweise, dass die Wiederverwertung von Purinen und ihr Transport in Tryptophan stärker als in Arginin stattfand. Der vakuoläre Proteinabbau schien verstärkt aufzutreten, unter anderem bedingt durch die Hochregulation von CAGL0K12254g, einem Homolog von *VID24*, das möglicherweise eine Rolle in der glucoseinduzierten Katabolitrepression durch den Abbau von Fructose-1,6-Bisphosphatase spielt.

Auch die Aminosäuregärung von aromatischen Aminosäuren zu Alkoholen trat bei dieser Untersuchung als möglicher wichtiger biologischer Prozess in Erscheinung ( $p = 0,026$ ). In der *Saccharomyces Genome Database* tragen derzeit nur drei Gene eine GO-Annotation zu diesem Prozess. Um die Expression aller an diesem Stoffwechselweg beteiligten Gene zu analysieren, wurden Sequenzen im *C. glabrata*-Genom gesucht, die anhand der Ähnlichkeit auf Aminosäureebene als Homologe zu den Genen von *S. cerevisiae* bezeichnet werden



**Tabelle 3-6: GO-Analyse der in Tryptophanmedium hochregulierten Gene von *C. glabrata*.** Hier sind alle angereicherten GO-Terme mit einer Signifikanz von  $p < 0,05$  gezeigt; bei Oberklassen sind (zur Einordnung) auch solche mit größeren p-Werten angegeben. Anzahl und Prozent in Anteil der gefundenen Gene an der Gesamtzahl der so annotierten Gene im Genom von *C. glabrata*. Die Kurzbezeichnungen sind verändert nach den Termen der *Gene Ontology* (Carbon *et al.*, 2009). Terme, die mehreren Oberklassen zugeordnet werden konnten, werden hier nur in einer Oberklasse dargestellt.

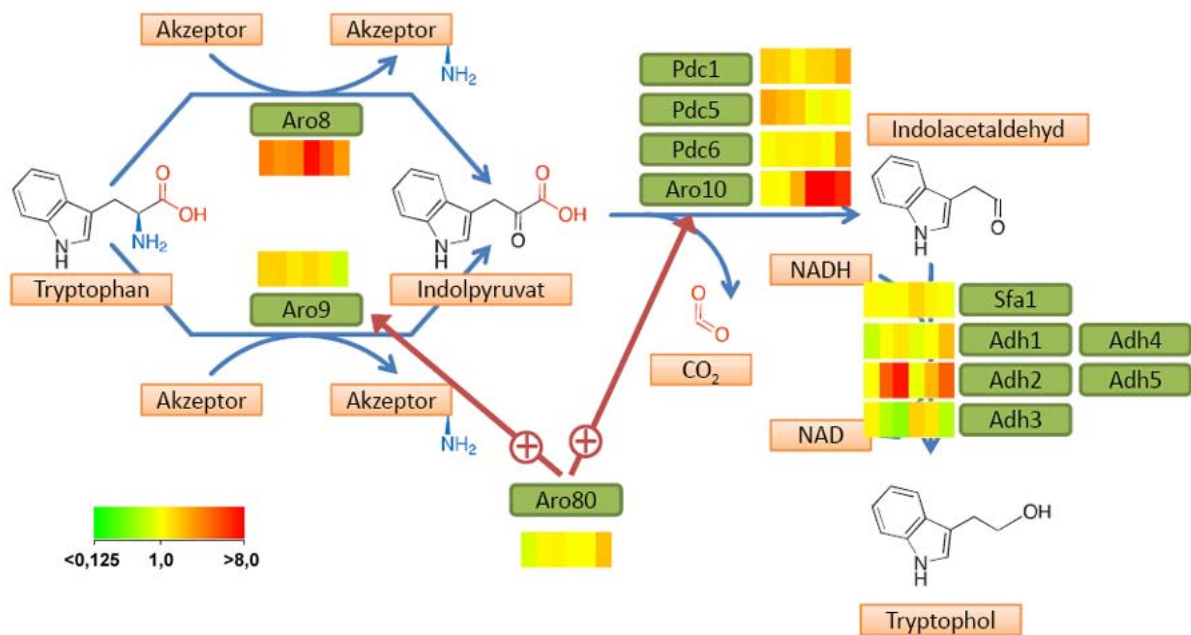
GO #	Kurzbezeichnung	p-Wert	Anzahl	%
0006807	<b>Stickstoffmetabolismus</b>	0,000	10/223	4%
0006520	Aminosäuremetabolismus	0,000	8/188	4%
0006526	Argininbiosynthese	0,000	5/10	50%
0042450	Argininbiosynthese via Ornithin	0,009	1/1	100%
0000955	Abbau über Aminosäuregärung	0,026	1/3	33%
0000949	Abbau aromatischer Aminosäuren zu Alkoholen	0,017	1/2	50%
0000950	Abbau verzweigtkettiger Aminosäuren zu Alkoholen	0,017	1/2	50%
0000951	Methioninabbau zu 3-Methylthiopropanol	0,009	1/1	100%
0009074	Abbau aromatischer Aminosäuren	0,026	1/3	33%
0006559	Phenylalaninabbau	0,026	1/3	33%
0006569	Tryptophanabbau	0,026	1/3	33%
0006572	Tyrosinabbau	0,017	1/2	50%
0006082	<b>Metabolismus organischer Säuren</b>	0,001	9/293	3%
0019541	Propionatmetabolismus	0,043	1/5	20%
0046165	<b>Alkoholbiosynthese</b>	0,031	2/32	6%
0006114	Glycerinbiosynthese	0,009	1/1	100%
0006810	<b>Transportaktivität</b>	0,066	12/890	1%
0015696	Ammoniumtransport	0,026	1/3	33%
0006865	Aminosäuretransport	0,035	2/34	6%
0055085	Transmembrantransport	0,001	5/78	6%
0015856	Cytosintransport	0,009	1/1	100%
0006863	Purintransport	0,009	1/1	100%
0015671	Sauerstofftransport	0,017	1/2	50%
0015746	Citrattransport	0,009	1/1	100%
0030163	<b>Proteinkatabolismus</b>	0,245	4/291	1%
0007039	Vakuolärer Proteinabbau	0,035	3/83	4%
0006950	<b>Stressantwort</b>	0,797	3/472	1%
0000304	Reaktion auf Singletsauerstoff	0,017	1/2	50%
0006464	<b>Proteinmodifikation</b>	0,908	3/529	1%
0016578	Histon-Deubiquitinierung	0,017	1/2	50%
0006139	<b>Nukleotidmetabolismus</b>	0,972	7/1331	1%
0043101	Purin-Wiederverwertung	0,051	1/6	17%
0032263	GMP-Wiederverwertung	0,009	1/1	100%
0032264	IMP-Wiederverwertung	0,009	1/1	100%

konnten (Tabelle 3-7). Obwohl vier Aldehyddehydrogenase-Gene gefunden wurden, konnte für *ADH1*, *ADH2*, *ADH3* und *ADH5* wegen der großen Ähnlichkeiten innerhalb der Genfamilie keine eindeutige Zuordnung zu *C. glabrata*-Homologen vorgenommen werden. Dies galt ebenso für die Phenylpyruvatdecarboxylasegene *PDC1*, *PDC5* und *PDC6*. Für *ADH4* konnte kein Gen mit signifikanter Ähnlichkeit bei *C. glabrata* gefunden werden (Tabelle 3-7).

**Tabelle 3-7: *C. glabrata*-Homologe der Gene für die Aminosäuregärung.** Expect-Werte nach tblastx-Vergleich der Sequenzen. *Genfamilie* kennzeichnet Gene, für die eine Bestimmung des wahrscheinlichsten Homologs nicht möglich war.

<i>S. cerevisiae</i> -Gen	<i>C. glabrata</i> -Gen	Expect-Wert	Genfamilie
<i>ADH1</i>	CAGLOI07843G	7,0E-160	Adh-Familie
<i>ADH2</i>	CAGLOM14047G	2,0E-19	
<i>ADH3</i>	CAGLOJ01441G	3,0E-153	
<i>ADH5</i>	CAGLOH06853G	2,0E-28	
<i>ADH4</i>	Kein Homolog	-	
<i>ARO10</i>	CAGLOA03102G	0,0	Pdc-Familie
<i>ARO8</i>	CAGLOG01254G	0,0	
<i>ARO80</i>	CAGLOF03025G	1,0E-176	
<i>ARO9</i>	CAGLOG06028G	8,0E-172	
<i>PDC1</i>	CAGLOM07920G	0,0	
<i>PDC5</i>	CAGLOG02937G	0,0	
<i>PDC6</i>	CAGLOL06842G	6,0E-154	
<i>SFA1</i>	CAGLOL01111G	2,0E-173	

Die Expression dieser Gene wurde in Abbildung 3-18 direkt auf den Stoffwechselweg bei *S. cerevisiae* projiziert. Deutlich erkennbar ist die starke Hochregulierung von *ARO8* und *ARO10* in Tryptophanmedium schon nach acht Stunden (Faktor 12,8× und 7,2×; vgl. Tabelle 3-5), die im weiteren Zeitverlauf etwas nachläßt (48h: *ARO8* – 2,0×; *ARO10* – 5,7×). Das Homolog zur Aminotransferase II *ARO9*, CAGLOG06028g, zeigt wenig Aktivierung unter tryptophanhaltigen Anzuchtbedingungen. Dies steht im Gegensatz zur Situation bei



**Abbildung 3-18: Expressionsniveau der Gene der Aminosäuregärung im Zeitverlauf bei *C. glabrata*.** In pigmentinduzierendem Medium zeigt sich eine verstärkte Expression von *ARO8* und besonders *ARO10*, nicht jedoch *ARO9*. Bei den restlichen Pyruvatdecarboxylasen (PDC) und den Alkoholdehydrogenasen (*ADH1-5* und *SFA1*) ist keine Abhängigkeit vom Medium erkennbar. Expressionsdaten sind im Vergleich zur Vorkultur dargestellt. Felder 1-3: Arginin 8h, 24h, 48h. Felder 4-6: Tryptophan 8h, 24h, 48h. Zuordnung der Homologe nach Tabelle 3-7. Schema nach dem bekannten Reaktionsweg in *S. cerevisiae*, verändert nach Saccharomyces Genome Database (SGD project).

*S. cerevisiae*, wo *ARO8* konstitutiv exprimiert wird und *ARO9* durch aromatische Aminosäuren induzierbar ist. Neben *ARO10* zeigt unter den anderen Phenylpyruvatdecarboxylasen nur das *PDC5* zugeordnete Gen CAGLOG02937g nach 8 und 24 Stunden eine Induktion, hier allerdings in argininhaltigem Medium.

Für die Umsetzung des Indolacetaldehyds in Tryptophol läßt sich keine spezifische Induktion einer Alkoholdehydrogenase in Tryptophanmedium erkennen. Zu späten Zeitpunkten wird das mögliche Homolog zu *ADH2* (CAGL0M14047g) in beiden Medien stark hochreguliert, allerdings katalysiert das Protein bei *S. cerevisiae* auch die Nutzung von Ethanol als Kohlenstoffquelle und wird dort unter Glucosemangelbedingungen, wie sie nach 24 und 48 Stunden auftreten, exprimiert (Ciriacy, 1975). Der Transkriptionsfaktor *ARO80* zeigt keine deutliche Regulation (Faktor 0,6-1,8 in Arginin und Tryptophan über alle Zeitpunkte).

### 3.2.4 Generierung von gezielten Mutanten des Synthesewegs

---

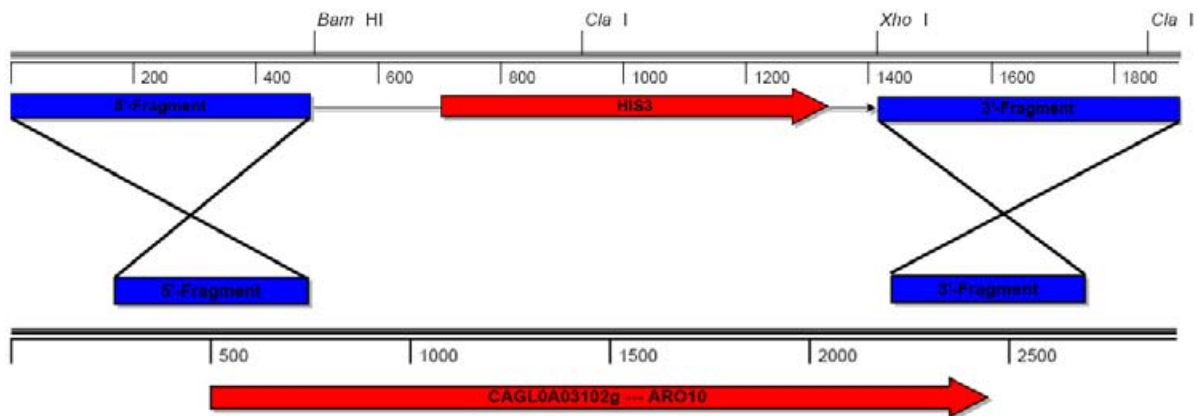
Die mit Hilfe der Mutantenbibliothek (Abschnitt 3.2.1), der Transkriptionsanalyse (Abschnitt 3.2.3) und den Vorversuchen in Abschnitt 3.1 gewonnenen Daten legten nahe, dass der Abbauweg der aromatischen Aminosäuren eine zentrale Rolle bei der Synthese des Pigments spielt. Daher wurden die wichtigsten Gene dieses Abbauwegs systematisch deletiert und die Mutanten auf ihre Fähigkeit zur Pigmentsynthese hin untersucht. Zu diesen Genen zählen *ARO8* und *ARO9*, die für die beiden Aminotransferasen kodieren und das Gen *ARO10* für die Phenylpyruvatdecarboxylase. Für die Deletionen wurde auf verschiedene auxotrophe Mutanten des *C. glabrata*-Wildtypstamms ATCC2001 zurückgegriffen.

#### 3.2.4.1 Herstellung und Analyse von *aro10Δ*

---

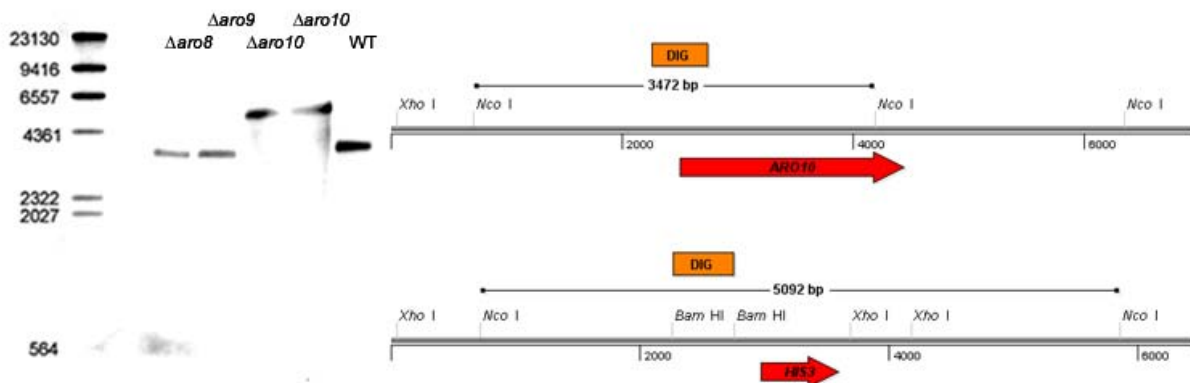
Die in der Transposoninsertionsbank gefundenen Mutante *V4B4* trägt eine Insertion im vermuteten Promotorbereich des Gens CAGL0A03102g, das mit *ARO10* aus *S. cerevisiae* eine sehr starke Ähnlichkeit aufweist und deshalb im weiteren als *CgARO10* (oder kurz *ARO10*) bezeichnet wird. Dieses Gen wurde in einer *his3Δ*-Mutante durch eine Histidinprototrophiekassette ersetzt (Abbildung 3-19) und die entstandene Mutante als *aro10Δ* bezeichnet.

Gen	Homolog	Beschreibung des Homologs	Ähnl.	Ident.	Expect
<i>ARO10</i>	<i>ScARO10</i>	Phenylpyruvatdecarboxylase	71%	58%	0,0



**Abbildung 3-19: Deletionskonstrukt für *ARO10*.** Das *C. glabrata*-Homolog von *ScARO10* wurde über homologe Rekombination durch eine Histidin-Prototrophiekassette ersetzt. Zuordnung der Homologen nach BLAST-Suche (blastx). Die weiteren Mutanten (*aro9Δ* und *aro8Δ*) wurden analog zu diesem Schema erzeugt.

Die Mutanten wurden über PCR mit den flankierenden Primern (nicht dargestellt) und Southern-Blot (Abbildung 3-20) auf die korrekte Insertion der Kassette und vollständige Deletion des Wildtypgens getestet. Beide Tests zeigten, dass das *ARO10*-Gen vollständig durch die Kassette ersetzt worden ist.



**Abbildung 3-20: Southern-Blot der *aro10Δ*-Mutanten.** Genomische DNA von *aro8Δ*, *aro9Δ*, zwei *aro10Δ*-Mutanten und Wildtyp wurde mit *Nco*I verdaut. Der Nachweis erfolgte mit digoxigeninmarkierter, 5'-seitiger Sonde (DIG). Erwartete Größen waren 3472 bp für den Wildtyp und 5092 bp für die Mutante. Nur die beiden *aro10Δ*-Mutanten zeigten die erwartete Bandengröße, das Gen *ARO10* ist dort durch die *HIS3*-Kassette ersetzt.

### 3.2.4.1.1 Phänotypisierung der *aro10Δ*-Mutante

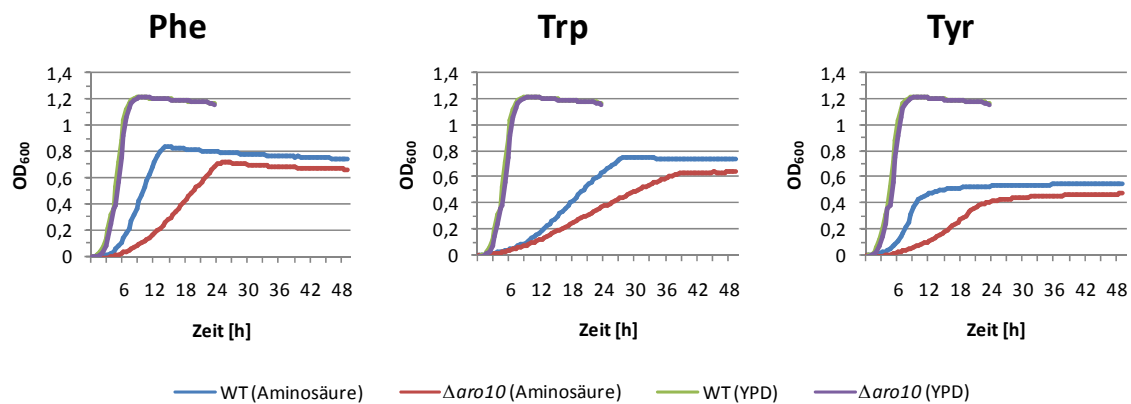
Die entstandene Mutante *aro10Δ* zeigt keinen Defekt beim Wachstum im YPD-Vollmedium oder Minimalmedium mit Ammoniumsulfat als Stickstoffquelle (vgl. Abschnitt 3.2.5). Die

Prototrophiekassette erfüllt also unter diesen Bedingungen die Funktion des Wildtypgens und die Deletion von *ARO10* hat keinen generellen Wachstumsdefekt zur Folge.

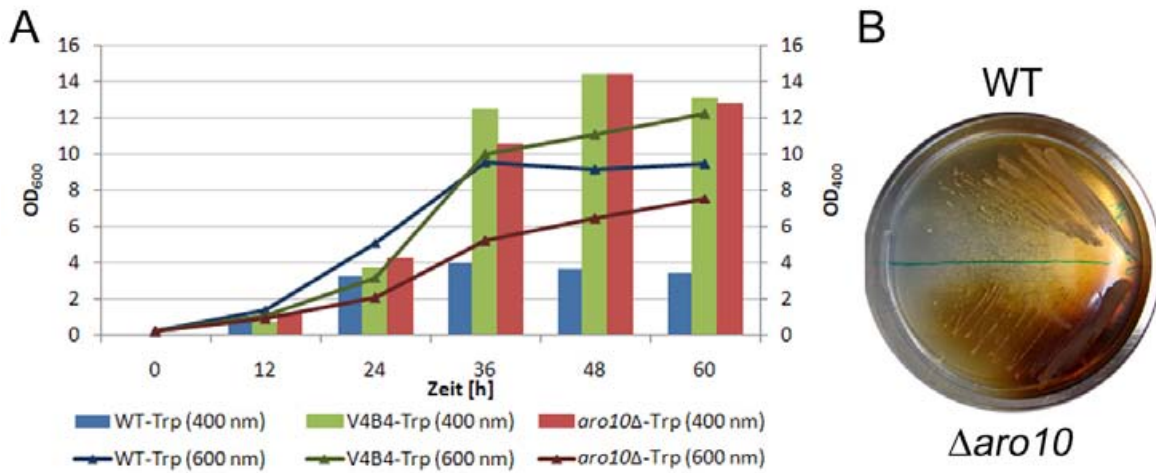
*ARO10* ist bei *S. cerevisiae* am Abbau von aromatischen Aminosäuren beteiligt. Eine Mutante wurde bisher nur im Rahmen eines systematischen Mutantenscreenings getestet (Giaever *et al.*, 2002), nicht aber auf ihr Wachstum mit verschiedenen Aminosäuren als Stickstoffquellen. Deshalb wurden alle in *C. glabrata* erzeugten Mutanten auf ihr Wachstum in den zwanzig proteinogenen Aminosäuren getestet (Abschnitt 3.2.5).

Bei *C. glabrata* führte die Deletion von *ARO10* zu einer verringerten Wachstumsgeschwindigkeit mit Tryptophan, Phenylalanin und Tyrosin (Abbildung 3-21) als Stickstoffquelle, nicht jedoch mit anderen Aminosäuren (Abschnitt 3.2.5). Die Generationszeiten bei Mutante (58 min) und Wildtyp (56 min) waren in YPD nahezu identisch, in Tryptophan betragen sie 200 und 254 Minuten, in Phenylalanin 73 und 143 Minuten und in Tyrosin 107 und 148 Minuten. Die *aro10* $\Delta$ -Mutante zeigte also ein leicht abgeschwächtes Wachstum, wenn aromatische Aminosäuren als einzige Stickstoffquelle angeboten wurden.

In Tryptophanmedium kam es bei der Mutante *aro10* $\Delta$  zu einer verstärkten Pigmentierung, vergleichbar der Promotor-Insertionsmutante *V4B4* (Abbildung 3-22). Die Deletion des Gens führte also zu einer starken Anreicherung des Pigments, aber nur zu einem geringen Wachstumsdefekt. Die Deletion führte auch zu einer verstärkten Klumpenbildung in Minimalmedium mit den getesteten Aminosäuren (nicht dargestellt).



**Abbildung 3-21: Wachstum von *aro10* $\Delta$  in aromatischen Aminosäuren.** In allen drei Aminosäuren zeigte die Mutante einen Wachstumsdefekt. Zum Vergleich die nahezu identischen Wachstumskurve von Wildtyp und Mutante in YPD-Vollmedium.

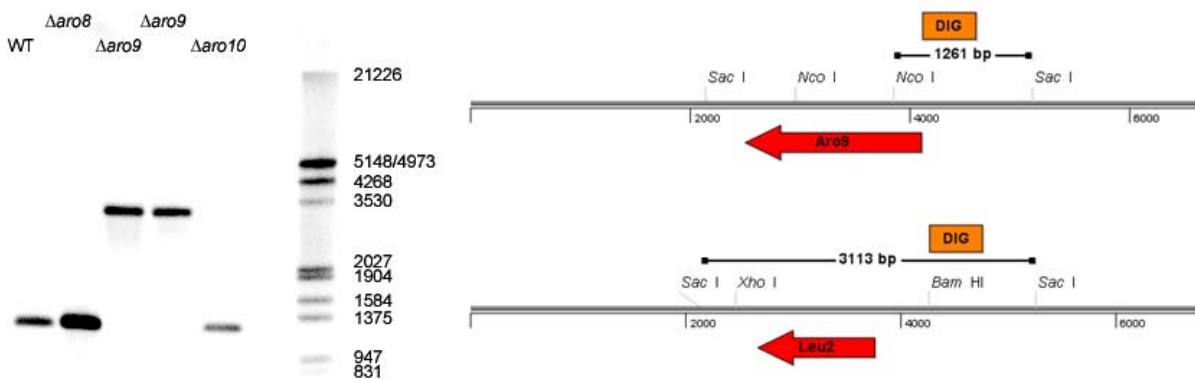


**Abbildung 3-22: Pigmententwicklung der Mutante *aro10Δ*.** (A) Pigment im Überstand einer Flüssigkultur mit Tryptophan (400 nm; Balken) und Wachstum von Wildtyp und Mutanten (600 nm; Linien). Nach über 24 Stunden Wachstum erzeugten beide Mutanten deutlich mehr Pigment als der Wildtyp. (B) Verstärkte Pigmentbildung durch die *aro10Δ*-Mutante auf Platten mit Tryptophan als Stickstoffquelle.

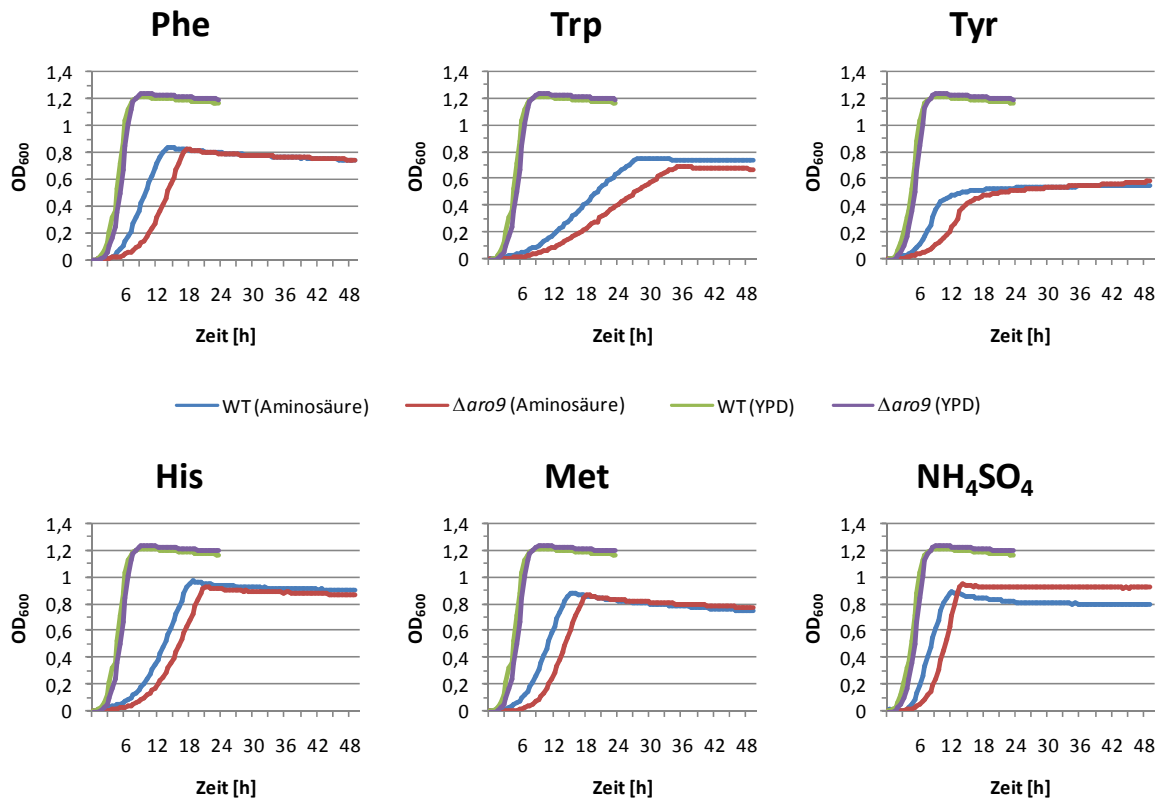
### 3.2.4.2 Herstellung und Analyse von *aro9Δ*

Das Gen CAGLOG06028g zeigt die größte Ähnlichkeit zu dem *S. cerevisiae*-Gen für die aromatische Aminotransferase II Aro9 (vgl. Abschnitt 3.2.3.2). Bei der Bäckerhefe katalysieren die beiden aromatischen Aminotransferasen Aro8 und Aro9 den ersten Schritt des Katabolismus von aromatischen Aminosäuren (Kradolfer et al., 1982), indem sie die Aminogruppe auf einen Akzeptor übertragen (Kradolfer et al., 1982, Urrestarazu et al., 1998). Aro9 ist auch an der Synthese von Phenylalanin und Tyrosin beteiligt, in Mutanten ohne *ARO9* kann diese Funktion aber auch durch Aro8 übernommen werden (Urrestarazu et al., 1998). In Medium mit aromatischen Aminosäuren wird die Expression von *ARO9* bei der

Gen	Homolog	Beschreibung des Homologs	Ähnl.	Ident.	Expect
<i>ARO9</i>	<i>ScARO9</i>	Aromatische Aminotransferase II	75%	57%	6E-176



**Abbildung 3-23: Southern Blot zum Nachweis der Deletion von *ARO9*.** Verdau der genomischen DNA mit *SacI* und *NcoI*, Nachweis mit 5'-seitiger, digoxigeninenmarkierter Sonde *ARO9*-Bam (DIG). Erwartete Größen: Wildtyp 1261 bp, Mutante 3113 bp. In beiden *aro9Δ*-Mutanten ist *ARO9* erfolgreich deletiert.



**Abbildung 3-24: Wachstum von *aro9Δ* in verschiedenen Aminosäuren.** Mit aromatischen Aminosäuren (Phenylalanin, Phe, Tryptophan, Trp, und Tyrosin, Tyr) als Stickstoffquelle zeigte die Mutante leichte Wachstumsdefekte im Vergleich zum Wildtyp, mit Histidin und Methionin war die Wachstumsrate fast so groß wie beim Wildtyp. Zum Vergleich ist das Wachstum beider Stämme in YPD-Vollmedium gezeigt.

Bäckerhefe hochreguliert (Iraqi et al., 1999), nicht aber die von CAGLOG06028g in *C. glabrata* (Abschnitt 3.2.3.2). Das Gen CAGLOG06028g wurde wie zuvor *ARO10* deletiert, indem es über homologe Rekombination durch eine Leucin-Kassette ersetzt wurde. Die Mutanten wurden über PCR und Southern-Blot überprüft (Abbildung 3-23).

Das Wachstum der *aro9Δ*-Mutante war in Medien mit aromatischen Aminosäuren als einzige Stickstoffquelle im Vergleich zum Wildtyp leicht abgeschwächt. Die Generationszeit in Phenylalanin war mit 105 Minuten länger als beim Wildtyp (73 Minuten), aber kürzer als bei der *aro10Δ*-Mutante mit 143 Minuten (vgl. Abschnitt 3.2.4.1). Ebenso war das Wachstum in Tryptophan und Tyrosin reduziert (Abbildung 3-24). Mit Methionin als Stickstoffquelle waren die Generationszeiten ähnlich zum Wildtyp (98 und 105 Minuten), wie auch mit Histidin (140 und 159 Minuten) und mit Ammoniumsulfat (71 und 68 Minuten).

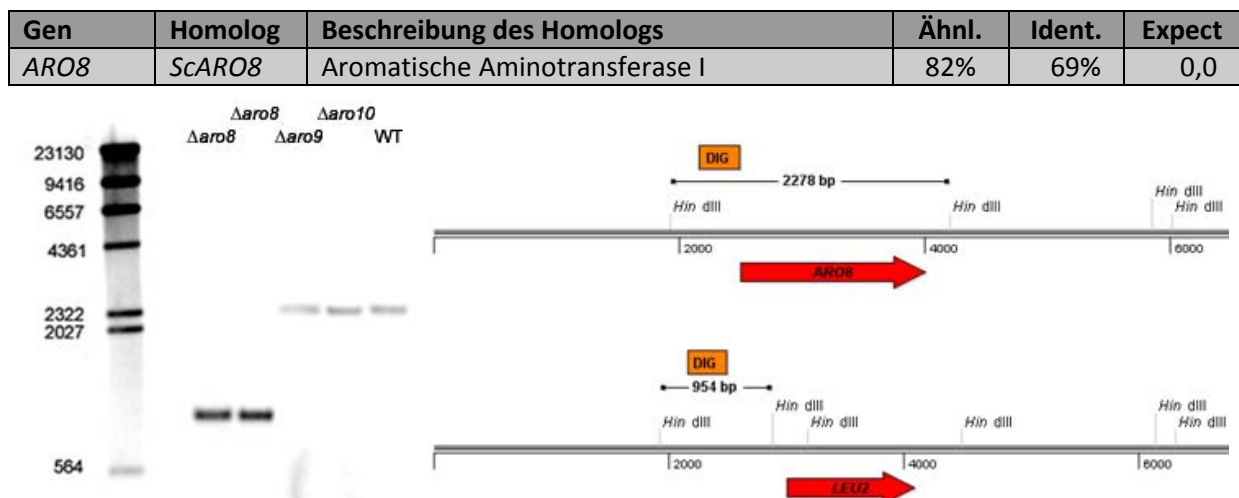
Die Pigmentbildung wurde durch die Deletion von *ARO9* nicht beeinträchtigt, sowohl in Flüssigmedium als auch auf Platten bildeten die Mutanten Pigment auf Wildtypniveau (Abbildung 3-27, Abbildung 3-28).

### 3.2.4.3 Herstellung und Analyse von *aro8Δ*

Das Gen CAGL0G01254g war unter pigmentinduzierenden Bedingungen besonders stark hochreguliert (Abschnitt 3.2.3.2), und zeigt eine starke Ähnlichkeit zum *S. cerevisiae*-Gen *ARO8*. Ähnlich zu *ARO10* und *ARO9* wurde es deshalb über homologe Rekombination durch eine Leucin-Kassette ersetzt und so deletiert. Die Mutanten wurden wiederum über PCR und Southern-Blot (Abbildung 3-25) überprüft und auf Wachstum in verschiedenen Aminosäuren und die Bildung von Pigment in induzierendem Medium getestet.

Der Wachstumsdefekt in Medien mit aromatischen Aminosäuren als alleinige Stickstoffquelle ist bei der *aro8Δ*-Mutante besonders ausgeprägt (Abbildung 3-26). In Medium mit Phenylalanin betrug die Verdopplungszeit der Mutante 226 Minuten und die des Wildtyps 73 Minuten, in Tyrosin 409 statt 107 Minuten.

Mit Tryptophan als einziger Stickstoffquelle kam es zu fast keinem Wachstum mehr, die Generationenzeit betrug hier 999 Minuten statt 200 beim Wildtyp. Dies ist dem Phänotyp der *Aro8<sup>-</sup>*-Mutante von *S. cerevisiae* ähnlich, die auf Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin kein Wachstum mehr zeigt (Iraqi et al., 1998). Mit Methionin war ebenfalls eine Reduktion der Wachstumsgeschwindigkeit bei der Mutante meßbar, von 105 auf 173 Minuten Verdopplungszeit. In *S. cerevisiae* dient *Aro8* – und in geringerem Maße auch *Aro9*, *Bat1* und *Bat2* – als Aminotransferase auch für Methionin (Pirkov et al., 2008). Der Phänotyp der *aro8Δ*- und *aro9Δ*-Mutante in Methioninmedium deutet also wiederum auf eine ähnliche Funktion wie bei der Bäckerhefe.

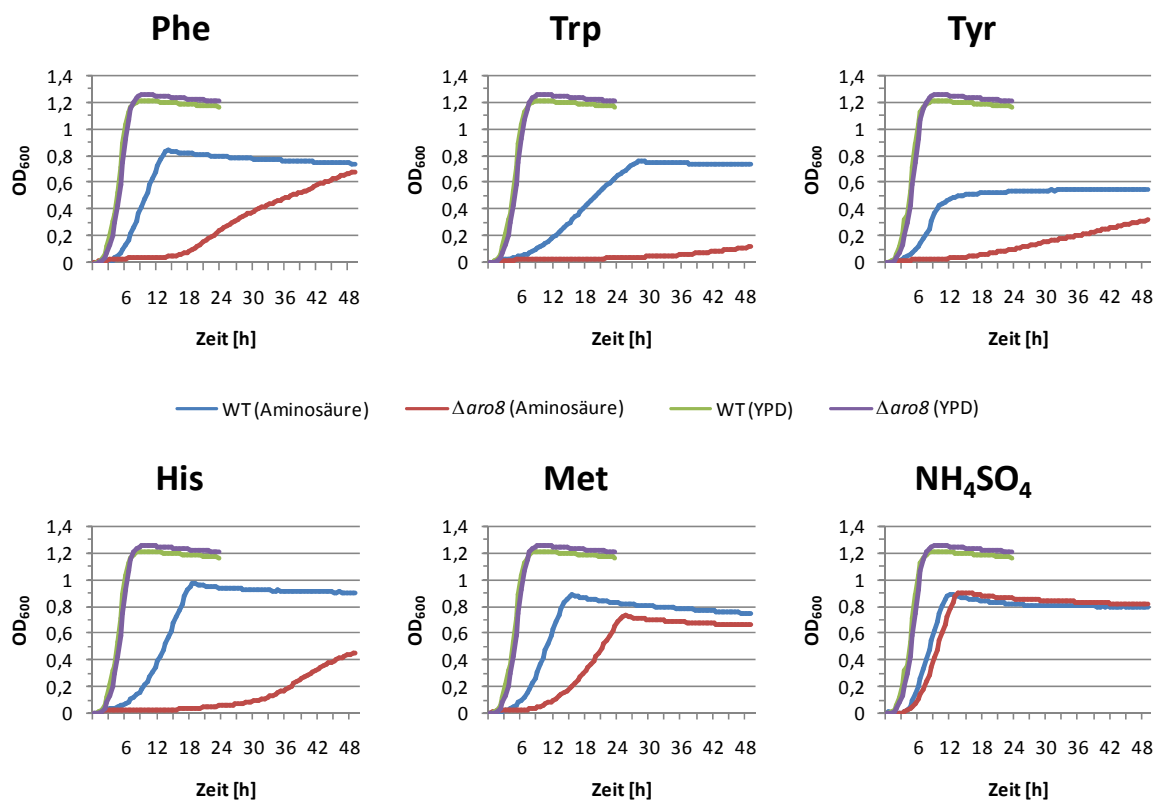


**Abbildung 3-25: Southern-Blot der *aro8Δ*-Mutante.** Genomische DNA von Wildtyp (WT), zwei *aro8Δ*- und je einer *aro9Δ*- und *aro10Δ*-Mutante wurde mit *HinDIII* verdaut. Der Nachweis erfolgte über ein 5'-seitiges, digoxigenin-(DIG)-markiertes Fragment. Erwartete Größen waren 2278 bp für Wildtyp und 954 bp für *aro8Δ*-Mutante. Beide Klone zeigten die erwartete Fragmentgrößen.

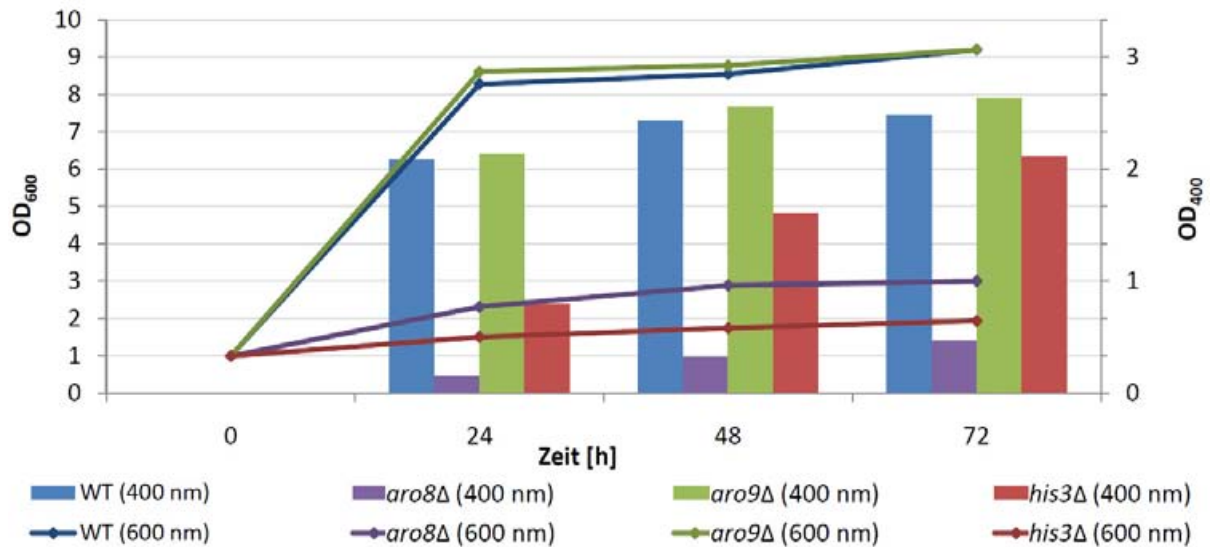


Im Gegensatz zu *S. cerevisiae* (Large, 1986) konnte *C. glabrata* auch Histidin als Stickstoffquelle nutzen (Abbildung 3-26). Die *aro8Δ*-Mutante zeigte aber mit dieser Aminosäure eine deutliche Reduzierung der Wachstumsrate, die Generationszeit betrug 351 statt 159 Minuten. Bei Bakterien und den meisten Eukaryoten erfolgt der Abbau von Histidin im ersten Schritt über die Abspaltung des Ammoniums durch eine Histidin-Ammonium-Lyase (EC 4.3.1.3) (Suchi *et al.*, 1995). In einigen Organismen wurde auch eine Übertragung der Aminogruppe über eine Histidin-2-Oxoglutarat-Transaminase (EC 2.6.1.38) oder eine Histidin-Pyruvat-Transaminase (EC 2.6.1.58) auf den jeweiligen Akzeptor vorgeschlagen (Spolter & Baldridge, 1964, Wickramasinghe *et al.*, 1967). Für diese beiden Reaktionen sind aber bislang keine zugehörigen Gene beschrieben worden.

Für die bekannten bakteriellen und eukaryontischen Histidin-Ammonium-Lyasen (HAL) ließen sich über eine pBLAST-Suche (Altschul *et al.*, 1990) weder für *C. glabrata* noch für *S. cerevisiae* Homologe finden. Homologe zu bakteriellen HAL fanden sich bei allen Gruppen innerhalb der Basidiomyceten (bspw. *Ustilago maydis*, *Rhodotorula glutinis*, auch *Agaricus bisporus*), aber bei den Ascomyceten nur innerhalb der Pezizomycotina (bspw. *Neurospora* spp., *Aspergillus* spp., *Penicillium marneffeii*), nicht aber bei den



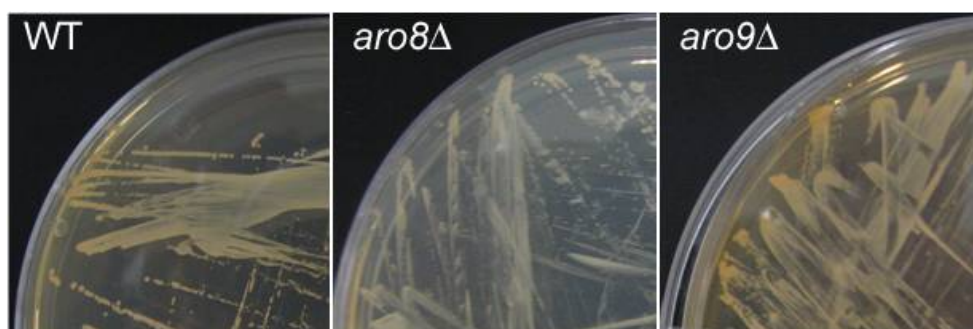
**Abbildung 3-26: Wachstum der *aro8Δ*-Mutante mit ausgesuchten Aminosäuren und Ammoniumsulfat.** Der Wachstumsdefekt in aromatischen Aminosäuren ist stärker als bei der *aro9Δ*- und *aro10Δ*-Mutante, ebenso in Histidin und Methionin. Mit Ammoniumsulfat und in YPD-Vollmedium entspricht das Wachstum dem des Wildtyps.



**Abbildung 3-27: Vergleich der Pigmentproduktion von Wildtyp und den Mutanten *aro8Δ*, *aro9Δ* und *his3Δ*.** Die Deletionsmutante *aro8Δ* zeigt in Tryptophanmedium nur geringes Wachstum ( $OD_{600}$ , linke Skala) und eine stark reduzierte Pigmentproduktion ( $OD_{400}$ , rechte Skala). Dagegen synthetisiert die *his3Δ*-Mutante trotz ebenso geringer Zellzahl Pigment bis zum Wildtypniveau. Die Deletion des *ARO9*-Gens führt zu keinem Defekt in der Pigmentproduktion. Wachstum der Hefen in induzierendem Medium bei 37°C, danach Inkubation des zellfreien Überstands für drei Tage (vgl. Abschnitt 3.1.1).

Saccharomycotina (bspw. *Candida* spp., *Saccharomyces* spp.) oder den Taphrinomycotina (*Schizosaccharomyces pombe*). Diese fehlende Aktivität scheint bei *C. glabrata* also möglicherweise durch eine Ammoniumtransferaseaktivität von Aro8 kompensiert zu werden. Da aber die Deletion von *ARO8* keine völlige Wachstumshemmung nach sich zieht, muß es noch ein weiteres Enzym geben, das diese Aktivität wenigstens teilweise übernehmen kann.

Die Pigmentproduktion ist bei der *aro8Δ*-Mutante deutlich verringert. Abbildung 3-27 zeigt die Bildung des Pigments in Flüssigmedium mit Tryptophan im Vergleich zu Wildtyp, *aro9Δ*-Mutante und *his3Δ*-Mutante. Während sich Wachstum und Pigmentbildung von Wildtyp und *aro9Δ* nicht unterschieden, bildete die schlecht wachsende Mutante *aro8Δ* auch nach 72 Stunden Inkubation nur etwa 20% der Pigmentmenge des Wildtyps. Zum Vergleich ist in



**Abbildung 3-28: Pigmentbildung von Wildtyp (WT), *aro8Δ*- und *aro9Δ*-Mutante auf Minimalmedium mit Tryptophan und Threonin als Stickstoffquelle.** Beide Mutanten können auf diesem Medium wachsen, und die Deletionsmutante von *ARO8* zeigt wie in Flüssigmedium eine deutlich reduzierte Pigmentbildung. Die Deletion von *ARO9* hat keine erkennbare Auswirkung auf die Pigmentierung. Inkubation für vier Tage bei 37°C.

Abbildung 3-27 die *his3Δ*-Mutante gezeigt, die ebenfalls in diesem Medium nicht wachsen konnte, aber trotzdem etwa 85% des Wildtyppigments produzierte (vgl. Abschnitt 3.1.5). Die verminderte Pigmentmenge von *aro8Δ* basiert also nicht auf der geringeren Zellzahl im pigmentinduzierenden Medium, sondern auf einer starken Verringerung der Pigmentproduktion.

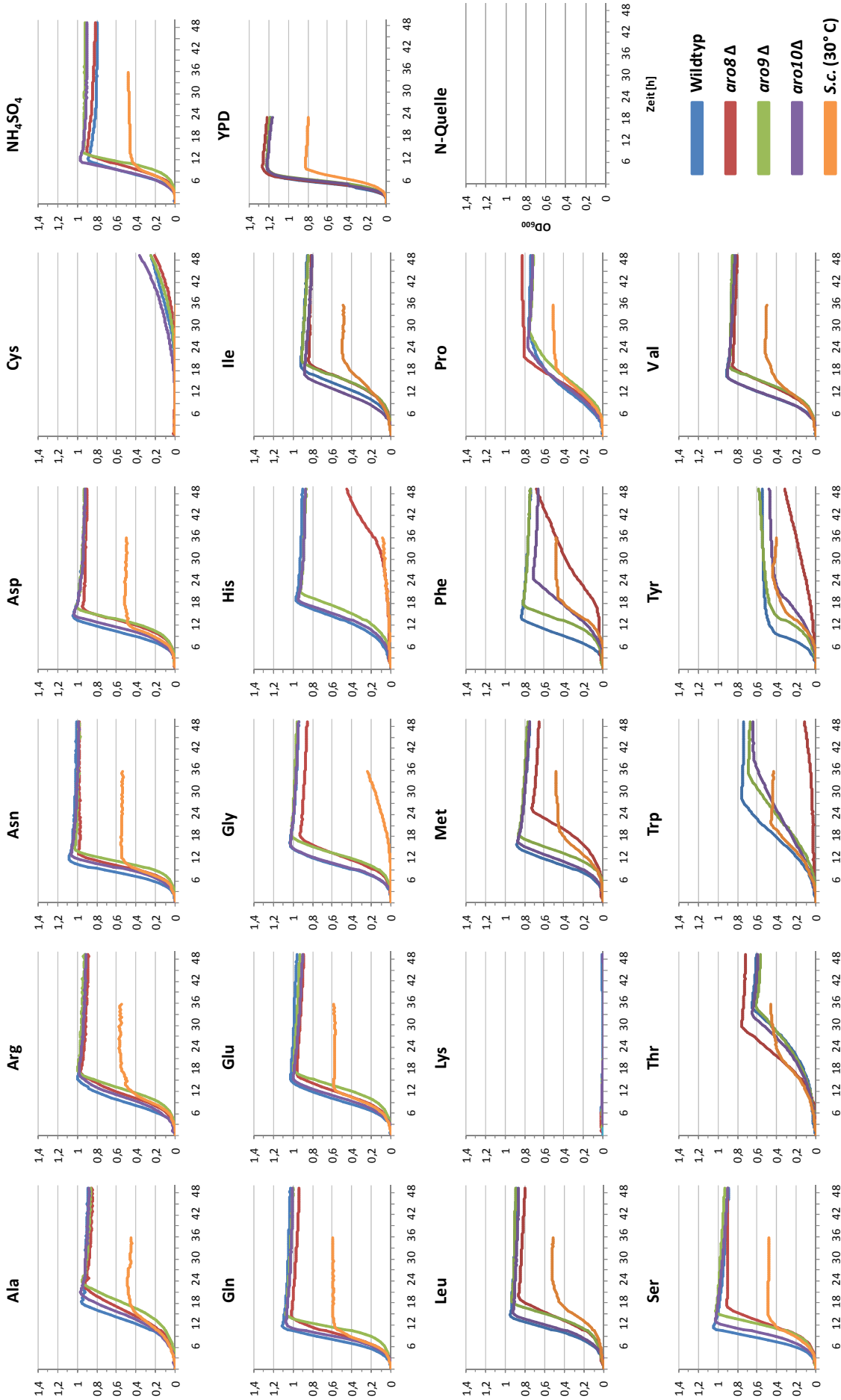
Für die Untersuchung der Pigmentbildung auf Agarplatten wurde eine Mischung aus jeweils 7,5 mM Tryptophan und Threonin verwendet, da Threonin die Pigmentbildung nur wenig behindert und beim Wildtyp eine dem Tryptophan angenäherte Wachstumsrate zeigt (Abbildung 3-29). Auf diesen Platten wächst die *aro8Δ*-Mutante ebenfalls, bildet aber nach bis zu vier Tagen Inkubation deutlich weniger Pigment als der Wildtyp oder die *aro9Δ*-Mutante. Die Deletion des Gens *ARO8* führt also unter allen getesteten Bedingungen zu einer deutlichen Reduktion der Pigmentbildung in *C. glabrata*.

### 3.2.5 Vergleich des Wachstums

---

Um mögliche weitere Defekte im Wachstum der Mutanten mit Aminosäuren als einziger Stickstoffquelle zu erkennen, wurden die Mutanten und der Wildtyp in Minimalmedien mit den 20 klassischen proteinogenen Aminosäuren in Konzentrationen von je 10 mM angezogen. Zusätzlich erfolgte eine Anzucht mit 0,5% Ammoniumsulfat und in YPD-Vollmedium. Außerdem wurde das Wachstum von *S. cerevisiae* bei 30°C als Vergleich herangezogen. In Abbildung 3-30 sind sämtliche Wachstumskurven zusammengefaßt. Die Mutanten der *ARO*-Gene zeigten mit den meisten Stickstoffquellen keinen Wachstumsdefekt, Ausnahmen sind die aromatischen Aminosäuren, wie zuvor beschrieben. Insgesamt kann *C. glabrata* unter diesen Bedingungen alle Aminosäuren als alleinige Stickstoffquelle nutzen, mit Ausnahme von Lysin (kein Wachstum) und von Cystein, das nur sehr langsames Wachstum erlaubt.

*S. cerevisiae* wuchs mit fast allen Aminosäuren zu einer geringeren Dichte heran, aber in den meisten Fällen mit einer mit *C. glabrata* vergleichbaren Kinetik. Wie zuvor beschrieben (Large, 1986) und hier auch sichtbar, konnte aber die Bäckerhefe Lysin, Cystein, Glycin und Histidin nicht oder nahezu nicht nutzen. Die *aro8Δ*-Mutante von *C. glabrata* zeigte in Histidin einen starken Wachstumsdefekt, nicht aber in Glycin. Von den zwei durch *C. glabrata* zusätzlich genutzten Aminosäuren ist also nur die Verwendung von Histidin abhängig von *Aro8*.

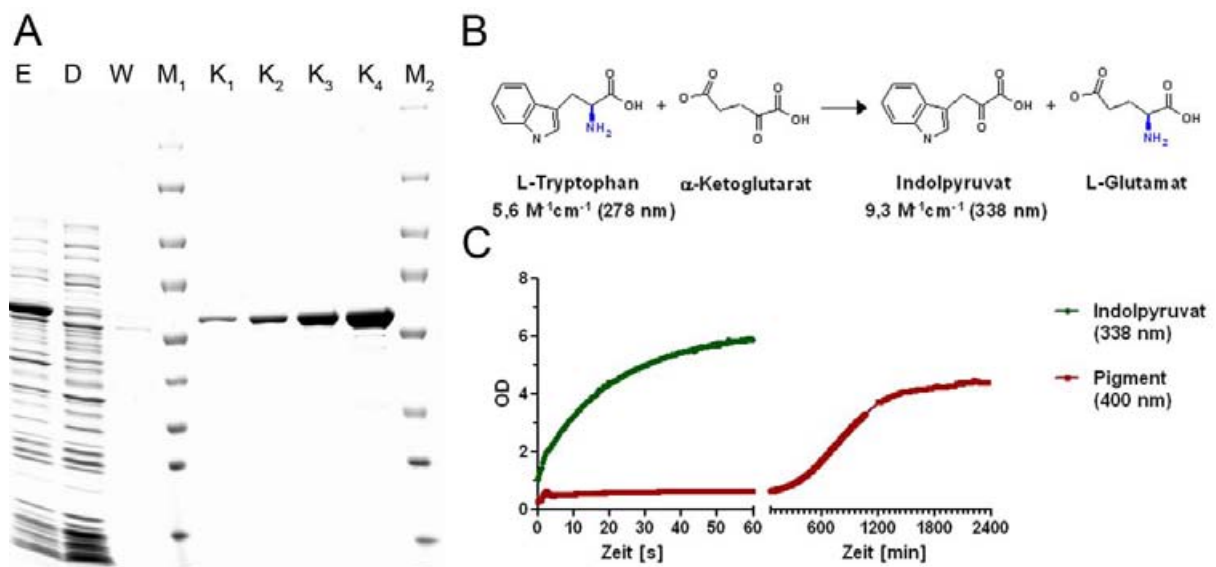


**Abbildung 3-29: Wachstumskurven von *C. glabrata*-Wildtyp und -Mutanten und *S. cerevisiae* mit verschiedenen Stickstoffquellen.** Wachstum bei 37°C, *S. cerevisiae* (*S.c.*) bei 30°C, in 10 mM Aminosäuren, 0,5% NH<sub>4</sub>SO<sub>4</sub> oder YPD-Vollmedium. Das Wachstum der Mutanten unterscheidet sich besonders bei den aromatischen Aminosäuren vom Wildtyp, *aro8*Δ zeigt die stärkste Abschwächung. *S. cerevisiae* wächst bis zu einer geringeren Dichte meist mit Wachstumsraten, die mit *C. glabrata* vergleichbar sind. Unterschiede zeigten sich zwischen den Arten bei Glycin und Histidin, bei letzterem war auch das Wachstum von  $\Delta$ *aro8* stark reduziert.

### 3.2.6 Heterologe Expression von Aro8

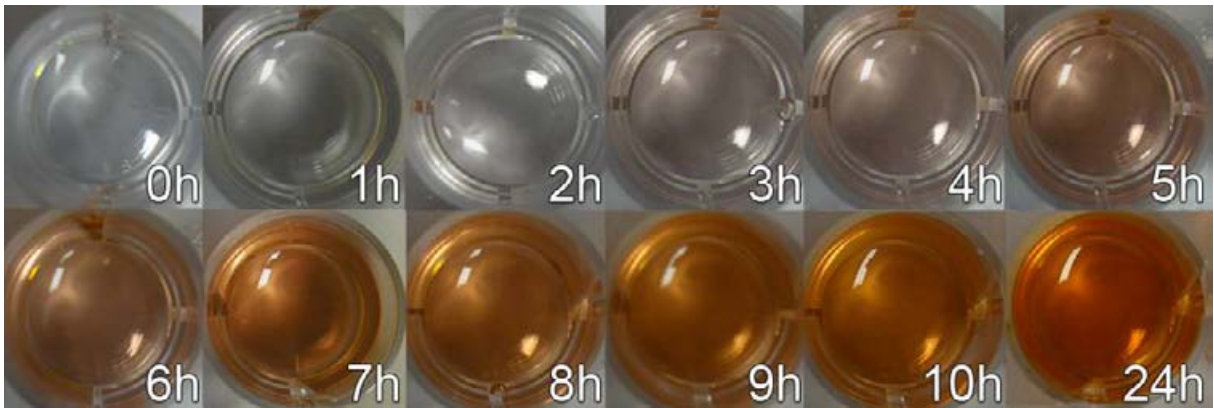
Die durch die Expressionsanalyse und die Untersuchungen von zufälligen und gezielten Mutanten gewonnenen Erkenntnisse zeigten, dass die aromatische Aminotransferase Aro8 für die Pigmentsynthese nötig ist. Ob das Enzym alleine auch ausreichend für die Bildung des Pigments ist, sollte durch eine heterologe Expression und anschließende *in vitro*-Untersuchungen des Enzyms untersucht werden.

Dazu wurde Aro8 gemeinsam mit einem N-terminalen Histidin-Marker in dem *E. coli*-Stamm BL21 Rosetta exprimiert, über eine Nickel-Sepharose-Säule aufgereinigt und dann aufkonzentriert (siehe Abschnitt 2.4.8). Abbildung 3-30A stellt die einzelnen Schritte dieses Prozesses dar. Als Produkt wurde ein Protein von etwa 61 kDa Größe erwartet, das sich auch in hoher Reinheit im Polyacrylamidgel finden ließ. Es wird im weiteren als Aro8\* bezeichnet. Das Enzym wurde in 50% Glycerin bei -20°C gelagert, nachdem initiale Tests gezeigt haben, daß es unter diesen Bedingungen stabil bleibt und seine Aktivität bewahrt.



**Abbildung 3-30:** (A) SDS-PAGE-Analyse der Schritte für die Proteinaufreinigung. E - Rohextrakt der induzierten *E. coli*-Kultur; D - Durchlauf nach Bindung an die Nickel-Sepharose-Säule; W - Eluat von der Säule bei Waschschritt mit 40 mM Imidazol; M<sub>1</sub> - Marker 1 (Fermentas PageRuler : ≈170, ≈130, ≈100, ≈70, ≈55, ≈40, ≈35, ≈25, ≈15 kDa); K<sub>1</sub>-K<sub>4</sub> - Protein nach Elution mit 200 mM Imidazol und Konzentrierung über eine Filtereinheit; M<sub>2</sub> - (Fermentas PageRuler Plus: ≈250, ≈130, ≈100, ≈70, ≈55, ≈40, ≈35, ≈25, ≈15 kDa). Das Enzym Aro8\* zeigt nach Aufreinigung und Konzentrierung eine deutlich sichtbare einzelne Bande bei den erwarteten 61 kDa. (B) Erwartete Reaktion im *in vitro*-Ansatz zur Aktivitätsmessung von Aro8\* (siehe Text). (C) In Gegenwart von Aro8\* (10 mU/ml) bildet sich innerhalb weniger Sekunden aus L-Tryptophan (10 mM) Indolpyruvat (grüne Linie, 338 nm). Nach einigen Stunden tritt eine deutliche Zunahme der Absorption bei 400 nm auf, die die Pigmentbildung anzeigt (vgl. Abbildung 3-1).

Zuerst wurde bestimmt, ob Aro8\* wie erwartet eine Aminotransferaseaktivität besitzt (Abbildung 3-30B). In einem Ansatz mit Tryptophan, dem Aminogruppenakzeptor α-Ketoglutarat und dem Cofaktor Pyridoxalphosphat zeigte sich photometrisch (Absorption bei 338 nm) die schnelle Bildung von Indolpyruvat (Abbildung 3-30C). Die Reaktion blieb

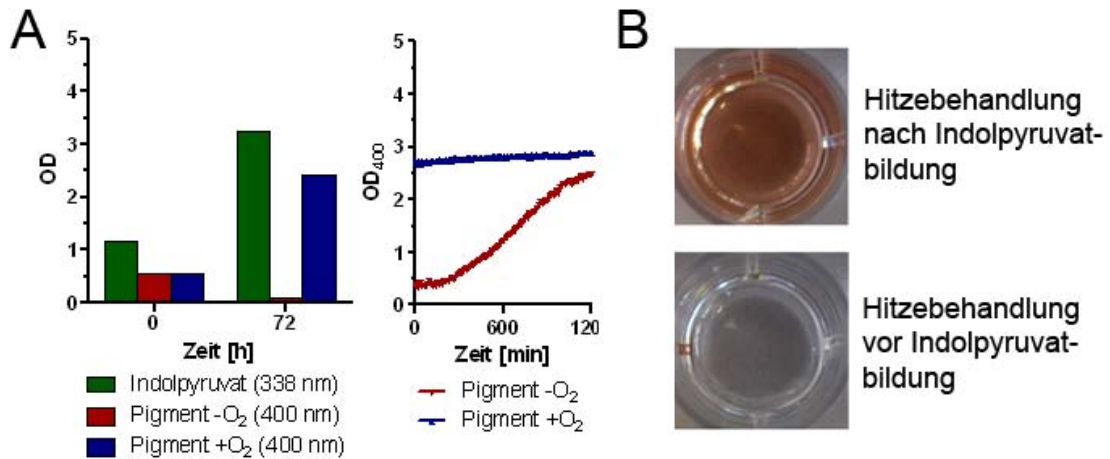


**Abbildung 3-31:** Bildung des braunen Pigments in *in vitro*-Ansätzen. Zu 10 mM Tryptophan und dem Akzeptor  $\alpha$ -Ketoglutarat wurden 10 mU Aro8\* gegeben. Nach einigen Stunden zeigte sich eine deutliche Braunfärbung, die nach etwa einem Tag ihr Maximum erreichte.

aus, wenn kein Akzeptor zur Verfügung gestellt wurde, es handelt sich also um eine Aminotransferaseaktivität. Über den Extinktionskoeffizienten  $\epsilon = 9,3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  konnte der enzymatische Umsatz bestimmt werden. Eine Unit wurde so definiert als die Menge Enzym, die unter den Bedingungen dieses Tests innerhalb einer Minute 1  $\mu\text{mol}$  L-Tryptophan in Indolpyruvat umsetzt (Abschnitt 2.4.8). Die spezifische Aktivität des isolierten Proteins Aro8\* betrug 120 mU/mg, die Aktivität war dabei stereospezifisch, denn mit D-Tryptophan ließ sich keine Indolpyruvatbildung messen (nicht gezeigt).

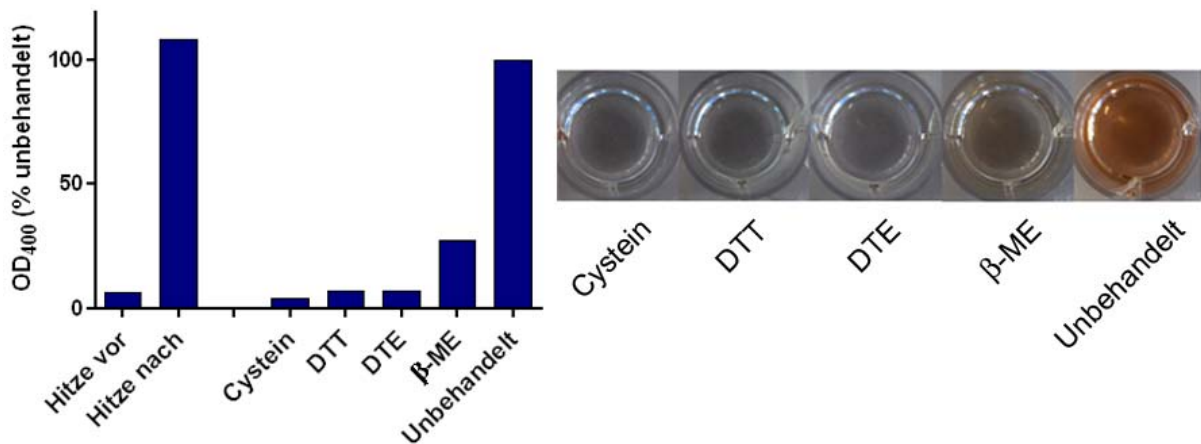
Interessanterweise zeigte sich nach einigen Minuten bis Stunden eine zunehmende Rot- und Braunfärbung des Versuchsansatzes und entsprechend eine Zunahme der Absorption bei 400 nm (Abbildung 3-30C; Abbildung 3-31). Der Verlauf der Farbreaktion entsprach dabei dem des Pigments im Überstand von *C. glabrata* (Abschnitt 3.1.1).

Um zu klären, ob es sich bei der enzymatischen Umsetzung von Tryptophan um die erste, sauerstoffunabhängige Reaktion der Pigmentbildung von *C. glabrata* handelte, wurde der Ansatz unter Sauerstoffabschluß getestet. Nach drei Tagen zeigte sich zwar keinerlei sichtbare Pigmentbildung, aber photometrisch konnte eine hohe Absorption bei 338 nm gemessen werden, die die Bildung von Indolpyruvat anzeigte (Abbildung 3-32A). Sobald dieser Ansatz der normalen Atmosphäre ausgesetzt war, begann die Bildung des sichtbaren Pigments (Abbildung 3-32A). Wurde das Enzym im Ansatz vor der Reaktion hitzeinaktiviert, wurde kein Indolpyruvat gebildet und es kam auch zu keiner Pigmentierung. Eine Inaktivierung nach der Bildung des Indolpyruvats dagegen konnte die anschließende Pigmentierung nicht verhindern (Abbildung 3-32B). Für die von Aro8\* katalysierte Reaktion von Tryptophan zum sichtbaren Pigment ist also ein enzymabhängiger, sauerstoffunabhängiger und ein enzymunabhängiger, sauerstoffabhängiger Schritt nötig.



**Abbildung 3-32: Primär- und Sekundärreaktion in der *in vitro*-Pigmentbildung** (A) Sauerstoffabhängigkeit der *in vitro*-Pigmentbildung. In einem sauerstofffrei gehaltenen Reaktionsansatz mit Tryptophan, Akzeptor  $\alpha$ -Ketoglutarat und Aro8<sup>\*</sup> bildet sich zwar Indolpyruvat (grüner Balken, 338 nm), aber auch nach zwei Tagen kein Pigment (roter Balken, 400 nm). In einem parallelen Ansatz an sauerstoffhaltiger Atmosphäre bildet sich wie erwartet Pigment (blauer Balken, 400 nm). Im sauerstofffreien Ansatz beginnt, nachdem er einige Stunden normaler Atmosphäre ausgesetzt wurde, die Bildung des Pigments (roter Kurve, 400 nm). Die OD<sub>400</sub> erreicht dabei etwa das Niveau des Kontrollansatzes mit Sauerstoff. (B) Enzymunabhängigkeit der Sekundärreaktion. Wird das Enzym nach der Bildung des Indolpyruvats durch 15 Minuten bei 99°C hitzeinaktiviert, bildet sich das Pigment normal innerhalb von 24 Stunden. Bei Hitzeinaktivierung vor der Indolpyruvatbildung kommt es zu keiner Pigmentbildung mehr.

Der sauerstoffabhängige Schritt der Pigmentbildung im Überstand von *C. glabrata* konnte durch die Anwesenheit von Cystein inhibiert werden (Abschnitt 3.1.3). Wurde Cystein zu dem Reaktionsansatz mit Aro8<sup>\*</sup>, Tryptophan und  $\alpha$ -Ketoglutarat gegeben, kam es ebenfalls zu einer starken Verringerung der Pigmentbildung. Eine mögliche Ursache hierfür war die Behinderung der enzymatischen Indolpyruvatbildung durch Cystein. Tatsächlich verringern 2,5 mM Cystein die Tryptophan-Transaminaseaktivität von Aro8<sup>\*</sup> um etwa 65%, 5 mM Cystein um 85% (hier nicht dargestellt). Höhere Tryptophandosen konnten diesen Effekt wieder verringern, was auf eine kompetitive Inhibitionswirkung hindeutete. Eine weitere mögliche Erklärung war die antioxidative Wirkung der Thiolgruppe des Cysteins. Deshalb wurden weitere thiolgruppenhaltige, reduzierende Substanzen getestet: Dithiothreitol, Dithioerythrol und  $\beta$ -Mercaptoethanol. Die Zugabe von jeweils 5 mM dieser Substanzen zum Reaktionsansatz reduzierte die Pigmentbildung stark (Abbildung 3-33), wobei die Stärke der Reaktion (mit Ausnahme des Cysteins) in etwa dem relativen Reduktionspotential der Substanz entsprach (Surdhar & Armstrong, 1987). Interessanterweise schwächten diese Substanzen die Aminotransferaseaktivität von Aro8<sup>\*</sup> mit Tryptophan und  $\alpha$ -Ketoglutarat nicht ab. Die sauerstoffabhängige Reaktion des Indolpyruvats zum Pigment ließ sich also durch die Anwesenheit dieser thiolgruppenhaltigen Substanzen behindern.



**Abbildung 3-33: Inhibition der Pigmentbildung durch reduzierende Substanzen.** Die thiolgruppenhaltigen Stoffe Cystein, Dithiothreitol (DTT), Dithioerythritol (DTE) und  $\beta$ -Mercaptopethanol ( $\beta$ -ME) inhibierten die Pigmentbildung stark. Das linke Diagramm zeigt die OD<sub>400</sub> nach zwei Tagen Reaktionsdauer mit 10 mU Aro8\* und 10 mM Tryptophan, als Vergleich ist die Wirkung der Hitzeinaktivierung gezeigt (vgl. Abbildung 3-32B). Rechts ist die fehlende Braunfärbung nach zwei Tagen Inkubation im Vergleich mit der unbehandelten Kontrolle gezeigt. Als einzige behandelte Probe zeigt sich bei Zugabe des schwachen Reduktionsmittels  $\beta$ -Mercaptopethanol eine leichte Pigmentbildung.

### 3.2.7 Zusammenfassung Abschnitt 3.2

Die Analyse von Transposoninsertionsmutanten und Transkriptionsprofilen von *C. glabrata* hat gezeigt, dass die Aminosäuregärung von Tryptophan als wahrscheinliche Quelle für einen Pigmentvorläufer dient. Gezielte Mutanten in diesem Stoffwechselweg haben das bestätigt. Die Deletion des Gens für die aromatische Aminotransferase Aro8 führte zu einer Mutante, die kaum noch Pigment produzierte und mit Tryptophan als Stickstoffquelle nicht mehr wachsen konnte. Tryptophanabbau und Pigmentbildung sind also in Aro8 gekoppelt. Die Decarboxylase Aro10 vermindert die Pigmentbildung, denn eine *aro10Δ*-Mutante war hyperpigmentiert. Das Zwischenprodukt der Pigmentbildung entsteht also nach dem Aro8- und vor dem Aro10-katalysierten Schritt des Tryptophankatabolismus. Die alternative aromatische Aminotransferase Aro9 spielt nur eine untergeordnete Rolle in der Pigmentierung und dem Wachstum mit aromatischen Aminosäuren als Stickstoffquelle.

Die Expression von Aro8 in Form des histidinmarkierten Aro8\* hat gezeigt, dass diese Aminotransferase alleine ausreichend ist, um die Reaktion von L-Tryptophan zum Pigment zu katalysieren. Das durch die Transferaseaktivität entstehende Zwischenprodukt Indolpyruvat reagierte dabei spontan – über Zwischenschritte, siehe Abschnitt 3.1.2.1 – in Gegenwart von Sauerstoff weiter, ohne dass das Enzym für diesen zweiten Schritt benötigt würde. Reduzierende, hydroxylradikalfangende Substanzen wie Cystein, DTT, DTE oder  $\beta$ -Mercaptoethanol inhibierten diese Reaktion.



### 3.3 Biologische Wirkung des Pigments für *C. glabrata*

---

Das Pigment lagert sich nach der Synthese in oder an der Hefezelle an, wie am dunklen Zellpellet gut erkennbar war. Vergleichbar den zellwandständigen Melaninen könnte es also eine Schutzwirkung vermitteln. Um diese Möglichkeit zu überprüfen, wurden pigmentierte und nicht-pigmentierte *C. glabrata* mehreren verschiedenen Umweltstressen ausgesetzt.

#### 3.3.1 Schutz vor Wasserstoffperoxid

---

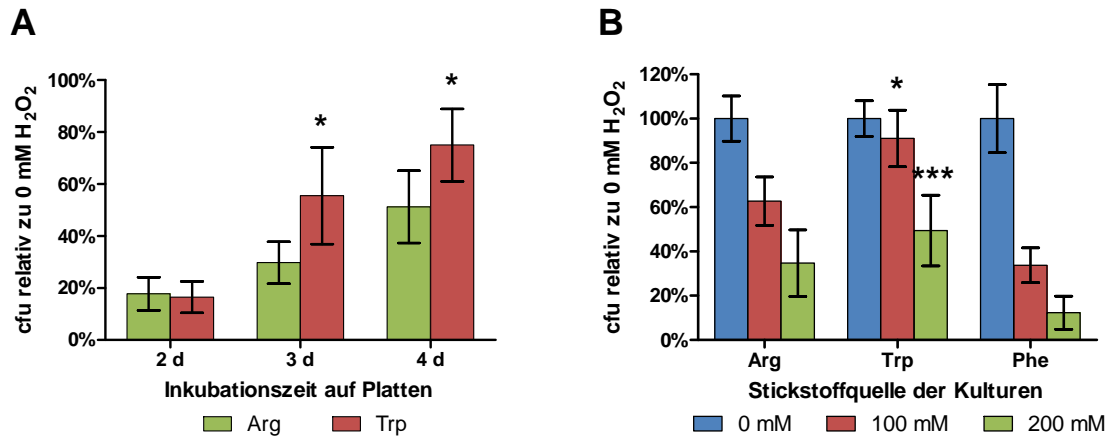
Um zu untersuchen, ob das Pigment möglicherweise einen Schutz vor reaktiven Sauerstoffspezies bieten kann, wie er schon für Melanine gezeigt worden ist (Romero-Martinez et al., 2000), wurden pigmentierte und nicht pigmentierte *C. glabrata*-Zellen *in vitro* Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) ausgesetzt und danach die Überlebensrate bestimmt. Im Vergleich zu *Saccharomyces cerevisiae* und *C. albicans* ist *C. glabrata* deutlich resistenter gegen  $H_2O_2$  (Cuellar-Cruz et al., 2008), weswegen für die folgende Versuche eine vergleichsweise hohe Wasserstoffperoxid-Konzentration verwendet werden mußte.

Das Pigment wird in Flüssigkulturen von *C. glabrata* erst lange nach dem Eintritt in die stationäre Phase in großer Menge sichtbar (Abschnitt 3.1.1). In dieser Phase war die  $H_2O_2$ -Resistenz nochmals um etwa das Zehnfache erhöht ((Cuellar-Cruz et al., 2008) und eigene Beobachtungen), so dass eine Unterscheidung der Überlebensraten bei der Verwendung von Flüssigkulturen nicht mehr möglich war. Für die Messungen wurden deswegen Kolonien von Agarplatten verwendet, auf denen sich das Pigment noch während der Wachstumsphase bilden konnte.

##### 3.3.1.1 Zeitlicher Verlauf des Schutzes

---

Abbildung 3-34 zeigt die Entwicklung der Resistenz in Abhängigkeit von dem Alter der Platten und der Bildung des Pigments. Nach zwei Tagen war auf arginin- und tryptophanhaltigen Agarplatten deutliches Wachstum der Kolonien zu erkennen. Die Überlebensrate der Zellen bei einer Behandlung mit 100 mM Wasserstoffperoxid für eine Stunde unterschied sich nicht (Abbildung 3-34).



**Abbildung 3-34: Resistenz gegen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.** (A) Zeitlicher Verlauf der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Resistenz auf SD-Agarplatten mit Tryptophan und Arginin als Stickstoffquelle. Auf Tryptophan gewachsene, pigmentierte *C. glabrata* (Trp) waren besser gegen 100 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> geschützt als auf Arginin gewachsenen, pigmentlose (Arg). Die Resistenz stieg mit zunehmender Inkubationsdauer auf beiden Medien. Behandlung mit 100 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> für eine Stunde bei 37°C. *n*=4. (B) Resistenz von *C. glabrata* gegen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> unter verschiedenen Anzuchtbedingungen. Vorkultur mit Arginin (Arg), Tryptophan (Trp) und Phenylalanin (Phe). Die pigmentierten Hefen aus der Tryptophankultur überlebten die Wasserstoffperoxid-Exposition besser als die nicht pigmentierten. Überlebende cfu (relativ zu 0 mM) nach einer Stunde Exposition mit den angegebenen Konzentrationen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *n*=10. Signifikanzniveaus \* *p*<0,05 und \*\*\* *p*<0,001.

Nach drei Tagen Wachstum war eine Pigmentierung auf Tryptophanplatten erkennbar, und die Überlebensrate stieg unter beiden Anzuchtbedingungen an. Dabei überstanden die pigmentierten *C. glabrata*-Hefen die Exposition signifikant (*p*<0,5) besser als die nicht pigmentierten. Auch nach vier Tagen war die Resistenz weiter gestiegen, die pigmenthaltigen Zellen waren weiterhin besser geschützt als die auf Arginin gewachsenen. Ähnlich der Flüssigkultur stieg also auf Agarplatten die Resistenz der Hefen mit zunehmenden Alter der Kultur an, es zeigten sich aber deutliche Unterschiede zwischen den pigmentierten und den nichtpigmentierten Zellen.

### 3.3.1.2 Erhöhter Schutz der pigmentierten Wildtypzellen

Um diesen Schutzeffekt weiter zu untersuchen, wurden die pigmentierten und nichtpigmentierten Zellen nach drei Tagen Wachstum verschiedenen Konzentrationen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ausgesetzt. Als zusätzliche Kontrolle wurden Platten mit Phenylalanin – wie Tryptophan eine aromatische Aminosäure – eingesetzt. In vorherigen Versuchen lag die Generationenzeit mit Phenylalanin als einziger Stickstoffquelle näher an der mit Arginin als an der mit Tryptophan (Abschnitt 3.2.5). So sollte ein möglicher Einfluß der Wachstumsgeschwindigkeit und des Typs der Stickstoffquelle ausgeschlossen werden.

Es bestanden wieder deutliche Unterschiede zwischen den pigmentierten und unpigmentierten Kulturen. Besonders ausgeprägt waren diese Unterschiede bei einer Wasserstoffperoxidkonzentration von 100 mM. Hier überlebten im Mittel etwa 90% der auf Tryptophan angezogenen Hefen, aber nur etwa 60% der auf Arginin und 35% der auf Phenylalanin gewachsenen (Abbildung 3-34B). Die statistische Signifikanz im Vergleich zur Tryptophankultur war in beiden Fällen hoch ( $p < 0,0001$ ). Wie erwartet, war die Überlebensrate bei 200 mM  $H_2O_2$  nochmals reduziert, aber auch hier waren die pigmentierten Zellen besser geschützt als die nicht pigmentierten ( $p < 0,05$ ).

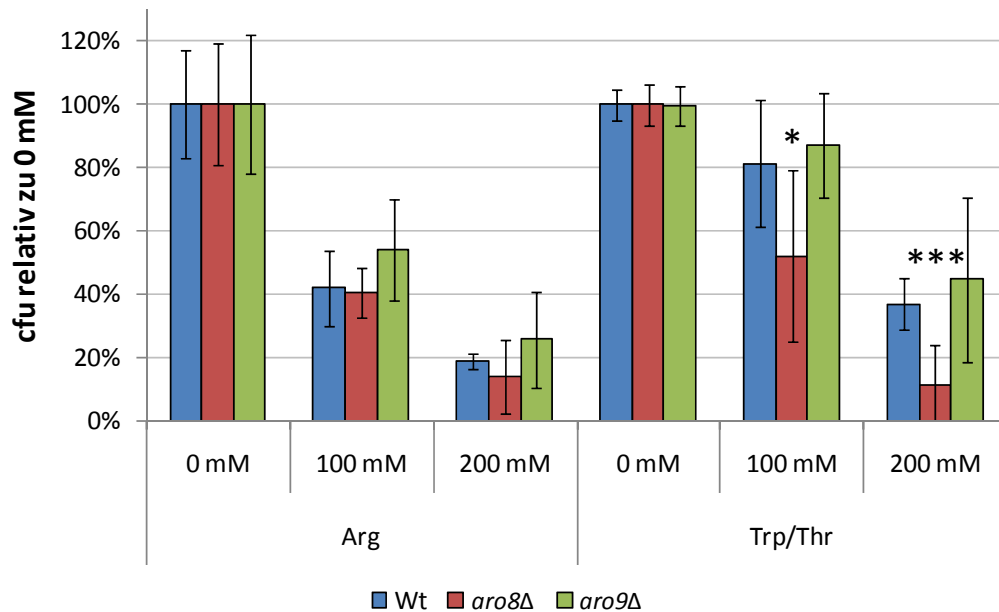
Unter allen getesteten Bedingungen zeigten pigmentierte, auf Tryptophan angezogene *C. glabrata*-Hefen also einen erhöhten Schutz gegen Wasserstoffperoxid.

### 3.3.1.3 Verringerter Schutz der Mutante *aro8Δ*

Für die Untersuchung der vorhandenen Mutanten des Pigmentsynthesewegs, also *aro8Δ*, *aro9Δ* und *aro10Δ*, mußte die Zusammensetzung des Anzuchtmediums verändert werden, weil die *aro8Δ*-Mutante auf Tryptophan als alleiniger Stickstoffquelle nicht oder nur sehr schlecht wachsen kann (Abschnitt 3.2.4.3). Als Alternative wurde ein Agar mit einem Tryptophan-Threonin-Gemisch von je 7,5 mM verwendet, da Threonin die Pigmentbildung relativ wenig hemmt (Abschnitt 3.1.3) und die *aro8Δ*-Mutante mit diesen Aminosäuren ein dem Wildtyp angenähertes Wachstum zeigt (Abschnitt 3.2.5).

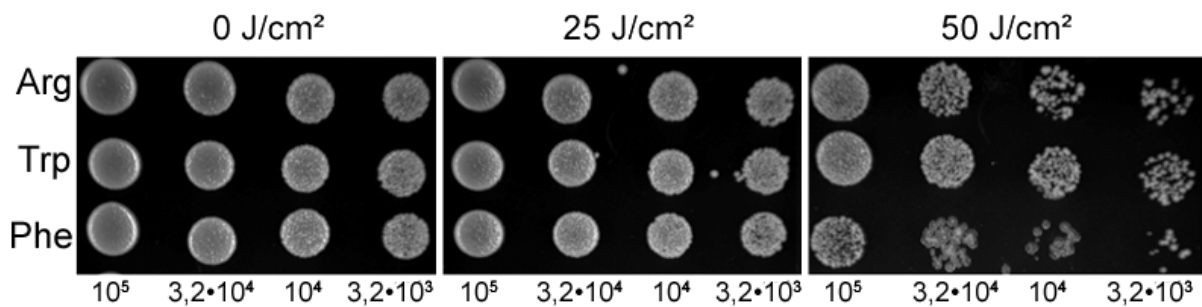
Die Mutante *aro10Δ* konnte wegen ihres unter diesen Bedingungen stark klumpenden Phänotyps nicht in die Untersuchungen mit einbezogen werden. Mit dem verwendeten System der Überlebensrate von koloniebildenden Einheiten hätten sich durch Zellklumpen fälschlicherweise deutlich erhöhte relative Überlebensraten gezeigt. Dies konnte durch Vorversuche bestätigt werden (Daten nicht gezeigt, vergleiche auch Abschnitt 3.2.4.1.1).

Abbildung 3-35 zeigt das Überleben der Mutanten nach Wasserstoffperoxidbehandlung. Während sich nach einer Anzucht auf argininhaltigen, nicht pigmentinduzierenden Platten keine Unterschiede zeigten und die Überlebensrate von Wildtyp und beiden Mutanten bei 100 mM bei etwa 40% und bei 200 mM bei etwa 20% lag, führte das vorherige Wachstum auf pigmentinduzierendem Tryptophan/Threonin-Medium zu unterschiedlichen Überlebensraten in  $H_2O_2$ .



**Abbildung 3-35: Überleben von Mutanten des Pigmentsynthesewegs nach H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Exposition.** Bei nicht pigmentierten Zellen (Arg) gibt es keinen Unterschied im Überleben zwischen Wildtyp und Mutanten. Unter pigmentinduzierenden Bedingungen (Trp/Ile) überlebte die pigmentreduzierte Mutante *aro8Δ* bei 100 mM und 200 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> signifikant schlechter als der Wildtyp, die pigmentproduzierende Mutante *aro9Δ* zeigte dagegen keinen Unterschied im Überleben. Signifikanzniveaus \* ( $p < 0,05$ ) und \*\*\* ( $p < 0,001$ ).

Bei 100 mM zeigte die geringer pigmentierte Mutante *aro8Δ* ein verringertes Überleben – im Mittel 52% gegen 81% für den Wildtyp ( $p < 0,05$ ). Diese Rate entspricht in etwa der mittleren Überlebensrate der nicht pigmentierten Hefen auf Argininmedium (45%). Die etwas stärker pigmentierte Mutante *aro9Δ* dagegen zeigte sogar eine sehr geringe, nicht signifikante Steigerung der Überlebensrate (87%) im Vergleich zum Wildtyp. Bei 200 mM waren die Unterschiede zwischen Wildtyp und *aro8Δ* noch deutlicher ausgeprägt, die Überlebensrate betrug 37% beim Wildtyp und nur 11% bei der Mutante ( $p < 0,001$ ) – wiederum vergleichbar mit der Rate unter nicht pigmentinduzierenden Bedingungen. Auch war die *aro9Δ*-Mutante (45%) hier wieder etwa auf Wildtypniveau. Die in der Pigmentierung defekte Mutante *aro8Δ* zeigte also auf pigmentinduzierendem Medium eine reduzierte Resistenz gegenüber Wasserstoffperoxid, während die pigmentierte *aro9Δ*-Mutante keinen meßbaren Unterschied zum Wildtyp aufwies. Unter nicht pigmentinduzierenden Bedingungen ist für beide Mutanten kein Unterschied zum Wildtyp feststellbar.



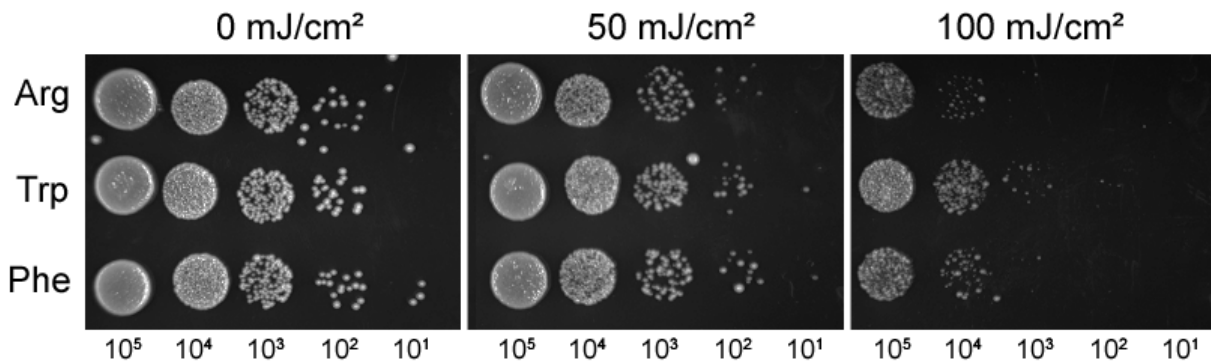
**Abbildung 3-36: Schutz vor UV-A-Licht.** Pigmentierte Hefen waren vor UV-A-Licht besser geschützt als unpigmentierte, der Schutz ist aber weniger ausgeprägt als bei UV-C- und UV-B-Licht (Abbildung 3-37; Abbildung 3-38). Die Verdünnungsreihe erfolgte hier für eine genauere Auflösung in zwei Schritten für je eine Zehnerpotenz. Die Wellenlänge des UV-Lichts betrug 365 nm. Gezeigt ist ein typisches Experiment.

### 3.3.2 Schutz vor UV-Strahlung

Der Schutz vor UV-Strahlung ist eine wichtige Rolle für verschiedene Pigmente bei Pilzen (Abschnitt 1.3.2.3) und konnte für das Pigment von *M. furfur* bereits gezeigt werden (Mayser et al., 2002, Mayser et al., 2003). Ob auch *C. glabrata* durch die Pigmentierung vor UV-Strahlung geschützt ist, sollte durch Bestrahlung mit definierten Dosen UV-Lichts verschiedener Wellenlängen festgestellt werden. Die entsprechenden Dosen wurden für jede Wellenlänge in Vorversuchen bestimmt. Wie erwartet lagen die Dosen für das Licht im UV-A-Bereich etwa tausendfach höher als in den beiden anderen Wellenlängenbereichen. Die Hefen wurden für das Experiment wie zuvor auf pigmentinduzierendem Tryptophanmedium und auf nicht induzierendem Arginin- und Phenylalaninmedium angezogen und in verschiedenen Verdünnungen auf Vollmedium getropft. Die Zellen wurden sofort danach mit UV-A- (365 nm), UV-B- (312 nm) und UV-C-Licht (254 nm) bestrahlt und dann über Nacht bei 37°C inkubiert.

#### 3.3.2.1 Erhöhter Schutz gegen UV-A-, UV-B- und UV-C-Licht

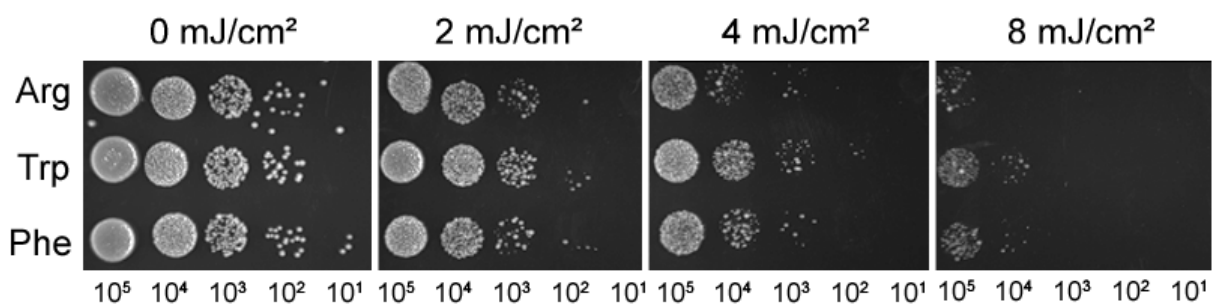
Unter allen getesteten Bedingungen waren mit Tryptophan angezogene, pigmentierte Hefezellen gegen UV-Licht resistenter als nicht pigmentierte. Der Unterschied fiel bei dem wenig schädlichen UV-A-Licht noch gering aus (Abbildung 3-36), wo die Bestrahlungszeit für die benötigten Dosen mit mehreren Stunden extrem lang war. In dieser Zeit kam es zu einer deutlichen Erwärmung der Platten, so dass auch thermische Effekte eine Rolle gespielt haben könnten. Deutlicher war der Unterschied bei UV-B-Licht (Abbildung 3-37). Die Dosis lag hier etwa tausendfach niedriger und die Bestrahlungszeit war entsprechend kürzer. Bereits bei



**Abbildung 3-37: Schutz vor UV-B-Licht.** Bei höheren Dosen UV-B-Strahlung überlebten auf Tryptophan angezogene, pigmentierte Hefen besser als auf Arginin oder Phenylalanin angezogene unpigmentierte. Die Wellenlänge des UV-Lichts betrug 312 nm. Gezeigt ist ein typisches Experiment.

50 mJ/cm<sup>2</sup> war ein Unterschied im Überleben zwischen den pigmentierten und nicht-pigmentierten Hefen zu erkennen, der bei 100 mJ/cm<sup>2</sup> fast eine Zehnerpotenz erreichte.

Auch bei Bestrahlung mit dem noch effektiveren UV-C-Licht sind die tryptophaninduzierten Zellen besser geschützt. Der Unterschied zu den nichtpigmentierten Hefen war hier bei 4 und 8 mJ/cm<sup>2</sup> am stärksten ausgeprägt, während sich zwischen den in Arginin und in Phenylalanin angezogenen Zellen kein meßbarer Unterschied zeigt. Wie *M. furfur* (und vergleichbar den melanisierten Pilzen) ist *C. glabrata* also vor UV-Licht besser geschützt, wenn die Hefen zuvor Pigment gebildet haben.



**Abbildung 3-38: Schutz vor UV-C-Licht.** Geringere Dosen UV-C- als UV-B-Licht waren für das effektive Abtöten von *C. glabrata* notwendig. Pigmentierte Zellen aus einer Tryptophanvorkultur überlebten die Bestrahlung mit UV-C-Licht besser als nichtpigmentierte. Die Wellenlänge des UV-Lichts betrug 254 nm. Gezeigt ist ein typisches Experiment.

### 3.4 Biologische Wirkung auf *C. albicans*

Im Wirt kommen *C. glabrata* und *C. albicans* häufig in den gleichen Nischen vor (Redding, 2001, Klotz et al., 2007). Sollte die Pigmentbildung auch *in vivo* stattfinden, wäre *C. albicans* dem Pigment also möglicherweise direkt ausgesetzt. Es sollte daher getestet werden, ob die Pigmentbildung von *C. glabrata* Auswirkungen auf *C. albicans* haben kann.

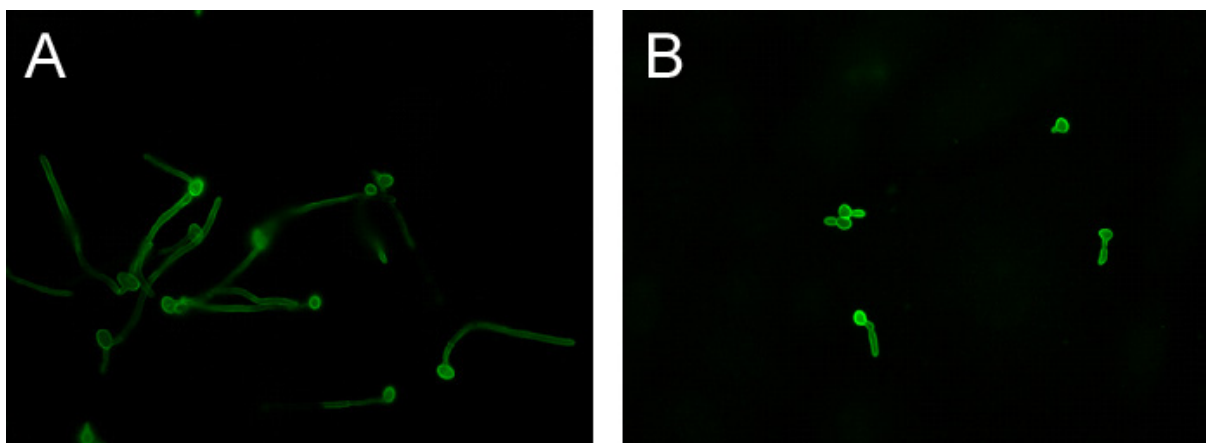
### 3.4.1 Reduktion der Hyphenbildung

*C. albicans* bildet unter verschiedenen Induktionsbedingungen Hyphen, darunter bei Kontakt mit Wirtsepithelzellen, in Gegenwart von Serum und bei hohen CO<sub>2</sub>-Konzentrationen.

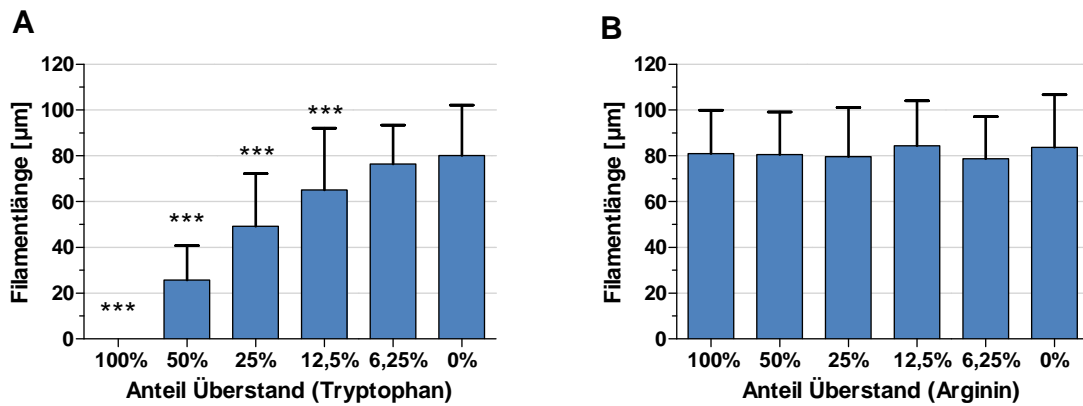
Der pigmenthaltige Überstand inhibierte die Hyphenbildung von *C. albicans* (Abbildung 3-39) unter diesen Bedingungen. Statt der typischen Hyphen bildeten sich Hefen, Pseudohyphen und deutlich verkürzte Hyphen, aber auch Mischformen, bei denen das filamentöse Wachstum in die Hefeform überging. Als Maß für die Wirkung des Überstands wurde deshalb die Gesamtlänge der von der initialen Hefe ausgehenden Struktur, hier allgemein als Filament bezeichnet, nach Inkubation bei 37°C mit 10% Serum verwendet.

In Abbildung 3-40A sind die durchschnittlichen Längen der Filamente gezeigt, die in Gegenwart verschiedener Konzentrationen des *C. glabrata*-Überstands gebildet wurden. Während unverdünnter Überstand (100%) die Filamentbildung völlig unterdrückte, nahmen die durchschnittlichen Längen mit abnehmender Konzentration des Überstands zu. Bis zu einer Verdünnung von 1:8 (12,5%) waren die Unterschiede zur Kontrolle noch signifikant, bei Konzentrationen von 6,25% und weniger war kein Unterschied mehr meßbar.

Dieser Effekt trat nicht mit Überstand aus anderen Kulturbedingungen auf. In Abbildung 3-40B sind beispielhaft die selben Verdünnungen des Überstands einer mit Arginin gewachsenen *C. glabrata*-Kultur gezeigt. In allen Konzentrationen bildete *C. albicans* normale Filamente, deren Länge von etwa 80 µm sich in keinem Fall von der Kontrolle



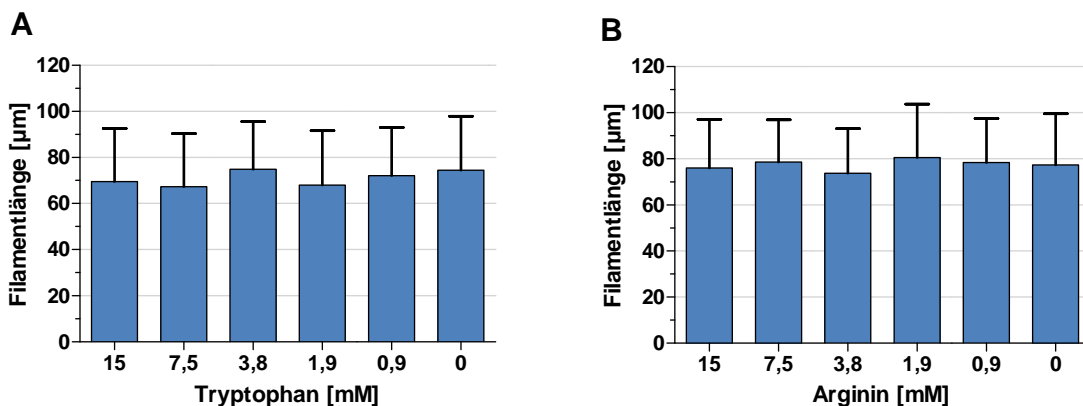
**Abbildung 3-39: Wirkung von Pigment auf die Hyphenbildung von *C. albicans*.** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von Calcofluor-White-gefärbten *C. albicans* nach vier Stunden Inkubation unter hypheninduzierenden Bedingungen. (A) Mit Überstand einer mit Arginin angezogenen *C. glabrata*-Kultur, (B) mit pigmenthaltigem Überstand einer mit Tryptophan angezogenen Kultur.



**Abbildung 3-40: Verringerung der Filamentlängen bei serumbehandelten *C. albicans*-Zellen mit *C. glabrata*-Kulturüberstand.** (A) Pigmentierter Überstand aus tryptophanhaltigem Medium in verschiedenen Verdünnungen reduzierte die Filamentlänge, (B) pigmentfreier Überstand aus argininhaltigem Medium zeigte keine Wirkung auf die Filamentlänge. Messung nach 4 Stunden bei 37°C mit 10% Serum zur Hypheninduktion. Signifikanzniveau \*\*\* ( $p < 0,001$ ).

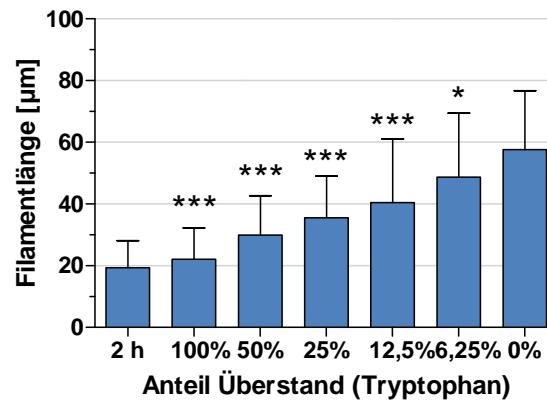
unterschied. Auch Überstand von *C. glabrata* aus Vollmedium und Minimalmedium mit Threonin oder Phenylalanin führte zu keiner meßbaren Reduktion der Filamentbildung (nicht gezeigt). Um auszuschließen, dass möglicherweise Reste des für die Pigmentbildung eingesetzten Tryptophans im Überstand die Repression bewirken, wurden die Tryptophan- und Argininmedien ebenfalls getestet. Keines der Medien bewirkte eine Verringerung der Filamentlängen (Abbildung 3-41).

Auch die Verlängerung von sich bereits bildenden Hyphen konnte durch Zugabe des Pigments verhindert werden. Hierzu wurde zwei Stunden mit 10% Serum Hyphenwachstum induziert und dann das Pigment zu den wachsenden Keimschläuchen gegeben. Nach dieser Zeit hatten die Keimschläuche bereits eine Länge von durchschnittlich 19  $\mu\text{m}$ . Bei Zugabe von reinem pigmentierten Überstand (100%) verlängerten sich diese in den nächsten zwei



**Abbildung 3-41: *C. glabrata*-Medien haben keinen Einfluß auf die Filamentlänge bei *C. albicans*.** (A) Induktionsmedium mit verschiedenen Konzentrationen Tryptophan, (B) nicht induzierendes Medium mit verschiedenen Konzentrationen Arginin. Messung nach 4 Stunden bei 37°C mit 10% Serum.





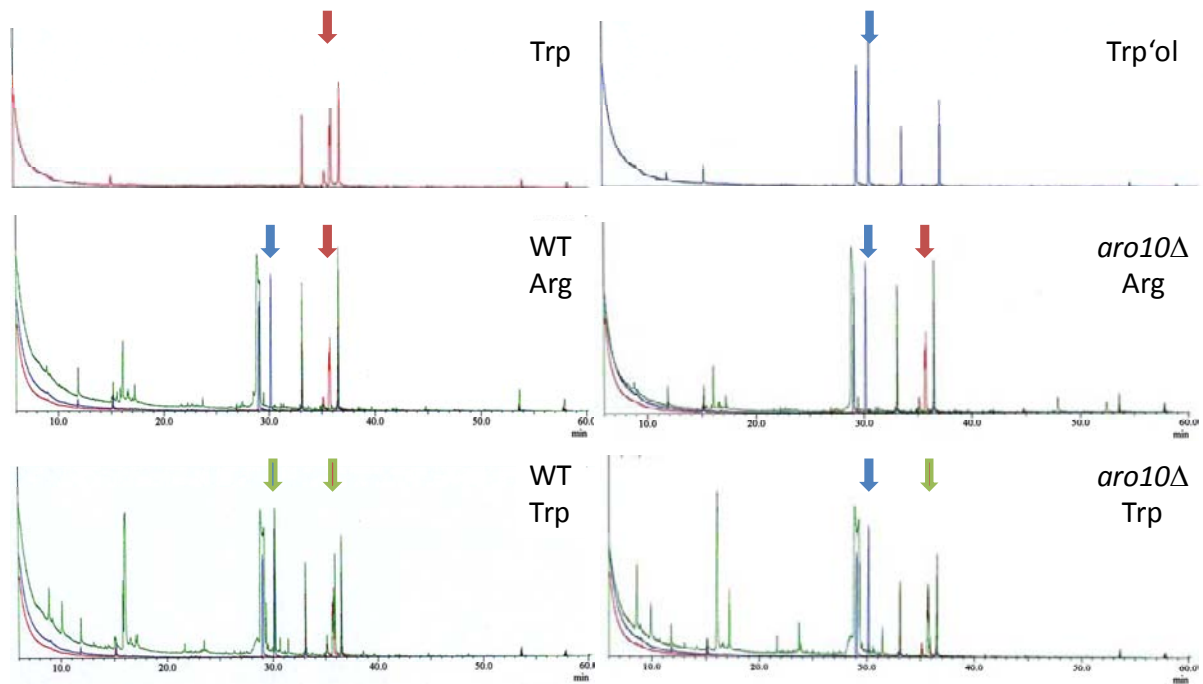
**Abbildung 3-42: Die Verlängerung von Keimschläuchen wird durch die Zugabe von Pigment gehemmt.** Die Präinkubation erfolgte in 10% Serum für 2 Stunden (2h), danach wurden verschiedener Mengen Pigment zugegeben. Alle getesteten Konzentrationen verringerten die Verlängerung über die nächsten zwei Stunden signifikant im Vergleich zu 0%. Signifikanzniveaus \* ( $p < 0,05$ ) und \*\*\* ( $p < 0,001$ ).

Stunden fast nicht mehr (auf insgesamt 22 µm). Mit sinkender Konzentration des Pigments verringerte sich der Effekt, bis zu einer Gesamtlänge von 58 µm ohne Pigment (Abbildung 3-42). Aber schon 6,25% Pigmentüberstand reduzierte dabei die Länge signifikant (auf durchschnittlich 49 µm;  $p < 0,05$ ).

#### 3.4.1.1 Nachweis von Tryptophol

Der Überstand einer pigmentinduzierten *C. glabrata*-Kultur enthielt also eine Substanz, die die Bildung von Filamenten bei *C. albicans* behindern und bei bereits wachsenden Keimschläuchen die Verlängerung unterdrücken kann. Ein Produkt des Abbaus von aromatischen Aminosäuren bei *S. cerevisiae* sind die jeweiligen Fuselalkohole, im Fall von Tryptophan also Tryptophol (vgl. Abschnitt 1.5). Vereinzelt wurde beschrieben, dass von *C. albicans* selbst erzeugtes Tryptophol in der Lage ist, die Bildung von Hyphen zu unterdrücken (Lingappa *et al.*, 1969, Chen & Fink, 2006). Die Synthese des Tryptophols erfolgt dabei ebenso wie bei *S. cerevisiae* über die Aminosäuregärung (Ghosh *et al.*, 2008).

Um nachzuweisen, ob auch *C. glabrata* Tryptophol in großen Mengen aus Tryptophan produzieren kann, wurde der Überstand von pigmentierten (in Tryptophan gewachsenen) und unpigmentierten (in Arginin gewachsenen) *C. glabrata*-Zellen mittels einer HPLC-Analyse untersucht. Als Standards dienten dabei kommerziell erhältliches Tryptophol und Tryptophan in einer Konzentration von 15 mM. Da das Protein Aro10 den letzten Schritt der Aminosäuregärung zum Tryptophol katalysiert (siehe Abschnitt 1.5.1), wurde auch die *C. glabrata*-Mutante *aro10Δ* in die Untersuchungen einbezogen.



**Abbildung 3-43: HPLC-Analyse der Überstände von Kulturen mit *C. glabrata*-Wildtyp und *aro10Δ*-Mutante.** Vergleich jeweils mit Tryptophan(Trp)- und Tryptophol(Trp'ol)-Standards im gleichen Medium. Die Proben sind grün dargestellt, blau und rot sind Tryptophol und Tryptophan. Roter und blauer Pfeil: Markerpeaks für Tryptophan und Tryptophol. Grüne Pfeilumrandung: Markerpeak, der auch in einer der Proben auftrat. Bei Wachstum in Arginin ist in beiden Stämmen kein Tryptophan oder Tryptophol nachweisbar (Pfeile ohne Umrandung). Der Wildtyp bildet mit Tryptophan große Mengen Tryptophol (blau-grüner Pfeil), die Mutante dagegen nicht (rot-grüner Pfeil: Tryptophanrest im Medium).

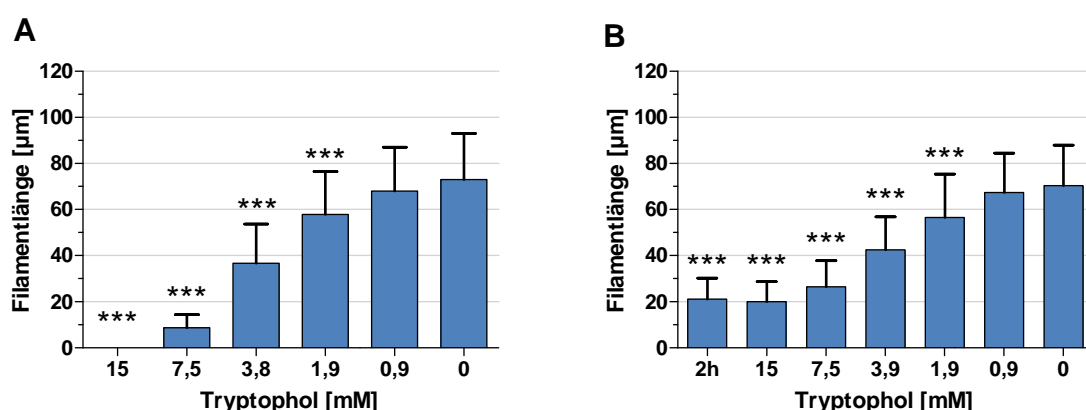
In Abbildung 3-43 sind die Chromatogramme der Standards und der Überstände dargestellt. Sowohl Tryptophan als auch Tryptophol zeigten spezifische Peaks, die in einigen der Überständen zu finden sind. Tryptophan trat dabei als unverbrauchter Rest in den beiden pigmentierten Proben von Mutante und Wildtyp auf. Tryptophol wurde in größerer Menge nur bei dem in Tryptophan gewachsenen Wildtyp, nicht jedoch bei *aro10Δ* gebildet. Eine ungefähre Abschätzung der Konzentrationen über den Tryptopholstandard ergab eine Konzentration von ca. 7,5 mM Tryptophol bei dem pigmentierten Wildtyp und ca. 0,25 mM bei der Mutante. Bei Anzucht in Arginin wurde weder von Mutante noch Wildtyp Tryptophol gebildet. Der pigmentierte Überstand des *C. glabrata*-Wildtypstamms ATCC2001 enthielt also große Mengen Tryptophol, dessen Synthese wie bei *S. cerevisiae* aus Tryptophan über die Phenylpyruvatdecarboxylase Aro10 erfolgte.

### 3.4.1.2 Wirkung von Tryptophol auf *C. albicans*

Die Effekte von Tryptophol auf die Hyphenbildung von *C. albicans* sind bislang nicht systematisch untersucht worden. Um zu ermitteln, ob die im Überstand von *C. glabrata* gemessenen Tryptopholkonzentrationen ausreichend sind, um den hyphenreprimierenden Effekt des Pigments zu erklären, wurde *C. albicans* definierten Konzentrationen Tryptophol ausgesetzt – ausgehend von 15 mM – und die Hyphenlängen gemessen.

In Konzentrationen von 1,9 mM und mehr reduzierte die Anwesenheit von Tryptophol unter den Testbedingungen die Filamentlänge von *C. albicans* signifikant (Abbildung 3-44A). Die Reduktion bei 3,9 mM Tryptophol auf etwa 35  $\mu\text{m}$  entspricht dabei ungefähr der Reduktion mit 25-50% Pigment (Abbildung 3-40), die Reduktion bei 1,9 mM liegt mit 55  $\mu\text{m}$  in dem Bereich zwischen 12,5% und 25% Pigment. Die von *C. glabrata* gebildete Menge Tryptophol (Abschnitt 3.4.1.1) lag also in einem Bereich, in dem die Substanz eine deutliche Wirkung auf *C. albicans* zeigt.

Auch die Verlängerung von bereits gebildeten Hyphen konnte durch Tryptophol verringert werden (Abbildung 3-44B), wiederum ähnlich zu den mit dem pigmentierten Überstand gemessenen Effekten (Abschnitt 3.4.1). Nach 2 Stunden Inkubationszeit erreichten die Hyphen eine mittlere Länge von  $21 \pm 9 \mu\text{m}$ , die nach weiteren 2 Stunden ohne Tryptophol auf  $70 \pm 18 \mu\text{m}$  anstieg. Mit 15 mM und 7,5 mM Tryptophol wurde diese Verlängerung fast völlig unterdrückt, und noch mit 1,9 mM war eine signifikant geringere Verlängerung meßbar (auf  $57 \pm 19 \mu\text{m}$ ).



**Abbildung 3-44: Wirkung von Tryptophol auf die Filamentbildung von *C. albicans*.** (A) Tryptophol in verschiedenen Konzentrationen verringerte die Filamentbildung in Serum. (B) Zugabe von Tryptophol zu entstehenden Hyphen nach zwei Stunden Inkubation ohne Tryptophol inhibierte die Verlängerung der Hyphen. Die Messung der Filamentlängen erfolgte nach 4 Stunden (A) oder 2+2 Stunden (B) in 10% Serum bei 37°C. Vergleichswert "2h" in (B) nach zwei Stunden ohne Tryptophol. Signifikanzniveau \*\*\* ( $p < 0,001$ ).

### 3.4.2 Transkriptionsanalyse der Hyphenrepression

---

Für die Unterdrückung der Hyphenbildung waren verschiedene Gründe denkbar. Es könnte sich (1) um eine toxische Wirkung von Tryptophol auf *C. albicans* handeln, um (2) eine Störung des Hyphenwachstums an sich – beispielsweise durch Wirkung auf die Zellwand – oder um (3) eine Unterdrückung des hyphenassoziierten Transkriptionsprogramms von *C. albicans*. Für die weitere Untersuchung wurde deshalb eine Transkriptionsanalyse von *C. albicans*-Zellen durchgeführt, die unter hypheninduzierenden Bedingungen Tryptophol ausgesetzt wurden. Vergleichbare Untersuchungen existieren bereits zur hyphenreprimierenden Wirkung des *Quorum-sensing*-Moleküls Farnesol (Cho *et al.*, 2007, Kebaara *et al.*, 2008), aber noch nicht zu Tryptophol.

Deshalb wurden Hefen vier Stunden in Minimalmedium mit 10% Serum mit 0, 1 oder 5 mM Tryptophol bei 37°C angezogen. Bei 0 mM bildeten sich erwartungsgemäß Hyphen, die mit steigender Tryptopholkonzentration unterdrückt wurden (vgl. Abschnitt 3.4.1.2). Von diesen Kulturen wurden Transkriptionsprofile mit Hilfe von *C. albicans*-Microarrays gewonnen.

Der Vergleich der Profile läßt eine toxische Wirkung (Erklärung 1) unwahrscheinlich erscheinen. Die meisten Gene (10 von 14) der sogenannten *Core Stress Response*, die bei *C. albicans* unter osmotischem, oxidativen und Schwermetall-Stress erhöht exprimiert werden (Enjalbert *et al.*, 2006), wurden durch Tryptophol nicht beeinflusst. Des weiteren wuchs *C. albicans* auch mit 5 mM Tryptophol noch in Hefenform, was sich so auch im Transkriptionsprofil abbildet.

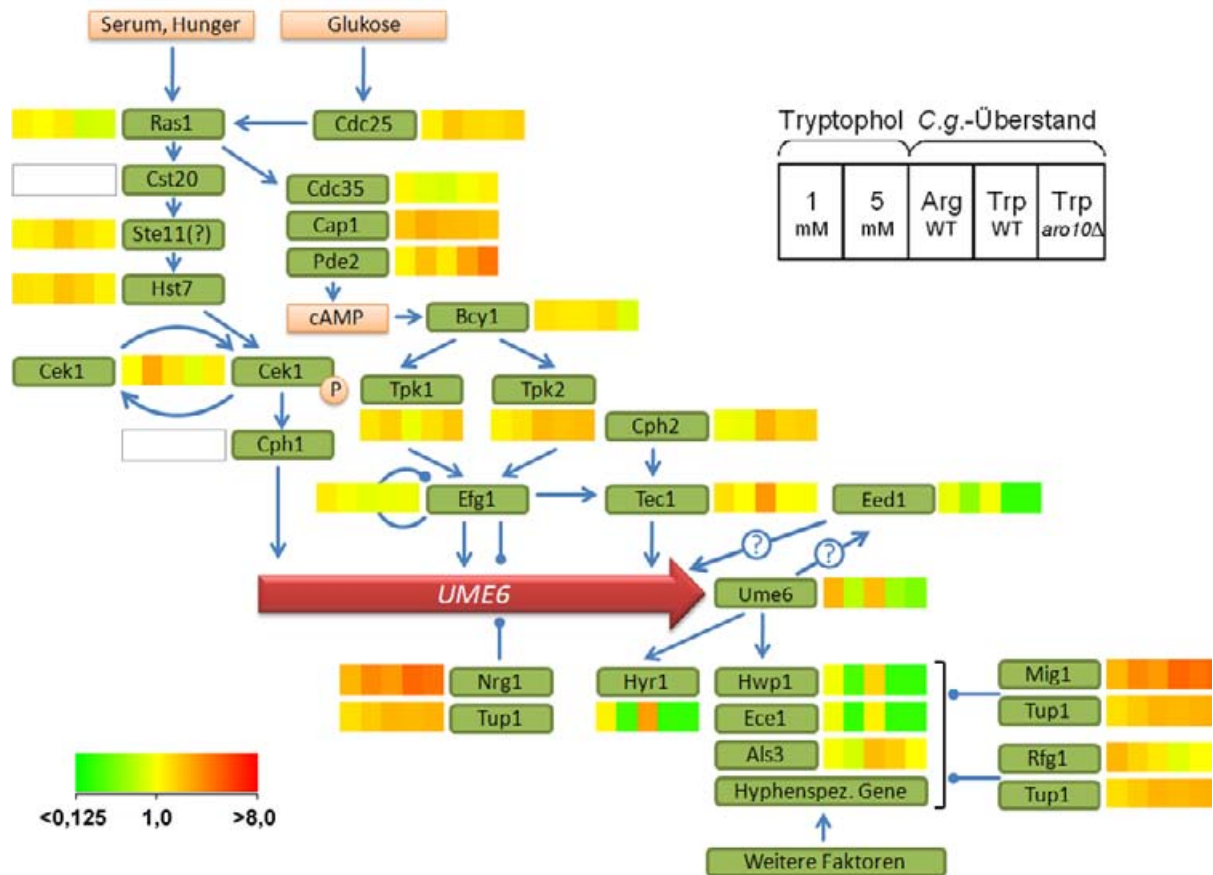
Insgesamt ließen sich 41 Gene finden, die in 5 mM Tryptophol im Vergleich zur Kontrolle mindestens dreifach herunterreguliert waren. Eine Liste dieser Gene befindet sich im Anhang 7.6.3. Unter diesen Genen fanden sich viele sogenannte hyphenassoziierte Gene wie *ECE1*, das für ein Protein kodiert, dessen Expression direkt mit der Elongation der Hyphen korreliert (Birse *et al.*, 1993), oder *HWP1*, ein Gen für ein Adhäsion, das die Bindung an Wirtszellen (Staab *et al.*, 1999) und im Biofilm der *C. albicans*-Zellen untereinander (Nobile *et al.*, 2006) vermittelt (Tabelle 3-9). Die Expression beider Gene ist hyphenspezifisch; die Herunterregulierung zeigte also auch auf transkriptioneller Ebene den morphologisch sichtbaren Phänotyp der reduzierten Hyphenbildung an.

Bei einem Genlistenvergleich (Newman & Weiner, 2005) der gesamten Liste von herunterregulierten Genen mit bereits publizierten Daten zeigten sich viele Übereinstimmungen mit Experimenten, bei denen Gene in der Hyphenregulation disruptiert wurden (Tabelle 3-8).

**Tabelle 3-8: Vergleich der durch Tryptophol herunterregulierten Genen mit bekannten Transkriptionsprofilen.** Liste nach L2L-Algorithmus (Newman & Weiner, 2005) mit *C. albicans*-Datensätzen (BRI *Candida albicans* Research, 2009). Beschreibung: Kurzbeschreibung des Experiments; Identisch: Anzahl gefundener Übereinstimmungen und Gesamtgröße der jeweiligen Genliste; Faktor: Anreicherungsfaktor der übereinstimmenden Gene; p-Wert: p-Wert nach Binomialverteilung; Referenz: Ursprüngliche Quelle der Genlisten

Beschreibung	Identisch	Faktor	p-Wert	Referenz
Herunterreguliert in Hyphenzellen ohne Efg1-Transkriptionsfaktor	7/40	30,0	3,6E-09	(Harcus <i>et al.</i> , 2004)
Herunterreguliert in Hyphenzellen ohne Ras1-GTPase	6/41	25,1	1,5E-07	(Harcus <i>et al.</i> , 2004)
Herunterreguliert in Hyphenzellen ohne Cdc35-Adenylatzyklase	12/290	7,1	2,0E-07	(Harcus <i>et al.</i> , 2004)
Hochreguliert in Hyphen nach 6 Stunden in FBS und 37°C	6/51	20,2	5,6E-07	(Nantel <i>et al.</i> , 2002)
Hochreguliert 9 Stunden nach Repression der Cdc5-Kinase	8/152	9,0	3,7E-06	(Bachewich <i>et al.</i> , 2005)

Ras1 beispielsweise aktiviert die Cdc35-Adenylatcyclase (Leberer *et al.*, 2001), die über die Produktion von cAMP zur Aktivierung von Efg1 führt (Sonneborn *et al.*, 2000). Efg1 seinerseits reguliert als Transkriptionsfaktor die Expression von hyphenassoziierten Genen (Stoldt *et al.*, 1997). Die gesamte Genliste deutete also einen Effekt von Tryptophol auf die Regulation der Hyphenbildung an. Aus diesem Grund wurden die Expressionsdaten der unter diesen Bedingungen relevanten Gene auf ein Schema der Hypheninduktion bei *C. albicans* projiziert (Abbildung 3-45). Es wird deutlich, dass der kürzlich erkannte zentrale Transkriptionsregulator Ume6 (Banerjee *et al.*, 2008, Carlisle *et al.*, 2009) mit Tryptophol herunterreguliert ist (zu der Wirkung des Pigments siehe Abschnitt 3.4.3). Damit einher geht die Herunterregulierung der von Ume6 abhängigen Gene, wie die erwähnten *HWP1* und *ECE1* – aber auch *HYR1*, dessen Expression allein von Ume6 abhängig ist (Zeidler *et al.*, 2009). Ebenso ist das Gen *EED1* herunterreguliert, das an der Elongation von Hyphen beteiligt ist (Zakikhany *et al.*, 2007), dessen mögliche Interaktion mit Ume6 aber noch unklar ist (R. Martin, persönliche Mitteilung).



**Abbildung 3-45: Expression von hyphenrelevanten *C. albicans*-Genen im Vergleich mit einer hyphenbildenden Kultur.** Mit 5 mM Tryptophol und den pigmentierten Überständen von *C. glabrata* wurde die Expression von *UME6* im Vergleich zur hyphenbildenden Kontrolle stark vermindert. Die von Ume6 abhängigen hyphenassoziierten Gene folgten diesem Expressionsmuster, besonders das nur von Ume6 regulierte *HYR1* (Zeidler et al., 2009). Das für die Elongation von Hyphen relevante Gen *EED1* (Zakikhany et al., 2007) zeigte ebenfalls eine starke Herunterregulierung mit Tryptophol und Pigment. Die Gene *CST20* und *CPH1* sind auf den verwendeten Microarrays nicht enthalten, und es konnten somit keine Expressionsdaten angegeben werden. Verändert nach (Biswas et al., 2007, Banerjee et al., 2008, Zeidler et al., 2009).

Somit konnte auch die Möglichkeit ausgeschlossen werden, dass Tryptophol nur die morphologische Ausprägung der Hyphen unterdrückt, beispielsweise durch Störung der Zellwandsynthese (Erklärung 2). In diesem Fall wäre eine Expression der hyphenassoziierten Gene trotzdem zu erwarten gewesen. Unter Einfluß von Tryptophol wird demnach das hyphenspezifische Transkriptionsprogramm von *C. albicans* unterdrückt.

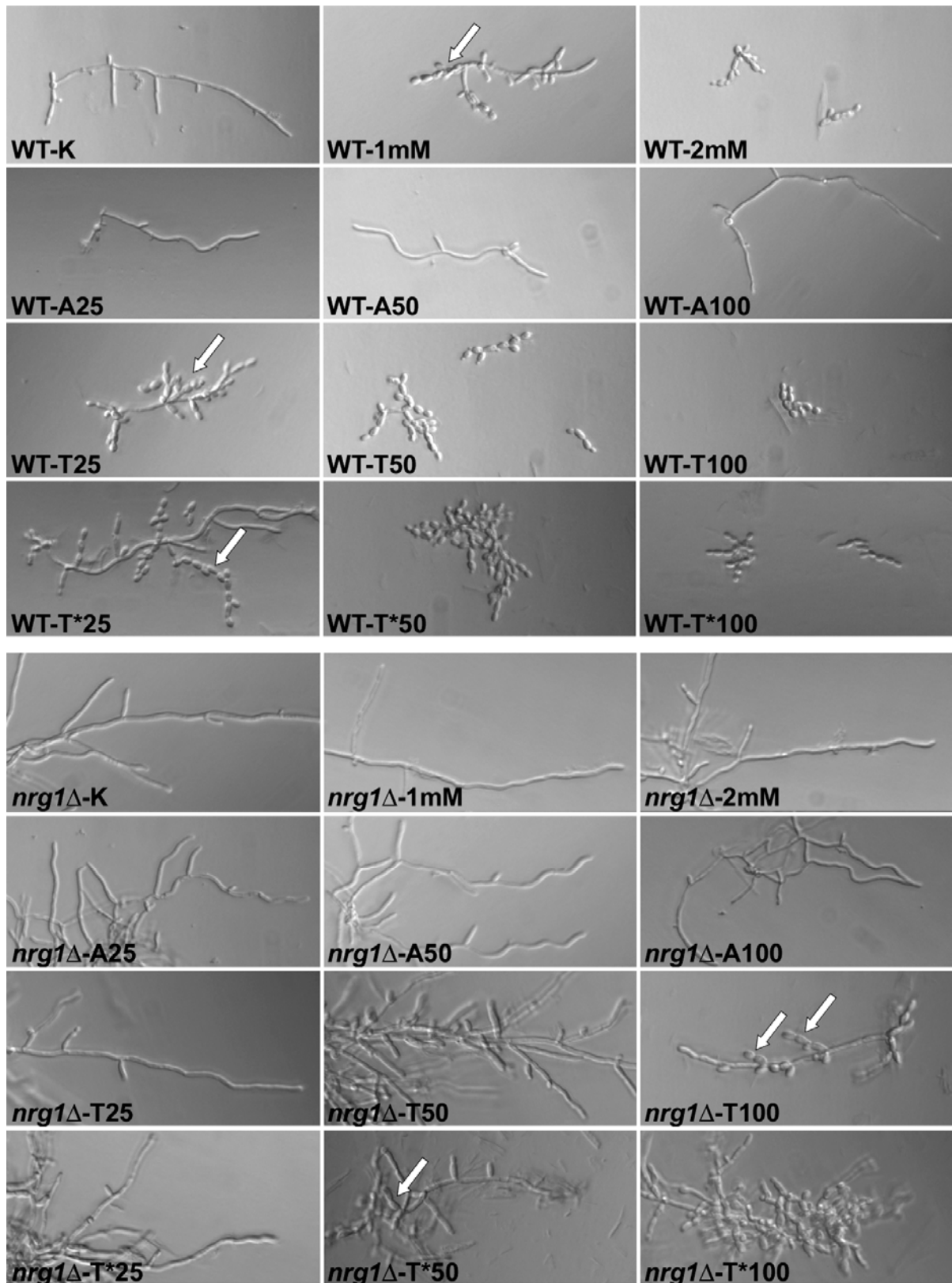
Der Grund für die Regulation von *UME6* ließ sich den Expressionsdaten nicht direkt entnehmen. Die Signaltransduktion zur Einleitung des Hyphenprogramms erfolgt hauptsächlich über Phosphorylierung, die sich im Transkriptionsprofil nicht erkennen läßt. Auch ist das Expressionsniveau der meisten Transkriptionsfaktoren generell so niedrig, dass Microarray-Daten nur wenig Rückschlüsse erlauben. Trotzdem zeigt sich bei einem Transkriptionsfaktor eine mögliche Regulation: *NRG1*, dessen Genprodukt eine reprimierende

Wirkung für hyphenassoziierte Gene hat, wird mit steigender Tryptopholkonzentration im Vergleich zur tryptopholfreien Kontrolle verstärkt transkribiert (Faktor 1,73× bei 1 mM und Faktor 2,47× bei 5 mM Tryptophol; Tabelle 3-9). Nrg1 wirkt zusammen mit Tup1, das seinerseits auch mit Rfg1 oder Mig1 interagieren kann, um die Expression von jeweils spezifischen Genen zu unterdrücken (Murad *et al.*, 2001a). Eine Steigerung der *TUP1*-mRNA um den Faktor zwei wurde in farnesolbehandelten *C. albicans* beschrieben (Kebaara *et al.*, 2008). Hier erreichte *TUP1* eine 1,5fach höhere Expression in 5 mM Tryptophol. Tabelle 3-9 faßt die Expression der wichtigsten Repressoren zusammen.

**Tabelle 3-9: Expression ausgewählter hyphenassoziiierter Gene von *C. albicans* nach vier Stunden in Tryptophol.** Expressionsniveau im Vergleich zur gemeinsamen Referenz (logarithmisches Hefenwachstum) für verschiedene Konzentrationen Tryptophol (0, 1 und 5 mM). Vergleich der Expressionsniveaus zur Kontrolle ohne Tryptophan in Vielfachen. Die Transkriptionsfaktorgene *TUP1* und *NRG1* werden leicht heraufreguliert, die Hyphenmarkergene *ECE1* und *HWP1* sehr stark herunterreguliert.

Gen	0 mM	1 mM	5 mM	1 mM / 0 mM	5 mM / 0 mM	Name
<b>Transkriptionsfaktorgene</b>						
orf19.610	1,27	1,06	0,77	0,83×	0,61×	<i>EFG1</i>
orf19.4318	1,15	0,87	1,39	0,76×	1,21×	<i>MIG1</i>
orf19.7150	0,33	0,57	0,82	1,73×	2,47×	<i>NRG1</i>
orf19.5558	0,59	0,70	0,58	1,19×	0,98×	<i>RBF1</i>
orf19.6109	0,71	0,84	1,08	1,18×	1,51×	<i>TUP1</i>
<b>Hyphenassoziierte Gene</b>						
orf19.3374	59,09	42,14	1,14	0,71×	0,02×	<i>ECE1</i>
orf19.1321	5,81	4,26	0,91	0,73×	0,16×	<i>HWP1</i>
orf19.4975	6,93	6,10	1,01	0,88×	0,15×	<i>HYR1</i>
orf19.1816	2,58	1,94	1,40	0,75×	0,54×	<i>ALS3</i>
orf19.7561	2,92	1,89	0,84	0,65×	0,29×	<i>EED1</i>

Um zu testen, ob diese Transkriptionsfaktoren tatsächlich mögliche Vermittler der tryptopholinduzierten Hyphenrepression darstellen, wurden Mutanten von *TUP1*, *NRG1* und *MIG1* mit 1 mM und 2 mM Tryptophol behandelt. Unter normalen Umständen bilden die *nrg1Δ*- und *tup1Δ*-Mutanten konstitutiv Filamente aus. Wie Nrg1 ist Mig1 ein Bindepartner von Tup1, und diente hier als Kontrolle, da er hauptsächlich Gene zur Nutzung von alternativen Kohlenstoffquellen reguliert und nicht – wie Nrg1 – hyphenassoziierte Gene.

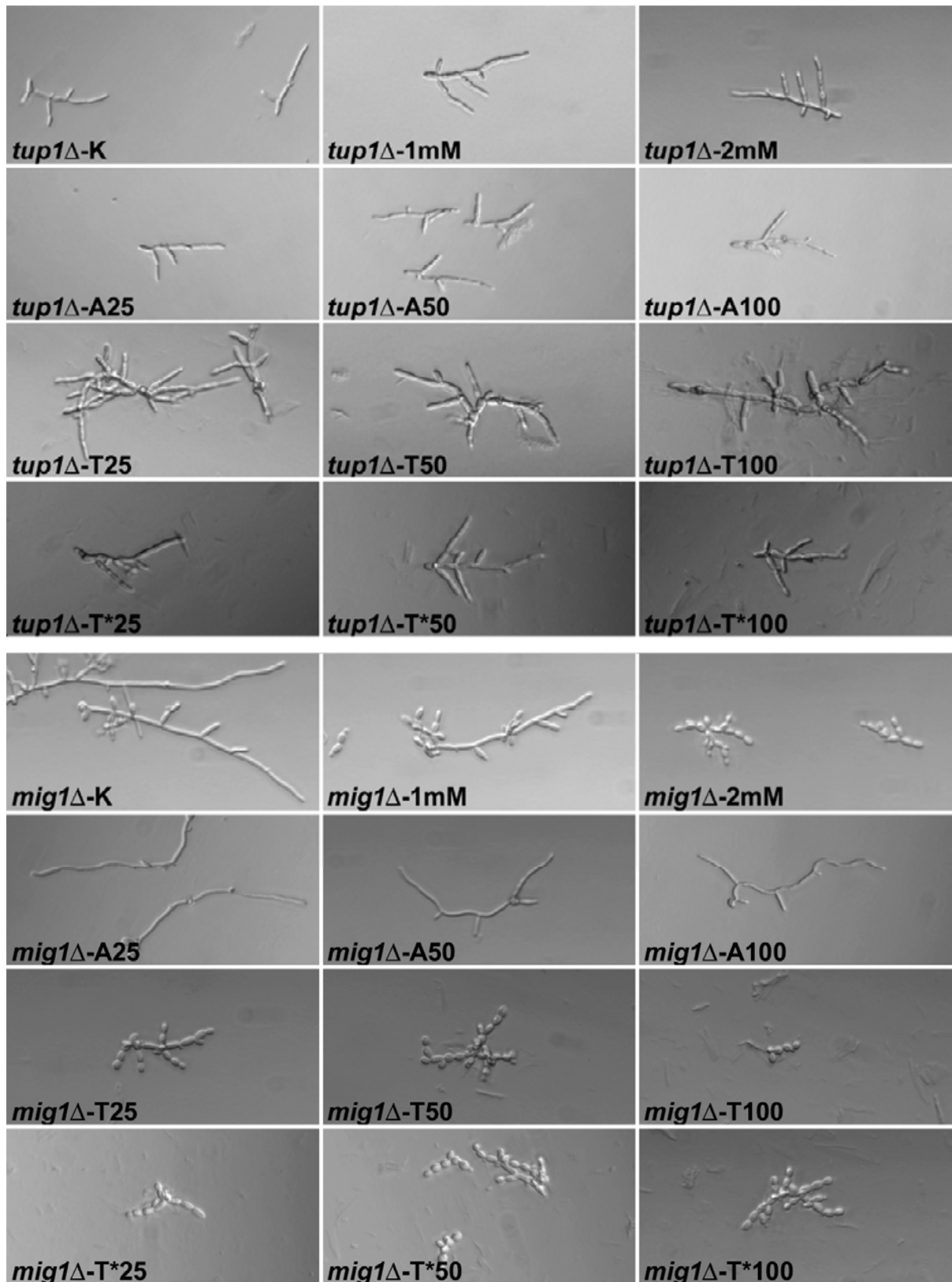


**Abbildung 3-46: Wirkung von Tryptophol und Pigment auf *C. albicans*.** Dargestellt sind die typischen Morphologien nach 6 Stunden Wachstum in induzierendem Medium ohne Zusätze (K), mit Tryptophol (1mM, 2mM), Überständen von Arginin (A)- und Tryptophan (T)-Kulturen von *C. glabrata* und Überständen von Tryptophan-Kulturen von *aro10Δ* (T\*), letztere jeweils in Verdünnungen von 25%, 50% und 100%. Die Filamentbildung des *C. albicans*-Wildtyp (WT) wurde mit Tryptophol und in pigmentierten Überständen stark unterdrückt. Die *nrg1Δ*-Mutante (*nrg1Δ*) wurde von Tryptophol nicht beeinflusst, aber durch hohe Konzentrationen Pigment, sowohl von *C. glabrata*-Wildtyp als auch *aro10Δ*-Mutante. Besonders *nrg1Δ*-T\*100 bestand zum überwiegenden Teil aus abgerundeten Zellen. Die Überstände der *C. glabrata*-Argininkulturen hatten keinen Einfluß auf die Morphologie. Die Pfeile markieren abgerundete Zellen in Bildern mit gemischten Morphologien.



Die Morphologie des *C. albicans*-Wildtyps wurde durch Tryptophol sehr stark beeinflusst, statt Hyphen bildeten die Zellen Pseudohyphen und Hefen (WT-1mM & -2mM). Die *nrg1Δ*-Mutante dagegen wuchs unter diesen Bedingungen weiter filamentös (Abbildung 3-46). Auch in Pigmentüberstand änderte sich die Morphologie des *C. albicans*-Wildtyp schon bei niedrigen Konzentrationen ab 25% (Abbildung 3-46, WT-T25 & -T\*25). Interessanterweise war davon aber auch die *nrg1Δ*-Mutante betroffen, und zwar sowohl in Wildtyp- als auch von *aro10Δ*-Mutanten-Überständen. Anders als bei hohen Tryptopholkonzentrationen (10 mM), wo das Wachstum der *nrg1Δ*-Mutante komplett zum Erliegen kam (nicht gezeigt), wuchs diese Mutante bei hohen Pigmentkonzentrationen mit stark abgerundeten Zelltypen. Der Effekt schien bei den tryptopholarmen Überständen der *aro10Δ*-Mutante sogar stärker ausgeprägt zu sein (Abbildung 3-46, *nrg1Δ*-T\*100). Auch konnte dieser Effekt nicht auf dem "verbrauchten" Medium basieren, denn der Überstand der in Arginin gewachsenen Kultur bewirkte keine morphologische Veränderung (Abbildung 3-46, WT-A100). Die Wirkung von Tryptophol ist also Nrg1-abhängig, und das Pigment enthält eine Substanz, die zusätzlich Nrg1-unabhängig das filamentöse Wachstum unterdrückt.

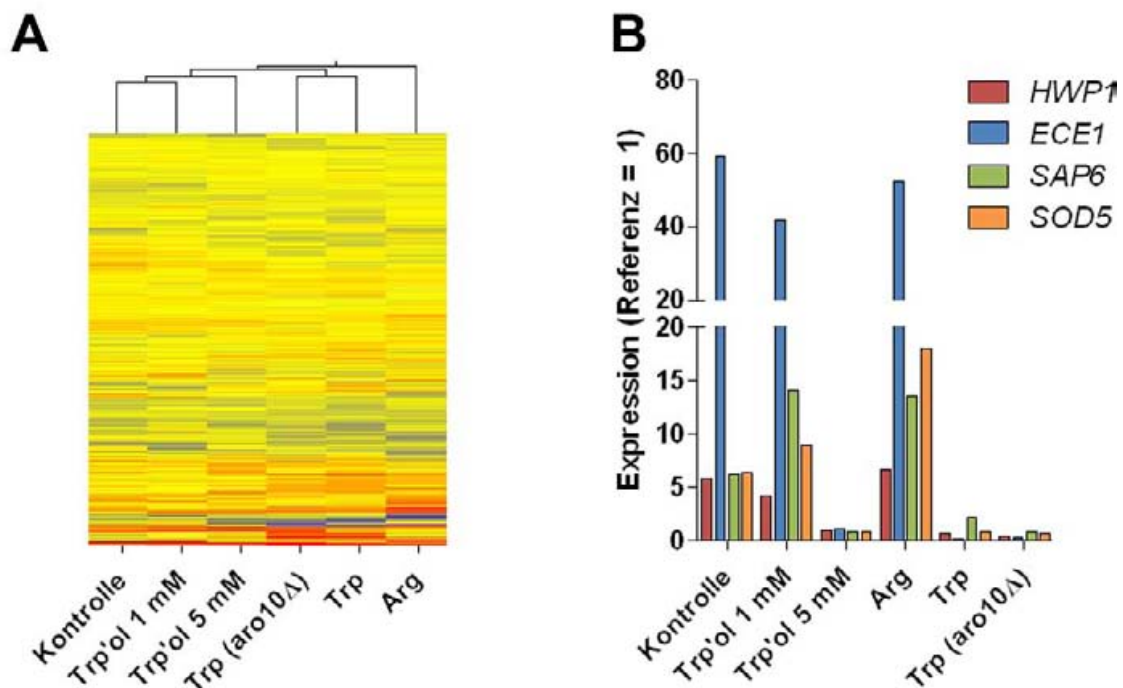
Mutanten mit einer Deletion des Hyphenrepressors Tup1 bildeten unter den getesteten Bedingungen pseudohyphenartige Filamente. Mit Tryptophol ließ sich dieser Phänotyp nicht beeinflussen, ähnlich wie bei *nrg1Δ* (Abbildung 3-47, *tup1Δ*-1mM & -2mM). Auch der Überstand des Pigments zeigte keine meßbare Wirkung, allenfalls eine leichte Verkürzung und Verdickung einiger Zellen im Filament war bei hohen Konzentrationen erkennbar (Abbildung 3-47, *tup1Δ*-T100 und -T\*100). Wieder hatte der Argininüberstand keinen Einfluß auf die Morphologie. Im Gegensatz dazu reagierte die Mutante *mig1Δ* identisch dem Wildtyp (Abbildung 3-47, *mig1Δ*). Sowohl Tryptophol als auch geringe Mengen pigmentierter Überstand, nicht aber der unpigmentierte Überstand, konnten die Hyphenbildung unterdrücken. Mig1 ist für die Repression also nicht essentiell, und die Rolle von Tup1 kann wegen der Morphologie nicht genau definiert werden.



**Abbildung 3-47: Wirkung von Tryptophol und Pigment auf *C. albicans* (II).** Dargestellt sind die typischen Morphologien nach 6 Stunden Wachstum in induzierendem Medium ohne Zusätze (K), mit Tryptophol (1mM, 2mM), Überständen von Arginin (A)- und Tryptophan (T)-Kulturen von *C. glabrata* und Überständen von Tryptophan-Kulturen von *aro10Δ* (T\*), letztere jeweils in Verdünnungen von 25%, 50% und 100% (vgl. Abbildung 3-46). Die Morphologie der *tup1Δ*-Mutante (*tup1Δ*) unterschied sich in allen getesteten Bedingungen nicht stark. Im Gegensatz dazu wurde die Hyphenbildung der *mig1Δ*-Mutante (*mig1Δ*) von Tryptophol und pigmentiertem Überstand von *C. glabrata*-Wildtyp und *aro10Δ*-Mutante stark reprimiert – identisch zum Verhalten des Wildtyps. Wie auch dort wirkte Arginin nicht auf die Morphologie der *mig1Δ*-Mutante.

### 3.4.3 Vergleich mit der Transkriptionsantwort auf Pigment

Das Vorhandensein von Tryptophol im Überstand pigmentierter *C. glabrata*-Kulturen konnte als eine mögliche Erklärung für die hyphenreprimierende Wirkung beim Wildtyp angesehen werden. Allerdings zeigte sich diese Repression auch mit dem Überstand von *aro10Δ*-Kulturen, die deutlich weniger Tryptophol enthielten als die Überstände des Wildtyps (Abschnitt 3.4.1.1). Deshalb wurden auch von pigmentexponierten *C. albicans*-Zellen eine Transkriptionsanalyse durchgeführt und die Daten mit denen der Tryptopholrepression verglichen. Es zeigte sich, dass auch *C. albicans*-Zellen, die pigmenthaltigen Überständen von *C. glabrata*-Wildtyp oder *aro10Δ* ausgesetzt wurden, trotz ansonsten hypheninduzierenden Bedingungen keine erhöhte Transkription der Hyphenmarkergene *HWP1*, *ECE1*, *SAP6* und *SOD5* aufwiesen (Abbildung 3-48B). Im Gegensatz dazu waren diese Gene bei der in Hyphenform wachsenden Kontrolle und mit Überständen einer *C. glabrata*-Argininkultur stark hochreguliert.



**Abbildung 3-48: Vergleich der Expressionmuster von *C. albicans* nach Anzucht in Tryptophol oder Pigmentüberstand.** (A) Hierarchische Clusteranalyse der Daten. Die Transkriptionsprofile von *C. albicans* in Überständen von *C. glabrata*-Wildtyp und *aro10Δ*-Mutante mit Tryptophanmedium (Trp) zeigten untereinander mehr Ähnlichkeit als in Überständen einer in Argininmedium (Arg) gewachsenen *C. glabrata*-Wildtypkultur. Zwischen *C. albicans* mit tryptopholhaltigem Überstand (Trp'ol) und mit Kulturüberstand von in Tryptophan gewachsenen *C. glabrata*-Kulturen war der Unterschied größer als innerhalb der Tryptophol-Versuche. (B) Ausgewählte Markergene für Hyphenwachstum zeigten eine deutliche Reduktion der Expression mit 5 mM Tryptophol und mit Überständen der Tryptophankulturen von Wildtyp und *aro10Δ*-Mutante. Im Gegensatz dazu wurden diese Gene mit 1 mM Tryptophol und im Überstand einer in Arginin gewachsenen Kultur weiter stark transkribiert, auf einem Niveau, das mit der Kontrolle vergleichbar war.

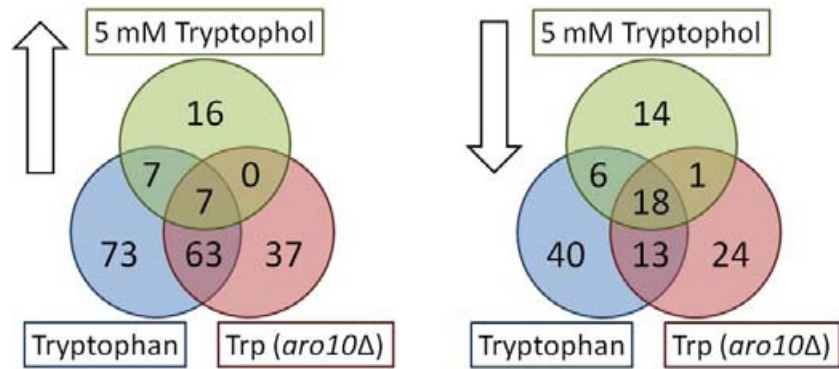


Abbildung 3-49: Venn-Diagramme der hoch- und herunterregulierten Gene in Tryptophol und Überstand von Tryptophankulturen von *C. glabrata*-Wildtyp und *aro10Δ*-Mutante. Hyphenassoziierte Gene finden sich hauptsächlich in der Schnittmenge aller herunterregulierten Gene, die gemeinsamen heraufregulierten Gene beider Tryptophanüberstände kodieren in größerer Zahl für Transporter.

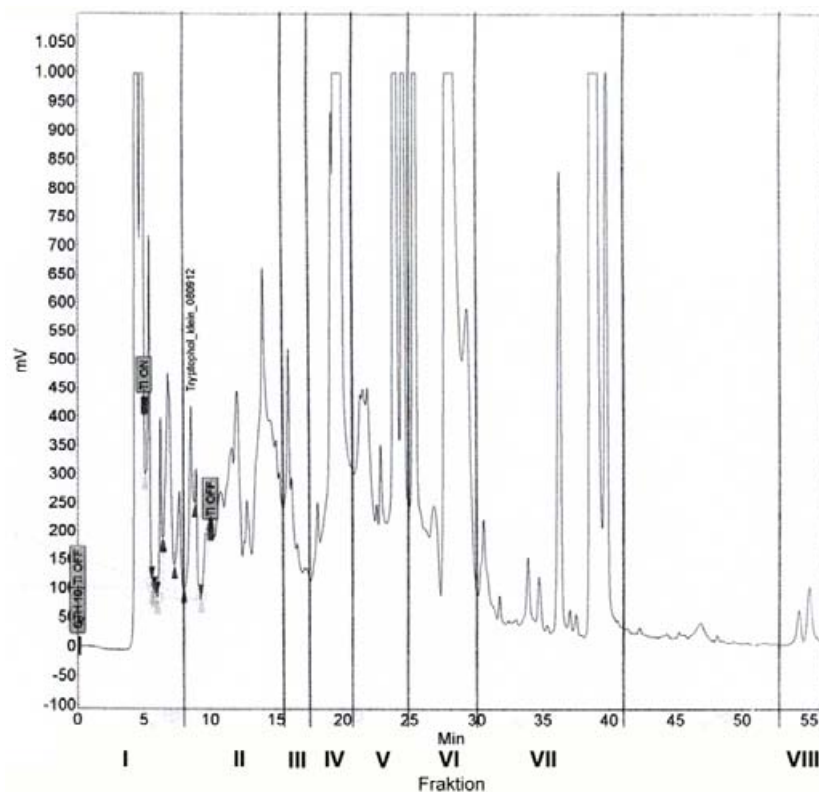
Die Transkriptionsprofile von *C. albicans* mit den beiden pigmentierten Kulturüberständen waren sich dabei ähnlich, und gemeinsam gruppierten sie in einer Clusteranalyse eher mit *C. albicans*-Zellen, die Tryptophol ausgesetzt wurden, als mit denen, die mit dem nicht-pigmentierten Überstand behandelt wurden (Abbildung 3-48A). Das zeigte sich auch deutlich in der Projektion der Expressionsdaten auf das Schema der Hypheninduktion in Abbildung 3-45. Hier reduzierte das Pigment von Mutante und Wildtyp wie Tryptophol hauptsächlich *UME6* und die von Ume6 abhängigen hyphenassoziierten Gene.

Für die weitere Analyse wurde jeweils die Genexpression mit der hyphenbildenden Kontrolle verglichen und als Grenzwert ein dreifacher Unterschied gesetzt. Die im Vergleich zur normal verlaufenden Hyphenbildung hoch- oder herunterregulierten Gene konnten so ermittelt werden. Von den Listen der Gene, die durch die Überstände der beiden Tryptophan-Kulturen reguliert wurden, wurden dann noch diejenigen Gene subtrahiert, die auch mit Argininüberständen reguliert waren. Ein Vergleich dieser spezifisch durch Pigment oder Tryptophol aktivierten oder reprimierten Gene über ein Venn-Diagramm (Abbildung 3-49) zeigte, dass die hyphenassoziierten Gene hauptsächlich in der gemeinsamen Schnittmenge der mit 5 mM Tryptophol, Wildtyp- und Mutanten-Tryptophankultur herunterregulierten Genlisten zu finden sind (4 der 7 Gene mit der entsprechenden GO-Annotation). Für diese Gene war also kein Unterschied zwischen den tryptopholhaltigen Bedingungen und dem tryptopholarmen Mutantenüberstand auszumachen, bei beiden wurde die Expression wie mit Tryptophol stark unterdrückt.

Gemeinsam war den Expressionsmustern in pigmenthaltigen Überständen (im Gegensatz zu Tryptophol) eine erhöhte Transkription verschiedener Transportergene (7/63) und von Genen des Lipidmetabolismus (8/63). Zusätzlich zeigte sich im direkten Vergleich zwischen

den pigmentierten Überständen von *aro10Δ* und dem Wildtyp unter den hochregulierten Genen eine signifikante Anreicherung von Transportergenen und Aminosäurepermeasegenen im *aro10Δ*-Überstand (19 von 51 Genen mit 3× höherer Expression). Aber auch in den hochregulierten Genen im Wildtypüberstand waren Gene dieser Kategorien angereichert (5 von 30), darunter eines für den *Multidrug*-Transporter *Cdr1* (Prasad *et al.*, 1995).

Daraus ließen sich mehrere Schlußfolgerungen ableiten. Zum einen ist die potentielle toxische Wirkung von Tryptophol nicht allein für die Hyphenrepression verantwortlich (vgl. auch Abschnitt 3.4.2). Die tryptophol- und überstandbehandelten *C. albicans* zeigten immer noch Wachstum und ihr Transkriptionsprofil ähnelte dem Hefewachstum, mit wenig Stressantwort. Die erhöhte Transkription von Aminosäuretransportergenen deutet auf Stickstoffmangel in Gegenwart der schlechten Stickstoffquelle Tryptophan und möglicherweise auf einen Transport von Pigmentbestandteilen aus den *C. albicans*-Zellen hin. Das hyphenassoziierte Transkriptionsprogramm von *C. albicans* war reprimiert, was nicht nur auf die Wirkung des Tryptophols zurückgeführt werden kann. Denn auch der Überstand der *aro10Δ*-Mutante mit ihrer geringen Tryptopholmenge löste eine sehr ähnliche Transkriptionsantwort aus. Auch dies deutete auf mindestens eine weitere Substanz im Überstand von pigmentierten *C. glabrata*-Zellen hin, die das Hyphenwachstum von *C. albicans* unterdrücken kann.

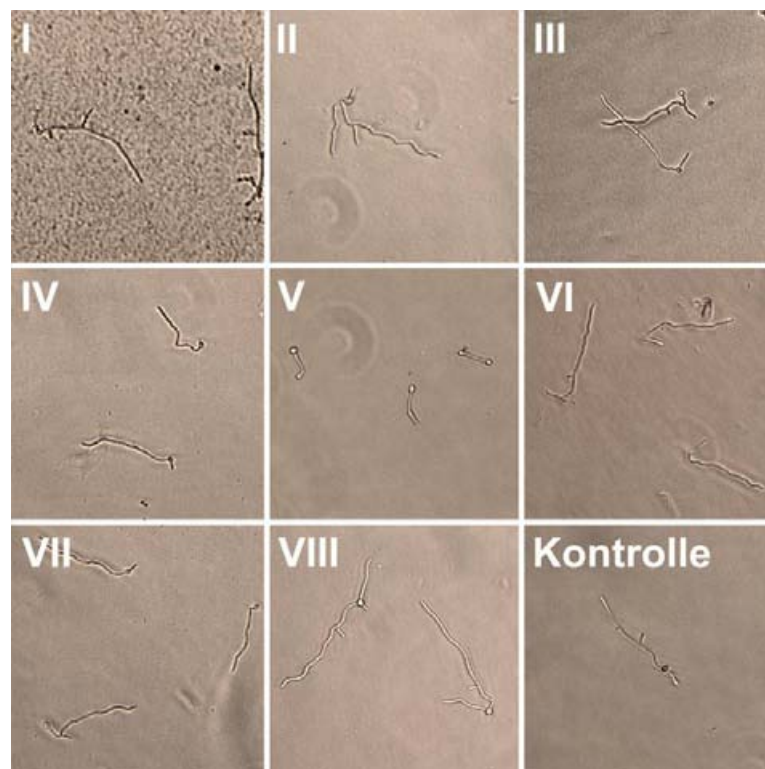


**Abbildung 3-50: HPLC-Chromatogramm des pigmentierten Überstands des *C. glabrata*-Wildtyps.** Das Pigment setzt sich aus einer Vielzahl von Verbindungen zusammen, die hier über eine präparative HPLC in einzelne Fraktionen unterteilt wurde. Die in den weiteren Versuchen verwendeten Fraktionen I-VIII sind eingetragen (vgl. Abbildung 3-52 und Abbildung 3-51).

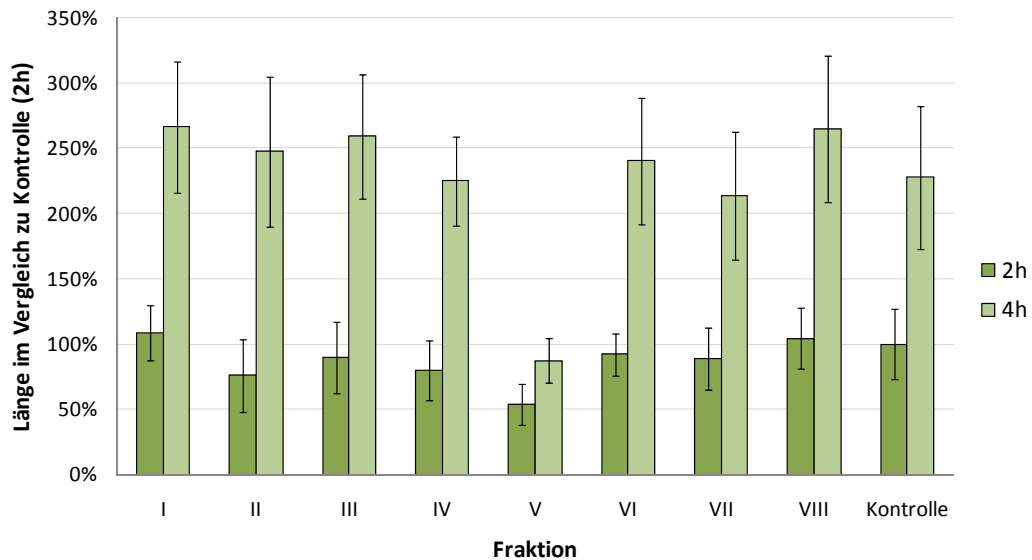
### 3.4.4 Fraktionierung des pigmenthaltigen Überstandes

Das wahrscheinlich strukturell sehr ähnliche Pigment von *Malassezia furfur* besteht aus einer Vielzahl von Indolderivaten (Mayser et al., 1998, Mayser et al., 2007), es handelt sich also um ein Gemisch unterschiedlichster Substanzen und dem Hauptprodukt des Tryptophanabbaus, Tryptophol, in hoher Konzentration (Abschnitt 3.4.1.1). Um weiter zu definieren, welche Verbindungen für die Hyphenrepression verantwortlich sind, wurde das Pigment mittels einer quantitativen HPLC in einzelne Fraktionen aufgeteilt (Abbildung 3-50) und diese auf ihre hyphenreprimierende Wirkung in serumhaltigem Medium getestet. In Abbildung 3-51 sind typische Beispiele für die Hyphenbildung von *C. albicans* nach Zugabe von verschiedenen Pigmentfraktionen gezeigt. Für eine genauere Quantifizierung wurden die Hyphenlängen nach 2 und 4 Stunden bestimmt und mit der Länge der *C. albicans*-Hyphen aus der Kontrolle ohne Pigment verglichen.

Nach zwei Stunden Wachstum in hypheninduzierendem Medium waren erste signifikante Unterschiede zu erkennen (Abbildung 3-52), besonders bei Fraktion V ( $54\pm 15\%$  Hyphenlänge der Kontrolle), aber auch bei den Fraktionen II ( $76\pm 28\%$ ) und IV ( $80\pm 23\%$ ). Deutlich ausgeprägt waren die Unterschiede nach vier Stunden Wachstum. Mit Fraktion V



**Abbildung 3-51: Hyphenbildung von *C. albicans* mit verschiedenen HPLC-Fraktionen des Pigments (I-VIII).** Eine deutliche Reduktion der Hyphenbildung nach vier Stunden Inkubation mit 10% Serum war nur in der Fraktion V zu erkennen. In dieser Fraktion zeigten die Keimschläuche auch eine auffällige Verdickung an ihrem Ende. Als Kontrolle diente Medium ohne Pigment.



**Abbildung 3-52: Hyphenlängen von *C. albicans* in Serum nach Behandlung mit unterschiedlichen Fraktionen des pigmenthaltigen Überstands von *C. glabrata*.** Dargestellt ist die Hyphenlänge nach 2 und 4 Stunden im Vergleich zu 2 Stunden pigmentfreiem Wachstum ("Kontrolle"). Nur in der Fraktion V zeigte sich eine starke Reduktion der Filamentlänge.

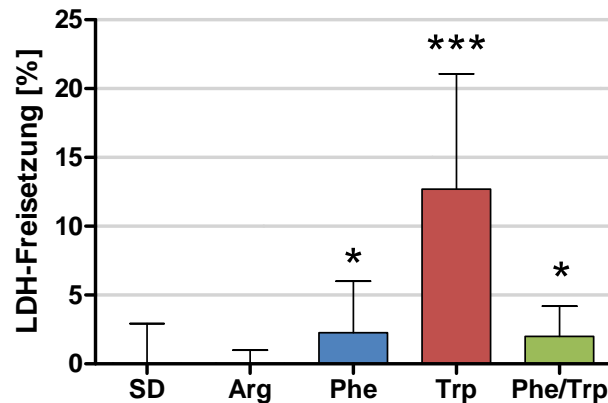
behandelte Zellen erreichten nur 87% der Referenzlänge (zwei Stunden Wachstum ohne Pigment), beziehungsweise  $38 \pm 7\%$  der Kontrolle nach vier Stunden. Die hypheninhibierende Aktivität des Pigments war also in Fraktion V zu finden. Interessanterweise fand sich in der HPLC der charakteristische Peak für Tryptophol in Fraktion II, also nicht in der reprimierenden Fraktion. In dieser Fraktion befand sich also die bislang nicht charakterisierte Substanz, die neben Tryptophol für die Repression der Hyphen von *C. albicans* durch das Pigment verantwortlich ist.

### 3.5 Biologische Wirkung auf Wirtszellinteraktion

Nach den Effekten auf den mit *C. glabrata* gemeinsam auftretenden Pilz *C. albicans* wurde auch die Wirkung auf Wirtszellen untersucht. Hierfür wurden in verschiedenen Infektionsmodellen pigmentierte und nicht pigmentierte *C. glabrata*-Zellen eingesetzt, um Hinweise auf eine mögliche Rolle des Pigments in der Pathogenese zu erhalten.

#### 3.5.1 Schädigung von Epithelzellen durch pigmentierte *C. glabrata*

Obwohl *C. glabrata* *in vivo* schwere Infektionen verursachen kann, schädigt es im Gegensatz zu *C. albicans* humane Epithelzellen *in vitro* kaum (Li & Dongari-Bagtzoglou, 2007). Um



**Abbildung 3-53: Schädigung von Epithelzellen durch *C. glabrata* nach verschiedenen Anzuchtbedingungen.** Die Messung der LDH-Aktivität im Überstand als Maß der Zellschädigung erfolgte nach 24 Stunden Koinkubation mit TR146-Epithelzellen. Verglichen wurde jeweils mit der LDH-Aktivität nach vollständiger Lyse der Epithelzellen (100%). In Tryptophan (Trp) angezogene, pigmentierte *C. glabrata* schädigten Epithelzellen signifikant stärker als nicht pigmentierte. Bei Anzucht von *C. glabrata* auf Phenylalanin (Phe) und einem Gemisch von Phenylalanin und Tryptophan (Phe/Trp), das zu nahezu keiner Pigmentbildung führte, war eine sehr geringe Zellschädigung meßbar, mit Ammoniumsulfat (SD) und Arginin als Stickstoffquelle war keine LDH-Freisetzung meßbar. Signifikanzniveaus \* ( $p < 0,05$ ) und \*\*\* ( $p < 0,001$ ).

festzustellen, ob die Pigmentproduktion einen Einfluß auf die Schädigung von humanen Epithelzellen hat, wurde ein *Monolayer* der Zelllinie TR146 mit *C. glabrata* aus verschiedenen Wachstumsbedingungen infiziert. Die Zellschädigung wurde dabei anhand der Aktivität des von zerstörten Zellen freigesetzten Enzyms Laktatdehydrogenase (LDH) gemessen (Abbildung 3-53). Als Maximalwert (100%) dienten chemisch vollständig lysierte Epithelzellen.

Bei der Kontrolle, auf SD-Medium mit Ammoniumsulfat gewachsenen *C. glabrata*-Zellen, zeigte sich keine meßbare Schädigung der Epithelzellen nach 24 Stunden ( $-0,5 \pm 3,4\%$  LDH-Aktivität). Dieses Ergebnis steht im Einklang mit den Daten von Li *et al.* nach Anzucht in Vollmedium (Li & Dongari-Bagtzoglou, 2007). Dagegen lag die Schädigung bei pigmentierten, auf tryptophanhaltigem Medium angezogenen Hefen bei  $12,7 \pm 8,4\%$  des Maximalwerts – eine signifikante Steigerung ( $p = 6 \cdot 10^{-8}$ ). Nichtpigmentierte *C. glabrata*-Zellen waren nur zu sehr wenig Zellschädigung in der Lage, nach Anzucht auf Argininmedium betrug die LDH-Aktivität  $-2,3 \pm 3,3\%$  ( $p = 0,1$ ) und auf Phenylalaninmedium  $2,3 \pm 3,7\%$  ( $p = 0,02$ ). Auch nach Wachstum auf einem Gemisch aus Tryptophan und Phenylalanin (jeweils 7,5 mM), bei dem ebenfalls kein sichtbares Pigment gebildet wird, schädigte *C. glabrata* die Epithelzellen nur schwach ( $2,0 \pm 2,2\%$ ) und nicht signifikant mehr als mit Phenylalanin allein ( $p = 0,8$ ). Die Zellschädigung basiert also nicht allein auf dem Wachstum in Gegenwart von Tryptophan, sondern scheint die Pigmentsynthese zu erfordern.

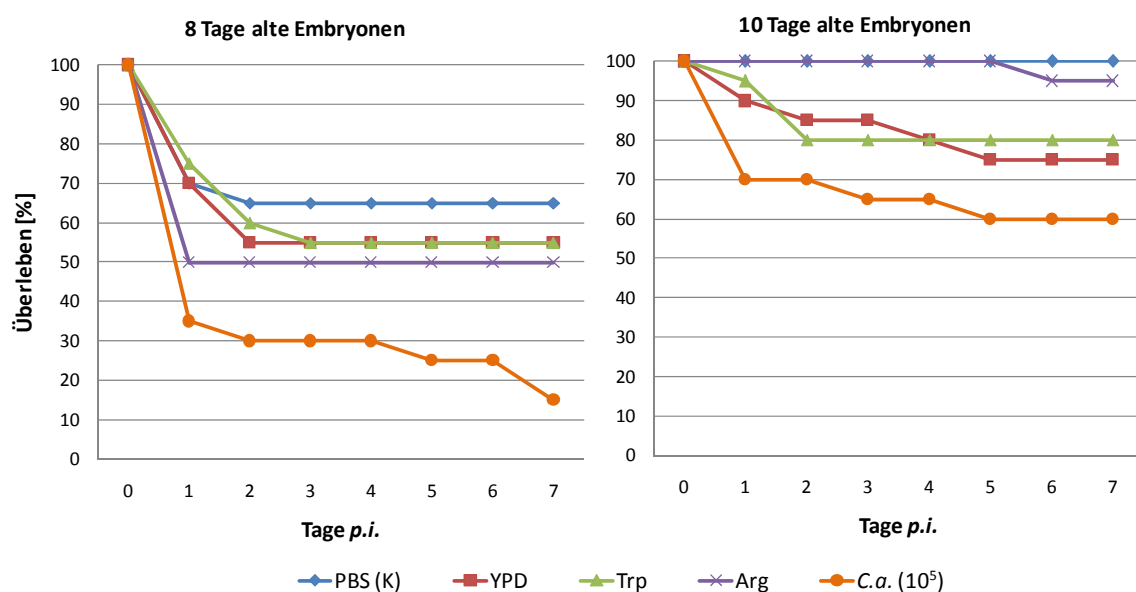


### 3.5.2 Keine meßbare Wirkung im Eierinfektionsmodell

Um zu testen, inwieweit die erhöhte Schädigung *in vitro* auch auf die Situation *in vivo* zutrifft, wurden pigmentierte und nichtpigmentierte *C. glabrata*-Hefen in einem Infektionsmodell getestet. Hierzu wurde ein neu etabliertes Eiermodell verwendet, in dem Hühnerembryonen *in ovo* mit dem Pilz infiziert werden und das Überleben der Embryonen bestimmt wird (I. Jacobsen, unveröffentlichte Daten).

Ähnlich wie im Mausinfektionsmodell (Atkinson *et al.*, 1995, Brieland *et al.*, 2001, Kaur *et al.*, 2007) zeigt *C. glabrata* in diesem System eine sehr geringe Virulenz (I. Jacobsen, unveröffentlichte Daten). Es sollte daher getestet werden, ob die Virulenz ähnlich wie beim Epithelzellmodell (Abschnitt 3.5.1) durch Pigmentierung gesteigert werden kann. Für den Versuch wurden acht und zehn Tage alte Hühnerembryonen mit  $10^7$  Hefen infiziert und täglich auf Überleben geprüft. Das Alter der Embryonen richtete sich dabei nach den Erfahrungswerten bei *C. albicans*-Infektionen, die bei acht Tage alte Embryonen zu einem schnelleren Absterben führen als bei zehn Tage alten (vgl. Abbildung 3-54).

Zwischen den pigmentierten und den unpigmentierten *C. glabrata*-Zellen gab es keinen meßbaren Unterschied im Überleben der Hühnerembryonen (Abbildung 3-54). Das traf sowohl auf mit Minimalmedium mit Arginin als auch auf mit Vollmedium angezogene Hefen zu. Ebenso ließ sich kein Unterschied zwischen der Kontrollgruppe, die mit reinem PBS scheininfiziert wurde, und den *C. glabrata*-Infektionsgruppen feststellen. Zum Vergleich ist



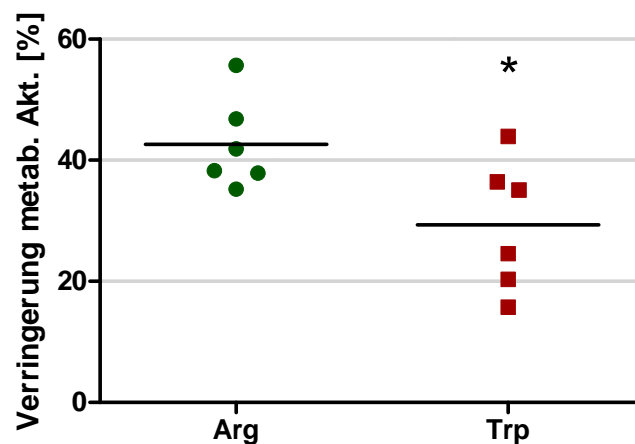
**Abbildung 3-54: Überlebende Hühnerembryonen nach Infektion mit  $10^7$  *C. glabrata*.** Infektion von 8 bzw. 10 Tage alten Embryonen mit *C. glabrata*-Zellen aus Vollmedium (YPD), Minimalmedium mit Arginin (Arg) und mit Tryptophan (Trp). Als Kontrolle (K) diente PBS ohne Hefen, als Vergleich eine *C. albicans*-Infektion (mit  $10^5$  Zellen) aus einem anderen Versuch. Die Infektion mit *C. glabrata* zeigte unter keiner Wachstumsbedingung einen signifikanten Unterschied zur PBS-Kontrolle.

in Abbildung 3-54 auch der typische Verlauf einer *C. albicans*-Infektion in diesem Modell dargestellt (I. Jacobsen, unveröffentlichte Daten). Trotz der hundertfach geringeren Infektionsdosis starben dabei deutlich mehr Embryonen ab. Die Pigmentierung durch Anzucht auf tryptophanhaltigem Medium führte also zu keiner erhöhten Virulenz im embryonierten Hühnereimodell der *C. glabrata*-Infektion.

### 3.5.3 Schutz von pigmentierten *C. glabrata* bei Koinkubation mit Neutrophilen

Der erhöhte Schutz vor Wasserstoffperoxid bei pigmentierten *C. glabrata*-Hefen (Abschnitt 3.3.1) deutete auf eine mögliche Schutzwirkung gegen die reaktiven Sauerstoffspezies der Immuneffektorzellen hin. Deshalb wurden pigmentierte und nichtpigmentierte *C. glabrata*-Zellen mit Immunzellen koinkubiert und das Überleben der Pilze gemessen. Als Modell wurden dabei aus menschlichem Blut isolierte polymorphonucleäre Granulocyten gewählt. Diese bestehen zum größten Teil (87% – (Fradin et al., 2005)) aus neutrophilen Granulocyten und werden deshalb im weiteren kurz als Neutrophile bezeichnet. Neutrophile phagozytieren *C. glabrata* wie *C. albicans* effektiv *in vitro* (Lyman & Walsh, 1994) und diese Aufnahme führt in den Immunzellen zur Auslösung des *oxidative bursts* (Kowanko et al., 1991) und so zum Abtöten der Pilzzellen.

Pigmentierte und nichtpigmentierte *C. glabrata*-Zellen wurden mit humanen Neutrophilen aus Spenderblut inkubiert und danach als Maß für die Schädigung der Pilze die metabolische Aktivität der Hefezellen über eine XTT-abhängige Messung quantifiziert. Als Kontrolle



**Abbildung 3-55: Neutrophile schädigten pigmentierte *C. glabrata*-Zellen weniger als nichtpigmentierte.** Gemessen wurde die Reduktion der metabolischen Aktivität nach einer Stunde Koinkubation mit Neutrophilen. Die Vorkultur erfolgte auf Medium mit Arginin oder Tryptophan. Pigmentierte *C. glabrata* (Trp) wurden weniger geschädigt als nichtpigmentierte (Arg). Kreise und Quadrata entsprechen einzelnen Versuchen, der Mittelwert ist als Linie eingetragen. \* Signifikant nach Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test mit Signifikanzniveau 0,05. n=6.

dienten in neutrophilenfreiem Medium inkubierte *C. glabrata*. Nach einer einstündigen Koinkubation war bei den nichtpigmentierten Hefen die metabolische Aktivität bereits um  $43\pm 8\%$  gesunken, während es bei den pigmentierten, auf Tryptophan gewachsenen nur  $29\pm 11\%$  waren (Abbildung 3-55). Dieser Unterschied im Vermögen der Neutrophilen, die Hefen effektiv zu schädigen, betrug damit fast ein Drittel. Der Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test ergab ein Signifikanzniveau von  $p=0,05$  für den Unterschied zwischen den beiden Kulturbedingungen. Die Pigmentierung konnte also die Schädigung von Hefen durch Neutrophile signifikant verringern.

#### 4 Diskussion

---

*Candida glabrata* wird im allgemeinen als ein Pilz mit weißlichen bis cremefarbenen Kolonien beschrieben (Odds, 1988). Zwar existieren die sogenannten *brown*- und *dark brown*-Phänotypen, die als Ausprägungen des *switching*-Systems von *C. glabrata* beschrieben wurden (Lachke et al., 2000, Lachke et al., 2002) – dabei handelt es sich allerdings nicht um ein Pigment, sondern um eine Braunfärbung, die auf der Reduzierung von Kupfer auf kupfersulfathaltigen Testplatten basiert. Die dafür nötige erhöhte Expression von Metallothionin und anderen Genen des Kupferentgiftungssystems ist bereits gut untersucht (Lachke et al., 2000, Srikantha et al., 2005). Analoges gilt für die rosa-violette Färbung von *C. glabrata*-Kolonien auf *CHROMagar Candida*, die durch Zusatz von chromogenen Substanzen ausgelöst wird und als wichtiges diagnostisches Werkzeug eingesetzt wird (Odds & Bernaerts, 1994). Eine Pigmentbildung, die nicht auf solchen chromogenen Substraten basiert, sondern auf der Umsetzung der Aminosäure Tryptophan, wurde erstmals von Mayser *et al.* beschrieben (Mayser et al., 2007). Das Pigment findet sich nach der Synthese sowohl im Kulturüberstand als mit den Hefezellen assoziiert.

Der Weg der Pigmentsynthese von *C. glabrata* war bei Beginn dieser Arbeit völlig unbekannt. Das tryptophanabhängige Pigment wurde zwar zuvor als strukturell ähnlich zu dem Pigment von *M. furfur* beschrieben (Mayser et al., 2007), der Biosyntheseweg oder die Funktion des Pigments konnte aber bis dato weder für *M. furfur* noch für *C. glabrata* entschlüsselt werden.

In der vorliegenden Arbeit sollte deshalb versucht werden, die Biosynthese des Pigments zu charakterisieren und über den Einsatz von Transkriptionsanalysen und einer Mutantenbank molekularbiologisch zu analysieren. Über gezielte Deletionsmutanten sollten die identifizierten Gene weiter charakterisiert werden und mögliche Hinweise auf die biologische Funktion der Pigmentsynthese gewonnen werden.

#### 4.1 Bedingungen der Pigmentsynthese

---

Zuerst galt es, die Bedingungen zu charakterisieren, unter denen das Pigment gebildet wird. Die Experimente in Abschnitt 3.1 zeigen, dass die Biosynthese von diversen Faktoren beeinflusst wird. Hier werden diese Faktoren noch einmal zusammengefaßt, bevor sie im weiteren zusammen mit den molekularbiologischen Erkenntnissen zur Synthese diskutiert werden.

Dass die Anwesenheit von Tryptophan eine absolute Notwendigkeit darstellt, haben zuvor die Experimente von Mayser *et al.* an *M. furfur* und *C. glabrata* gezeigt (Mayser *et al.*, 1998, Mayser *et al.*, 2007). Bei *C. glabrata* wird das Pigment schon mit Konzentrationen von ca. 1 mM Tryptophan in halbmaximaler Menge gebildet (Abschnitt 3.1.7). Dieser Wert ist vergleichbar mit den Mengen, die bei *M. furfur* benötigt werden (Mayser *et al.*, 1998).

Die Bildung des Pigments erfolgt dabei zweistufig. Die erste Stufe verläuft parallel zum Wachstum in geeignetem Induktionsmedium mit Tryptophan (Abschnitt 3.1.1). Die zweite Stufe findet auch unabhängig von der Anwesenheit der Hefen innerhalb mehrerer Stunden im Überstand statt, erfordert aber Sauerstoff (Abschnitt 3.1.2).

Die inhibierende Wirkung von anderen Stickstoffquellen, die zusätzlich zum Tryptophan zum Induktionsmedium gegeben werden, ist für *M. furfur* nur teilweise untersucht (Mayser *et al.*, 1998) und konnte hier für die proteinogenen Aminosäuren für *C. glabrata* ausführlicher beschrieben werden. Alle alternativen Stickstoffquellen reduzieren die Pigmentbildung von einer nahezu vollständigen Inhibition (durch Ammoniumsulfat oder Arginin) bis zu einer nur geringen Hemmung, beispielsweise durch Tyrosin (Abschnitt 3.1.3). Es ließ sich dabei aber kein eindeutiger Zusammenhang zwischen der Minderung der Pigmentbildung und der Art der Aminosäure – aromatisch, polar, apolar – oder auch der Wachstumsrate von *C. glabrata* mit dieser Aminosäure finden.

Ein weiterer wichtiger Faktor ist die Anwesenheit von Glukose, da mit alternativen nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquellen wie Acetat oder Glycerin die Pigmentbildung stark reduziert ist (Abschnitt 3.1.6). Wachstum selbst spielt dabei keine Rolle, auch auxotrophe Mutanten, die in dem pigmentinduzierenden Medium nicht wachsen konnten, produzierten die maximale Menge Pigment (Abschnitt 3.1.5).

Interessanterweise wird die Synthese des Pigments auch durch eine hohe initiale Zelldichte reduziert. Wird das Induktionsmedium mit großen Zellzahlen beimpft, findet sich nach der Inkubationszeit weniger Pigment im Überstand. Das scheint im Gegensatz zu *M. furfur* zu stehen, bei dem das Pigment auch mit hohen Animpfdichten gebildet wird (Hort et al., 2008a). Zwei Erklärungen kommen für die Inhibition in Betracht: Durch die hohe Zelldichte könnte die Glukose oder das Tryptophan im Medium schnell verbraucht und somit die weitere Pigmentsynthese unterdrückt worden sein. Alternativ könnte die Synthese des Pigments auch durch einen *Quorum-sensing*-Effekt behindert werden. Der umgekehrte Fall, die Aktivierung von Pigmentbildung durch *Quorum sensing*, ist beispielsweise bei gramnegativen Bakterien der Gattung *Serratia* (Thomson et al., 2000) oder dem phytopathogenen Enterobakterium *Brenneria rubrifaciens* (McClellan & Kluepfel, 2009) bekannt. Auch bei Pilzen beeinflusst *Quorum sensing* wichtige physiologische und morphologische Prozesse. Ein bekanntes Beispiel ist die Hyphenbildung von *C. albicans*, die durch hohe Zelldichten unterbunden werden kann (Odds, 1988, Hornby et al., 2001), und auf die in Abschnitt 4.4.2 weiter eingegangen wird.

## 4.2 Modell der Pigmentsynthese

---

Die Ergebnisse dieser Arbeit erlauben es, ein erstes Modell der Pigmentsynthese des Ascomyceten *C. glabrata* zu entwerfen. Dieses Modell steht im Einklang mit jüngsten Ergebnissen bei den Basidiomyceten *M. furfur* (Hort et al., 2008b) und *Ustilago maydis* (Zuther et al., 2008), die beide strukturell sehr ähnliche Pigmente synthetisieren. Zusammen können diese Daten dazu beitragen, die offensichtlich weit verbreitete und konservierte Pigmentsynthese in Gegenwart von Tryptophan zu erhellen.

Der Stoffwechselweg des Pigments bei *C. glabrata* und *M. furfur* war zu Beginn dieser Arbeit völlig unbekannt. Frühere Versuche, die an der Pigmentsynthese beteiligten Gene bei *M. furfur* über einen cDNA-Subtraktionsansatz zu finden, führten zwar zu einer Liste mit

möglicherweise beteiligten Proteinen (Brunke, 2004, Hort et al., 2008a), jedoch sind bei diesem Pilz die für den weiteren Nachweis nötigen molekularbiologischen Methoden nicht verfügbar (Brunke & Hube, 2006, Hort et al., 2008b). Im Gegensatz dazu bot sich *C. glabrata* als Modellorganismus zur Erforschung der Pigmentsynthese an, da dieser Pilz eng mit der Bäckerhefe verwandt ist, wodurch sowohl viele molekularbiologische Methoden als auch die weitreichende Annotation des Hefegenoms (SGD project) genutzt werden konnte. Zusätzlich ist auch das Genom von *C. glabrata* selbst bereits sequenziert und zu großen Teilen annotiert (Dujon et al., 2004, Sherman et al., 2009).

#### 4.2.1 Technische Aspekte

---

Für die Analyse des Synthesewegs wurden zwei unabhängige Verfahren eingesetzt. Zum einen war dies die Durchmusterung einer Bibliothek von zufälligen Insertionsmutanten (Castaño et al., 2003) mit einem einfachen Ausleseparameter – der Bildung von Pigment auf induzierendem Medium. Solche Mutantenbanken wurden mit jeweils anderen Fragestellungen bei *C. glabrata* (De Las Penas et al., 2003, Kaur et al., 2004, Tsai et al., 2004) und anderen Pilzen (de Jesus Ferreira et al., 2001, Suzuki et al., 2003, Lopez-Berges et al., 2009) bereits mehrfach erfolgreich angewandt. Auch in dieser Arbeit konnten verschiedene Insertionsmutanten gefunden werden, die einen relevanten Phänotyp zeigten.

Etwa jede 120. getestete Mutante (insgesamt 140) konnte auf Tryptophan als einziger Stickstoffquelle nicht wachsen. Bei *S. cerevisiae* sind etwa 60 Gene im Genom vorhanden, die für die verschiedenen Aminosäureprototrophien (ausgenommen Tryptophan) – und somit für das Wachstum auf dem Testmedium – notwendig sind (SGD project). Wenn man diese Zahl auf die derzeit bekannten 5202 Gene von *C. glabrata* (Sherman et al., 2009) bezieht, wäre eine Rate von einer auxotrophen Mutante in etwa 90 Klonen zu erwarten gewesen, oder insgesamt 190 statt der gefundenen 140 Mutanten. Die geringe Abweichung deutet darauf hin, dass die untersuchten Insertionsmutanten zufällig verteilt waren. Dies steht im Einklang mit der Beschreibung durch die Ersteller dieser Bank (Castaño et al., 2003).

Ein Problem bei der Verwendung der Transposonbank für die Fragestellung dieser Arbeit wird deutlich, wenn man die tatsächlich an der Pigmentsynthese involvierten Gene betrachtet. Die gezielt hergestellte Mutante *aro8Δ* zeigte eine deutliche Verringerung der Pigmentproduktion (Abschnitt 3.2.4.3). Eine Mutante mit einer Transposoninsertion im

korrespondierenden Gen wurde aber nicht in der Mutantenbibliothek gefunden. Der Grund ist sehr wahrscheinlich, dass diese Mutante mit Tryptophan als einziger Stickstoffquelle nicht wachsen kann und eine solche Vermischung von primären Metabolismus und Pigmentierung nicht im Verfahren berücksichtigt wurde.

#### 4.2.2 Die Rolle von Aro8

---

Zwei unabhängige Befunde aus den beiden verwendeten Screening-Systemen deuteten auf eine Schlüsselrolle von Aro8 und führten zu der Entscheidung, eine Deletionsmutante *aro8Δ* herzustellen. Zum einen wurde mit der Mutantenbibliothek ein Gen (*ARO10*) gefunden, dessen Homolog bei *S. cerevisiae* in der Aminosäuregärung involviert ist. Die Deletion dieses Gens führte zu einem hyperpigmentierten Phänotyp (Abschnitte 3.2.2.1 & 3.2.4.1.1). Im metabolischen Weg der Aminosäuregärung liegen die beiden Aminotransferasen Aro8 und Aro9 direkt stromaufwärts von Aro10 (Abschnitt 1.5). Sie katalysieren in parallelen Reaktionen (Kradolfer et al., 1982, Iraqui et al., 1998) den einzigen Schritt vom Tryptophan zum Zwischenprodukt Indol-3-pyruvat, das danach von Aro10 decarboxyliert wird (Vuralhan et al., 2005). Die Anreicherung des Pigments bei Deletion von *ARO10* deutete darauf hin, dass in dieser ersten Reaktion eine Vorstufe des Pigments entsteht und Aro8 und Aro9 somit möglicherweise an der Pigmentsynthese direkt beteiligt sind.

Im zweiten wichtigen Ansatz zur Aufklärung des Pigmentsynthesewegs, der Transkriptionsanalyse einer pigmentbildenden Kultur (Abschnitt 3.2.3), gehörten *ARO8* und *ARO10* zu den am stärksten heraufregulierten Genen während der Pigmentbildung. Im Gesamtbild zeigte sich, dass die größten transkriptionellen Unterschiede bei der Nutzung von Tryptophan im Vergleich zu Arginin wieder die Gene der Aminosäuregärung betrafen. Aus diesen beiden Gründen wurden sowohl *ARO8* als auch *ARO9*, das kaum Regulation durch das Tryptophanangebot zeigte, jeweils über homologe Rekombination deletiert.

##### 4.2.2.1 Vergleich mit *S. cerevisiae* – Nomenklatur

---

Für die Deletionen mußten die *C. glabrata*-Homologe der bei *S. cerevisiae* an der Aminosäuregärung beteiligten Gene bestimmt werden. Das Gen CAGLOG01254g zeigte zu dem *S. cerevisiae*-Gen *ARO8* (*ScARO8*) die größte Ähnlichkeit auf Proteinsequenzebene (vgl.

Abschnitt 3.2.4.3). Deswegen wurde, auch der Annotation in der Génolevures-Datenbank (Sherman et al., 2009) folgend, der Hefegenname für *C. glabrata* übernommen. Tatsächlich entspricht die enzymatische Funktion, die Aminotransferaseaktivität mit Tryptophan als Donor, dem ersten Schritt des Tryptophanabbaus.

Gegen die Zuordnung zu *ScARO8* sprechen allerdings mehrere Tatsachen. Zum einen zeigt *ScAro8* eine sehr viel geringere Aktivität mit Tryptophan als Substrat ( $K_m = 6$  mM) als mit Phenylalanin oder Tyrosin ( $K_m = 0,3$  mM) (Kradolfer et al., 1982). Es wurde deshalb spekuliert, dass statt *ScAro8* die zweite Aminotransferase, *ScAro9* ( $K_m = 0,2-0,4$  mM für Tryptophan), hauptsächlich am Abbau von Tryptophan beteiligt ist (Kradolfer et al., 1982, Iraqui et al., 1999). Im Gegensatz dazu hat die *C. glabrata*-Deletionsmutante von CAGLOG01254g (*aro8* $\Delta$ ) einen signifikanten Wachstumsdefekt in Tryptophan (Abschnitt 3.2.4.3), die als *aro9* $\Delta$  bezeichnete jedoch nur eine leichte Wachstumsreduktion (Abschnitt 3.2.5).

Weiterhin zeigte sich in den Transkriptionsprofilen unter pigmentinduzierenden Bedingungen eine starke Induktion von CAGLOG01254g (*aro8* $\Delta$ , Abschnitt 3.2.3.2), was nicht dem Verhalten von *ScARO8* bei *S. cerevisiae* entspricht. Dort wird *ScARO9* durch die Anwesenheit von aromatischen Aminosäuren und über den Transkriptionsfaktor *ScAro80* induziert (Iraqui et al., 1999), während *ScARO8* nur der generellen Regulation der Aminosäuresynthese unterliegt und von Tryptophan nicht induziert werden kann (Iraqui et al., 1998, Godard et al., 2007). Die Transkriptionsregulation von CAGLOG01254g in Tryptophan ähnelt also mehr *ScARO9* als *ScARO8*.

Interessanterweise ist auch die Syntenie der Gene zwischen *S. cerevisiae* und *C. glabrata* bei *ARO8* unterbrochen. Zusammen mit dem *KEX1*-Homolog CAGLOG01232 findet es sich auf Chromosom 7 von *C. glabrata*, zwischen zwei Bereichen, die den *S. cerevisiae*-Chromosomen 12 und 14 entsprechen (Byrne & Wolfe, 2005). Diese Unterschiede im chromosomalen Arrangement könnten die unterschiedliche Regulation erklären. Das *C. glabrata*-Gen *ARO8* ähnelt funktional also mehr dem Hefegen *ScARO9*, die Nomenklatur der Génolevures-Datenbank wurde in dieser Arbeit aus Gründen der Vergleichbarkeit aber trotzdem beibehalten.



#### 4.2.2.2 Katabolische Funktion für aromatische Aminosäuren

---

Beide Deletionsmutanten (*aro8Δ* und *aro9Δ*) zeigten auf Vollmedium, aber auch auf Ammoniumsulfat, keinen signifikanten Wachstumsdefekt. Dies entspricht dem Phänotyp der *S. cerevisiae*-Mutanten der homologen Gene: beim Ausfall der Aminotransferase I, die auch den letzten Schritt der Phenylalanin- und Tyrosinbiosynthese katalysiert (Kradolfer et al., 1982), kann die Aminotransferase II (ScAro9) diese Funktion ebenso übernehmen und die Auxotrophien verhindern (Iraqi et al., 1998, Iraqi et al., 1999). Das zeigt sich auch daran, dass beide Mutanten mit fast allen getesteten Aminosäuren nahezu identische Wachstumsraten zeigten. Die Unterschiede traten erwartungsgemäß bei der Verwendung von aromatischen Aminosäuren auf. Während die Deletion von *ARO9* zu einem geringen Wachstumsdefekt besonders mit Tryptophan führte, wuchs *aro8Δ* auf Tryptophan gar nicht mehr und auf Tyrosin und Phenylalanin nur noch extrem langsam (Abschnitt 3.2.4.3). Auch das steht (mit Einschränkungen, vgl. Abschnitt 4.2.2.1) im Einklang mit den Ergebnissen von *S. cerevisiae*, wo die Deletion der Aminotransferase I als hauptsächlich anabolisches Enzym kaum Einfluß auf das Wachstum auf aromatischen Aminosäuren hat (Urrestarazu et al., 1998), die Deletion der Aminotransferase II aber das Wachstum auf Tryptophan komplett unterdrückt (Iraqi et al., 1999). Aro8 ist also bei *C. glabrata* die wichtigste Aminotransferase für das Wachstum mit aromatischen Aminosäuren als Stickstoffquelle (Abbildung 4-1). Dafür spricht auch die Aminotransferaseaktivität, die mit Tryptophan als Aminogruppendonor und  $\alpha$ -Ketoglutarat als Aminogruppenakzeptor bei dem heterolog exprimierten Protein Aro8\* meßbar war. Die Funktion von Aro8 als aromatische Aminotransferase von *C. glabrata* ist damit nachgewiesen.

#### 4.2.2.3 Histidin als mögliches Substrat für Aro8

---

Interessanterweise zeigte sich bei *aro8Δ* auch ein sehr starker Wachstumsdefekt mit Histidin als einziger Stickstoffquelle, der bei *aro9Δ* und *aro10Δ* nicht auftrat. Das sprach für eine Aktivität von Aro8 mit Histidin. Allerdings konnte für das homologe Protein bei der Bäckerhefe *in vitro* gezeigt werden, dass mit Histidin als Donor keine Aminotransferaseaktivität meßbar ist, auch in der relativ hohen und in dieser Arbeit verwendeten Konzentration von 10 mM (Urrestarazu et al., 1998). Es stellte sich also die Frage, wie der Mutantenphänotyp zu erklären ist.

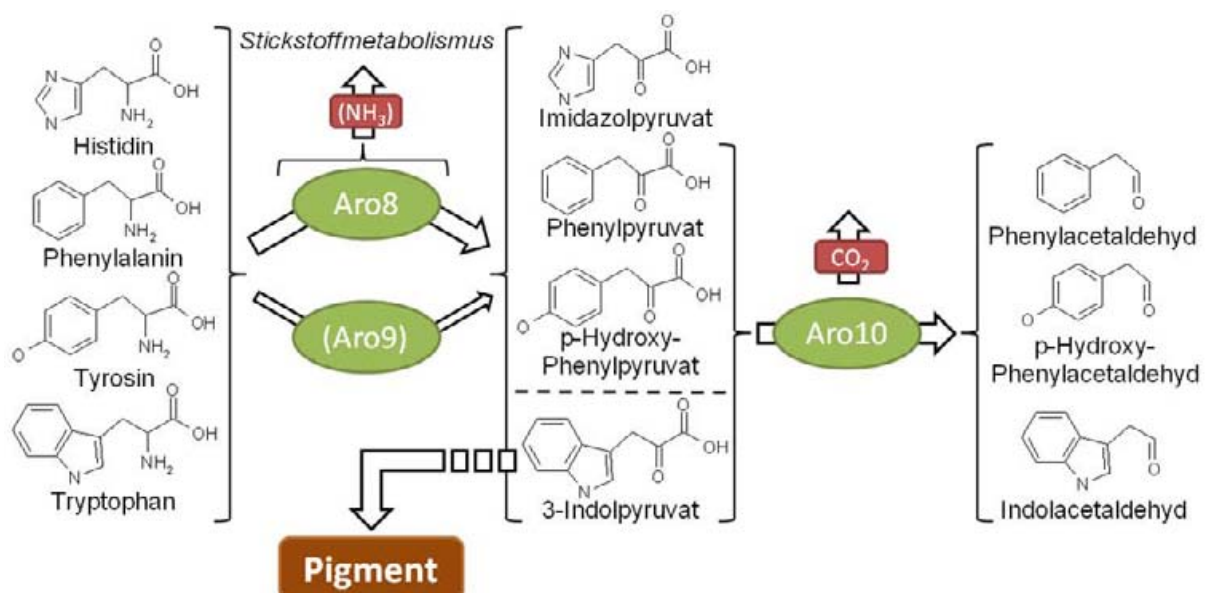
Der Abbau von Histidin erfolgt unter anderem bei Bakterien (Consevage & Phillips, 1990, Wu *et al.*, 1992), Säugern (Taylor *et al.*, 1990, Suchi *et al.*, 1995) und einigen Pilzen (Polkinghorne & Hynes, 1982) über eine Histidin-Ammonium-Lyase (auch Histidase, EC 4.3.1.3). Eine *in silico*-Suche zeigte, dass weder *S. cerevisiae* noch *C. glabrata* ein Homolog zu diesem Gen besitzen (Abschnitt 3.2.4.3) und somit theoretisch auch keine Histidase-Aktivität. Tatsächlich wächst die Bäckerhefe im Gegensatz zu *C. glabrata* nicht auf einem Medium, dem als einzige Stickstoffquelle Histidin zugesetzt wurde (Abschnitt 3.2.5). Eine mögliche Erklärung ist, dass die aromatische Aminotransferase bei *C. glabrata* im Gegensatz zu *S. cerevisiae* auch Histidin als Aminogruppendonor akzeptiert und somit das Wachstum erlaubt (Abbildung 4-1). Tatsächlich konnte bei einigen Bakterien eine Aminotransferasereaktion mit einer sehr hohen  $K_m$  auch für Histidin gezeigt werden. Ein Beispiel ist die *Klebsiella aerogenes*-Aminotransferase I, deren  $K_m$  für die Transferreaktion von Histidin auf 2-Oxoglutarat bei 70 mM liegt (Paris & Magasanik, 1981). Möglicherweise hat das *C. glabrata*-Enzym also eine geringere  $K_m$ , die vergleichsweise gutes Wachstum in 10 mM Histidin erlaubt. Die weitere Reaktion erfolgt dann wahrscheinlich nicht über *ARO10*, denn im Gegensatz zu den Aro8-Substraten zeigt die *aro10Δ*-Mutante mit Histidin keine Reduktion der Wachstumsgeschwindigkeit. Auch ist weder bei Bakterien noch bei Eukaryoten eine solche Reaktion beschrieben, bei *E. coli* wird es stattdessen zu Imidazol-Laktat reduziert.

Die größere metabolische Flexibilität von *C. glabrata* im Vergleich mit *S. cerevisiae* (*C. glabrata* wächst auf 18 von 20 proteinogenen Aminosäuren) könnte eine Anpassung an die Bedingungen an den Wirt sein, wie es beispielsweise auch bei der Nutzung von zusätzlichen Kohlenstoffquellen durch pathogene *E. coli*-Stämme (Fabich *et al.*, 2008) oder bei der Flexibilität in Bezug auf Stickstoffquellen bei *A. nidulans* (Krappmann & Braus, 2005) vorgeschlagen wurde. In jüngster Zeit wird der metabolischen Flexibilität von Pilzen im Infektionsprozess eine immer größere Relevanz zugeschrieben (Brock, 2009). Auch *C. glabrata* dürfte im Wirt auf die Nutzung möglichst vieler, auch suboptimaler Stickstoffquellen angewiesen sein, und Aro8 könnte so auch in dieser Beziehung eine wichtige Rolle in der Wirt-Pathogen-Interaktion spielen.

#### 4.2.2.4 Pigmentbildung durch Aro8

Der für diese Arbeit wohl wichtigste Phänotyp einer Mutante im Vergleich zum Wildtyp war aber die stark reduzierte Pigmentbildung der Deletionsmutante von *ARO8*. Im üblichen Induktionsmedium mit Tryptophan als einziger Stickstoffquelle konnte die Mutante zwar nicht wachsen, sie bildete aber auch fast kein Pigment aus, obwohl hierfür Wachstum *per se* nicht nötig ist, wie Experimente mit der ebenfalls nicht in diesem Medium wachsenden *his3Δ*-Mutante gezeigt haben (Abschnitt 3.1.5). In Mischungen, die neben Tryptophan noch weitere Stickstoffquellen enthalten, zeigte sich trotz Wachstums eine sehr starke Reduktion der Pigmentbildung bei dieser Mutante (Abschnitt 3.2.4.3). Zusammen zeigte das, dass das Wachstum auf Tryptophan und die Bildung des Pigments über dieses Gen gekoppelt ist. Der Nachweis für diese wegen der Homologie zu *S. cerevisiae* und den Wachstumsdefekten von *aro8Δ* vermutete Transaminierungsreaktion erfolgte über die rekombinante Expression von Aro8 in *E. coli*. Hier zeigte sich, daß das Enzym Aro8 alleine ausreichend ist, um aus L-Tryptophan das Pigment zu generieren (Abbildung 4-1).

Trotzdem kommt die Pigmentsynthese auch in der Deletionsmutante nicht völlig zum Erliegen und erreicht in Induktionsmedium nach drei Tagen immer noch 20-25% des Wildtypniveaus (Abschnitt 3.2.4.3). Als Erklärung hierfür bietet sich an, dass Aro9 als parallel



**Abbildung 4-1: Vorgeschlagene Funktionen für Aro8, Aro9 und Aro10 bei *C. glabrata*.** Aro8 ist die wichtigste Aminotransferase für den Katabolismus von Histidin, Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan. Die Aminogruppe wird auf einen Akzeptor (Glutamat und andere) übertragen und dem Stickstoffmetabolismus zugeführt ( $NH_3$ ). Aus Indolpyruvat entsteht über mehrere Schritte das Pigment, während Aro10 die Ketosäuren decarboxyliert und so in Fuselaldehyd überführt. Basierend auf (Hazelwood et al., 2008) und (SGD project), modifiziert für *C. glabrata* nach Ergebnissen dieser Arbeit.

agierende aromatische Aminotransferase ebenfalls Tryptophan als Substrat verwenden kann, jedoch mit einer deutlich höheren  $K_m$  (bei *S. cerevisiae* 6 mM statt 0,2-0,4 mM, siehe Abschnitt 4.2.2.1) und somit einer geringeren Umsatzrate. Um dies zu überprüfen, müsste eine Doppelmutante beider aromatischen Aminotransferasen hergestellt werden. Das wurde zwar im Verlauf dieser Arbeit versucht, allerdings ohne Erfolg. Theoretisch sollte die Herstellung einer Doppelmutante möglich sein, da wenigstens bei *S. cerevisiae* eine solche Mutante auf entsprechenden Medien lebensfähig ist (Urrestarazu et al., 1998).

Die weiteren Schritte auf dem Weg der Pigmentbildung können ohne Beteiligung von zusätzlichen Enzymen ablaufen (Abschnitt 3.2.6). Auch bei dem Basidiomyceten *U. maydis*, wo ein sehr ähnliches Pigment gebildet wird, wurde parallel zu dieser Arbeit gezeigt, dass eine einzige Aminotransferase für die Pigmentierung ausreicht (Zuther et al., 2008). Damit wäre Aro8 ausreichend und notwendig für die effektive Synthese des Pigments in *C. glabrata*.

#### 4.2.3 Die Rolle von Aro10

---

Auch die Phenylpyruvatdecarboxylase Aro10 ist Teil der Aminosäuregärung. In Medium mit Tryptophan als Stickstoffquelle gehörte das entsprechende *C. glabrata*-Homolog zu den am stärksten heraufregulierten Genen (Abschnitt 3.2.3.2). Die Deletionsmutante zeigte allerdings im Vergleich zu *aro8Δ* nur einen sehr geringen Wachstumsdefekt, wenn aromatische Aminosäuren als einzige Stickstoffquelle angeboten wurden. Mit allen anderen getesteten Stickstoffquellen war das Wachstum dagegen dem Wildtyp vergleichbar (Abschnitt 3.2.5). Alle Medien enthielten neben Aminosäuren auch die Kohlenstoffquelle Glukose, wodurch für das Wachstum nur die Verfügbarkeit des Stickstoffs aus den Aminosäuren limitierend sein sollte. Aro10 folgt im Katabolismus aber erst auf die von Aro8 und Aro9 katalysierte Aminostransferasereaktion (Vuralhan et al., 2005), und eine Deletion von *ARO10* sollte somit die Stickstoffaufnahme nicht behindern.

Die trotzdem vorhandene Reduktion der Wachstumsrate in Medium mit aromatischen Aminosäuren lässt sich somit wahrscheinlich auf eine Anreicherung der desaminierten Zwischenprodukte zurückführen. Allerdings existieren in *C. glabrata*, wie der Sequenzvergleich zeigt (Abschnitt 3.2.3.2), Homologe zu den alternativen Decarboxylasen von *S. cerevisiae*. Diese können wahrscheinlich die Funktion von Aro10 auch in der Mutante

teilweise übernehmen, wie es für Hefe bereits gezeigt wurde (Dickinson et al., 2003, Vuralhan *et al.*, 2003), und so das (verlangsamte) Wachstum ermöglichen.

Ein weiteres Indiz dafür, dass das *C. glabrata*-Gen *ARO10* tatsächlich die Funktion der wichtigsten Decarboxylase beim Tryptophanabbau ausübt, ist die Tatsache, dass bei der Mutante die Produktion von Tryptophol stark reduziert ist (Abschnitt 3.4.1.1). Tryptophol entsteht als Endprodukt der Aminosäuregärung von Tryptophan durch Oxidation des decarboxylierten Indolacetaldehyds (Dickinson et al., 2003, Hazelwood et al., 2008). Die Verringerung im Überstand der *aro10Δ*-Mutante zeigt also einen wahrscheinlichen Defekt in der Aminosäuregärung an, der nur teilweise durch alternative Routen ausgeglichen wird.

Die Pigmentierung der Deletionsmutante *aro10Δ* war ungewöhnlicherweise im Vergleich zum Wildtyp stark erhöht (Abschnitt 3.2.4.1). Als Erklärung dafür bietet sich an, dass Aro10 unter normalen Umständen den Abbau eines Zwischenproduktes katalysiert, das in Abwesenheit dieses Enzyms auf einem alternativen Weg zum vollständigen Pigment weiterreagiert (Abbildung 4-1). Zusammen mit den Ergebnissen der *aro8Δ*-Mutante erscheint Indol-3-pyruvat als Zwischenprodukt am wahrscheinlichsten, das durch Aro8 gebildet und von Aro10 weitermetabolisiert wird (Abbildung 4-1). Das Indolpyruvat reagiert dabei schon ohne Einwirkung von Sauerstoff zu einem oder mehreren weiteren Vorläuferprodukten, denn reines Indolpyruvat konnte in dem Überstand von sauerstofffrei anzogenen *C. glabrata*-Kulturen nicht nachgewiesen werden. Das steht auch in guter Übereinstimmung mit einem der vorgeschlagenen Reaktionswege bei *U. maydis* (Zuther et al., 2008), bei dem Indolpyruvat mit Tryptophan zu einem Zwischenprodukt reagiert, dessen weitere Umsetzung Sauerstoff erfordert.

#### 4.2.4 Weitere relevante Proteine

---

Neben den Genen der Aminosäuregärung wurden noch weitere Gene unter den pigmentinduzierenden Bedingungen heraufreguliert (Abschnitt 3.2.3.2). Es ist möglich, dass darunter einige für weitere pigmentierungsrelevante Proteine kodieren. Im folgenden werden diese Gene, deren Produkte und ihre mögliche Relevanz für die Pigmentbildung bei *C. glabrata* diskutiert.

Das Protein Pdr12 ist bei *S. cerevisiae* an der Resistenz gegen schwache organische Säuren wie Benzoat oder Sorbat beteiligt, indem es als ABC-Transporter diese Verbindungen über die Zellmembran exportiert (Piper *et al.*, 1998). Auch für endogene organische Säuren, wie sie in Form von Fuselsäuren als alternatives Endprodukt der Aminosäuregärung anfallen, wird eine Rolle von Pdr12 diskutiert: eine *PDR12*-Deletionsmutante ist hypersensitiv gegen diverse zugefügte Fuselsäuren, aber nicht gegen die korrespondierenden Fuselalkohole (Hazelwood *et al.*, 2006). Neben Säuren kann Pdr12 auch weitere Substanzen wie Fluorescein exportieren (Holyoak *et al.*, 1999).

Bei Wachstum mit Tryptophan als Stickstoffquelle ist *PDR12* in *C. glabrata* deutlich stärker exprimiert als mit Arginin (Abschnitt 3.2.3.2) – nach acht Stunden 5,7× und nach 24 Stunden 25× stärker als die Vorkultur, während sich in Arginin-Medium keinerlei Änderung zeigt. Möglicherweise deutet diese Transkription also auf den zunehmenden Export von Fuselsäuren hin, die neben dem Tryptophol aus der Aminosäuregärung hervorgehen. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, dass sich das Substratspektrum von Pdr12 auch auf die Zwischenprodukte der Pigmentsynthese (also die organische Säure Indolpyruvat oder ein Derivat davon) erstreckt und Pdr12 somit auch für den Export des Pigmentvorläufers in das Medium verantwortlich ist. Dies ließe sich nur durch eine Deletionsmutante in *C. glabrata* nachweisen, die in dieser Arbeit nicht zur Verfügung stand.

Die Mutanten der Gene *GID8*, *VID24*, *VID30* und *FYV10* zeigten eine reduzierte Pigmentbildung in der Transposoninsertionsbibliothek. Zudem war *VID24* unter den am stärksten während der Pigmentbildung heraufregulierten Gene zu finden. Interessanterweise handelt es sich bei den Produkten der vier genannten Gene sämtlich um Komponenten eines bekannten Komplexes von neun Proteinen in *S. cerevisiae*, dem vakuolären Import- und Degradations-(VID-)Komplex (Regelmann *et al.*, 2003, Santt *et al.*, 2008). Die am besten beschriebene Funktion dieses Komplexes ist die Ubiquitinierung und somit der proteasomale Abbau der Fructose-1,6-Bisphosphatase nach einem Wechsel in glucosehaltiges Medium, um so die Gluconeogenese zu stoppen (Schork *et al.*, 1995, Regelmann *et al.*, 2003). Die meisten der genannten Proteine sind auch in einer alternativen, vakuolären Abbauroute beteiligt, die aber eine ähnliche Funktion erfüllt (Hoffman & Chiang, 1996, Regelmann *et al.*, 2003). Die hohe Anreicherung von Proteinen in

diesem Komplex, deren Disruption die Pigmentbildung reduziert, deutet sehr stark auf eine Verbindung zur Pigmentsynthese hin. Welcher Natur kann diese Verbindung sein?

Tatsächlich ist nicht nur die Fructose-1,6-Bisphosphatase von dieser posttranslationalen Regulation über Degradation betroffen. Auch andere Proteine, wie der Hexose-Transporter Hxt7 (Snowdon *et al.*, 2008) werden über diesen Komplex reguliert, ebenso sind Teile des Komplexes für die Steuerung der Transkription von stickstoffregulierten Genen nötig (van der Merwe *et al.*, 2001). Daher wird mittlerweile eine allgemeinere Funktion des VID-Komplexes bei der Antwort auf sich verändernde Kohlenstoff- und Stickstoffangebot angenommen (Snowdon *et al.*, 2008). Die wahrscheinlichste Erklärung für die beobachtete verringerte Pigmentsynthese ist also eine fehlende Anpassung der Mutanten entweder auf das Vorhandensein von Glucose, die für die Pigmentbildung nötig ist, oder auf die Anwesenheit der Stickstoffquelle Tryptophan. Der Vid-Komplex kann somit eine wichtige Rolle bei der Regulation der Pigmentsynthese spielen.

#### 4.2.5 Regulation der Pigmentsynthese

---

Mindestens drei wichtige Faktoren müssen zusammenkommen, damit *C. glabrata* über Aro8 effektiv Pigment produziert. Es muß Tryptophan vorhanden sein, es dürfen keine alternativen Stickstoffquellen im Medium existieren, und als Kohlenstoffquelle muß Glucose (oder möglicherweise andere gut verwertbare Verbindungen) angeboten werden. Die Notwendigkeit von Tryptophan ergibt sich aus dem vorgeschlagenen Syntheseweg, in dem der Indolkörper direkt für die Verbindungen des Pigments verwendet wird. Die Unterdrückung der Pigmentsynthese in Gegenwart von anderen Stickstoffquellen und mit alternativen Kohlenstoffquellen läßt sich aber nicht ohne weiteres aus diesem Modell herleiten. Die Regulation der Pigmentierung unter diesen Bedingungen soll deshalb im weiteren näher betrachtet werden.

##### 4.2.5.1 Die Rolle der Kohlenstoffquelle

---

Eine Möglichkeit zur Reduktion der Pigmentsynthese besteht in der Aktivität von Aro10, das das Zwischenprodukt Indolpyruvat zu Tryptophol umsetzt – wie die stark erhöhte Produktion von Pigment in der *ARO10*-Deletionsmutante zeigt. Interessanterweise wurde

bei *S. cerevisiae* sowohl eine transkriptionelle Steuerung (Iraqi et al., 1999) als auch eine posttranskriptionelle (Vuralhan et al., 2005) für *ARO10* gezeigt. Während die Transkription von *ScARO10* in Anwesenheit von aromatischen Aminosäuren hochreguliert wird, konnten Vuralhan et al. in *S. cerevisiae* auch in einer *ScAro10*-Überexpressionsmutante keine Decarboxylaseaktivität messen, wenn Glucose als Kohlenstoffquelle verwendet wurde (Vuralhan et al., 2005). Mit Ethanol dagegen war die Aktivität vorhanden. Somit haben sowohl Stickstoff- als auch Kohlenstoffquelle einen wichtigen Einfluß auf die tatsächliche Aktivität von *ScAro10* (Vuralhan et al., 2005). Da die Ursache für die posttranskriptionelle Regulation noch unbekannt ist, kann man über eine mögliche Rolle des VID-Komplexes spekulieren. In diesem Fall würde *Aro10* in Gegenwart von Glucose proteasomal oder vakuolär abgebaut und stünde somit nicht zur Verfügung (vgl. Abschnitt 4.2.4). Weitere Versuche, insbesondere die Herstellung von Doppelmutanten der VID-beteiligten Gene und *ARO10*, sollten darüber Aufschluß geben können.

Eine solche posttranskriptionelle Regulation könnte teilweise die Unterschiede in der Pigmentierung mit verschiedenen Kohlenstoffquellen erklären. So wäre nach diesem Modell in Glucose und Tryptophan zwar eine hohe Transkription von *ARO10* zu beobachten, aber kaum aktives Protein vorhanden, die Pigmentbildung könnte also stattfinden. Auch in Glycerin, Acetat und Ethanol würde die *ARO10*-Transkription durch Tryptophan induziert, aber das Protein wäre dort aktiv. Die hohe Decarboxylaseaktivität verringerte somit die Menge an Indolpyruvat und damit an Pigment.

#### 4.2.5.2 Die Rolle des Sauerstoffs

---

Dass Sauerstoff eine wichtige Rolle bei der Synthese des Pigments spielt, konnte gezeigt werden, indem *C. glabrata* in sauerstofffreier Atmosphäre mit Tryptophan angezogen wurde. Es zeigte sich, dass der unter diesen Umständen nicht pigmentierte Überstand langsam nachdunkelt, sobald er der normalen Atmosphäre ausgesetzt wurde (Abschnitt 3.1.2). Ebenso bildet sich in einem *in vitro*-Ansatz mit isoliertem *Aro8*-Enzym das Pigment nur in Anwesenheit von Sauerstoff, während die Reaktion von Tryptophan zu Indolpyruvat erwartungsgemäß sauerstoffunabhängig ist (Abschnitt 3.2.6). Für die Reaktion von Indolpyruvat zum Pigment wiederum ist kein aktives Enzym mehr nötig. Das bedeutet, dass die Pigmentierung in einem zweistufigen Prozess erfolgen kann – zuerst wird das



Zwischenprodukt sauerstoffunabhängig durch *C. glabrata* gebildet und in den Überstand abgegeben, wo es in einem zweiten, sauerstoffabhängigen Schritt zu dem eigentlichen Pigment zu reagieren scheint. Die Ausbeute des Pigments – wie auch das Wachstum von *C. glabrata* – blieb unter den stark hypoxischen Bedingungen aber geringer als bei Hefen, die unter normoxischen Bedingungen gewachsen waren.

Die Abhängigkeit der Gesamtreaktion von O<sub>2</sub> ist eindeutig, und dieser Befund deckt sich mit dem von Zuther *et al.* vorgeschlagenen Mechanismus für die Pigmentbildung bei *U. maydis*, wo Indolpyruvat über mehrere Zwischenschritte mit Tryptophan und dann in Gegenwart von Sauerstoff zu verschiedenen Bestandteilen des *U. maydis*-Pigments reagieren kann (Zuther *et al.*, 2008). Auch in einem anderen Kontext wurde die Abhängigkeit der spontanen Reaktion von Indolpyruvat zu Indolverbindungen von Sauerstoff gezeigt (Bittinger *et al.*, 2003). Die Reaktion von Indolpyruvat zum Pigment konnte durch reduzierende thiolgruppenhaltige Substanzen wie Cystein, Dithiothreitol, Dithioerythrol und  $\beta$ -Mercaptopethanol inhibiert werden. Auch das spricht für eine oxidative Reaktion, die von diesen reduzierenden Substanzen behindert werden kann. Die Befunde für diesen Reaktionsschritt bei der Bildung des Pigments von *C. glabrata* stehen damit gut im Einklang mit den vorgeschlagenen Reaktionen bei *U. mayids* (Zuther *et al.*).

#### 4.2.5.3 Die Rolle der Stickstoffquellen

---

Für *C. glabrata* ist der Abbau über die Aminosäuregärung scheinbar der einzige Weg, um den für das Wachstum benötigten Stickstoff aus Tryptophan zu gewinnen. Die alternative Route über Kyrunenin existiert bei *C. glabrata* im Gegensatz zu *S. cerevisiae* nicht (Li *et al.*, 2007, Wogulis *et al.*, 2008). Indol-3-pyruvat sollte also bei der Nutzung der Aminogruppe von Tryptophan immer entstehen und somit die Verwertung von Tryptophan automatisch zur Bildung des Pigments führen. Trotzdem verringern zusätzlich angebotene Stickstoffquellen ebenso wie hohe Zelldichte oder nichtfermentierbare Kohlenstoffquellen die Pigmentsynthese effektiv – in den letzten beiden Fällen sogar mit Tryptophan als einziger Stickstoffquelle.

Die zusätzlichen Aminosäuren selbst oder das Ammoniumsulfat haben dabei keinen negativen Einfluß auf die sauerstoffabhängige Reaktion zum endgültigen Pigment (Abschnitt 3.1.3). Die Ausnahme dabei bildet Cystein, dass die Bildung des Pigments aus dem farblosen

Überstand einer sauerstofffrei angezogenen *C. glabrata*-Kultur verlangsamen kann. Es zeigte sich, daß Cystein sowohl kompetitiv die Tryptophan-Aminotransferaseaktivität von Aro8 reduzieren konnte als auch die Reaktion von Indolpyruvat zum Pigment zu behinderte. Wahrscheinlich basiert dieser Effekt auf der reduzierenden Eigenschaft der Thiolgruppe im Cystein, die die oxidative Sekundärreaktion der Pigmentbildung behindert (siehe Abschnitt 4.2.5.2). Interessanterweise ist Cystein aber auch diejenige Aminosäure, in deren Gegenwart bei der Melaninsynthese statt des schwarzen Eumelanin gelb-rötliches Phaeomelanin gebildet wird, in dem diese Aminosäure direkt mit dem Melaninvorläufer Dopaquinon reagiert (Ito & Wakamatsu, 2008). Ob es bei der Synthese des indolbasierten Pigments von *C. glabrata* zu vergleichbaren Reaktionen kommen kann und somit den Phaeomelaninen analoge, schwefelhaltige Verbindungen entstehen, müßte in weiteren Experimenten geklärt werden. Zumindest bei melanisierten Pilzen wie *Cryptococcus neoformans* (Williamson *et al.*, 1998) wurden Phaeomelanine bislang nicht gefunden, was auch mit der prooxidativen Wirkung dieses Pigmenttyps zusammenhängt, die im Gegensatz zur Funktion des Eumelanin steht (De Leeuw *et al.*, 2001, Ito & Wakamatsu, 2008).

Für die anderen getesteten Aminosäuren und das Ammoniumsulfat bleibt die Frage bestehen, warum die Pigmentbildung teils so massiv inhibiert wird. Obwohl es keinen offensichtlichen Zusammenhang mit der Güte der Stickstoffquelle, gemessen als höchste unterstützte Wachstumsrate von *C. glabrata* mit dieser Substanz, und der Inhibitionswirkung gibt (Abschnitt 3.1.3), ist eine Verbindung zu Stickstoffmetabolismus und -rezeption wahrscheinlich.

#### 4.2.5.4 Wahrnehmung und Signaltransduktion

---

Die Regulation der Pigmentbildung durch die verfügbaren Stickstoffquellen erinnert an die Stickstoffkatabolitrepression (*Nitrogen Catabolite Repression*, NCR) bei der Bäckerhefe und anderen Pilzen (Wiame *et al.*, 1985). Dabei wird in Anwesenheit einer gut verwertbaren Stickstoffquelle die Expression von Genen herunterreguliert, die für Proteine des Katabolismus von weniger guten Quellen kodieren (Hofman-Bang, 1999). Die dafür notwendige Wahrnehmung der Konzentration von verschiedenen möglichen Stickstoffquellen erfolgt über bei *S. cerevisiae* über mehrere, teils überlappende Wege (Gagiano *et al.*, 2002).

Einer der wichtigsten Routen ist dabei ist die TOR-Kaskade, die in Gegenwart von Ammonium oder anderen guten Stickstoffquellen dazu führt, dass der Transkriptionsfaktor Gln3 nicht in den Kern gelangt und dort die Transkription von Genen des Stickstoffkatabolismus aktiviert (Hofman-Bang, 1999). Die Mutante eines möglichen Homologes von Gln3 in *C. glabrata* hat in dem Induktionsmedium keine veränderte Pigmentierung gezeigt (Abschnitt 3.1.8). Auch besitzt das Hefegen *ScARO9*, das wahrscheinlich dem für die Pigmentierung wichtigen *C. glabrata*-Gen *ARO8* entspricht, ungewöhnlicherweise keine typische Bindestelle für Gln3 (Iraqi et al., 1999). Wahrscheinlich spielt die TOR-Kaskade also keine oder nur eine untergeordnete Rolle bei der Regulation der Pigmentbildung in *C. glabrata*.

Ein anderer Weg, über den bei *S. cerevisiae* das Stickstoffangebot der Umgebung wahrgenommen werden kann, ist die cAMP-PKA-Signaltransduktion mit dem G-Proteingekoppelten Rezeptor Gpr1 und der G-Protein- $\alpha$ -Untereinheit Gpa2 (Gagiano et al., 2002). Gpr1 nimmt auf bislang unbekannte Art Stickstoffmangel im Medium wahr und führt über Gpa2 zu einem Anstieg des intrazellulären cAMP und damit zu einer Aktivierung der Proteinkinase A (Bcy1) mit entsprechender Veränderung der Genexpression (Gagiano et al., 2002). Das Signal, der Stickstoffmangel, kann dabei entweder eine geringe Konzentration der Stickstoffquelle sein (Lorenz et al., 2000) oder die ausschließliche Anwesenheit von schlecht verwertbaren Quellen. Auch bei anderen Pilzen ist eine ähnliche Differenzierung von Stickstoffquellen beobachtet worden. Bei *Cr. neoformans* führen beispielsweise Methionin und Tryptophan zu einer cAMP-Antwort, die wenigstens im Fall des Methionins über ein Gpr1-Homolog (Gpr4) vermittelt wird (Xue et al., 2006). Auch in *C. albicans* wirken Prolin und Methionin über ein Gpr1-Homolog und führen über einen Anstieg von cAMP zur Hyphenbildung (Maidan et al., 2005).

Weiterhin reagiert das Gpr1/Gpa2-System auf die Anwesenheit von Glucose im Medium ebenfalls mit einem cAMP-Anstieg (Lorenz et al., 2000). Interessanterweise kann dieser Signaltransduktionsweg blockiert werden, indem die Proteinkinase Ime2 (beispielsweise über exogenes Acetat) aktiviert wird (Donzeau & Bandlow, 1999) – bei *S. cerevisiae* dient dieser Antagonismus zur Trennung der Transkriptionsprogramme Pseudohyphenwachstum (Stickstoffmangel, aber Glucose vorhanden) und Sporulation (Stickstoffmangel und keine oder wenig Glucose). Acetat wirkt dabei möglicherweise direkt über das

Acetylierungsmuster des *IME2*-Promotors (Burgess *et al.*, 1999) und signalisiert so schlecht verwertbare, nicht fermentierbare Kohlenstoffquellen.

Die Regulation der Pigmentbildung in *C. glabrata* ist diesen Prozessen sehr ähnlich. Das Pigment wird in großen Mengen nur in Gegenwart von Glucose gebildet und nicht mit nichtfermentierbaren Kohlenstoffquellen wie Acetat (Abschnitt 3.1.6). Auch wenn alternative Stickstoffquellen angeboten werden, wird die Bildung des Pigments ganz oder teilweise inhibiert (Abschnitt 3.1.3). Weiterhin führt exogen zugeführtes cAMP (in Form von Dibutyryl-cAMP, Abschnitt 3.1.8) zu verstärkter Pigmentbildung auch unter ansonsten inhibierenden Bedingungen – ähnliches ist für die Pseudohyphenbildung bei *S. cerevisiae* (Kubler *et al.*, 1997) und die Melaninbildung bei *Cr. neoformans* (Alspaugh *et al.*, 1997) beschrieben worden. Zuletzt zeigt eine Mutante des *C. glabrata*-Homologs von *ScGPR1* eine deutlich reduzierte Pigmentbildung in Induktionsmedium.

Dieser Vergleich mit anderen Pilzen zeigt, dass eine Beteiligung von einem oder mehreren G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR, *G Protein Coupled Receptors*) an der Pigmentierung sehr wahrscheinlich ist. Dabei können die beiden pigmentinduzierenden Faktoren – Glucose und Stickstoffquelle Tryptophan – entweder durch separate GPCR detektiert werden, oder ein GPCR nimmt beides wahr. Daran ist *Gpr1* zumindest beteiligt, die Weiterleitung des Signals erfolgt wahrscheinlich über das Homolog der G-Protein- $\alpha$ -Untereinheit *Gpa2* und über cAMP und führt möglicherweise so zu einer Hochregulierung von *ARO8* oder einer Inaktivierung von *Aro10* (Abbildung 4-2).

Es kann natürlich nicht ausgeschlossen werden, dass die anderen Signaltransduktionswege, die der Bäckerhefe die Art der vorhandenen Stickstoffquelle signalisieren, an der Regulation der Pigmentsynthese beteiligt sind. So ist es zum einen denkbar, dass der mit der Mutante des *Gpr1/Gpa2*-Wegs beobachtete Effekt nur auf der fehlerhaften Wahrnehmung der Glucosekonzentration basiert und somit zu einer Inhibition der Pigmentierung führt. Weiterhin findet die Pigmentierung auch in der *gpr1 $\Delta$* -Mutante statt, wenn auch stark reduziert. Es kann also einen oder mehrere weitere Wege geben, über die die Anwesenheit von Tryptophan und Glucose (und die Abwesenheit einer gut verwertbaren Stickstoffquelle) signalisiert wird. Zu den möglichen Kandidaten gehört hier der MAP-Kinase-Weg über ein *Ras2*-Homolog (Mosch *et al.*, 1996).



hochmolekulare Polymere von phenolischen oder indolischen Verbindungen, während für das hier untersuchte Pigment bislang nur Verbindungen aus zwei bis drei Indolkörpern bekannt sind (Mayser et al., 2003, Irlinger et al., 2004, Kramer et al., 2005b). Außerdem lagern sich Melanine hauptsächlich in der Zellwand der Pilze ein und bilden dort eine hochgradig resistente Schicht aus (Wang et al., 1996), während das Pigment von *C. glabrata* und *M. furfur* in großer Menge auch in die Umgebung abgegeben wird.

Große Ähnlichkeiten lassen sich aber bei der Regulation der Pigmentierung finden. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Pigmentierung von *C. glabrata* unter anderem von der Aktivierung der cAMP-Kaskade reguliert wird (Abschnitt 4.2.5.4). Bei vielen anderen Pilzen ist die Melaninproduktion ebenfalls von dem cAMP-Signalweg abhängig. Bei *Cr. neoformans* beispielsweise wird die DOPA-Melanisierung bei Glucose-, aber auch bei Stickstoffmangel über die G-Protein- $\alpha$ -Untereinheit Gpa1 eingeleitet (Alspaugh et al., 1997), das starke Ähnlichkeit zu Gpa2 von *S. cerevisiae* und *C. glabrata* aufweist. Der Mutantenphänotyp kann durch exogenes cAMP ausgeglichen werden (Alspaugh et al., 1997). Und auch bei *A. fumigatus* ist ein Gpa2-Homolog über die cAMP-Kaskade an der DHN-Melaninbildung in den Konidien beteiligt (Liebmann et al., 2003, Grosse et al., 2008). Weitere Beispiele für die Regulation der Pigmentbildung über G-Proteine finden sich bei den Pflanzenpathogenen *Cryphonectria parasitica* (Gao & Nuss, 1996), *Ustilago hordei* und *U. maydis*, bei denen die Melaninbildung durch cAMP allerdings verringert wird (Lichter & Mills, 1998, Durrenberger & Kronstad, 1999).

Diese Parallelen sind wohl darin begründet, dass G-Protein-gekoppelte Rezeptoren häufig an der Wahrnehmung der Umgebungsbedingungen beteiligt sind und somit eine wichtige Rolle bei der Anpassung der Morphologie und des Transkriptionsprofils an sich ändernde Umweltbedingungen spielen (Zaman et al., 2008). Die Bildung von Pigment, ob Melanin oder andere Verbindungen, ist in den genannten Fällen also wahrscheinlich eine Anpassung an externen Streß, gegen den Pigmente eine Schutzwirkung zeigen. Ähnlich den Melaninen ist das Spektrum des durch das Pigment vermittelten Schutzes groß.

### 4.3.2 Schutz vor UV-Licht

---

Die Schutzfunktion vor UV-Bestrahlung wurde für das Pigment von *M. furfur* bereits gut untersucht (Mayser et al., 2003, Machowinski et al., 2006). Hier konnte gezeigt werden,

dass auch *C. glabrata* in seiner pigmentierten Form vor UV-Licht besser geschützt ist (Abschnitt 3.3.2), und zwar sowohl gegen UV-B als auch gegen das noch schädlichere UV-C-Licht. Die Ergebnisse zum langwelligen UV-A-Licht sind schwerer zu interpretieren, wahrscheinlich überwiegen bei der langen Bestrahlungszeit von bis zu mehreren Stunden die thermischen Effekte (vgl. auch (Pape, 2001)).

Der Schutz ist sehr wahrscheinlich auf die beschriebene UV-absorbierenden Eigenschaften von Verbindungen wie Pityriacitrin zurückzuführen sind, die sich in den Pigmenten beider Organismen finden (Mayser et al., 2002, Mayser et al., 2007). In dieser Beziehung ähnelt das Pigment den Melaninen, die beispielsweise die dem Sonnenlicht ausgesetzten Sporen bei vielen *Aspergillus*-Arten schützen (Singaravelan et al., 2008). Auch der pathogene Pilz *Cr. neoformans* wird durch Melaninbildung vor UV-Licht geschützt, wie Wang *et al.* mit UV-C-Dosen, die den in dieser Arbeit verwendeten vergleichbar sind, gezeigt haben (Wang & Casadevall, 1994a).

Ob der UV-Schutz für *C. glabrata* eine Rolle *in vivo* spielt, bleibt unklar. Die genannten melanisierten Pilze kommen auch freilebend vor, und *M. furfur* ist regelmäßig auf der menschlichen Haut zu finden (Gueho *et al.*, 1998), wo der Schutz vor UV-Licht eine wichtige Rolle spielen kann. Dagegen tritt *C. glabrata* im kommensalen Zustand auf meist lichtgeschützten Schleimhäuten und selten auf der Haut auf (Roth & James, 1988).

#### 4.3.3 Schutz vor oxidativem Stress

---

Pigmentierte *C. glabrata*-Hefen waren auch vor Wasserstoffperoxid deutlich besser geschützt als nichtpigmentierte. In 100 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stieg die Überlebensrate durch das Pigment um das eineinhalbfache von 60% auf 90% nach einer Stunde Inkubation, und auch mit 200 mM zeigten die pigmentierten Hefen einen besseren Schutz. Bei diesen Experimenten zeigte sich, dass verschiedene Faktoren die Messung stark beeinflussen können. Zum einen dauert die Pigmentbildung mehrere Tage, weswegen die Pilze auf Festmedien angezogen werden mußten, denn in Flüssigkultur zeigte sich nach der dreitägigen Inkubationszeit eine extrem hohe basale Wasserstoffperoxidresistenz (Daten nicht gezeigt). Der Grund liegt nach Cuellar-Cruz *et al.* sehr wahrscheinlich in der verstärkten Expression der Katalase Cta1 in der stationären Phase (Cuellar-Cruz et al., 2008). Auch auf Festmedien stieg die Resistenz kontinuierlich an, sowohl unter induzierenden als auch unter

nicht induzierenden Bedingungen (Abschnitt 3.3.1.1). Nach Einsetzen der sichtbaren Pigmentierung zeigte sich aber zu jedem Zeitpunkt ein deutlich besserer Schutz der pigmentierten Zellen, was auf eine Schutzwirkung des Pigments hinweist. Ein weiteres Problem ist die Notwendigkeit, für pigmentierte und nichtpigmentierte Hefen verschiedene Aminosäuren als Stickstoffquelle zu verwenden. Bei anderen Modellpilzen, wie zum Beispiel *Cr. neoformans*, kann der Vorläufer L-DOPA zusätzlich zugefügt werden, bei *C. glabrata* dagegen ist die Pigmentierung mit dem Primärmetabolismus von Tryptophan gekoppelt.

Deswegen wurden verschiedene Wachstumsbedingungen und Mutanten getestet. Bei Wachstum mit der – wie Tryptophan aromatischen – Aminosäure Phenylalanin war die Empfindlichkeit gegenüber Wasserstoffperoxid höher als mit Tryptophan. Das Überleben war hier sogar noch etwas geringer als beim Wachstum mit Arginin. Auf der Mischung von Tryptophan und Threonin, die die Pigmentbildung erlaubt, war die Resistenz entsprechend der verringerten Pigmentierung leicht reduziert. Interessanterweise zeigte sich der Schutz auf diesem Medium nur bei dem Wildtyp und der ebenfalls pigmentierten Mutante *aro9Δ*. Die nahezu pigmentlose Mutante *aro8Δ* konnte zwar auf Tryptophan/Threonin-Medium wachsen, war aber gegen  $H_2O_2$  etwa so sensitiv wie auf Arginin-Medium. Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass die Synthese des Pigments zu einem erhöhten Schutz vor Wasserstoffperoxid führt.

Welche Vorteile könnte *C. glabrata* diese zusätzliche Resistenz bieten? Zum einen kommt ein Schutz vor den reaktiven Sauerstoffspezies des Wirtsimmunsystems in Frage, der in Abschnitt 4.3.5 diskutiert wird. Ein anderer interessanter Aspekt ist die Tatsache, dass auch mit *C. glabrata* gemeinsam als Kommensale auftretende Mikroorganismen reaktive Sauerstoffspezies erzeugen. Hierzu zählen beispielsweise orale Streptococci, die  $H_2O_2$  bis zu einer Konzentration von 10 mM ausscheiden können (Ryan & Kleinberg, 1995), oder *Enterococcus faecalis*, der im Darm größere Mengen Wasserstoffperoxid erzeugen kann (Huycke *et al.*, 2001). Zudem produziert auch *C. albicans*, besonders während der Hyphenbildung reaktive Sauerstoffspezies in größerer Menge (Schröter *et al.*, 2000). Beide Pilze, *C. glabrata* und *C. albicans*, kommen gemeinsam in verschiedenen Wirtsnischen vor (vgl. Abschnitt 4.4.2). Auch außerhalb der eigentlichen Infektionssituation kann *C. glabrata* also kontinuierlich reaktiven Sauerstoffspezies ausgesetzt sein, und das Pigment könnte gemeinsam mit der vergleichsweise hochaktiven Katalase von *C. glabrata* einen wichtigen Vorteil in diesen Lebensräumen bieten.



#### 4.3.4 Möglichkeiten der Synthese *in vivo*

---

Um als wirksamer Schutz während der Infektion und der Besiedlung dienen zu können, müßte das Pigment auch *in vivo* synthetisiert werden können. Derzeit stehen noch keine Modelle zur Verfügung, um eine mögliche Pigmentsynthese während oder vor der eigentlichen Infektion zu verfolgen. Zwei Argumente können gegen die Synthese *in vivo* ins Feld geführt werden. Zum einen ist für die Bildung des Pigments die Anwesenheit von Tryptophan erforderlich. Außerdem wird die Synthese durch die Anwesenheit anderer Aminosäuren, wie sie in der Infektionssituation gegeben sein sollte, stark gehemmt. Beides spricht aber nicht unbedingt gegen eine Pigmentierung im Wirt.

Die Notwendigkeit eines Vorläufermoleküls ist analog zu der Situation bei *Cr. neoformans*, der zur Pigmentbildung einen Grundstoff wie L-DOPA benötigt (Staib, 1962, Chaskes & Tyndall, 1975). Trotzdem läßt sich während der *Cr. neoformans*-Infektion Melaninbildung nachweisen (Rosas *et al.*, 2000). Ähnliches konnte auch für *Histoplasma capsulatum*-Hefen beobachtet werden, die ebenfalls eine exogene phenolische Verbindung für die Melanisierung benötigen und trotz geringer Mengen in den Organen im Tiermodell Melanin bilden können (Nosanchuk *et al.*, 2002). Weiterhin erzeugt *M. furfur* auf der Haut während der Infektion deutlich sichtbare Braunfärbung, die auf die Pigmentproduktion aus Tryptophan zurückgeführt wird (Mayser *et al.*, 1998).

Die in dieser Arbeit verwendete Tryptophankonzentration mit 15 mM ist vergleichsweise hoch und dürfte im Wirt nicht anzutreffen sein. Allerdings kann *C. glabrata* auch schon mit deutlich geringeren Konzentrationen Pigment synthetisieren (Abschnitt 3.1.7). Als Quelle dieses Tryptophans kommt die Nahrung in Betracht. Der Gastrointestinaltrakt ist ein bekanntes Reservoir für *Candida*-Infektionen (Cole *et al.*, 1996, Wells *et al.*, 2007, Miranda *et al.*, 2009) und systemische Infektionen mit *C. glabrata*, die von einer oralen Infektion ausgehen, sind beschrieben (Redding *et al.*, 2004). Tatsächlich enthalten einige Nahrungsmittel große Mengen an Tryptophan – Parmesan beispielsweise bis zu 0,56% und Schweinefleisch etwa 0,25% ihres jeweiligen Gewichts ([www.ars.usda.gov/nutrientdata](http://www.ars.usda.gov/nutrientdata)). Unter diesen Umständen könnte *C. glabrata* also auch *in vivo* genügend Tryptophan für die Pigmentsynthese vorfinden.

Die Inhibition durch andere Aminosäuren im Medium kann ebenfalls umgangen werden, wie die Produktion von Pigment auf arginin- und tryptophanhaltigem Medium in Gegenwart von cAMP zeigt (Abschnitt 3.1.8). Die Produktion von cAMP kann im Infektionsverlauf durch

viele Faktoren erhöht werden, beispielsweise wie oben beschrieben durch Nährstoffmangel, oder durch die Anwesenheit von Serum, wie es für *C. albicans* gezeigt wurde (Miwa *et al.*, 2004). Auch bei *C. glabrata* sind Umstände denkbar, unter ein erhöhter cAMP-Spiegel (oder auch alternative Signaltransduktionswege wie die Aktivierung der MAP-Kaskade) die Bildung des Pigments auch in Gegenwart alternativer Stickstoffquellen ermöglichen könnte.

Ob und wann *C. glabrata* das Pigment tatsächlich *in vivo* bildet, bedarf noch weiterer Untersuchungen. Erst adäquate Tiermodelle könnten zeigen, ob eine Pigmentierung beispielsweise vor dem Eindringen in das Gewebe oder Blut (und damit dem Kontakt mit Immunzellen) stattfinden muß, um einen schützenden Effekt zu erzielen, oder auch während oder sogar nach der Disseminierung erfolgen kann. Wenn diese Systeme etabliert sind, können die Mutanten auf eine mögliche veränderte Virulenz hin getestet werden, um die Rolle des Pigments *in vivo* zu ermitteln. Erste Hinweise konnten hier schon mit einfacheren Zellkulturmodellen gewonnen werden, die im folgenden diskutiert werden.

#### 4.3.5 Schutz vor dem Immunsystem des Wirtes

---

Es konnte in dieser Arbeit nachgewiesen werden, dass die Synthese des Pigments das Abtöten des Pilzes durch menschliche Neutrophile verringern kann (Abschnitt 3.5.3). Diese Schutzfunktion ist in Hinblick auf die Interaktion von *C. glabrata* mit dem Immunsystem sehr interessant und könnte eine mögliche biologische Funktion *in vivo* darstellen. Für den Mechanismus dieser Schutzwirkung kommen zwei Erklärungen in Betracht.

Zum einen konnte hier gezeigt werden, dass pigmentierte *C. glabrata in vitro* vor der Wirkung von Wasserstoffperoxid besser geschützt sind als nichtpigmentierte (Abschnitt 3.3.1). Über denselben Mechanismus könnten die Pilze also auch den respiratorischen *Burst* der Neutrophilen besser überleben, der wahrscheinlich einen wichtigen Beitrag zum Abtöten der Hefen leistet (Kowanko *et al.*, 1991). Tatsächlich konnte für eine andere *C. glabrata*-Mutante (*erg11Δ*) schon gezeigt werden, dass eine verringerte H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Resistenz mit einer verringerten Überlebensrate in Neutrophilen einhergeht (Kan *et al.*, 1996). Auch bei *C. albicans* wird eine Mutante der Superoxiddismutase Sod5 von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und Neutrophilen gleichermaßen effektiver abgetötet als der Wildtyp (Martchenko *et al.*, 2004, Fradin *et al.*, 2005). Ähnlich den melanisierten Pilzen (Wang *et al.*, 1995, Peltroche-Llacsahuanga *et al.*,

2003, Brakhage & Liebmann, 2005) könnte also das Pigment eine chemische Schutzwirkung gegen den respiratorischen Burst entfalten.

Eine alternative Erklärung basiert auf der Unterdrückung der fungiziden Wirkung der Neutrophilen. Für eine Substanzklasse aus dem Pigment von *M. furfur* – die Pityriarubine – konnte *in vitro* eine Verringerung des oxidativen Bursts von chemisch aktivierten Granulocyten gezeigt werden (Kramer et al., 2005a). Auch wirkt Malassezin, eine weitere Verbindung aus dem Pigment, auf humane Melanocyten über die Aktivierung des Arylhydrocarbonrezeptors proapoptotisch (Kramer et al., 2005b). Dieser Rezeptor ist auch in Neutrophilen vorhanden, und seine Aktivierung durch Dioxine und ähnliche Substanzen kann zur Immunsuppression führen (Lawrence & Kerkvliet, 2006). Möglicherweise erreichen Verbindungen des Pigmentgemischs von *C. glabrata* bei der Interaktion mit Neutrophilen lokal ausreichend hohe Konzentrationen, um diese Effekte auszulösen. Desweiteren wurde ein vergleichbarer Effekt, das Auslösen der Apoptose in Leukocyten, auch mit Tryptophol im niedrigen millimolaren Bereich beobachtet (Kosalec et al., 2008b). So besteht also die Möglichkeit, dass auch die lokale Unterdrückung der Neutrophilenantwort eine Rolle bei der erhöhten Überlebensrate von pigmentierten *C. glabrata* spielt.

#### 4.4 Wirkung des Pigments auf andere Organismen

---

##### 4.4.1 Schädigung von Epithelzellen

---

Einer der interessanten Unterschiede zwischen den pathogenen Pilzen *C. glabrata* und *C. albicans* ist das relative Unvermögen von *C. glabrata*, in *in vitro*-Experimenten eine größere Zellschädigung zu verursachen. Während *C. albicans* durch sein Hyphenwachstum und hydrolytische Enzyme recht rapide sowohl einlagige als auch komplexe Zellkulturmodelle schädigen kann (Schaller et al., 1999, Schaller et al., 2006, Li et al., 2007), zeigt *C. glabrata* nahezu keine Cytotoxizität im Monolagen-Modell (Li et al., 2007).

Auch in dieser Arbeit war keine über die spontane Freisetzung von Laktatdehydrogenase (LDH) hinausgehende Zellschädigung meßbar, wenn die Hefen zuvor mit Arginin, Phenylalanin oder Ammoniumsulfat als Stickstoffquelle angezogen worden sind (Abschnitt 3.5.1). Nur die pigmentierten, mit Tryptophan gewachsenen Hefen verursachten eine signifikante Schädigung, die aber nicht durch das Tryptophan allein verursacht ist, da die

Anzucht mit einer Mischung von Tryptophan und Phenylalanin ebenfalls nur zu geringster Schädigung geführt hat. Die Anwesenheit eines oder mehrerer Bestandteile des Pigments führt also zu einer verstärkten Schädigung von humanen Epithelzellen im Monolagen-Modell. Möglicherweise dafür verantwortlich sein könnten, analog zu der Situation bei den Immunzellen, das Tryptophol, dessen zytotoxische Wirkung sich auf mehrere humane Zelllinien erstreckt (Kosalec *et al.*, 2008a, Kosalec *et al.*, 2008b). Auch hier müsste eine ausreichend hohe lokale Konzentration erreicht werden, um die toxische Wirkung zu entfalten. Mit den gleichen Einschränkungen kommen Verbindungen wie Malassezin (Wille *et al.*, 2001b) in Betracht. Da Malassezin in Melanocyten proapoptotisch wirkt (Kramer *et al.*, 2005b), könnte eine ähnliche Wirkung durch diese oder eine andere Verbindung auch für Epithelzellen der Linie TR146, wie sie hier Verwendung fanden, möglich sein.

Welchen Nutzen könnte diese Schädigung von Wirtszellen für *C. glabrata* haben? Während einer Infektion ist *C. glabrata* offenbar in der Lage, Endothel- oder Epithelzellbarrieren zu durchbrechen, und gelangt so in den Blutstrom und von dort in die Organe. *C. albicans* nutzt hierfür unter anderem Hyphen und extrazelluläre Proteasen, über die *C. glabrata* nicht verfügt (Kaur *et al.*, 2005). Die Bildung von wirtszellschädigenden Substanzen könnte deshalb während der Pathogenese von *C. glabrata* eine wichtige Rolle spielen.

#### 4.4.2 Wirkung auf *C. albicans*

---

Die Wirkung des Pigments auf die Hyphenbildung von *C. albicans* ist sehr interessant im Hinblick auf das gemeinsame Vorkommen der beiden Pathogene in verschiedenen Wirtsnischen (Coco *et al.*, 2008): Der Überstand von pigmentierten *C. glabrata*-Kulturen inhibiert die Bildung von Hyphen stark, während nicht-pigmenthaltiger Überstand keine Wirkung zeigt (Abschnitt 3.4.1).

Dieses Phänomen erinnert an das sogenannte *Quorum sensing*, das bei *C. albicans* zu einer Unterdrückung der Hyphenbildung führt, vermittelt durch das Molekül Farnesol (Hornby *et al.*, 2001). Von dem Bakterium *Pseudomonas aeruginosa* gebildete, strukturell ähnliche Substanzen können diesen Effekt ebenfalls hervorrufen (Hogan *et al.*, 2004). Die Wirkung von Farnesol erfolgt dabei offensichtlich über die GTPase Ras1 und den daran anschließenden cAMP-Signaltransduktionsweg, der zur Hyphenbildung führt (Feng *et al.*, 1999, Davis-Hanna *et al.*, 2008). Diese *Quorum-sensing*-Moleküle (QSM) können schon bei einer Konzentration von ca. 200  $\mu\text{M}$  nahezu hundert Prozent der Hyphenbildung

unterdrücken (Hogan et al., 2004). Es stellte sich daher die Frage, welche Moleküle von *C. glabrata* produziert werden, die für den beschriebenen Effekt in Frage kommen. Die Untersuchung des Überstands mittels HPLC (Abschnitt 3.4.1.1) zeigte eine mögliche Verbindung – Tryptophol, das bei *S. cerevisiae* als Endprodukt der Aminosäuregärung aus Tryptophan gebildet wird (Kradolfer et al., 1982).

#### 4.4.2.1 Tryptophol als Repressor der Hyphenbildung von *C. albicans*

Tatsächlich wurden für die Fuselalkohole, zu denen Tryptophol gehört, schon unterschiedliche Wirkungen auf *C. albicans* beschrieben. Tyrosol, das Endprodukt der Aminosäuregärung des Tyrosins, wirkt auf die Hyphenbildung sogar förderlich, und seine Anwesenheit im Medium verkürzt die Zeit bis zur Bildung der ersten Keimschläuche (Chen et al., 2004). Eine hyphenreprimierende Wirkung von Tryptophol wurde vereinzelt beschrieben (Lingappa et al., 1969, Chen & Fink, 2006), und die Produktion von Tryptophol aus Tryptophan ist sehr weit verbreitet. Neben der hier beschriebenen Reaktion in *C. glabrata* und in *S. cerevisiae* ist auch in *C. albicans* die Produktion schon früh beschrieben worden (Lingappa et al., 1969). Kürzlich wurden die in *C. albicans* an der Aminosäuregärung beteiligten Gene identifiziert (Ghosh et al., 2008). Auch hier handelt es sich wie bei *C. glabrata* um Homologe der Bäckerhefengene.

Welcher Mechanismus kann hinter dieser Hyphenrepression stehen? Kabeera et al. haben gezeigt, dass die *tup1Δ/tup1Δ*- und die *nrg1Δ/nrg1Δ*-Mutante von *C. albicans* nicht auf Farnesol reagieren können (Kebaara et al., 2008) – der gleiche Effekt konnte in dieser Arbeit mit Tryptophol beobachtet werden. Zwar zeigt Tryptophol eine genotoxische Wirkung, beispielsweise auf menschliche Zellen (Kosalec et al., 2008b), diese allein kann aber nicht für die reprimierende Wirkung bei *C. albicans* verantwortlich sein. Selbst bei einer Dosis von 5 mM kommt es noch zu (hefeförmigen) Wachstum von *C. albicans*, und die fehlende Wirkung auf die *tup1Δ/tup1Δ*- und *nrg1Δ/nrg1Δ*-Mutante, bei der ein spezifischer Hyphenrepressor deletiert wurde (Braun & Johnson, 1997), deutet auf eine geringe Schädigung von *C. albicans*. Die Wirkung von Tryptophol ist damit nicht allein durch die Toxizität vermittelt, sondern wahrscheinlich über den Signaltransduktionsweg der Hyphenbildung.

Im Gegensatz zu Farnesol (Cho et al., 2007, Davis-Hanna et al., 2008) war die Wirkung von Tryptophol auf das Transkriptionsprofil von *C. albicans* noch nicht untersucht. Deshalb wurden in dieser Arbeit Mikroarray-Experimente durchgeführt, um einen Vergleich mit den pigmentexponierten Zellen durchführen zu können. Der genaue Wirkmechanismus konnte zwar noch nicht aufgeklärt werden, aber die Transkriptionsdaten zeigten eine sehr deutliche Reduktion des Transkriptionsaktivators *UME6*, dessen zentrale Rolle bei der Ausbildung von Filamenten (Pseudohyphen und Hyphen) vor kurzer Zeit erkannt worden ist (Banerjee et al., 2008, Carlisle et al., 2009, Zeidler et al., 2009). Auf welchem Weg kann diese transkriptionelle Repression erfolgen? Die Transkription von *UME6* wird von mehreren Faktoren aktiviert, unter anderem über den Ras1-abhängigen cAMP-Signalweg, und von den Repressoren Tup1 und Nrg1 in Kombination unterdrückt (Zeidler et al., 2009). Tatsächlich scheint die *nrg1Δ/nrg1Δ*-Mutante ebenso wie *tup1Δ/tup1Δ* nicht mehr oder deutlich weniger auf Tryptophol zu reagieren (Abschnitt 3.4.1.2). Damit erscheint es wahrscheinlich, dass die Unterdrückung der Filamentbildung auf Ebene dieser Repressoren der *UME6*-Transkription erfolgt. Dafür spricht auch, dass eine geringe Steigerung des Transkriptionniveaus bei diesen Repressoren gemessen werden konnte, wenn auch auf für Transkriptionsfaktoren typisch niedrigem Gesamtexpressionsniveau, das die Aussagekraft der Daten einschränkt.

#### 4.4.2.2 Weitere hyphenreprimierende Pigmentbestandteile

---

Interessanterweise zeigte sich ein deutlicher Unterschied in der Wirkung von Tryptophol und Pigment auf die *nrg1Δ/nrg1Δ*-Mutante. Im Gegensatz zu Tryptophol ließ sich die Filamentbildung durch pigmentierten Überstand verringern, die Mutante wuchs in Form von abgerundeten Zellen. Zudem wirkte der tryptopholarme (Abschnitt 3.4.1.1) pigmentierte Überstand der *aro10Δ*-Mutante mindestens ebenso stark wie der des Wildtyps – sowohl auf *C. albicans*-Wildtyp als auch die Mutanten. Das zeigt, dass das Pigment einen weiteren Stoff enthält, der anders als Tryptophol auch auf die *nrg1Δ/nrg1Δ*-Mutante wirken kann. Die Fraktionierung des Überstands hat die Existenz dieses weiteren reprimierenden Stoffes bestätigt (Abschnitt 3.4.4).

Auf Transkriptionsebene unterschied sich die hyphenreprimierende Wirkung von Tryptophol und den pigmentierten Überständen von *C. glabrata*-Wildtyp und der *aro10Δ*-Mutante

wenig. Insbesondere die Hyphen-Markergene *HWP1* (Sharkey *et al.*, 1999) und *ECE1* (Birse *et al.*, 1993) sind unter beiden Bedingungen stark in ihrer Expression reduziert worden, und wie mit Tryptophol waren die Ume6-regulierten Gene genauso betroffen wie *UME6* selbst. Wegen des geringen Tryptopholanteils im Überstand der *aro10Δ*-Mutante ist dieser Effekt sehr wahrscheinlich auf die oben erwähnte, in der Fraktionierung gefundene Substanz zurückzuführen. Dabei handelt es sich aber offenbar nicht um ein von *C. glabrata* bei hoher Zelldichte gebildetes *Quorum-sensing*-Molekül, denn der Überstand von pigmentlosen, in Arginin angezogenen Kulturen zeigt weder morphologisch (Abschnitt 3.4.1) noch auf Transkriptionsebene (Abschnitt 3.4.3) einen vergleichbaren Effekt.

Die genaue Wirkweise dieser Substanz ist ebenso unklar wie die Struktur. Da die *nrg1Δ*-Mutante nicht betroffen ist, agiert die Verbindung möglicherweise über die Unterdrückung der Aktivierung des Transkriptionsprogramms, anstelle der Aktivierung der Repressoren. Unter den aktivierenden Faktoren lassen sich auf Transkriptionsebene allerdings keine signifikanten Unterschiede feststellen. Da die Signaltransduktion aber hauptsächlich über posttranslationale Prozesse wie Phosphorylierung erfolgt (vgl. Abbildung 3-45), können mit Transkriptionsanalysen keine direkten Aussagen über die Aktivität getroffen werden. Hier können in Zukunft *C. albicans*-Mutanten der beteiligten Gene Aufschluß über den genauen Mechanismus geben. Die Aufschlüsselung der beteiligten Struktur aus dem Pigment und ihrer Wirkung ist ein interessantes Ziel im Rahmen der Forschung an dem Hefe-Hyphen-Dimorphismus von *C. albicans*, der einen wichtigen Pathogenitätsfaktor darstellt

Zusammengefaßt läßt sich der beschriebene hyphenreprimierende Effekt also am besten erklären, wenn man annimmt, dass die Repression durch den pigmenthaltigen Überstand zum einen durch das entstandene Endprodukt Tryptophol verursacht wird. Zum anderen wirken eine oder mehrere der Indolverbindungen, aus denen das Pigment zusammengesetzt ist, ebenfalls unterdrückend auf *C. albicans*. Die hyphenreprimierende Wirkung könnte dabei, bei einer *in vivo* erfolgenden Produktion, Auswirkungen auf die Interaktionen zwischen *C. glabrata* und *C. albicans* während einer gemeinsamen Besiedlung des Wirtes haben. Für das ebenfalls häufig koisolierte Bakterium *Ps. aeruginosa* wurde eine Unterdrückung des Hyphenwachstums von *C. albicans* über das bakterieneigene *Quorum-sensing*-Molekül schon gezeigt (Hogan *et al.*, 2004). Umgekehrt verhindert das *C. albicans*-eigene Farnesol das Schwärmen von *Ps. aeruginosa* (McAlester *et al.*, 2008) – ein Beispiel für eine wechselseitige Unterdrückung bestimmter morphologischer Formen.

Möglicherweise bietet eine Unterdrückung der invasiven Hyphenwuchsform von *C. albicans* Vorteile für assoziiert wachsende Bakterien und Pilzen wie *Ps. aeruginosa* und *C. glabrata*, beispielsweise über die Verhinderung einer verstärkten Immunantwort, die durch die Hyphen hervorgerufen werden könnte.

#### 4.5 Ist das Pigment ein Pathogenitäts- oder Virulenzfaktor von *C. glabrata*?

Die beschriebenen Wirkungen des Pigmentes führen zu der Frage, ob das Pigment von *C. glabrata* als ein möglicher Pathogenitäts- oder Virulenzfaktor betrachtet werden kann. Um dies zu diskutieren, soll zunächst geklärt werden, wodurch ein solcher Faktor eigentlich definiert wird. Klassischerweise wird zwischen der Pathogenität, also der Fähigkeit, eine Krankheit zu verursachen, und der Virulenz, also dem Maß, in dem ein pathogener Erreger krankheitserregend wirkt, unterschieden. Manche pilzliche Faktoren, wie die Fähigkeit, bei 37°C zu wachsen, sind für die Pathogenese beim Menschen eine *conditio sine qua non*, also ein Pathogenitätsfaktor im klassischen Sinn. Bei vielen weiteren Faktoren, wie zum Beispiel der Melaninbildung, ist diese Trennschärfe so nicht gegeben. Die Anwesenheit dieser Faktoren ermöglicht erst die Pathogenese, aber die spezifische Ausprägung kann die Virulenz bestimmen. Im weiteren soll zusammenfassend von Virulenzfaktoren gesprochen werden, um diese beiden Aspekte abzudecken.

Wie bestimmt sich also ein solcher Virulenzfaktor? Die Definition ist nicht einheitlich, im allgemeinen werden aber solche Faktoren so bezeichnet, die den Mikroorganismus beim Überleben auf Kosten des Wirtes unterstützen. Während Virulenz definitionsgemäß nur im Zusammenspiel mit dem Wirt existiert, kann man zwei Klassen von Virulenzfaktoren unterscheiden – solche mit einer Funktion auch außerhalb des Wirtes, und solche, die spezifisch nur im Kontext des Wirtes Relevanz haben. Beispielhaft für letztere sei die Kapsel von *Cr. neoformans* genannt, die bei freilebenden Pilzen vor Austrocknung und Angriffen durch räuberische Amöben schützt, und im Wirt gegen die Phagozytose durch Immunzellen wirksam ist (Kozel *et al.*, 1988, Steenbergen *et al.*, 2001, Casadevall *et al.*, 2003).

Auch die Pigmentbildung von *C. glabrata* sollte in diese Kategorie fallen. Zwar ist für diesen Pilz kein natürliches Reservoir außerhalb des Wirtes bekannt, aber die in dieser Arbeit beschriebenen Schutzfunktionen vor UV-Licht und vor reaktiven Sauerstoffspezies können *C. glabrata* auch außerhalb der eigentlichen Infektionssituation nützen. Im kommensalen



Zustand, der unter diesem Aspekt prinzipiell dem freilebenden Zustand von *Cr. neoformans* entspricht, könnte das Pigment vor biotischen (also anderen kommensalen Mikroorganismen wie *C. albicans*) und abiotischen Faktoren (beispielsweise UV-Licht) schützen. Kann es aber auch dem Pilz in der Infektionssituation auf Kosten des Wirtes nützlich sein?

Die Schädigung der Epithelzellen und die höhere Resistenz gegen Neutrophile sprechen dafür. Zwar konnte im Eiermodell zwischen pigmentierten und nichtpigmentierten Hefen kein Unterschied in der Virulenz gemessen werden, es ist aber unklar, inwiefern dieses Modell eine tatsächliche Infektion nachbildet. Denn im Gegensatz zu *C. albicans* zeigten die Hefen eine sehr geringe Pathogenität, was die Aussagekraft dieses Modells im Vergleich mit der klinischen Situation reduziert. Der Nachweis, ob das Pigment ein Virulenzfaktor ist, gestaltet sich also schwierig. Bisher ist nicht bekannt, ob das Pigment *in vivo* auch tatsächlich gebildet wird. Mutanten des Pigmentsynthesewegs wie *aro8Δ* sind gleichzeitig in ihrem Wachstum auf verschiedenen Aminosäuren eingeschränkt, wodurch sich eine klare Zuordnung eines möglichen Virulenzdefekts zu der Pigmentsynthese in einem *in vivo*-Modell nicht herstellen ließe. Auch das reduzierte Wachstum könnte die Virulenz abschwächen. Die Verschränkung von Metabolismus und möglichem Virulenzfaktor erschwert also den schlüssigen Nachweis einer spezifischen Rolle des Pigments. Das Potential ist jedoch vorhanden, und die Vermutung liegt nahe, dass es von *C. glabrata* auch genutzt wird.

## 5 Zusammenfassung

---

Obwohl die Bedeutung von *C. glabrata* als Krankheitserreger stetig zunimmt, sind bislang nur wenige Pathogenitätsfaktoren dieses Pilzes bekannt. Die Entdeckung einer neuartigen Pigmentsynthese bei *C. glabrata* hat die Möglichkeit eröffnet, dass es sich analog zu den gut erforschten pilzlichen Melaninen bei diesem Pigment um einen neuen Pathogenitätsfaktor handeln könnte. In dieser Arbeit sollte deshalb der Syntheseweg des Pigments von *C. glabrata* analysiert und die möglichen biologischen Funktionen der Pigmentbildung bestimmt werden. Die Leitfragen waren dabei (1) wie der Syntheseweg des Pigments verläuft, (2) unter welchen Bedingungen das Pigment gebildet wird und (3) welche biologische Wirkung das Pigment für *C. glabrata* hat.

Über Transkriptionsprofilanalysen, eine Mutantenbibliothek, die Generierung spezifischer Mutanten und die heterologe Expression des relevanten Proteins konnte die erste Frage beantwortet und der Syntheseweg identifiziert und zu einem großen Teil aufgeklärt werden. Die Pigmentsynthese ist mit dem Tryptophanabbau von *C. glabrata* über die Aminosäuregärung gekoppelt: die aromatische Aminotransferase Aro8, die den ersten Schritt des Abbaus katalysiert, ist auch entscheidend für die Pigmentbildung. Das entstehende Zwischenprodukt, Indolpyruvat, reagiert danach entweder über weitere Zwischenschritte zu dem Pigment oder folgt über die Phenylpyruvat-Decarboxylase Aro10 weiter dem Weg der Aminosäuregärung. Die alternative aromatische Aminotransferase Aro9 spielt bei der Pigmentierung nur eine untergeordnete Rolle.

Die Bandbreite der Antworten auf die zweite Leitfrage ist breiter: Die Faktoren, die die Pigmentbildung beeinflussen, sind vielfältiger Natur. Tryptophan ist für die Synthese des Pigments unabdingbar, und Sauerstoff wird für die spontane Reaktion des Pigmentvorläufers zum eigentlichen Pigment benötigt. Alternative Stickstoffquellen, nichtfermentierbare Kohlenstoffquellen und hohe Zelldichte verringern die Pigmentbildung durch *C. glabrata*. Viele dieser Faktoren konnten in einem vorläufigen Modell zusammengefaßt werden, in dem an dieser Regulation der cAMP-Signaltransduktionsweg beteiligt ist, sehr wahrscheinlich über den Rezeptor Gpr1.

Für das Pigment ließen sich in Beantwortung der dritten Frage auch verschiedene mögliche biologische Funktionen beschreiben. Pigmentierte Hefen sind besser gegen UV-Licht, gegen Wasserstoffperoxid und gegen die Wirkung von menschlichen Neutrophilen geschützt. Zudem zeigen sie eine deutlich höhere Schädigung von Wirtszellen in einem *in vitro*-Modell. In diesen Funktionen ähnelt es damit den bekannten pilzlichen Melaninen und kann somit als möglicher Pathogenitätsfaktor von *C. glabrata* behandelt werden. Daneben konnte aber auch gezeigt werden, dass Pigmentbestandteile die Bildung von Filamenten durch den häufig gemeinsam mit *C. glabrata* auftretenden pathogenen Pilz *C. albicans* wirksam unterdrücken können.

Neben diesen direkten Antworten ergaben sich auch weitere interessante Nebenaspekte der Biologie von *C. glabrata* aus dieser Arbeit. So wurden hier zum ersten Mal die wichtigsten Schritte der Aminosäuregärung in *C. glabrata* aufgeklärt. Dabei zeigte sich, dass die beiden aromatischen Aminotransferasen von *C. glabrata* andere Funktionen und eine andere Regulation als in *S. cerevisiae* haben. Weiterhin konnte Histidin als mögliches neues

Substrat von Aro8 beschrieben werden, wodurch *C. glabrata* im Gegensatz zu *S. cerevisiae* den beiden gemeinsamen Verlust der Histidase kompensiert. Auch deutete sich eine Verknüpfung des Vid-Komplexes mit der Stickstoffwahrnehmung an, wodurch eine Verbindung der Wahrnehmung von Stickstoff- und Kohlenstoffquellen möglich scheint.

## 5.1 Summary

---

The relative importance of *C. glabrata* as a causative agent of severe diseases is rising steadily. But in spite of this, few pathogenicity factors have been described for this fungus. Pigment synthesis by *C. glabrata* may constitute a novel pathogenicity factor, analogous to the well-studied fungal melanins. This work aimed to elucidate the biosynthetic pathway of pigment production and determine the biological function of *C. glabrata* pigmentation. Three central questions were posed: (1) how is the pigment synthesized, (2) under which conditions does pigmentation take place and (3) what is the biological role of the pigment?

Using transcriptional profiling, a random mutant library, targeted knock-out mutants of *C. glabrata*, and recombinant expression of a central protein, the pigment biosynthetic pathway was identified and partially elucidated. Pigment synthesis is strictly coupled to tryptophan degradation in *C. glabrata*. The aromatic amino transferase Aro8 catalyzes both the first step in tryptophan utilization and in pigment synthesis. Indole pyruvate, the resulting intermediate, then reacts further to form the pigment. Alternatively, it follows the Ehrlich pathway of amino acid degradation via the decarboxylase Aro10, thus preventing pigment formation. The aromatic amino transferase Aro9, which acts in parallel to Aro8, plays a lesser role in pigmentation.

A multitude of factors influence the pigmentation process: while tryptophan is an absolute prerequisite, other additional nitrogen sources can inhibit pigmentation. Oxygen is also required for a secondary, spontaneous reaction step after the initial intermediate formation. Non-fermentable carbon sources and high initial cell density strongly reduce the amount of pigment formed. Many of these different factors and influences can be integrated into a preliminary model of pigmentation, based on the activity of the cyclic AMP signal transduction pathway and the receptor protein Gpr1.

The biological functions of this pigment are also quite diverse. Pigmented cells are better protected against the adverse effects of hydrogen peroxide, UV light and killing by human neutrophils. Furthermore, pigment containing yeasts cause more damage to human cells in an *in vitro* epithelial model. In these respects, the pigment resembles the well-known fungal melanins, and may thus be considered a potential pathogenicity factor of *C. glabrata*. In addition to these effects, pigmented supernatant of *C. glabrata* cultures was able to effectively repress filament production in *C. albicans*, a fungus known to occur in co-infections with *C. glabrata*.

Further novel aspects of the biology of *C. glabrata* have been described in this work in addition to the original questions. For the first time, the initial steps of the Ehrlich pathway have been elucidated in *C. glabrata*. Interestingly, the function and regulation of the *C. glabrata* aromatic amino transferases differs from their known counterparts in the closely related baker's yeast. Furthermore, Aro8 in *C. glabrata* seems to accept histidine as a substrate, in contrast to the enzyme in *S. cerevisiae*. This enables *C. glabrata* to grow on histidine as a sole nitrogen source, despite the lack of a histidase enzyme. Also, a connection between the carbon and nitrogen sensing mechanisms via the Vid complex seems plausible in light of the data presented here.

## 5.2 Ausblick

---

In dieser Arbeit konnte erstmals die Synthese dieses neuartigen, tryptophanabhängigen Pigments bei einem humanpathogenen Pilz aufgeschlüsselt werden und dem Pigment dabei verschiedene mögliche Rollen in der Pathogenese zugeordnet werden. Da neben *C. glabrata* und *M. furfur* auch weitere pathogene Pilze, darunter sowohl Asco- als Basidiomyceten, dieses Pigment produzieren können, bietet diese Arbeit die Grundlagen, um auch bei weiteren Pilzen die Rolle des tryptophanabhängigen Pigments zu erforschen.

Bei *C. glabrata* selbst fehlen derzeit noch die entsprechenden *in vivo*-Modelle, um schlüssig die Rolle der Pigmentbildung in der Pathogenese nachzuweisen. In einem Mausmodell konnte gezeigt werden, dass Aminosäureprotophien nur einen sehr geringen Einfluß auf den Infektionsverlauf haben (Jacobsen, Brunke, *et al.*, in Vorbereitung). Inwieweit das auch für Mutanten gilt, die spezifische Aminosäuren nicht als Stickstoffquelle nutzen können, wie *aro8Δ*, müßte vor der Erprobung dieser Mutanten im Tierversuch abgeklärt werden.

Auch *in vitro* gibt es noch weitere interessante Fragestellungen. Zum einen könnten die hier erlangten Ergebnisse verwendet werden, um weiter zu untersuchen, über welchen Signaltransduktionsweg die Pigmentsynthese reguliert wird. Neben der möglichen Bestätigung von Gpr1 als Rezeptor wäre die Rolle des Transkriptionsfaktors Aro80 von Interesse, ebenso wie der mögliche Zusammenhang der vesikelinduzierten Degradation (VID) und der Aktivität von Aro10. Kann die posttranslationale Regulation von Aro10 die Pigmentierung wirklich wie vermutet beeinflussen? Und welche Rolle spielt der VID-Komplex dabei? Diese Aspekte gingen weit über die Fragestellung dieser Arbeit hinaus, könnten aber auch Rückschlüsse auf die Stickstoffverwertung bei *S. cerevisiae* erlauben.

Auch die Histidinverwertung durch *C. glabrata* bietet ein interessantes Feld für weitere Forschung. Offensichtlich erfolgt diese im Gegensatz zur Bäckerhefe, die Histidin nicht als Stickstoffquelle nutzen kann, über Aro8. Das vorhandene, heterolog exprimierte Protein kann in Zukunft Aufschluß darüber geben, ob *C. glabrata* hier einen ungewöhnlichen Weg der Aminosäureverwertung verwendet.

Zuletzt ist die Substanz im Pigment von *C. glabrata*, die die Filamentbildung von *C. albicans* so effektiv unterdrücken kann, von sehr hohem Interesse. Detailliertere Fraktionierungen in Verbindung mit den etablierten Nachweisverfahren sollten in naher Zukunft eine Beschreibung dieser Substanz ermöglichen.

In Zukunft kann somit, auch mit dieser Arbeit als Grundlage, die Funktion der tryptopholanhängigen Pigmentsynthese bei *C. glabrata* und weiteren humanpathogenen Pilzen noch näher untersucht werden. Die mögliche Rolle in der Pathogenese, der recht einfache Syntheseweg und die Vielzahl der Effekte machen die Pigmentsynthese zu einem interessanten Objekt der Forschung an pathogenen Pilzen und ihrer Bekämpfung.

## 6 Danksagungen

---

Mein Dank gebührt einer Vielzahl von Menschen, Kollegen und Freunde, die direkt oder indirekt zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen habe. Hier können nur einige wenige erwähnt werden, aber auch allen ungenannt bleibenden gilt selbstverständlich ein großes Dankeschön!

Zuerst möchte ich mich bei Prof. Bernhard Hube bedanken. In seinem Labor und unter seiner Betreuung konnte ich sowohl in Berlin als auch in Jena in einer immer sehr guten, stets offenen und im besten Sinne herausfordernden wissenschaftlichen Atmosphäre arbeiten.

Dank gebührt auch Prof. Rupert Mutzel, der sich freundlicherweise als Gutachter dieser Arbeit angeboten hat.

Meinen Kollegen möchte ich ebenso danken für die sehr gute, immer freundliche und aufgeschlossene Atmosphäre im Labor, aber auch und ganz besonders für die vielen fruchtbaren Diskussionen und die unzähligen Hilfen im Laboralltag. Dieser Dank gilt selbstverständlich den Mitgliedern der ehemaligen NG4/FG16 am Robert-Koch-Institut (also Abigail, Antje, Chantal, Katharina, Oli, Rebecca, Ricardo und Sascha) ebenso wie denen der Abteilung MPM am Hans-Knöll-Institut (Anja, Betty, Cindy, Duncan, François, Ilse, Ines, Jenny, Katharina, Katja, Lydia, Melanie, Pedro, Petra, Ronny und Silvia). Ein zusätzliches Dankeschön gilt natürlich noch einmal Antje und Ines (für die Hilfe bei den Neutrophilenversuchen), Ricardo (für die Hilfe bei den Experimenten mit Epithelzellen), Ilse (für die Eierversuche) und Martin für seine unermüdliche Arbeit am Mikroskop, ebenso Ronny und Duncan für die konstruktiven, kritischen Anmerkungen beim Lesen der ersten Entwürfe und vieler anderer Texte. Ohne diese Kollegen und Freunde wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Auch der Studienstiftung des deutschen Volkes möchte ich dafür danken, dass die mir für diese Arbeit großzügigerweise ein Stipendium gewährt hat.

Dank gebührt weiterhin Prof. Arturo Casadevall für die Bereitstellung der Mutantenbibliothek, Prof. Geraldine Butler für eine erste Generation der *C. glabrata*-Microarrays, Dr. Steffen Rupp für die zweite Generation Microarrays und Prof. Karl Kuchler für die zusätzlichen Mutanten von *C. glabrata*. Im Hans-Knöll-Institut bin ich dem Biotechnikum zu Dank verpflichtet, besonders Prof. Uwe Horn, Dr. Bettina Bardl und Armin Siering für die Analysen der Pigmentverbindungen. Ebenso danke ich natürlich Dr. Matthias Brock und Christian Fleck für die technische Hilfe bei der Expression und dem Testen des Enzyms, aber auch für die vielen spontanen Diskussionen und die immer neuen Ideen. Außerhalb des Instituts haben mich gerade in letzter Zeit Jan, Karsten, Jürgen und Mirko glücklicherweise immer wieder von der Arbeit ablenken können. Auch dafür: Danke!

Auf privater Ebene gilt mein Dank natürlich meinen Eltern, die mich immer und stets unterstützt haben. Ohne diese Unterstützung wäre diese Arbeit sicherlich niemals möglich gewesen.

Ein letztes, aber ganz besonderes Dankeschön geht natürlich an meinen Freund Stefan, für seine große Geduld, ganz besonders in letzter Zeit, und dafür, dass immer da ist. Danke!





## 7 Anhang

---

### 7.1 Erklärung

---

Hiermit versichere ich, dass ich diese Dissertation mit dem Titel

"Molekularbiologische Untersuchungen zur Pigmentsynthese von humanpathogenen Pilzen"

selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt habe

---

Ort, Datum

---

Unterschrift

## 7.2 Lebenslauf

---

**Der Lebenslauf ist in der Online-Version  
aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten**

### 7.3 Bisherige Publikationen

---

**Brunke, S.**, K. Seider, R. Almeida, A. Albrecht, D. Barz, Steffen Rupp & B. Hube, (2009) *Candida glabrata* tryptophan-based pigment production via the Ehrlich pathway. ***Mol Microbiol*** (Revision eingereicht).

Jacobsen, I., **S. Brunke**, K. Seider, T. Schwarzmüller, A. Firon, C. d'Enfert, K. Kuchler & B. Hube, (2009) *Candida glabrata* persistence in mice does not depend on host immunosuppression and is unaffected by fungal amino acid auxotrophy. ***Infect Immun*** doi:10.1128/IAI.01244-01209.

Butler, G., M. D. Rasmussen, M. F. Lin, M. A. Santos, S. Sakthikumar, C. A. Munro, E. Rheinbay, M. Grabherr, A. Forche, J. L. Reedy, I. Agrafioti, M. B. Arnaud, S. Bates, A. J. Brown, **S. Brunke**, M. C. Costanzo, D. A. Fitzpatrick, P. W. de Groot, D. Harris, L. L. Hoyer, B. Hube, F. M. Klis, C. Kodira, N. Lennard, M. E. Logue, R. Martin, A. M. Neiman, E. Nikolaou, M. A. Quail, J. Quinn, M. C. Santos, F. F. Schmitzberger, G. Sherlock, P. Shah, K. A. Silverstein, M. S. Skrzypek, D. Soll, R. Staggs, I. Stansfield, M. P. Stumpf, P. E. Sudbery, T. Srikantha, Q. Zeng, J. Berman, M. Berriman, J. Heitman, N. A. Gow, M. C. Lorenz, B. W. Birren, M. Kellis & C. A. Cuomo, (2009) Evolution of pathogenicity and sexual reproduction in eight *Candida* genomes. ***Nature*** 459: 657-662.

Wilson, D., S. Thewes, K. Zakikhany, C. Fradin, A. Albrecht, R. Almeida, **S. Brunke**, K. Grosse, R. Martin, F. Mayer, I. Leonhardt, L. Schild, K. Seider, M. Skibbe, S. Slesiona, B. Waechtler, I. Jacobsen & B. Hube, (2009) Identifying infection-associated genes of *Candida albicans* in the postgenomic era. ***FEMS Yeast Res*** 9: 688-700.

Almeida, R. S., **S. Brunke**, A. Albrecht, S. Thewes, M. Laue, J. E. Edwards, S. G. Filler & B. Hube, (2008) the hyphal-associated adhesin and invasin Als3 of *Candida albicans* mediates iron acquisition from host ferritin. ***PLoS Pathog*** 4: e1000217.

Hort, W., S. Lang, **S. Brunke**, P. Mayser & B. Hube, (2008) Analysis of differentially expressed genes associated with tryptophan-dependent pigment synthesis in *M. furfur* by cDNA subtraction technology. *Med Mycol* 47: 248-258.

**Brunke, S.** & B. Hube, (2006) MfLIP1, a gene encoding an extracellular lipase of the lipid-dependent fungus *Malassezia furfur*. *Microbiology* 152: 547-554.

Menzel, R., U. Greggers, A. Smith, S. Berger, R. Brandt, **S. Brunke**, G. Bundrock, S. Hulse, T. Plumpe, F. Schaupp, E. Schuttler, S. Stach, J. Stindt, N. Stollhoff & S. Watzl, (2005) Honey bees navigate according to a map-like spatial memory. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 3040-3045.

#### 7.4 Poster und Präsentationen

---

25. – 26.02.2005 Statusworkshop der DGHM-Fachgruppe Eukaryontische Krankheitserreger, Jena. Vortrag "Klonierung und Charakterisierung eines Lipasegens der lipophilen Hefe *Malassezia furfur*"

25. – 28.09.2005 2. gemeinsamen Jahrestagung der DGHM und VAAM, Göttingen. Poster "MfLIP1 encodes an extracellular lipase of the lipodependent fungus *Malassezia furfur*"

13. – 17.03.2006 8<sup>th</sup> ASM Conference on *Candida* and Candidiasis, Denver, USA. Poster "*Candida glabrata* as a model for studying pigment synthesis in pathogenic yeasts"

19. – 22.03.2006 Jahrestagung der VAAM, Jena. Poster "*Candida glabrata* as a model for pigment synthesis in *Malassezia furfur*"

23. – 24.02.2007 Statusworkshop der DGHM-Fachgruppe Eukaryontische Krankheitserreger, Stuttgart. Vortrag "Pigment production by *Candida glabrata*"

11. – 17.05.2007 2<sup>nd</sup> FEBS Advanced Lecture Course "Human Fungal Pathogens", Nizza, Frankreich. Poster "*Candida glabrata* as a model for fungal pigment synthesis"

12. – 15.09.2007 FunNet2007-Treffen des ERANet-PathoGenomics, Gosau, Österreich. Poster und Vortrag "Pigment production by *Candida glabrata*"

24. – 28.03.2008 9<sup>th</sup> ASM Conference on *Candida* and Candidiasis, New York, USA. Poster "Pigment Synthesis of *Candida glabrata*"

04. – 06.09.2008 42. Tagung der DMykG (MYK), Jena. Poster "Pigment synthesis of *Candida glabrata*"
21. – 24.09.2008 60. Jahrestagung der DGHM, Dresden. Poster "Pigment synthesis of *Candida glabrata*"
01. – 02.05.2009 Treffen des FunPath-Konsortiums im ERANet-PathoGenomics, Nizza, Frankreich. Vortrag "Pigment synthesis by *Candida glabrata*"
- 30.04.2009 Kolloquium des Hans-Knöll-Instituts, Jena. Vortrag "Pigment synthesis by *Candida glabrata*"
03. – 05.09.2009 43. Tagung der DMykG (MYK), Köln. Poster "Molekularbiologische Untersuchungen der Pigmentproduktion von *Candida glabrata* deuten auf erwartete und unerwartete biologische Funktionen"

## 7.5 Stipendien und Preise

---

**Doktorandenstipendium** der Studienstiftung des deutschen Volkes für das Projekt "Molekularbiologische Untersuchungen zur Pigmentsynthese von humanpathogenen Hefen" (2005-2008)

**medac-Forschungspreis 2008** für die Publikation "The hyphal-associated adhesin and invasin Als3 of *Candida albicans* mediates iron acquisition from host ferritin." Almeida, R. S., Brunke, S. *et al.* (2008) *PLoS Pathogens*

## 7.6 Genlisten

7.6.1 Differentiell in Tryptophan hochregulierte *C. glabrata*-Gene

C.g.-Genname	Expression (Vielfache von GR)				S.c. Homolog <sup>a</sup>	Ähnlich- keit <sup>b</sup>	Kategorie <sup>c</sup>
	Arg 8h	Arg 24h	Trp 8h	Trp 24h			
CAGL0A03102g	0,85	0,80	12,84	10,38	<i>ARO10</i>	3	Aminosäuregärung
CAGL0I10791g	0,61	0,73	8,82	6,27	<i>ARG3</i>	4	Argininsynthese
CAGL0H06017g	1,87	2,21	7,60	5,10	<i>FLR1</i>	3	Transporter / Permease
CAGL0J11242g	1,91	1,44	7,53	6,62	<i>RHO5</i>	3	Regulation / Signaltransduktion
CAGL0G01254g	2,63	2,09	7,22	3,90	<i>ARO8</i>	4	Aminosäuregärung
CAGL0K02145g	2,94	1,22	6,89	5,94	<i>YER130C</i>	1	Hypothetisches Protein
CAGL0C04917g	0,65	0,88	6,61	4,33	<i>CPA2</i>	4	Argininsynthese
CAGL0G04389g	1,32	1,07	5,97	4,27	<i>GZF3</i>	1	Regulation / Signaltransduktion
CAGL0M11660g	2,51	0,90	5,92	4,58	<i>RHR2</i>	4	Stressantwort
CAGL0K10780g	2,31	2,35	5,87	3,54	<i>IMD4</i>	4	Nucleotidmetabolismus
CAGL0M07293g	1,10	0,99	5,73	24,95	<i>PDR12</i>	3	Transporter / Permease
CAGL0M05775g	2,27	2,22	5,70	3,16	<i>NIP7</i>	4	Ribosom
CAGL0I06248g	2,74	1,46	5,69	3,79	<i>HAL5</i>	3	Regulation / Signaltransduktion
CAGL0K12254g	1,73	1,41	5,63	6,36	<i>VID24</i>	3	Glukose-induzierte Degradation
CAGL0I08987g	1,31	0,59	5,34	3,77	<i>ARG4</i>	4	Argininsynthese
CAGL0C05115g	1,27	1,10	5,21	4,10	<i>ARG1</i>	4	Argininsynthese
CAGL0L00671g	1,98	1,84	4,96	3,12	<i>FCY2</i>	4	Transporter / Permease
CAGL0L03157g	2,77	0,89	4,69	4,21	<i>GZF3</i>	1	Regulation / Signaltransduktion
CAGL0M05841g	2,16	0,84	4,54	3,30	<i>KTR2</i>	3	Glycosylierung
CAGL0J04554g	2,96	1,34	4,51	3,86	<i>AAT2</i>	3	Aminosäuremetabolismus
CAGL0B01507g	0,86	0,57	4,48	3,76	<i>ARG8</i>	4	Argininsynthese
CAGL0B04895g	2,26	2,71	4,46	4,54	<i>RFX1</i>	2	Regulation / Signaltransduktion
CAGL0G03531g	1,21	2,43	4,33	4,80	<i>SPR6</i>	1	Unbekannte Funktion
CAGL0I10747g	2,54	1,79	4,30	4,54	<i>MEP3</i>	4	Transporter / Permease
CAGL0F02563g	1,40	0,61	4,28	3,27	<i>HPT1</i>	4	Nucleotidmetabolismus
CAGL0C05555g	2,87	1,51	4,19	3,84	<i>GUD1</i>	3	Nucleotidmetabolismus
CAGL0G04763g	2,84	2,45	4,17	5,11	<i>RGS2</i>	1	Regulation / Signaltransduktion
CAGL0J09790g	1,92	1,12	3,90	3,09	<i>GGC1</i>	4	Transporter / Permease
CAGL0M08580g	2,03	2,39	3,66	3,86	<i>DON1</i>	1	Meiose
CAGL0M11198g	2,23	2,94	3,57	3,76	<i>UBP8</i>	3	Regulation / Signaltransduktion
CAGL0I10626g	1,18	1,26	3,48	3,25	<i>YGR125W</i>	3	Unbekannte Funktion
CAGL0H08393g	1,50	1,39	3,45	4,90	<i>BAP3</i>	4	Transporter / Permease
CAGL0E01793g	1,63	0,53	3,44	3,76	<i>YPS1</i>	3	Protease
CAGL0D01826g	2,55	2,92	3,40	3,43	<i>GCN1</i>	3	Regulation / Signaltransduktion
CAGL0G04213g	2,99	1,60	3,39	3,03	<i>RNR4</i>	3	Nucleotidmetabolismus
CAGL0J07502g	2,21	2,06	3,38	3,99	<i>YNL234W</i>	3	Regulation / Signaltransduktion
CAGL0L03388g	0,91	0,44	3,36	3,35			Keine ähnliches Protein
CAGL0I04862g	1,68	2,00	3,31	3,49	<i>SNQ2</i>	4	Transporter / Permease
CAGL0K05753g	2,63	1,38	3,31	4,66	<i>GNP1</i>	4	Transporter / Permease
CAGL0H02519g	2,52	2,87	3,28	3,78	<i>YMR253C</i>	3	Unbekannte Funktion
CAGL0K12540g	2,04	2,31	3,27	3,77	<i>HAC1</i>	1	Regulation / Signaltransduktion
CAGL0E05522g	2,26	2,25	3,21	3,85	<i>YOR342C</i>	3	Unbekannte Funktion
CAGL0B02057g	2,65	2,74	3,15	3,02	<i>FIN1</i>	1	Mitose
CAGL0I10901g	2,49	1,13	3,11	3,10	<i>SLK19</i>	3	Meiose
CAGL0F02387g	2,13	1,69	3,06	3,26	<i>PHO87</i>	3	Transporter / Permease
CAGL0L05038g	2,47	1,48	3,06	3,00	<i>MUD2</i>	2	Splicing
CAGL0B01683g	2,83	1,86	3,04	3,07	<i>TMN2</i>	4	Unbekannte Funktion

## 7.6.2 In 5 mM Tryptophol mindestens 3× hochregulierte *C. albicans*-Gene

C.a. – ORF	K <sup>a</sup> 0 mM	Expression (Vielfache von GR)					Gen- name	Kategorie
		Trp'ol 1 mM	Trp'ol 5 mM	Arg WT	Pgmt WT	Pgmt <i>aro10Δ</i>		
<i>Hochreguliert in 5 mM Tryptophol</i>								
orf19.5573	2,34	1,24	8,21	1,12	2,06	0,90		Hypothetischer ORF
orf19.4551	1,18	2,24	6,39	11,10	21,65	29,73	<i>CTN1</i>	Nichtfermentierbare C-Quellen
orf19.1069	1,63	1,59	5,54	1,42	1,46	4,48	<i>RPN4</i>	DNA-Bindeprotein
orf19.2048	0,88	0,61	5,22	2,92	16,41	36,28		Hypothetischer ORF
orf19.1415	0,72	0,87	2,95	0,51	1,70	1,21	<i>FRE10</i>	Eisenreduktase
orf19.853	0,79	1,06	2,77	1,00	1,38	1,75	<i>SAP99</i>	Putative sekretierte Protease
orf19.2308	0,84	1,31	2,65	0,36	0,95	1,55		Hypothetischer ORF
orf19.6899	0,82	1,44	2,53	2,01	1,35	1,63		Hypothetischer ORF
orf19.7455	0,66	0,42	2,29	1,73	1,42	1,25		Hypothetischer ORF
orf19.4894	0,70	0,98	2,16	2,66	5,24	4,15		Unbekannte Funktion
orf19.3782	0,66	0,88	1,99	0,75	0,97	0,62		Hypothetischer ORF
orf19.2013	0,56	0,60	1,69	0,68	0,96	0,80	<i>KAR2</i>	Chaperon
orf19.4676	0,43	0,66	1,57	1,87	2,99	3,49		Hypothetischer ORF
orf19.5042	0,42	1,34	1,51	2,80	2,00	1,60		Hypothetischer ORF
orf19.3229	0,41	0,57	1,38	0,58	1,14	0,92		Hypothetischer ORF
orf19.2531	0,24	0,19	1,32	0,83	1,52	2,38	<i>CSP37</i>	Hyphenzellwandprotein
<i>Hochreguliert in 5 mM Tryptophol und Pigment von Wildtyp</i>								
orf19.1631	1,09	1,91	5,27	1,00	1,47	3,28	<i>ERG6</i>	Ergosterolbiosynthese
orf19.7310	0,37	0,32	1,24	0,54	0,77	1,49		Hypothetischer ORF; Meiose?
orf19.220	0,41	0,46	1,45	0,53	1,21	1,61	<i>PIR1</i>	Hefenzellwandprotein
orf19.6000	1,18	1,83	4,76	0,96	1,51	5,11	<i>CDR1</i>	Multidrug-Transporter
orf19.2693	0,74	0,69	2,54	0,41	0,97	4,33		Hypothetischer ORF
orf19.6662	0,26	0,67	0,79	0,77	0,71	0,86		Hypothetischer ORF
orf19.6322	1,56	2,02	6,57	3,20	2,32	6,44	<i>ARD</i>	Nichtfermentierbare C-Quellen
<i>Hochreguliert in 5 mM Tryptophol, Pigment von Wildtyp und Pigment von aro10Δ-Mutante</i>								
orf19.5565	0,71	2,10	3,23	1,63	5,09	5,10		Abbau verzweigt-kettiger AS
orf19.3160	0,22	0,17	0,70	0,41	1,11	2,26	<i>HSP12</i>	Hitzeschockprotein
orf19.1027	0,28	0,22	1,20	0,78	2,37	3,99	<i>PDR16</i>	Phosphatidylinositol-Transfer
orf19.5380	0,35	0,88	1,40	0,87	1,34	1,66		Transkriptionsfaktor; Lysin?
orf19.7042	1,66	2,27	7,52	1,72	9,15	20,75		Hypothetischer ORF
orf19.7498	1,28	2,10	3,87	3,43	3,87	4,51	<i>LEU1</i>	Leucinsynthese; hyphenrepr.
orf19.2262	0,62	0,80	1,88	1,31	1,92	3,26		Hypothetischer ORF

Abkürzungen: K – Kontrolle; Trp'ol – Tryptophol; Arg – Argininüberstand (nichtpigmentiert); Pgmt – pigmentierter Überstand (Tryptophan); GR – Gemeinsame Referenz (siehe Abschnitt 2.6.1.1)

7.6.3 In 5 mM Tryptophol mindestens 3× runterregulierte *C. albicans*-Gene

C.a. – ORF	Expression (Vielfache von GR)						Gen- name	Kategorie
	K 0 mM	Trp'ol 1 mM	Trp'ol 5 mM	Arg WT	Pgmt WT	Pgmt <i>aro10Δ</i>		
<i>Herunterreguliert in 5 mM Tryptophol</i>								
orf19.1691	0,33	0,59	0,08	0,05	0,07	0,06		Hypothetischer ORF;
orf19.2374	0,87	0,44	0,21	0,16	0,34	0,20		Hypothetischer ORF
orf19.1714	1,25	0,84	0,36	1,03	0,64	0,45	<i>PGA44</i>	GPI-verankertes Protein
orf19.3707	1,38	0,76	0,37	5,03	1,85	0,75	<i>YHB1</i>	Stressantwort
CaalfMt24	1,52	1,07	0,41	0,37	0,56	0,32	<i>TRNT1</i>	Threonin-tRNA
orf19.1899	2,64	3,28	0,51	1,28	1,82	1,43		Hypothetischer ORF
orf19.1255	1,78	1,76	0,53	2,71	1,56	0,66		Transkriptionsfaktor
orf19.6834	1,78	0,86	0,53	0,67	0,99	0,70		Hypothetischer ORF
orf19.4941	1,72	1,07	0,54	0,31	0,42	0,50	<i>TYE7</i>	Transkriptionsfaktor; Hyphen
orf19.3801	2,55	1,71	0,73	3,12	0,92	0,94	<i>FAV1</i>	α-Pheromon-aktiviert
orf19.1321	5,79	4,23	0,91	6,64	0,74	0,45	<i>HWP1</i>	Hyphenzellwandprotein
orf19.670.	5,36	1,50	0,94	7,85	8,42	5,43		Hypothetischer ORF
orf19.1327	3,70	2,89	1,05	4,11	1,27	1,53	<i>RBT1</i>	Hyphenzellwandprotein
orf19.1354	5,40	2,92	1,66	11,49	3,65	9,63	<i>UCF1</i>	Hyphenreprimiert, cAMP-
orf19.6741	7,29	5,80	2,32	7,50	3,19	3,05		Hypothetischer ORF
<i>Hochreguliert in 5 mM Tryptophol und Pigment von Wildtyp</i>								
orf19.3262	1,02	0,82	0,19	1,30	0,21	0,20		Hypothetischer ORF
orf19.333	1,23	1,00	0,32	0,53	0,21	0,24	<i>FCY2</i>	Purin-Cytosin-Permease
orf19.2020	1,49	1,22	0,38	0,81	0,26	0,43	<i>HGT6</i>	Glukosetransport
orf19.5760	3,27	3,11	0,44	5,48	0,71	0,51	<i>IHD1</i>	Membranprotein (Hyphen)
orf19.2022	1,67	1,23	0,45	1,30	0,49	0,50		Hypothetischer ORF
orf19.5761	2,46	2,89	0,48	6,76	0,52	0,48		Unbekannte Funktion
orf19.2803	1,86	1,16	0,55	0,99	0,59	0,35	<i>HEM1</i>	Hämbiosynthese
orf19.2355	5,95	5,26	0,65	6,84	0,83	0,57	<i>ALS10</i>	Adhäsion
orf19.3475	2,80	2,63	0,72	3,38	0,40	0,29		Hypheninduziert
orf19.2060	6,44	8,95	0,78	18,00	0,88	0,72	<i>SOD5</i>	Stressantwort
orf19.7561	2,92	1,89	0,84	2,14	0,35	0,29	<i>DEF1</i>	Hyphenverlängerung
orf19.3718	5,29	5,62	0,86	3,17	0,92	0,55		Genfragment
orf19.5265	2,95	2,57	0,86	5,80	0,72	0,70	<i>KIP4</i>	Hypheninduziert
orf19.701	4,70	3,80	0,99	5,29	0,95	1,15	<i>CFL11</i>	Hypothetischer ORF;
orf19.4975	6,93	6,10	1,01	12,73	0,89	0,86	<i>HYR1</i>	Hyphenzellwandprotein
orf19.3384	6,84	5,74	1,11	4,14	1,40	0,91		Hyphenzellwandprotein
orf19.3374	59,18	41,83	1,14	52,36	0,22	0,26	<i>ECE1</i>	Hypheninduziert
<i>Herunterreguliert in 5 mM Tryptophol und Pigment von Wildtyp</i>								
orf19.7336	3,28	2,54	0,79	1,56	0,90	1,74		Hypothetischer ORF
<i>Herunterreguliert in 5 mM Tryptophol und Pigment von aro10Δ-Mutante</i>								
orf19.3966	1,40	1,75	0,45	0,52	0,74	0,35	<i>CRH12</i>	Zellwandprotein
orf19.1206	1,78	2,08	0,49	1,24	0,68	0,52	<i>FET35</i>	Eisenaufnahme
orf19.3406	1,82	0,93	0,60	2,78	1,41	0,53		Hypothetischer ORF
orf19.4749	2,23	1,32	0,74	1,63	0,75	0,59		Hypheninduziert
orf19.5542	6,30	14,08	0,85	13,54	2,11	0,79	<i>SAP6</i>	Sekretierte Protease
orf19.5392	6,12	2,59	0,90	3,76	5,41	1,10	<i>NGT1</i>	Hypheninduktion

Abkürzungen: K – Kontrolle; Trp'ol – Tryptophol; Arg – Argininüberstand (nichtpigmentiert); Pgmt – pigmentierter Überstand (Tryptophan); GR – Gemeinsame Referenz (siehe Abschnitt 2.6.1.1)



## 7.7 Abkürzungen und Herstellerverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung	
<b>Arg</b>	Arginin	
<b>bp</b>	Basenpaare	
<b>cAMP</b>	cyclic AMP – zyklisches Adenosinmonophosphat	
<b>cfu</b>	Colony forming units – koloniebildende Einheiten	
<b>cRNA</b>	copy RNA – RNS nach Amplifikation	
<b>CTP</b>	Cytidin-Triphosphat	
<b>Cy3</b>	Cyanine dye 3 – (Fluoreszenzfarbstoff)	
<b>Cy5</b>	Cyanine dye 5 – (Fluoreszenzfarbstoff)	
<b>DBcAMP</b>	N <sup>6</sup> ,2'-O-Dibutyryladenosen-3'-5'-zyklisches Monophosphat (→cAMP)	
<b>DIG</b>	Digoxigenin	
<b>DNA</b>	Desoxyribonucleid Acid – Desoxyribonukleinsäure	
<b>dNTP</b>	Desoxyribonukleosidtriphosphate	
<b>dUTP</b>	Desoxyuridintriphosphat	
<b>FBS</b>	Fötales Bovines Serum	
<b>HBSS</b>	Hanks' balanced salt solution –	
<b>HPLC</b>	High performance liquid chromatography – Hochleistungsflüssigkeitschromatografie	
<b>LOWESS</b>	Local Weighted Scatterplot Smoothing – (eine Regressionsanalyse)	
<b>MOPS</b>	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure	
<b>mRNA</b>	messenger RNA – Boten-RNS	
<b>orf/ORF</b>	Open Reading Frame – offenes Leseraster	
<b>Phe</b>	Phenylalanin	
<b>PMN</b>	Polymorphonukleäre Granulozyten	
<b>RNA</b>	Ribonucleic Acid – Ribonukleinsäure (RNS)	
<b>SD</b>	Synthetic Defined – (Synthetisches, definiertes Medium)	
<b>SDS</b>	Sodium dodecyl sulphate – Natriumdodecylsulfat	
<b>SSC</b>	Sodium Sodium Citrate Buffer – Natrium-Natriumcitratpuffer	
<b>Thr</b>	Threonin	
<b>Trp</b>	Tryptophan	
<b>Trp'ol</b>	Tryptophol	
<b>UV</b>	Ultraviolett	
<b>WT</b>	Wildtyp	
<b>YNB</b>	Yeast Nitrogen Base – (Grundlage für Minimalmedium)	
	Hersteller	Ort
<b>Applichem</b>		Darmstadt, Deutschland
<b>BD Biosciences Deutschland</b>		Heidelberg, Deutschland
<b>Eurogentec</b>		Liege, Belgien
<b>Invitrogen (inkl. Gibco) Deutschland</b>		Karlsruhe, Deutschland
<b>Merck</b>		Darmstadt, Deutschland
<b>NEB - New England Biolabs</b>		Ipswich, MA, USA
<b>PAA</b>		Linz, Österreich
<b>PeqLab</b>		Erlangen, Deutschland
<b>Qiagen</b>		Venlo, Niederlande
<b>Roche Applied Science Deutschland</b>		Mannheim, Deutschland
<b>Roth</b>		Karlsruhe, Deutschland
<b>Sigma - Aldrich Chemie Deutschland</b>		München, Deutschland
<b>TPP - Techno Plastic Products</b>		Trasadingen, Schweiz
<b>Vilber Lourmat</b>		Marne-la-Vallee, Frankreich

## 7.8 Abbildungsverzeichnis

---

Abbildung 1-1: Bekannte Strukturen aus dem Pigment von <i>M. furfur</i> .....	16
Abbildung 1-2: Tryptophanabbau bei <i>S. cerevisiae</i> über die Aminosäuregärung.....	19
Abbildung 3-1: Zeitlicher Verlauf der Pigmentbildung.....	43
Abbildung 3-2: Nachdunklung nach Anzucht in sauerstoffreier Atmosphäre .....	44
Abbildung 3-3: HPLC-Chromatogramm der Überstände. ....	45
Abbildung 3-4: HPLC-Chromatogramm der Nachdunklungsreaktion .....	46
Abbildung 3-5: Einfluß von weiteren Aminosäuren auf die Pigmentbildung.....	46
Abbildung 3-6: Hemmung der Pigmentproduktion durch zusätzliche Stickstoffquellen und Wachstumsgeschwindigkeit in den entsprechenden Medien. ....	47
Abbildung 3-7: Wirkung von verschiedenen Aminosäuren auf die Sekundärreaktion der Pigmentbildung.. ....	48
Abbildung 3-8: Pigmentbildung in Abhängigkeit von der initialen Zelldichte.....	49
Abbildung 3-9: Wachstum und Pigmentbildung von <i>C. glabrata</i> -Wildtyp und einer histidinauxotrophen Mutante in tryptophanhaltigem Medium. ....	50
Abbildung 3-10: Einfluß der Kohlenstoffquelle auf die Pigmentbildung .....	50
Abbildung 3-11: Minimale Tryptophankonzentration für sichtbare Pigmentierung. ....	52
Abbildung 3-12: Wirkung von cAMP auf die Pigmentierung .....	52
Abbildung 3-13: Schema zum Screening der Mutantenbibliothek .....	55
Abbildung 3-14: Verschiedene Klassen von Mutanten .....	55
Abbildung 3-15: Unabhängige Insertionsstellen von Tn7 im <i>GID8</i> -Homolog. ....	57
Abbildung 3-16: Hierarchische Clusteranalyse der Kulturbedingungen .....	59
Abbildung 3-17: Strategie bei der Auswertung der <i>C. glabrata</i> -Microarraydaten zur Pigmentierung	60
Abbildung 3-18: Expressionsniveau der Gene der Aminosäuregärung im Zeitverlauf bei <i>C. glabrata</i>	64
Abbildung 3-19: Deletionskonstrukt für <i>ARO10</i> .....	66
Abbildung 3-20: Southern-Blot der <i>aro10Δ</i> -Mutanten .....	66
Abbildung 3-21: Wachstum von <i>aro10Δ</i> in aromatischen Aminosäuren .....	67
Abbildung 3-22: Pigmententwicklung der Mutante <i>aro10Δ</i> .....	68
Abbildung 3-23: Southern Blot zum Nachweis der Deletion von <i>ARO9</i> .....	68
Abbildung 3-24: Wachstum von <i>aro9Δ</i> in verschiedenen Aminosäuren .....	69
Abbildung 3-25: Southern-Blot der <i>aro8Δ</i> -Mutante. ....	70
Abbildung 3-26: Wachstum der <i>aro8Δ</i> -Mutante mit ausgesuchten Aminosäuren und Ammoniumsulfat.....	71
Abbildung 3-27: Vergleich der Pigmentproduktion von Wildtyp und den Mutanten <i>aro8Δ</i> , <i>aro9Δ</i> und <i>his3Δ</i> .....	72
Abbildung 3-28: Pigmentbildung von Wildtyp (WT), <i>aro8Δ</i> - und <i>aro9Δ</i> -Mutante auf Minimalmedium mit Tryptophan und Threonin als Stickstoffquelle.....	72

Abbildung 3-29: Wachstumskurven von <i>C. glabrata</i> -Wildtyp und -Mutanten und <i>S. cerevisiae</i> mit verschiedenen Stickstoffquellen. ....	74
Abbildung 3-30: Resistenz gegen H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	80
Abbildung 3-31: Überleben von Mutanten des Pigmentsynthesewegs nach H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Exposition .....	82
Abbildung 3-32: Schutz vor UV-A-Licht .....	83
Abbildung 3-33: Schutz vor UV-B-Licht .....	84
Abbildung 3-34: Schutz vor UV-C-Licht .....	84
Abbildung 3-35: Wirkung von Pigment auf die Hyphenbildung von <i>C. albicans</i> .....	85
Abbildung 3-36: Verringerung der Filamentlängen bei serumbehandelten <i>C. albicans</i> -Zellen mit <i>C. glabrata</i> -Kulturüberstand. ....	86
Abbildung 3-37: <i>C. glabrata</i> -Medien haben keinen Einfluß auf die Filamentlänge bei <i>C. albicans</i> .....	86
Abbildung 3-38: Die Verlängerung von Keimschläuchen wird durch die Zugabe von Pigment gehemmt. ....	87
Abbildung 3-39: HPLC-Analyse der Überstände von Kulturen mit <i>C. glabrata</i> -Wildtyp und <i>aro10Δ</i> -Mutante.....	88
Abbildung 3-40: Wirkung von Tryptophol auf die Filamentbildung von <i>C. albicans</i> .....	89
Abbildung 3-41: Expression von hyphenrelevanten <i>C. albicans</i> -Genen im Vergleich mit einer hyphenbildenden Kultur.....	92
Abbildung 3-42: Wirkung von Tryptophol und Pigment auf <i>C. albicans</i> .....	94
Abbildung 3-43: Wirkung von Tryptophol und Pigment auf <i>C. albicans</i> (II).....	96
Abbildung 3-44: Vergleich der Expressionmuster von <i>C. albicans</i> nach Anzucht in Tryptophol oder Pigmentüberstand .....	97
Abbildung 3-45: Venn-Diagramme der hoch- und herunterregulierten Gene in Tryptophol und Überstand von Tryptophankulturen von <i>C. glabrata</i> -Wildtyp und <i>aro10Δ</i> -Mutante.....	98
Abbildung 3-46: HPLC-Chromatogramm des pigmentierten Überstands des <i>C. glabrata</i> -Wildtyps... ..	99
Abbildung 3-47: Hyphenbildung von <i>C. albicans</i> mit verschiedenen HPLC-Fractionen des Pigments .....	100
Abbildung 3-48: Hyphenlängen von <i>C. albicans</i> in Serum nach Behandlung mit unterschiedlichen Fraktionen des pigmenthaltigen Überstands von <i>C. glabrata</i> . ....	101
Abbildung 3-49: Schädigung von Epithelzellen durch <i>C. glabrata</i> nach verschiedenen Anzuchtbedingungen .....	102
Abbildung 3-50: Überlebende Hühnerembryonen nach Infektion mit 10 <sup>7</sup> <i>C. glabrata</i> .....	103
Abbildung 3-51: Neutrophile schädigten pigmentierte <i>C. glabrata</i> -Zellen weniger als nichtpigmentierte.....	104
Abbildung 4-1: Vorgeschlagene Funktionen für Aro8, Aro9 und Aro10 bei <i>C. glabrata</i> .....	113
Abbildung 4-2: Modell der Pigmentsynthese von <i>C. glabrata</i> . ....	123

## 8 Literatur

---

- Albrecht, A., A. Felk, I. Pichova, J. R. Naglik, M. Schaller, P. de Groot, D. MacCallum, F. C. Odds, W. Schafer, F. Klis, M. Monod & B. Hube, (2006) Glycosylphosphatidylinositol-anchored proteases of *Candida albicans* target proteins necessary for both cellular processes and host-pathogen interactions. *J Biol Chem* **281**: 688-694.
- Almeida, R. S., S. Brunke, A. Albrecht, S. Thewes, M. Laue, J. E. Edwards, S. G. Filler & B. Hube, (2008) The hyphal-associated adhesin and invasin Als3 of *Candida albicans* mediates iron acquisition from host ferritin. *PLoS Pathog* **4**: e1000217.
- Alspaugh, J. A., J. R. Perfect & J. Heitman, (1997) *Cryptococcus neoformans* mating and virulence are regulated by the G-protein alpha subunit GPA1 and cAMP. *Genes Dev* **11**: 3206-3217.
- Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers & D. J. Lipman, (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**: 403-410.
- Arnaud, M. B., M. C. Costanzo, M. S. Skrzypek, G. Binkley, C. Lane, S. R. Miyasato & G. Sherlock, (2005) The *Candida* Genome Database (CGD), a community resource for *Candida albicans* gene and protein information. *Nucleic Acids Res* **33**: D358-363.
- Ashbee, H. R. & E. G. Evans, (2002) Immunology of diseases associated with *Malassezia* species. *Clin Microbiol Rev* **15**: 21-57.
- Ashburner, M., C. A. Ball, J. A. Blake, D. Botstein, H. Butler, J. M. Cherry, A. P. Davis, K. Dolinski, S. S. Dwight, J. T. Eppig, M. A. Harris, D. P. Hill, L. Issel-Tarver, A. Kasarskis, S. Lewis, J. C. Matese, J. E. Richardson, M. Ringwald, G. M. Rubin & G. Sherlock, (2000) Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat Genet* **25**: 25-29.
- Atkinson, B. A., C. Bouthet, R. Bocanegra, A. Correa, M. F. Luther & J. R. Graybill, (1995) Comparison of fluconazole, amphotericin B and flucytosine in treatment of a murine model of disseminated infection with *Candida glabrata* in immunocompromised mice. *J Antimicrob Chemother* **35**: 631-640.
- Bachewich, C., A. Nantel & M. Whiteway, (2005) Cell cycle arrest during S or M phase generates polarized growth via distinct signals in *Candida albicans*. *Mol Microbiol* **57**: 942-959.
- Banerjee, M., D. S. Thompson, A. Lazzell, P. L. Carlisle, C. Pierce, C. Monteagudo, J. L. Lopez-Ribot & D. Kadosh, (2008) *UME6*, a novel filament-specific regulator of *Candida albicans* hyphal extension and virulence. *Mol Biol Cell* **19**: 1354-1365.
- Beck, T. & M. N. Hall, (1999) The *TOR* signalling pathway controls nuclear localization of nutrient-regulated transcription factors. *Nature* **402**: 689-692.
- Beissbarth, T., (2006) Interpreting experimental results using gene ontologies. *Methods Enzymol* **411**: 340-352.
- Bell, A. A. & M. H. Wheeler, (1986) Biosynthesis and Functions of Fungal Melanins. *Ann Rev Phytopathol* **24**: 411-451.
- Bertram, P. G., J. H. Choi, J. Carvalho, T. F. Chan, W. Ai & X. F. Zheng, (2002) Convergence of TOR-nitrogen and Snf1-glucose signaling pathways onto Gln3. *Mol Cell Biol* **22**: 1246-1252.
- Biasoli, M. S., M. E. Tosello & H. M. Magaro, (2002) Adherence of *Candida* strains isolated from the human gastrointestinal tract. *Mycoses* **45**: 465-469.

- Birse, C. E., M. Y. Irwin, W. A. Fonzi & P. S. Sypherd, (1993) Cloning and characterization of *ECE1*, a gene expressed in association with cell elongation of the dimorphic pathogen *Candida albicans*. *Infect Immun* **61**: 3648-3655.
- Biswas, S., P. Van Dijck & A. Datta, (2007) Environmental sensing and signal transduction pathways regulating morphopathogenic determinants of *Candida albicans*. *Microbiol Mol Biol Rev* **71**: 348-376.
- Bittinger, M. A., L. P. Nguyen & C. A. Bradfield, (2003) Aspartate aminotransferase generates proagonists of the aryl hydrocarbon receptor. *Mol Pharmacol* **64**: 550-556.
- Blumberg, H. M., W. R. Jarvis, J. M. Soucie, J. E. Edwards, J. E. Patterson, M. A. Pfaller, M. S. Rangel-Frausto, M. G. Rinaldi, L. Saiman, R. T. Wiblin & R. P. Wenzel, (2001) Risk factors for candidal bloodstream infections in surgical intensive care unit patients: the NEMIS prospective multicenter study. The National Epidemiology of Mycosis Survey. *Clin Infect Dis* **33**: 177-186.
- Borg-von Zepelin, M., S. Beggah, K. Boggian, D. Sanglard & M. Monod, (1998) The expression of the secreted aspartyl proteinases Sap4 to Sap6 from *Candida albicans* in murine macrophages. *Mol Microbiol* **28**: 543-554.
- Borg-von Zepelin, M., L. Kunz, R. Ruchel, U. Reichard, M. Weig & U. Gross, (2007) Epidemiology and antifungal susceptibilities of *Candida spp.* to six antifungal agents: results from a surveillance study on fungaemia in Germany from July 2004 to August 2005. *J Antimicrob Chemother* **60**: 424-428.
- Borst, A., M. T. Raimer, D. W. Warnock, C. J. Morrison & B. A. Arthington-Skaggs, (2005) Rapid acquisition of stable azole resistance by *Candida glabrata* isolates obtained before the clinical introduction of fluconazole. *Antimicrob Agents Chemother* **49**: 783-787.
- Boyum, A., (1968) Separation of leukocytes from blood and bone marrow. Introduction. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* **97**: 7.
- Brakhage, A. A. & B. Liebmann, (2005) *Aspergillus fumigatus* conidial pigment and cAMP signal transduction: significance for virulence. *Med Mycol* **43 Suppl 1**: S75-82.
- Braun, B. R. & A. D. Johnson, (1997) Control of filament formation in *Candida albicans* by the transcriptional repressor *TUP1*. *Science* **277**: 105-109.
- Brazma, A., P. Hingamp, J. Quackenbush, G. Sherlock, P. Spellman, C. Stoeckert, J. Aach, W. Ansorge, C. A. Ball, H. C. Causton, T. Gaasterland, P. Glenisson, F. C. Holstege, I. F. Kim, V. Markowitz, J. C. Matese, H. Parkinson, A. Robinson, U. Sarkans, S. Schulze-Kremer, J. Stewart, R. Taylor, J. Vilo & M. Vingron, (2001) Minimum information about a microarray experiment (MIAME)-toward standards for microarray data. *Nat Genet* **29**: 365-371.
- Brieland, J., D. Essig, C. Jackson, D. Frank, D. Loebenberg, F. Menzel, B. Arnold, B. DiDomenico & R. Hare, (2001) Comparison of pathogenesis and host immune responses to *Candida glabrata* and *Candida albicans* in systemically infected immunocompetent mice. *Infect Immun* **69**: 5046-5055.
- Brock, M., (2009) Fungal metabolism in host niches. *Curr Opin Microbiol* **12**: 371-376.
- Brockert, P. J., S. A. Lachke, T. Srikantha, C. Pujol, R. Galask & D. R. Soll, (2003) Phenotypic switching and mating type switching of *Candida glabrata* at sites of colonization. *Infect Immun* **71**: 7109-7118.
- Brunke, S., (2004) Molekularbiologische Ansätze zur Analyse von Pathogenitätsfaktoren bei *Malassezia furfur*. Diplomarbeit, Berlin: Robert-Koch-Institut, FG12.
- Brunke, S. & B. Hube, (2006) MfLIP1, a gene encoding an extracellular lipase of the lipid-dependent fungus *Malassezia furfur*. *Microbiology* **152**: 547-554.

- Brush, L. & N. P. Money, (1999) Invasive hyphal growth in *Wangiella dermatitidis* is induced by stab inoculation and shows dependence upon melanin biosynthesis. *Fungal Genet Biol* **28**: 190-200.
- Burgess, S. M., M. Ajimura & N. Kleckner, (1999) *GCN5*-dependent histone H3 acetylation and *RPD3*-dependent histone H4 deacetylation have distinct, opposing effects on *IME2* transcription, during meiosis and during vegetative growth, in budding yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 6835-6840.
- Byrne, K. P. & K. H. Wolfe, (2005) The Yeast Gene Order Browser: combining curated homology and syntenic context reveals gene fate in polyploid species. *Genome Res* **15**: 1456-1461.
- Calderone, R. A., (2002) *Candida and Candidosis*. ASM Press, Washington.
- Calvo, A. M., R. A. Wilson, J. W. Bok & N. P. Keller, (2002) Relationship between secondary metabolism and fungal development. *Microbiol Mol Biol Rev* **66**: 447-459, table of contents.
- Campo, J., J. Del Romero, J. Castilla, S. Garcia, C. Rodriguez & A. Bascones, (2002) Oral candidiasis as a clinical marker related to viral load, CD4 lymphocyte count and CD4 lymphocyte percentage in HIV-infected patients. *J Oral Pathol Med* **31**: 5-10.
- Cannon, R. D., A. R. Holmes, A. B. Mason & B. C. Monk, (1995) Oral *Candida*: clearance, colonization, or candidiasis? *J Dent Res* **74**: 1152-1161.
- Carbon, S., A. Ireland, C. J. Mungall, S. Shu, B. Marshall & S. Lewis, (2009) AmiGO: online access to ontology and annotation data. *Bioinformatics* **25**: 288-289.
- Carlisle, P. L., M. Banerjee, A. Lazzell, C. Monteagudo, J. L. Lopez-Ribot & D. Kadosh, (2009) Expression levels of a filament-specific transcriptional regulator are sufficient to determine *Candida albicans* morphology and virulence. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 599-604.
- Casadevall, A., (2005) Fungal virulence, vertebrate endothermy, and dinosaur extinction: is there a connection? *Fungal Genet Biol* **42**: 98-106.
- Casadevall, A., J. N. Steenbergen & J. D. Nosanchuk, (2003) 'Ready made' virulence and 'dual use' virulence factors in pathogenic environmental fungi--the *Cryptococcus neoformans* paradigm. *Curr Opin Microbiol* **6**: 332-337.
- Castaño, I., R. Kaur, S. Pan, R. Cregg, L. Penas Ade, N. Guo, M. C. Biery, N. L. Craig & B. P. Cormack, (2003) Tn7-based genome-wide random insertional mutagenesis of *Candida glabrata*. *Genome Res* **13**: 905-915.
- Chakrabarti, A., N. Nayak & P. Talwar, (1991) In vitro proteinase production by *Candida* species. *Mycopathologia* **114**: 163-168.
- Chaskes, S. & R. L. Tyndall, (1975) Pigment production by *Cryptococcus neoformans* from para- and ortho-Diphenols: effect of the nitrogen source. *J Clin Microbiol* **1**: 509-514.
- Chayakulkeeree, M. & J. R. Perfect, (2006) Cryptococcosis. *Infect Dis Clin North Am* **20**: 507-544, v-vi.
- Chen, H. & G. R. Fink, (2006) Feedback control of morphogenesis in fungi by aromatic alcohols. *Genes Dev* **20**: 1150-1161.
- Chen, H., M. Fujita, Q. Feng, J. Clardy & G. R. Fink, (2004) Tyrosol is a quorum-sensing molecule in *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 5048-5052.
- Cho, T., T. Aoyama, M. Toyoda, H. Nakayama, H. Chibana & H. Kaminishi, (2007) Transcriptional changes in *Candida albicans* Genes by both farnesol and high cell density at an early stage of morphogenesis in N-acetyl-D-glucosamine medium. *Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi* **48**: 159-167.

- Christie, K. R., S. Weng, R. Balakrishnan, M. C. Costanzo, K. Dolinski, S. S. Dwight, S. R. Engel, B. Feierbach, D. G. Fisk, J. E. Hirschman, E. L. Hong, L. Issel-Tarver, R. Nash, A. Sethuraman, B. Starr, C. L. Theesfeld, R. Andrada, G. Binkley, Q. Dong, C. Lane, M. Schroeder, D. Botstein & J. M. Cherry, (2004) *Saccharomyces* Genome Database (SGD) provides tools to identify and analyze sequences from *Saccharomyces cerevisiae* and related sequences from other organisms. *Nucleic Acids Res* **32**: D311-314.
- Ciriacy, M., (1975) Genetics of alcohol dehydrogenase in *Saccharomyces cerevisiae*. II. Two loci controlling synthesis of the glucose-repressible ADH II. *Mol Gen Genet* **138**: 157-164.
- Coco, B. J., J. Bagg, L. J. Cross, A. Jose, J. Cross & G. Ramage, (2008) Mixed *Candida albicans* and *Candida glabrata* populations associated with the pathogenesis of denture stomatitis. *Oral Microbiol Immunol* **23**: 377-383.
- Cole, G. T., A. A. Halawa & E. J. Anaissie, (1996) The role of the gastrointestinal tract in hematogenous candidiasis: from the laboratory to the bedside. *Clin Infect Dis* **22 Suppl 2**: S73-88.
- Consevage, M. W. & A. T. Phillips, (1990) Sequence analysis of the *hutH* gene encoding histidine ammonia-lyase in *Pseudomonas putida*. *J Bacteriol* **172**: 2224-2229.
- Cormack, B. P. & S. Falkow, (1999) Efficient homologous and illegitimate recombination in the opportunistic yeast pathogen *Candida glabrata*. *Genetics* **151**: 979-987.
- Cormack, B. P., N. Ghori & S. Falkow, (1999) An adhesin of the yeast pathogen *Candida glabrata* mediating adherence to human epithelial cells. *Science* **285**: 578-582.
- Csank, C. & K. Haynes, (2000) *Candida glabrata* displays pseudohyphal growth. *FEMS Microbiol Lett* **189**: 115-120.
- Cuellar-Cruz, M., M. Briones-Martin-del-Campo, I. Canas-Villamar, J. Montalvo-Arredondo, L. Riego-Ruiz, I. Castano & A. De Las Penas, (2008) High resistance to oxidative stress in the fungal pathogen *Candida glabrata* is mediated by a single catalase, Cta1p, and is controlled by the transcription factors Yap1p, Skn7p, Msn2p, and Msn4p. *Eukaryot Cell* **7**: 814-825.
- Dadachova, E., R. A. Bryan, X. Huang, T. Moadel, A. D. Schweitzer, P. Aisen, J. D. Nosanchuk & A. Casadevall, (2007) Ionizing radiation changes the electronic properties of melanin and enhances the growth of melanized fungi. *PLoS ONE* **2**: e457.
- Daszak, P., L. Berger, A. A. Cunningham, A. D. Hyatt, D. E. Green & R. Speare, (1999) Emerging infectious diseases and amphibian population declines. *Emerg Infect Dis* **5**: 735-748.
- Davis-Hanna, A., A. E. Piispanen, L. I. Stateva & D. A. Hogan, (2008) Farnesol and dodecanol effects on the *Candida albicans* Ras1-cAMP signalling pathway and the regulation of morphogenesis. *Mol Microbiol* **67**: 47-62.
- de Groot, P. W., E. A. Kraneveld, Q. Y. Yin, H. L. Dekker, U. Gross, W. Crielaard, C. G. de Koster, O. Bader, F. M. Klis & M. Weig, (2008) The cell wall of the human pathogen *Candida glabrata*: differential incorporation of novel adhesin-like wall proteins. *Eukaryot Cell* **7**: 1951-1964.
- de Jesus Ferreira, M. C., X. Bao, V. Laize & S. Hohmann, (2001) Transposon mutagenesis reveals novel loci affecting tolerance to salt stress and growth at low temperature. *Curr Genet* **40**: 27-39.
- de Jong, J. C., B. J. McCormack, N. Smirnoff & N. J. Talbot, (1997) Glycerol generates turgor in rice blast. *Nature* **389**: 244.
- De Las Penas, A., S. J. Pan, I. Castano, J. Alder, R. Cregg & B. P. Cormack, (2003) Virulence-related surface glycoproteins in the yeast pathogen *Candida glabrata* are encoded in subtelomeric clusters and subject to RAP1- and SIR-dependent transcriptional silencing. *Genes Dev* **17**: 2245-2258.

- De Leeuw, S. M., N. P. Smit, M. Van Veldhoven, E. M. Pennings, S. Pavel, J. W. Simons & A. A. Schothorst, (2001) Melanin content of cultured human melanocytes and UV-induced cytotoxicity. *J Photochem Photobiol B* **61**: 106-113.
- Dickinson, J. R., L. E. Salgado & M. J. Hewlins, (2003) The catabolism of amino acids to long chain and complex alcohols in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **278**: 8028-8034.
- Dolapci, I., A. Tekeli & S. Arıkan, (2004) [Evaluation of the Tween 80 opacity test for detection of the lipolytic activity of various *Candida* species and its utility in differentiation of *C. albicans* and *C. dubliniensis*]. *Mikrobiyol Bul* **38**: 429-433.
- Domergue, R., I. Castano, A. De Las Penas, M. Zupancic, V. Lockatell, J. R. Hebel, D. Johnson & B. P. Cormack, (2005) Nicotinic acid limitation regulates silencing and expression of a family of *Candida* adhesins during urinary tract infection. *Science* **308**: 866-870.
- Donzeau, M. & W. Bandlow, (1999) The yeast trimeric guanine nucleotide-binding protein alpha subunit, Gpa2p, controls the meiosis-specific kinase Ime2p activity in response to nutrients. *Mol Cell Biol* **19**: 6110-6119.
- Dujon, B., D. Sherman, G. Fischer, P. Durrens, S. Casaregola, I. Lafontaine, J. De Montigny, C. Marck, C. Neuveglise, E. Talla, N. Goffard, L. Frangeul, M. Aigle, V. Anthouard, A. Babour, V. Barbe, S. Barnay, S. Blanchin, J. M. Beckerich, E. Beyne, C. Bleykasten, A. Boisrame, J. Boyer, L. Cattolico, F. Confanioleri, A. De Daruvar, L. Despons, E. Fabre, C. Fairhead, H. Ferry-Dumazet, A. Groppi, F. Hantraye, C. Hennequin, N. Jauniaux, P. Joyet, R. Kachouri, A. Kerrest, R. Koszul, M. Lemaire, I. Lesur, L. Ma, H. Muller, J. M. Nicaud, M. Nikolski, S. Oztas, O. Ozier-Kalogeropoulos, S. Pellenz, S. Potier, G. F. Richard, M. L. Straub, A. Suleau, D. Swennen, F. Tekaia, M. Wesolowski-Louvel, E. Westhof, B. Wirth, M. Zeniou-Meyer, I. Zivanovic, M. Bolotin-Fukuhara, A. Thierry, C. Bouchier, B. Caudron, C. Scarpelli, C. Gaillardin, J. Weissenbach, P. Wincker & J. L. Souciet, (2004) Genome evolution in yeasts. *Nature* **430**: 35-44.
- Durrenberger, F. & J. Kronstad, (1999) The *ukc1* gene encodes a protein kinase involved in morphogenesis, pathogenicity and pigment formation in *Ustilago maydis*. *Mol Gen Genet* **261**: 281-289.
- Ehrlich, F., (1907) Über die Bedingungen der Fuselölbildung und über ihren Zusammenhang mit dem Eiweißaufbau der Hefe. *Ber Dtsch Chem Ges* **40**: 1027-1047.
- English, D. & B. R. Andersen, (1974) Single-step separation of red blood cells. Granulocytes and mononuclear leukocytes on discontinuous density gradients of Ficoll-Hypaque. *J Immunol Methods* **5**: 249-252.
- Enjalbert, B., D. A. Smith, M. J. Cornell, I. Alam, S. Nicholls, A. J. Brown & J. Quinn, (2006) Role of the Hog1 stress-activated protein kinase in the global transcriptional response to stress in the fungal pathogen *Candida albicans*. *Mol Biol Cell* **17**: 1018-1032.
- Enochs, W. S., M. J. Nilges & H. M. Swartz, (1993) A standardized test for the identification and characterization of melanins using electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy. *Pigment Cell Res* **6**: 91-99.
- Fabich, A. J., S. A. Jones, F. Z. Chowdhury, A. Cernosek, A. Anderson, D. Smalley, J. W. McHargue, G. A. Hightower, J. T. Smith, S. M. Autieri, M. P. Leatham, J. J. Lins, R. L. Allen, D. C. Laux, P. S. Cohen & T. Conway, (2008) Comparison of carbon nutrition for pathogenic and commensal *Escherichia coli* strains in the mouse intestine. *Infect Immun* **76**: 1143-1152.
- Feng, Q., E. Summers, B. Guo & G. Fink, (1999) Ras signaling is required for serum-induced hyphal differentiation in *Candida albicans*. *J Bacteriol* **181**: 6339-6346.



- Ferrari, S., F. Ischer, D. Calabrese, B. Posteraro, M. Sanguinetti, G. Fadda, B. Rohde, C. Bauser, O. Bader & D. Sanglard, (2009) Gain of function mutations in CgPDR1 of *Candida glabrata* not only mediate antifungal resistance but also enhance virulence. *PLoS Pathog* **5**: e1000268.
- Fradin, C., P. De Groot, D. MacCallum, M. Schaller, F. Klis, F. C. Odds & B. Hube, (2005) Granulocytes govern the transcriptional response, morphology and proliferation of *Candida albicans* in human blood. *Mol Microbiol* **56**: 397-415.
- Fu, Y., A. S. Ibrahim, W. Fonzi, X. Zhou, C. F. Ramos & M. A. Ghannoum, (1997) Cloning and characterization of a gene (*LIP1*) which encodes a lipase from the pathogenic yeast *Candida albicans*. *Microbiology* **143** ( Pt 2): 331-340.
- Gacser, A., F. Stehr, C. Kroger, L. Kredics, W. Schafer & J. D. Nosanchuk, (2007) Lipase 8 affects the pathogenesis of *Candida albicans*. *Infect Immun* **75**: 4710-4718.
- Gagiano, M., F. F. Bauer & I. S. Pretorius, (2002) The sensing of nutritional status and the relationship to filamentous growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res* **2**: 433-470.
- Gaitanis, G., V. Chasapi & A. Velegriaki, (2005) Novel application of the masson-fontana stain for demonstrating *Malassezia* species melanin-like pigment production in vitro and in clinical specimens. *J Clin Microbiol* **43**: 4147-4151.
- Gao, S. & D. L. Nuss, (1996) Distinct roles for two G protein alpha subunits in fungal virulence, morphology, and reproduction revealed by targeted gene disruption. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 14122-14127.
- Ghannoum, M. A., (2000) Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. *Clin Microbiol Rev* **13**: 122-143, table of contents.
- Ghosh, S., B. W. Kebaara, A. L. Atkin & K. W. Nickerson, (2008) Regulation of aromatic alcohol production in *Candida albicans*. *Appl Environ Microbiol* **74**: 7211-7218.
- Giaever, G., A. M. Chu, L. Ni, C. Connelly, L. Riles, S. Veronneau, S. Dow, A. Lucau-Danila, K. Anderson, B. Andre, A. P. Arkin, A. Astromoff, M. El-Bakkoury, R. Bangham, R. Benito, S. Brachat, S. Campanaro, M. Curtiss, K. Davis, A. Deutschbauer, K. D. Entian, P. Flaherty, F. Foury, D. J. Garfinkel, M. Gerstein, D. Gotte, U. Guldener, J. H. Hegemann, S. Hempel, Z. Herman, D. F. Jaramillo, D. E. Kelly, S. L. Kelly, P. Kotter, D. LaBonte, D. C. Lamb, N. Lan, H. Liang, H. Liao, L. Liu, C. Luo, M. Lussier, R. Mao, P. Menard, S. L. Ooi, J. L. Revuelta, C. J. Roberts, M. Rose, P. Ross-Macdonald, B. Scherens, G. Schimmack, B. Shafer, D. D. Shoemaker, S. Sookhai-Mahadeo, R. K. Storms, J. N. Strathern, G. Valle, M. Voet, G. Volckaert, C. Y. Wang, T. R. Ward, J. Wilhelmy, E. A. Winzeler, Y. Yang, G. Yen, E. Youngman, K. Yu, H. Bussey, J. D. Boeke, M. Snyder, P. Philippsen, R. W. Davis & M. Johnston, (2002) Functional profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Nature* **418**: 387-391.
- Gietz, D., A. St Jean, R. A. Woods & R. H. Schiestl, (1992) Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucleic Acids Res* **20**: 1425.
- Gillum, A. M., E. Y. Tsay & D. R. Kirsch, (1984) Isolation of the *Candida albicans* gene for orotidine-5'-phosphate decarboxylase by complementation of *S. cerevisiae* *ura3* and *E. coli* *pyrF* mutations. *Mol Gen Genet* **198**: 179-182.
- Godard, P., A. Urrestarazu, S. Vissers, K. Kontos, G. Bontempi, J. van Helden & B. Andre, (2007) Effect of 21 different nitrogen sources on global gene expression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **27**: 3065-3086.
- Gokce, G., N. Cerikcioglu & A. Yagci, (2007) Acid proteinase, phospholipase, and biofilm production of *Candida* species isolated from blood cultures. *Mycopathologia* **164**: 265-269.
- Gokhale, R. S., R. Sankaranarayanan & D. Mohanty, (2007) Versatility of polyketide synthases in generating metabolic diversity. *Curr Opin Struct Biol* **17**: 736-743.

- Gomez, B. L., J. D. Nosanchuk, S. Diez, S. Youngchim, P. Aisen, L. E. Cano, A. Restrepo, A. Casadevall & A. J. Hamilton, (2001) Detection of melanin-like pigments in the dimorphic fungal pathogen *Paracoccidioides brasiliensis* in vitro and during infection. *Infect Immun* **69**: 5760-5767.
- Grosse, C., T. Heinekamp, O. Kniemeyer, A. Gehrke & A. A. Brakhage, (2008) Protein kinase A regulates growth, sporulation, and pigment formation in *Aspergillus fumigatus*. *Appl Environ Microbiol* **74**: 4923-4933.
- Gueho, E., T. Boekhout, H. R. Ashbee, J. Guillot, A. Van Belkum & J. Faergemann, (1998) The role of *Malassezia* species in the ecology of human skin and as pathogens. *Med Mycol* **36 Suppl 1**: 220-229.
- Guery, B. P., M. C. Arendrup, G. Auzinger, E. Azoulay, M. Borges Sa, E. M. Johnson, E. Muller, C. Putensen, C. Rotstein, G. Sganga, M. Venditti, R. Zaragoza Crespo & B. J. Kullberg, (2008) Management of invasive candidiasis and candidemia in adult non-neutropenic intensive care unit patients: Part II. Treatment. *Intensive Care Med*.
- Hajjeh, R. A., A. N. Sofair, L. H. Harrison, G. M. Lyon, B. A. Arthington-Skaggs, S. A. Mirza, M. Phelan, J. Morgan, W. Lee-Yang, M. A. Ciblak, L. E. Benjamin, L. T. Sanza, S. Huie, S. F. Yeo, M. E. Brandt & D. W. Warnock, (2004) Incidence of bloodstream infections due to *Candida* species and in vitro susceptibilities of isolates collected from 1998 to 2000 in a population-based active surveillance program. *J Clin Microbiol* **42**: 1519-1527.
- Haldimann, A. & B. L. Wanner, (2001) Conditional-replication, integration, excision, and retrieval plasmid-host systems for gene structure-function studies of bacteria. *J Bacteriol* **183**: 6384-6393.
- Harcus, D., A. Nantel, A. Marcil, T. Rigby & M. Whiteway, (2004) Transcription profiling of cyclic AMP signaling in *Candida albicans*. *Mol Biol Cell* **15**: 4490-4499.
- Härtl, A., H. G. Hillesheim, W. Kunkel & E. J. Schrunner, (1995) [The *Candida* infected hen's egg. An alternative test system for systemic anticandida activity]. *Arzneimittelforschung* **45**: 926-928.
- Hawksworth, D. L., (2001) The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. *Mycol Res* **105**: 1422-1432.
- Hazelwood, L. A., J. M. Daran, A. J. van Maris, J. T. Pronk & J. R. Dickinson, (2008) The Ehrlich pathway for fusel alcohol production: a century of research on *Saccharomyces cerevisiae* metabolism. *Appl Environ Microbiol* **74**: 2259-2266.
- Hazelwood, L. A., S. L. Tai, V. M. Boer, J. H. de Winde, J. T. Pronk & J. M. Daran, (2006) A new physiological role for Pdr12p in *Saccharomyces cerevisiae*: export of aromatic and branched-chain organic acids produced in amino acid catabolism. *FEMS Yeast Res* **6**: 937-945.
- Hoffman, C. S. & F. Winston, (1987) A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene* **57**: 267-272.
- Hoffman, M. & H. L. Chiang, (1996) Isolation of degradation-deficient mutants defective in the targeting of fructose-1,6-bisphosphatase into the vacuole for degradation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **143**: 1555-1566.
- Hofman-Bang, J., (1999) Nitrogen catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biotechnol* **12**: 35-73.
- Hogan, D. A., A. Vik & R. Kolter, (2004) A *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing molecule influences *Candida albicans* morphology. *Mol Microbiol* **54**: 1212-1223.

- Holyoak, C. D., D. Bracey, P. W. Piper, K. Kuchler & P. J. Coote, (1999) The *Saccharomyces cerevisiae* weak-acid-inducible ABC transporter Pdr12 transports fluorescein and preservative anions from the cytosol by an energy-dependent mechanism. *J Bacteriol* **181**: 4644-4652.
- Hong, E. L., R. Balakrishnan, Q. Dong, K. R. Christie, J. Park, G. Binkley, M. C. Costanzo, S. S. Dwight, S. R. Engel, D. G. Fisk, J. E. Hirschman, B. C. Hitz, C. J. Krieger, M. S. Livstone, S. R. Miyasato, R. S. Nash, R. Oughtred, M. S. Skrzypek, S. Weng, E. D. Wong, K. K. Zhu, K. Dolinski, D. Botstein & J. M. Cherry, (2008) Gene Ontology annotations at SGD: new data sources and annotation methods. *Nucleic Acids Res* **36**: D577-581.
- Hornby, J. M., E. C. Jensen, A. D. Lisec, J. J. Tasto, B. Jahnke, R. Shoemaker, P. Dussault & K. W. Nickerson, (2001) Quorum sensing in the dimorphic fungus *Candida albicans* is mediated by farnesol. *Appl Environ Microbiol* **67**: 2982-2992.
- Hort, W., S. Lang, S. Brunke, P. Mayser & B. Hube, (2008a) Analysis of differentially expressed genes associated with tryptophan-dependent pigment synthesis in *M. furfur* by cDNA subtraction technology. *Med Mycol* **47**: 248-258.
- Hort, W., S. Lang, S. Brunke, P. Mayser & B. Hube, (2008b) Analysis of differentially expressed genes associated with tryptophan-dependent pigment synthesis in *M. furfur* by cDNA subtraction technology. *Med Mycol*: 1-11.
- Hoyer, L. L., (2001) The ALS gene family of *Candida albicans*. *Trends Microbiol* **9**: 176-180.
- Hube, B. & J. Naglik, (2001) *Candida albicans* proteinases: resolving the mystery of a gene family. *Microbiology* **147**: 1997-2005.
- Hube, B., F. Stehr, M. Bossenz, A. Mazur, M. Kretschmar & W. Schafer, (2000) Secreted lipases of *Candida albicans*: cloning, characterisation and expression analysis of a new gene family with at least ten members. *Arch Microbiol* **174**: 362-374.
- Huffnagle, G. B., G. H. Chen, J. L. Curtis, R. A. McDonald, R. M. Strieter & G. B. Toews, (1995) Down-regulation of the afferent phase of T cell-mediated pulmonary inflammation and immunity by a high melanin-producing strain of *Cryptococcus neoformans*. *J Immunol* **155**: 3507-3516.
- Huycke, M. M., D. Moore, W. Joyce, P. Wise, L. Shepard, Y. Kotake & M. S. Gilmore, (2001) Extracellular superoxide production by *Enterococcus faecalis* requires demethylmenaquinone and is attenuated by functional terminal quinol oxidases. *Mol Microbiol* **42**: 729-740.
- Iraqi, I., S. Vissers, B. Andre & A. Urrestarazu, (1999) Transcriptional induction by aromatic amino acids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **19**: 3360-3371.
- Iraqi, I., S. Vissers, M. Cartiaux & A. Urrestarazu, (1998) Characterisation of *Saccharomyces cerevisiae* *ARO8* and *ARO9* genes encoding aromatic aminotransferases I and II reveals a new aminotransferase subfamily. *Mol Gen Genet* **257**: 238-248.
- Irlinger, B., H. J. Kramer, P. Mayser & W. Steglich, (2004) Pityriarubins, biologically active bis(indolyl)spirans from cultures of the lipophilic yeast *Malassezia furfur*. *Angew Chem Int Ed Engl* **43**: 1098-1100.
- Ito, S. & K. Wakamatsu, (2008) Chemistry of mixed melanogenesis--pivotal roles of dopaquinone. *Photochem Photobiol* **84**: 582-592.
- Jacobson, E. S., (2000) Pathogenic roles for fungal melanins. *Clin Microbiol Rev* **13**: 708-717.
- Jacobson, E. S. & R. Ikeda, (2005) Effect of melanization upon porosity of the cryptococcal cell wall. *Med Mycol* **43**: 327-333.
- Jacobson, E. S., N. D. Jenkins & J. M. Todd, (1994) Relationship between superoxide dismutase and melanin in a pathogenic fungus. *Infect Immun* **62**: 4085-4086.

- Jacobson, E. S. & S. B. Tinnell, (1993) Antioxidant function of fungal melanin. *J Bacteriol* **175**: 7102-7104.
- Kan, V. L., A. Geber & J. E. Bennett, (1996) Enhanced oxidative killing of azole-resistant *Candida glabrata* strains with *ERG11* deletion. *Antimicrob Agents Chemother* **40**: 1717-1719.
- Kao, A. S., M. E. Brandt, W. R. Pruitt, L. A. Conn, B. A. Perkins, D. S. Stephens, W. S. Baughman, A. L. Reingold, G. A. Rothrock, M. A. Pfaller, R. W. Pinner & R. A. Hajjeh, (1999) The epidemiology of candidemia in two United States cities: results of a population-based active surveillance. *Clin Infect Dis* **29**: 1164-1170.
- Kauffman, C. A., (2007) Histoplasmosis: a clinical and laboratory update. *Clin Microbiol Rev* **20**: 115-132.
- Kaur, R., I. Castano & B. P. Cormack, (2004) Functional genomic analysis of fluconazole susceptibility in the pathogenic yeast *Candida glabrata*: roles of calcium signaling and mitochondria. *Antimicrob Agents Chemother* **48**: 1600-1613.
- Kaur, R., R. Domergue, M. L. Zupancic & B. P. Cormack, (2005) A yeast by any other name: *Candida glabrata* and its interaction with the host. *Curr Opin Microbiol* **8**: 378-384.
- Kaur, R., B. Ma & B. P. Cormack, (2007) A family of glycosylphosphatidylinositol-linked aspartyl proteases is required for virulence of *Candida glabrata*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 7628-7633.
- Kebaara, B. W., M. L. Langford, D. H. Navarathna, R. Dumitru, K. W. Nickerson & A. L. Atkin, (2008) *Candida albicans* Tup1 is involved in farnesol-mediated inhibition of filamentous-growth induction. *Eukaryot Cell* **7**: 980-987.
- Kitada, K., E. Yamaguchi & M. Arisawa, (1995) Cloning of the *Candida glabrata* TRP1 and HIS3 genes, and construction of their disruptant strains by sequential integrative transformation. *Gene* **165**: 203-206.
- Klotz, S. A., B. S. Chasin, B. Powell, N. K. Gaur & P. N. Lipke, (2007) Polymicrobial bloodstream infections involving *Candida* species: analysis of patients and review of the literature. *Diagn Microbiol Infect Dis* **59**: 401-406.
- Kojic, E. M. & R. O. Darouiche, (2004) *Candida* infections of medical devices. *Clin Microbiol Rev* **17**: 255-267.
- Kosalec, I., O. Puel, M. Delaforge, N. Kopjar, R. Antolovic, D. Jelic, B. Matica, P. Galtier & S. Pepeljnjak, (2008a) Isolation and cytotoxicity of low-molecular-weight metabolites of *Candida albicans*. *Front Biosci* **13**: 6893-6904.
- Kosalec, I., A. Safranic, S. Pepeljnjak, V. Bacun-Druzina, S. Ramic & N. Kopjar, (2008b) Genotoxicity of tryptophol in a battery of short-term assays on human white blood cells in vitro. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* **102**: 443-452.
- Kowanko, I. C., A. Ferrante, D. P. Harvey & K. L. Carman, (1991) Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor augments neutrophil killing of *Torulopsis glabrata* and stimulates neutrophil respiratory burst and degranulation. *Clin Exp Immunol* **83**: 225-230.
- Kozel, T. R., G. S. Pfrommer, A. S. Guerlain, B. A. Highison & G. J. Highison, (1988) Role of the capsule in phagocytosis of *Cryptococcus neoformans*. *Rev Infect Dis* **10 Suppl 2**: S436-439.
- Kradolfer, P., P. Niederberger & R. Hutter, (1982) Tryptophan degradation in *Saccharomyces cerevisiae*: characterization of two aromatic aminotransferases. *Arch Microbiol* **133**: 242-248.

- Kramer, H. J., D. Kessler, U. C. Hipler, B. Irlinger, W. Hort, R. H. Bodeker, W. Steglich & P. Mayser, (2005a) Pityriarubins, novel highly selective inhibitors of respiratory burst from cultures of the yeast *Malassezia furfur*: comparison with the bisindolylmaleimide arcyriarubin A. *Chembiochem* **6**: 2290-2297.
- Kramer, H. J., M. Podobinska, A. Bartsch, A. Battmann, W. Thoma, A. Bernd, W. Kummer, B. Irlinger, W. Steglich & P. Mayser, (2005b) Malassezin, a novel agonist of the aryl hydrocarbon receptor from the yeast *Malassezia furfur*, induces apoptosis in primary human melanocytes. *Chembiochem* **6**: 860-865.
- Krappmann, S. & G. H. Braus, (2005) Nitrogen metabolism of *Aspergillus* and its role in pathogenicity. *Med Mycol* **43 Suppl 1**: S31-40.
- Krcmery, V., (1999) *Torulopsis glabrata* an emerging yeast pathogen in cancer patients. *Int J Antimicrob Agents* **11**: 1-6.
- Kubler, E., H. U. Mosch, S. Rupp & M. P. Lisanti, (1997) Gpa2p, a G-protein alpha-subunit, regulates growth and pseudohyphal development in *Saccharomyces cerevisiae* via a cAMP-dependent mechanism. *J Biol Chem* **272**: 20321-20323.
- Kucharczyk, R., M. Zagulski, J. Rytka & C. J. Herbert, (1998) The yeast gene YJR025c encodes a 3-hydroxyanthranilic acid dioxygenase and is involved in nicotinic acid biosynthesis. *FEBS Lett* **424**: 127-130.
- Kuo, M. J. & M. Alexander, (1967) Inhibition of the lysis of fungi by melanins. *J Bacteriol* **94**: 624-629.
- Kvaal, C., S. A. Lachke, T. Srikantha, K. Daniels, J. McCoy & D. R. Soll, (1999) Misexpression of the opaque-phase-specific gene *PEP1* (*SAP1*) in the white phase of *Candida albicans* confers increased virulence in a mouse model of cutaneous infection. *Infect Immun* **67**: 6652-6662.
- Kwon-Chung, K. J. & J. E. Bennett, (1992) *Medical Mycology*. Lea & Febiger, Philadelphia.
- Lachke, S. A., S. Joly, K. Daniels & D. R. Soll, (2002) Phenotypic switching and filamentation in *Candida glabrata*. *Microbiology* **148**: 2661-2674.
- Lachke, S. A., T. Srikantha, L. K. Tsai, K. Daniels & D. R. Soll, (2000) Phenotypic switching in *Candida glabrata* involves phase-specific regulation of the metallothionein gene MT-II and the newly discovered hemolysin gene HLP. *Infect Immun* **68**: 884-895.
- Langfelder, K., B. Jahn, H. Gehringer, A. Schmidt, G. Wanner & A. A. Brakhage, (1998) Identification of a polyketide synthase gene (*pksP*) of *Aspergillus fumigatus* involved in conidial pigment biosynthesis and virulence. *Med Microbiol Immunol* **187**: 79-89.
- Langfelder, K., M. Streibel, B. Jahn, G. Haase & A. A. Brakhage, (2003) Biosynthesis of fungal melanins and their importance for human pathogenic fungi. *Fungal Genet Biol* **38**: 143-158.
- Large, P., (1986) Degradation of Organic Nitrogen Compounds by Yeasts. *Yeast* **2**: 1-34.
- Latge, J. P., (1999) *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. *Clin Microbiol Rev* **12**: 310-350.
- Lawrence, B. P. & N. I. Kerkvliet, (2006) Immune modulation by TCDD and related polyhalogenated aromatic hydrocarbons. In: Immunotoxicology and Immunopharmacology. R. Luebke, R. House & I. Kimber (eds). CRC Press, pp. 239-258.
- Leberer, E., D. H Marcus, D. Dignard, L. Johnson, S. Ushinsky, D. Y. Thomas & K. Schroppel, (2001) Ras links cellular morphogenesis to virulence by regulation of the MAP kinase and cAMP signalling pathways in the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Mol Microbiol* **42**: 673-687.
- Leidich, S. D., A. S. Ibrahim, Y. Fu, A. Koul, C. Jessup, J. Vitullo, W. Fonzi, F. Mirbod, S. Nakashima, Y. Nozawa & M. A. Ghannoum, (1998) Cloning and disruption of *caPLB1*, a phospholipase B gene involved in the pathogenicity of *Candida albicans*. *J Biol Chem* **273**: 26078-26086.

- Lemaitre, B., E. Nicolas, L. Michaut, J. M. Reichhart & J. A. Hoffmann, (1996) The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* **86**: 973-983.
- Li, L. & A. Dongari-Bagtzoglou, (2007) Oral epithelium-*Candida glabrata* interactions in vitro. *Oral Microbiol Immunol* **22**: 182-187.
- Li, L., H. Kashleva & A. Dongari-Bagtzoglou, (2007) Cytotoxic and cytokine-inducing properties of *Candida glabrata* in single and mixed oral infection models. *Microb Pathog* **42**: 138-147.
- Lichter, A. & D. Mills, (1998) Control of pigmentation of *Ustilago hordei*: the effect of pH, thiamine, and involvement of the cAMP cascade. *Fungal Genet Biol* **25**: 63-74.
- Liebmann, B., S. Gattung, B. Jahn & A. A. Brakhage, (2003) cAMP signaling in *Aspergillus fumigatus* is involved in the regulation of the virulence gene *pkcP* and in defense against killing by macrophages. *Mol Genet Genomics* **269**: 420-435.
- Lingappa, B. T., M. Prasad, Y. Lingappa, D. F. Hunt & K. Biemann, (1969) Phenethyl alcohol and tryptophol: autoantibiotics produced by the fungus *Candida albicans*. *Science* **163**: 192-194.
- Liu, H., (2001) Transcriptional control of dimorphism in *Candida albicans*. *Curr Opin Microbiol* **4**: 728-735.
- Lopez-Berges, M. S., D. I. P. A., M. J. Daboussi, H. A. Wahab, C. Vasnier, M. I. Roncero, M. Dufresne & C. Hera, (2009) Identification of virulence genes in *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* by large-scale transposon tagging. *Mol Plant Pathol* **10**: 95-107.
- Lorenz, M. C., X. Pan, T. Harashima, M. E. Cardenas, Y. Xue, J. P. Hirsch & J. Heitman, (2000) The G protein-coupled receptor *gpr1* is a nutrient sensor that regulates pseudohyphal differentiation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **154**: 609-622.
- Lyman, C. A. & T. J. Walsh, (1994) Phagocytosis of medically important yeasts by polymorphonuclear leukocytes. *Infect Immun* **62**: 1489-1493.
- Machowinski, A., H. J. Kramer, W. Hort & P. Mayser, (2006) Pityriacitrin - a potent UV filter produced by *Malassezia furfur* and its effect on human skin microflora. *Mycoses* **49**: 388-392.
- Maidan, M. M., L. De Rop, J. Serneels, S. Exler, S. Rupp, H. Tournu, J. M. Thevelein & P. Van Dijck, (2005) The G protein-coupled receptor *Gpr1* and the Galpha protein *Gpa2* act through the cAMP-protein kinase A pathway to induce morphogenesis in *Candida albicans*. *Mol Biol Cell* **16**: 1971-1986.
- Marichal, P., H. Vanden Bossche, F. C. Odds, G. Nobels, D. W. Warnock, V. Timmerman, C. Van Broeckhoven, S. Fay & P. Mose-Larsen, (1997) Molecular biological characterization of an azole-resistant *Candida glabrata* isolate. *Antimicrob Agents Chemother* **41**: 2229-2237.
- Martchenko, M., A. M. Alarco, D. Harcus & M. Whiteway, (2004) Superoxide dismutases in *Candida albicans*: transcriptional regulation and functional characterization of the hyphal-induced *SOD5* gene. *Mol Biol Cell* **15**: 456-467.
- Mavor, A. L., S. Thewes & B. Hube, (2005) Systemic fungal infections caused by *Candida* species: epidemiology, infection process and virulence attributes. *Curr Drug Targets* **6**: 863-874.
- Mayser, P., U. Schafer, H. J. Kramer, B. Irlinger & W. Steglich, (2002) Pityriacitrin - an ultraviolet-absorbing indole alkaloid from the yeast *Malassezia furfur*. *Arch Dermatol Res* **294**: 131-134.
- Mayser, P., H. Stapelkamp, H. J. Kramer, M. Podobinska, W. Wallbott, B. Irlinger & W. Steglich, (2003) Pityrialactone - a new fluorochrome from the tryptophan metabolism of *Malassezia furfur*. *Antonie Van Leeuwenhoek* **84**: 185-191.
- Mayser, P., A. Tows, H. J. Kramer & R. Weiss, (2004) Further characterization of pigment-producing *Malassezia* strains. *Mycoses* **47**: 34-39.

- Mayser, P., M. Wenzel, H. J. Kramer, B. L. Kindler, P. Spiteller & G. Haase, (2007) Production of indole pigments by *Candida glabrata*. *Med Mycol* **45**: 519-524.
- Mayser, P., G. Wille, A. Imkamp, W. Thoma, N. Arnold & T. Monsees, (1998) Synthesis of fluorochromes and pigments in *Malassezia furfur* by use of tryptophan as the single nitrogen source. *Mycoses* **41**: 265-271.
- McAlester, G., F. O'Gara & J. P. Morrissey, (2008) Signal-mediated interactions between *Pseudomonas aeruginosa* and *Candida albicans*. *J Med Microbiol* **57**: 563-569.
- McClellan, A. E. & D. A. Kluepfel, (2009) Genetic loci involved in rubrifacine production in the walnut pathogen *Brenneria rubrifaciens*. *Phytopathology* **99**: 145-151.
- Meilgaard, M. C., (1975) Flavor Chemistry of Beer: Part II: Flavour and Threshold of 239 Aroma Volatiles. *Tech. Q. Master Brew. Assoc. Am.* **12**: 151-168.
- Meshulam, T., S. M. Levitz, L. Christin & R. D. Diamond, (1995) A simplified new assay for assessment of fungal cell damage with the tetrazolium dye, (2,3)-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulphenyl)-(2H)-tetrazolium-5-carboxanilide (XTT). *J Infect Dis.* **172** 1153-1156.
- Metcalf, W. W., W. Jiang, L. L. Daniels, S. K. Kim, A. Haldimann & B. L. Wanner, (1996) Conditionally replicative and conjugative plasmids carrying lacZ alpha for cloning, mutagenesis, and allele replacement in bacteria. *Plasmid* **35**: 1-13.
- Miranda, L. N., I. M. van der Heijden, S. F. Costa, A. P. Sousa, R. A. Sienna, S. Gobara, C. R. Santos, R. D. Lobo, V. P. Pessoa, Jr. & A. S. Levin, (2009) *Candida* colonisation as a source for candidaemia. *J Hosp Infect* **72**: 9-16.
- Miwa, T., Y. Takagi, M. Shinozaki, C. W. Yun, W. A. Schell, J. R. Perfect, H. Kumagai & H. Tamaki, (2004) Gpr1, a putative G-protein-coupled receptor, regulates morphogenesis and hypha formation in the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* **3**: 919-931.
- Mosch, H. U., R. L. Roberts & G. R. Fink, (1996) Ras2 signals via the Cdc42/Ste20/mitogen-activated protein kinase module to induce filamentous growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 5352-5356.
- Murad, A. M., C. d'Enfert, C. Gaillardin, H. Tourneau, F. Tekaia, D. Talibi, D. Marechal, V. Marchais, J. Cottin & A. J. Brown, (2001a) Transcript profiling in *Candida albicans* reveals new cellular functions for the transcriptional repressors CaTup1, CaMig1 and CaNrg1. *Mol Microbiol* **42**: 981-993.
- Murad, A. M., P. Leng, M. Straffon, J. Wishart, S. Macaskill, D. MacCallum, N. Schnell, D. Talibi, D. Marechal, F. Tekaia, C. d'Enfert, C. Gaillardin, F. C. Odds & A. J. Brown, (2001b) *NRG1* represses yeast-hypha morphogenesis and hypha-specific gene expression in *Candida albicans*. *Embo J* **20**: 4742-4752.
- Naglik, J. R., S. J. Challacombe & B. Hube, (2003) *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. *Microbiol Mol Biol Rev* **67**: 400-428.
- Nakagawa, Y., T. Kanbe & I. Mizuguchi, (2003) Disruption of the human pathogenic yeast *Candida albicans* catalase gene decreases survival in mouse-model infection and elevates susceptibility to higher temperature and to detergents. *Microbiol Immunol* **47**: 395-403.
- Nantel, A., D. Dignard, C. Bachewich, D. H Marcus, A. Marcil, A. P. Bouin, C. W. Sensen, H. Hogues, M. van het Hoog, P. Gordon, T. Rigby, F. Benoit, D. C. Tessier, D. Y. Thomas & M. Whiteway, (2002) Transcription profiling of *Candida albicans* cells undergoing the yeast-to-hyphal transition. *Mol Biol Cell* **13**: 3452-3465.
- Neubauer, O. & K. Fromherz, (1911) Über den Abbau der Aminosäuren bei der Hefegärung. *Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem* **70**: 326-350.

- Newman, J. C. & A. M. Weiner, (2005) L2L: a simple tool for discovering the hidden significance in microarray expression data. *Genome Biol* **6**: R81.
- Niewerth, M. & H. C. Korting, (2001) Phospholipases of *Candida albicans*. *Mycoses* **44**: 361-367.
- Nikawa, H., H. Egusa, S. Makihira, M. Nishimura, K. Ishida, M. Furukawa & T. Hamada, (2003) A novel technique to evaluate the adhesion of *Candida* species to gingival epithelial cells. *Mycoses* **46**: 384-389.
- Nobile, C. J., D. R. Andes, J. E. Nett, F. J. Smith, F. Yue, Q. T. Phan, J. E. Edwards, S. G. Filler & A. P. Mitchell, (2006) Critical role of Bcr1-dependent adhesins in *C. albicans* biofilm formation in vitro and in vivo. *PLoS Pathog* **2**: e63.
- Nobile, C. J., H. A. Schneider, J. E. Nett, D. C. Sheppard, S. G. Filler, D. R. Andes & A. P. Mitchell, (2008) Complementary adhesin function in *C. albicans* biofilm formation. *Curr Biol* **18**: 1017-1024.
- Nosanchuk, J. D. & A. Casadevall, (2003) The contribution of melanin to microbial pathogenesis. *Cell Microbiol* **5**: 203-223.
- Nosanchuk, J. D., B. L. Gomez, S. Youngchim, S. Diez, P. Aisen, R. M. Zancope-Oliveira, A. Restrepo, A. Casadevall & A. J. Hamilton, (2002) *Histoplasma capsulatum* synthesizes melanin-like pigments *in vitro* and during mammalian infection. *Infect Immun* **70**: 5124-5131.
- Odds, F. C., (1988) *Candida and Candidosis*. Baillière Tindall, London.
- Odds, F. C. & R. Bernaerts, (1994) CHROMagar Candida, a new differential isolation medium for presumptive identification of clinically important *Candida* species. *J Clin Microbiol* **32**: 1923-1929.
- Panozzo, C., M. Nawara, C. Suski, R. Kucharczyka, M. Skoneczny, A. M. Becam, J. Rytka & C. J. Herbert, (2002) Aerobic and anaerobic NAD<sup>+</sup> metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* **517**: 97-102.
- Pape, B., (2001) Abnehmende UV-Licht-Sensibilität des *Malassezia furfur* bei Synthese von Pigmenten aus Tryptophan. In: Gießen: Justus-Liebig-Universität pp.
- Pappas, P. G., C. A. Kauffman, D. Andes, D. K. Benjamin, Jr., T. F. Calandra, J. E. Edwards, Jr., S. G. Filler, J. F. Fisher, B. J. Kullberg, L. Ostrosky-Zeichner, A. C. Reboli, J. H. Rex, T. J. Walsh & J. D. Sobel, (2009) Clinical practice guidelines for the management of candidiasis: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* **48**: 503-535.
- Paris, C. G. & B. Magasanik, (1981) Purification and properties of aromatic amino acid aminotransferase from *Klebsiella aerogenes*. *J Bacteriol* **145**: 266-271.
- Peltroche-Llacsahuanga, H., N. Schnitzler, S. Jentsch, A. Platz, S. De Hoog, K. G. Schweizer & G. Haase, (2003) Analyses of phagocytosis, evoked oxidative burst, and killing of black yeasts by human neutrophils: a tool for estimating their pathogenicity? *Med Mycol* **41**: 7-14.
- Perlroth, J., B. Choi & B. Spellberg, (2007) Nosocomial fungal infections: epidemiology, diagnosis, and treatment. *Med Mycol* **45**: 321-346.
- Piper, P., Y. Mahe, S. Thompson, R. Pandjaitan, C. Holyoak, R. Egner, M. Muhlbauer, P. Coote & K. Kuchler, (1998) The pdr12 ABC transporter is required for the development of weak organic acid resistance in yeast. *Embo J* **17**: 4257-4265.
- Pirkov, I., J. Norbeck, L. Gustafsson & E. Albers, (2008) A complete inventory of all enzymes in the eukaryotic methionine salvage pathway. *Febs J* **275**: 4111-4120.
- Polkinghorne, M. A. & M. J. Hynes, (1982) L-histidine utilization in *Aspergillus nidulans*. *J Bacteriol* **149**: 931-940.



- Prasad, R., P. De Wergifosse, A. Goffeau & E. Balzi, (1995) Molecular cloning and characterization of a novel gene of *Candida albicans*, *CDR1*, conferring multiple resistance to drugs and antifungals. *Curr Genet* **27**: 320-329.
- Redding, S. W., (2001) The role of yeasts other than *Candida albicans* in oropharyngeal candidiasis. *Curr Opin Infect Dis* **14**: 673-677.
- Redding, S. W., K. A. Marr, W. R. Kirkpatrick, B. J. Coco & T. F. Patterson, (2004) *Candida glabrata* sepsis secondary to oral colonization in bone marrow transplantation. *Med Mycol* **42**: 479-481.
- Rees, J. R., R. W. Pinner, R. A. Hajjeh, M. E. Brandt & A. L. Reingold, (1998) The epidemiological features of invasive mycotic infections in the San Francisco Bay area, 1992-1993: results of population-based laboratory active surveillance. *Clin Infect Dis* **27**: 1138-1147.
- Regelmann, J., T. Schule, F. S. Josupeit, J. Horak, M. Rose, K. D. Entian, M. Thumm & D. H. Wolf, (2003) Catabolite degradation of fructose-1,6-bisphosphatase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: a genome-wide screen identifies eight novel GID genes and indicates the existence of two degradation pathways. *Mol Biol Cell* **14**: 1652-1663.
- Romero-Martinez, R., M. Wheeler, A. Guerrero-Plata, G. Rico & H. Torres-Guerrero, (2000) Biosynthesis and functions of melanin in *Sporothrix schenckii*. *Infect Immun* **68**: 3696-3703.
- Rosas, A. L. & A. Casadevall, (1997) Melanization affects susceptibility of *Cryptococcus neoformans* to heat and cold. *FEMS Microbiol Lett* **153**: 265-272.
- Rosas, A. L., J. D. Nosanchuk, M. Feldmesser, G. M. Cox, H. C. McDade & A. Casadevall, (2000) Synthesis of polymerized melanin by *Cryptococcus neoformans* in infected rodents. *Infect Immun* **68**: 2845-2853.
- Roth, R. R. & W. D. James, (1988) Microbial ecology of the skin. *Annu Rev Microbiol* **42**: 441-464.
- Ruhnke, M. & G. Maschmeyer, (2002) Management of mycoses in patients with hematologic disease and cancer -- review of the literature. *Eur J Med Res* **7**: 227-235.
- Rupniak, H. T., C. Rowlett, E. B. Lane, J. G. Steele, L. K. Trejdosiewicz, B. Laskiewicz, S. Povey & B. T. Hill, (1985) Characteristics of four new human cell lines derived from squamous cell carcinomas of the head and neck. *J Natl Cancer Inst* **75**: 621-635.
- Ryan, C. S. & I. Kleinberg, (1995) Bacteria in human mouths involved in the production and utilization of hydrogen peroxide. *Arch Oral Biol* **40**: 753-763.
- Samaranayake, L. P., J. M. Raeside & T. W. MacFarlane, (1984) Factors affecting the phospholipase activity of *Candida* species in vitro. *Sabouraudia* **22**: 201-207.
- Sambrook, J. & D. Russell, (2001) *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Sandven, P., (2000) Epidemiology of candidemia. *Rev Iberoam Micol* **17**: 73-81.
- Sanglard, D., F. Ischer, D. Calabrese, P. A. Majcherczyk & J. Bille, (1999) The ATP binding cassette transporter gene *CgCDR1* from *Candida glabrata* is involved in the resistance of clinical isolates to azole antifungal agents. *Antimicrob Agents Chemother* **43**: 2753-2765.
- Santt, O., T. Pfirrmann, B. Braun, J. Juretschke, P. Kimmig, H. Scheel, K. Hofmann, M. Thumm & D. H. Wolf, (2008) The yeast *GID* complex, a novel ubiquitin ligase (E3) involved in the regulation of carbohydrate metabolism. *Mol Biol Cell* **19**: 3323-3333.
- Schaller, M., H. C. Korting, W. Schafer, J. Bastert, W. Chen & B. Hube, (1999) Secreted aspartic proteinase (Sap) activity contributes to tissue damage in a model of human oral candidosis. *Mol Microbiol* **34**: 169-180.

- Schaller, M., R. Mailhammer, G. Grassl, C. A. Sander, B. Hube & H. C. Korting, (2002) Infection of human oral epithelia with *Candida* species induces cytokine expression correlated to the degree of virulence. *J Invest Dermatol* **118**: 652-657.
- Schaller, M., K. Zakikhany, J. R. Naglik, G. Weindl & B. Hube, (2006) Models of oral and vaginal candidiasis based on *in vitro* reconstituted human epithelia. *Nat Protoc* **1**: 2767-2773.
- Schnitzler, N., H. Peltroche-Llacsahuanga, N. Bestier, J. Zundorf, R. Lutticken & G. Haase, (1999) Effect of melanin and carotenoids of *Exophiala (Wangiella) dermatitidis* on phagocytosis, oxidative burst, and killing by human neutrophils. *Infect Immun* **67**: 94-101.
- Schork, S. M., M. Thumm & D. H. Wolf, (1995) Catabolite inactivation of fructose-1,6-bisphosphatase of *Saccharomyces cerevisiae*. Degradation occurs via the ubiquitin pathway. *J Biol Chem* **270**: 26446-26450.
- Schröter, C., U. C. Hippler, A. Wilmer, W. Kunkel & U. Wollina, (2000) Generation of reactive oxygen species by *Candida albicans* in relation to morphogenesis. *Arch Dermatol Res* **292**: 260-264.
- Sentheshanmuganathan, S., (1960) The purification and properties of the tyrosine-2-oxoglutarate transaminase of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem J* **77**: 619-625.
- SGD project, Saccharomyces Genome Database. <http://www.yeastgenome.org>
- Sharkey, L. L., M. D. McNemar, S. M. Saporito-Irwin, P. S. Sypherd & W. A. Fonzi, (1999) *HWP1* functions in the morphological development of *Candida albicans* downstream of *EFG1*, *TUP1*, and *RBF1*. *J Bacteriol* **181**: 5273-5279.
- Sherman, D. J., T. Martin, M. Nikolski, C. Cayla, J. L. Souciet & P. Durrens, (2009) Génolevures: protein families and synteny among complete hemiascomycetous yeast proteomes and genomes. *Nucleic Acids Res* **37**: D550-554.
- Singaravelan, N., I. Grishkan, A. Beharav, K. Wakamatsu, S. Ito & E. Nevo, (2008) Adaptive melanin response of the soil fungus *Aspergillus niger* to UV radiation stress at "Evolution Canyon", Mount Carmel, Israel. *PLoS ONE* **3**: e2993.
- Sitte, P., H. Ziegler & F. Ehrendorfer, (2002) *Strasburger - Lehrbuch der Botanik*, p. 1007. Spektrum Akad. Vlg., Heidelberg.
- Slutsky, B., M. Staebell, J. Anderson, L. Risen, M. Pfaller & D. R. Soll, (1987) "White-opaque transition": a second high-frequency switching system in *Candida albicans*. *J Bacteriol* **169**: 189-197.
- Snowdon, C., C. Hlynialuk & G. van der Merwe, (2008) Components of the Vid30c are needed for the rapamycin-induced degradation of the high-affinity hexose transporter Hxt7p in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res* **8**: 204-216.
- Sonneborn, A., D. P. Bockmuhl, M. Gerads, K. Kurpanek, D. Sanglard & J. F. Ernst, (2000) Protein kinase A encoded by *TPK2* regulates dimorphism of *Candida albicans*. *Mol Microbiol* **35**: 386-396.
- Southern, E. M., (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* **98**: 503-517.
- Spolter, H. & R. C. Baldrige, (1964) Multiple Forms of Histidine-Pyruvate Transaminase in Rat Liver. *Biochim Biophys Acta* **90**: 287-290.
- Srikantha, T., K. J. Daniels, W. Wu, S. R. Lockhart, S. Yi, N. Sahni, N. Ma & D. R. Soll, (2008) Dark brown is the more virulent of the switch phenotypes of *Candida glabrata*. *Microbiology* **154**: 3309-3318.

- Srikantha, T., R. Zhao, K. Daniels, J. Radke & D. R. Soll, (2005) Phenotypic switching in *Candida glabrata* accompanied by changes in expression of genes with deduced functions in copper detoxification and stress. *Eukaryot Cell* **4**: 1434-1445.
- Staab, J. F., S. D. Bradway, P. L. Fidel & P. Sundstrom, (1999) Adhesive and mammalian transglutaminase substrate properties of *Candida albicans* Hwp1. *Science* **283**: 1535-1538.
- Staib, F., (1962) *Cryptococcus neoformans* und *Guizotia abyssinica* (syn. *G. oleifera* D. C.) (Farbreaktion für *Cr. neoformans*). *Zschr Hygiene* **148**: 466-475.
- Steenbergen, J. N., H. A. Shuman & A. Casadevall, (2001) *Cryptococcus neoformans* interactions with amoebae suggest an explanation for its virulence and intracellular pathogenic strategy in macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 15245-15250.
- Stoldt, V. R., A. Sonneborn, C. E. Leuker & J. F. Ernst, (1997) Efg1p, an essential regulator of morphogenesis of the human pathogen *Candida albicans*, is a member of a conserved class of bHLH proteins regulating morphogenetic processes in fungi. *Embo J* **16**: 1982-1991.
- Suchi, M., H. Sano, H. Mizuno & Y. Wada, (1995) Molecular cloning and structural characterization of the human histidase gene (HAL). *Genomics* **29**: 98-104.
- Sundstrom, P., (1999) Adhesins in *Candida albicans*. *Curr Opin Microbiol* **2**: 353-357.
- Surdhar, P. S. & D. A. Armstrong, (1987) Reduction potentials and exchange reactions of thiyl radicals and disulfide anion radicals. In.: American Chemical Society, pp. 6532-6537.
- Suzuki, C., Y. Hori & Y. Kashiwagi, (2003) Screening and characterization of transposon-insertion mutants in a pseudohyphal strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **20**: 407-415.
- Taylor, R. G., M. A. Lambert, E. Sexsmith, S. J. Sadler, P. N. Ray, D. J. Mahuran & R. R. McInnes, (1990) Cloning and expression of rat histidase. Homology to two bacterial histidases and four phenylalanine ammonia-lyases. *J Biol Chem* **265**: 18192-18199.
- Thomson, N. R., M. A. Crow, S. J. McGowan, A. Cox & G. P. Salmond, (2000) Biosynthesis of carbapenem antibiotic and prodigiosin pigment in *Serratia* is under quorum sensing control. *Mol Microbiol* **36**: 539-556.
- Tortorano, A. M., C. Kibbler, J. Peman, H. Bernhardt, L. Klingspor & R. Grillot, (2006) *Candidaemia* in Europe: epidemiology and resistance. *Int J Antimicrob Agents* **27**: 359-366.
- Tsai, H. F., M. Bard, K. Izumikawa, A. A. Krol, A. M. Sturm, N. T. Culbertson, C. A. Pierson & J. E. Bennett, (2004) *Candida glabrata* erg1 mutant with increased sensitivity to azoles and to low oxygen tension. *Antimicrob Agents Chemother* **48**: 2483-2489.
- Tsai, H. F., M. H. Wheeler, Y. C. Chang & K. J. Kwon-Chung, (1999) A developmentally regulated gene cluster involved in conidial pigment biosynthesis in *Aspergillus fumigatus*. *J Bacteriol* **181**: 6469-6477.
- Urrestarazu, A., S. Vissers, I. Iraqui & M. Grenson, (1998) Phenylalanine- and tyrosine-auxotrophic mutants of *Saccharomyces cerevisiae* impaired in transamination. *Mol Gen Genet* **257**: 230-237.
- van der Merwe, G. K., T. G. Cooper & H. J. van Vuuren, (2001) Ammonia regulates VID30 expression and Vid30p function shifts nitrogen metabolism toward glutamate formation especially when *Saccharomyces cerevisiae* is grown in low concentrations of ammonia. *J Biol Chem* **276**: 28659-28666.
- vanden Bossche, H., P. Marichal, F. C. Odds, L. Le Jeune & M. C. Coene, (1992) Characterization of an azole-resistant *Candida glabrata* isolate. *Antimicrob Agents Chemother* **36**: 2602-2610.
- Vazquez-Torres, A. & E. Balish, (1997) Macrophages in resistance to candidiasis. *Microbiol Mol Biol Rev* **61**: 170-192.

- Vermitsky, J. P., K. D. Earhart, W. L. Smith, R. Homayouni, T. D. Edlind & P. D. Rogers, (2006) Pdr1 regulates multidrug resistance in *Candida glabrata*: gene disruption and genome-wide expression studies. *Mol Microbiol* **61**: 704-722.
- Vuralhan, Z., M. A. Luttik, S. L. Tai, V. M. Boer, M. A. Morais, D. Schipper, M. J. Almering, P. Kotter, J. R. Dickinson, J. M. Daran & J. T. Pronk, (2005) Physiological characterization of the *ARO10*-dependent, broad-substrate-specificity 2-oxo acid decarboxylase activity of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol* **71**: 3276-3284.
- Vuralhan, Z., M. A. Morais, S. L. Tai, M. D. Piper & J. T. Pronk, (2003) Identification and characterization of phenylpyruvate decarboxylase genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol* **69**: 4534-4541.
- Wang, Y., P. Aisen & A. Casadevall, (1995) *Cryptococcus neoformans* melanin and virulence: mechanism of action. *Infect Immun* **63**: 3131-3136.
- Wang, Y., P. Aisen & A. Casadevall, (1996) Melanin, melanin "ghosts," and melanin composition in *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun* **64**: 2420-2424.
- Wang, Y. & A. Casadevall, (1994a) Decreased susceptibility of melanized *Cryptococcus neoformans* to UV light. *Appl Environ Microbiol* **60**: 3864-3866.
- Wang, Y. & A. Casadevall, (1994b) Growth of *Cryptococcus neoformans* in presence of L-dopa decreases its susceptibility to amphotericin B. *Antimicrob Agents Chemother* **38**: 2648-2650.
- Watanabe, A., I. Fujii, H. Tsai, Y. C. Chang, K. J. Kwon-Chung & Y. Ebizuka, (2000) *Aspergillus fumigatus* alb1 encodes naphthopyrone synthase when expressed in *Aspergillus oryzae*. *FEMS Microbiol Lett* **192**: 39-44.
- Weber, H., (1993) *Allgemeine Mykologie*, p. 541. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Wells, C. L., M. A. Johnson, M. J. Henry-Stanley & C. M. Bendel, (2007) *Candida glabrata* colonizes but does not often disseminate from the mouse caecum. *J Med Microbiol* **56**: 688-693.
- Wheeler, M., (1982) Melanin biosynthesis in *Verticillium dahliae*: dehydration and reduction reactions in cell-free homogenates. *Exp Mycol* **6**: 171-179.
- Wiame, J. M., M. Grenson & H. N. Arst, Jr., (1985) Nitrogen catabolite repression in yeasts and filamentous fungi. *Adv Microb Physiol* **26**: 1-88.
- Wickramasinghe, R., J. Hedegaard & J. Roche, (1967) [Degradation of L-histidine in *Escherichia coli* B: formation of imidazolepyruvic acid by an histidine-transaminase]. *C R Seances Soc Biol Fil* **161**: 1891-1896.
- Wille, G., P. Mayser, W. Thoma, T. Monsees, A. Baumgart, H. J. Schmitz, D. Schrenk, K. Polborn & W. Steglich, (2001a) Malassezin--A novel agonist of the arylhydrocarbon receptor from the yeast *Malassezia furfur*. *Bioorg Med Chem* **9**: 955-960.
- Wille, G., P. Mayser, W. Thoma, T. Monsees, A. Baumgart, H. J. Schmitz, D. Schrenk, K. Polborn & W. Steglich, (2001b) Malassezin - a novel agonist of the arylhydrocarbon receptor from the yeast *Malassezia furfur*. *Bioorg Med Chem* **9**: 955-960.
- Williamson, P. R., (1994) Biochemical and molecular characterization of the diphenol oxidase of *Cryptococcus neoformans*: identification as a laccase. *J Bacteriol* **176**: 656-664.
- Williamson, P. R., K. Wakamatsu & S. Ito, (1998) Melanin biosynthesis in *Cryptococcus neoformans*. *J Bacteriol* **180**: 1570-1572.
- Winder, A., T. Kobayashi, K. Tsukamoto, K. Urabe, P. Aroca, K. Kameyama & V. J. Hearing, (1994) The tyrosinase gene family--interactions of melanogenic proteins to regulate melanogenesis. *Cell Mol Biol Res* **40**: 613-626.

- Wogulis, M., E. R. Chew, P. D. Donohue & D. K. Wilson, (2008) Identification of formyl kynurenine formamidase and kynurenine aminotransferase from *Saccharomyces cerevisiae* using crystallographic, bioinformatic and biochemical evidence. *Biochemistry* **47**: 1608-1621.
- Wu, P. C., T. A. Kroening, P. J. White & K. E. Kendrick, (1992) Purification of histidase from *Streptomyces griseus* and nucleotide sequence of the *hutH* structural gene. *J Bacteriol* **174**: 1647-1655.
- Wysong, D. R., L. Christin, A. M. Sugar, P. W. Robbins & R. D. Diamond, (1998) Cloning and sequencing of a *Candida albicans* catalase gene and effects of disruption of this gene. *Infect Immun* **66**: 1953-1961.
- Xue, C., Y. S. Bahn, G. M. Cox & J. Heitman, (2006) G protein-coupled receptor Gpr4 senses amino acids and activates the cAMP-PKA pathway in *Cryptococcus neoformans*. *Mol Biol Cell* **17**: 667-679.
- Youngchim, S., R. J. Hay & A. J. Hamilton, (2005) Melanization of *Penicillium marneffe* in vitro and in vivo. *Microbiology* **151**: 291-299.
- Zakikhany, K., J. R. Naglik, A. Schmidt-Westhausen, G. Holland, M. Schaller & B. Hube, (2007) *In vivo* transcript profiling of *Candida albicans* identifies a gene essential for interepithelial dissemination. *Cell Microbiol* **9**: 2938-2954.
- Zaman, S., S. I. Lippman, X. Zhao & J. R. Broach, (2008) How *Saccharomyces* responds to nutrients. *Annu Rev Genet* **42**: 27-81.
- Zaragoza, O., C. Rodriguez & C. Gancedo, (2000) Isolation of the *MIG1* gene from *Candida albicans* and effects of its disruption on catabolite repression. *J Bacteriol* **182**: 320-326.
- Zeidler, U., T. Lettner, C. Lassnig, M. Muller, R. Lajko, H. Hintner, M. Breitenbach & A. Bito, (2009) *UME6* is a crucial downstream target of other transcriptional regulators of true hyphal development in *Candida albicans*. *FEMS Yeast Res* **9**: 126-142.
- Zhao, X., S. H. Oh, G. Cheng, C. B. Green, J. A. Nuessen, K. Yeater, R. P. Leng, A. J. Brown & L. L. Hoyer, (2004) ALS3 and ALS8 represent a single locus that encodes a *Candida albicans* adhesin; functional comparisons between Als3p and Als1p. *Microbiology* **150**: 2415-2428.
- Zuther, K., P. Mayser, U. Hettwer, W. Wu, P. Spiteller, B. L. Kindler, P. Karlovsky, C. W. Basse & J. Schirawski, (2008) The tryptophan aminotransferase Tam1 catalyses the single biosynthetic step for tryptophan-dependent pigment synthesis in *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol* **68**: 152-172.